

ELECTROSPUN CHITOSAN FIBERS FOR NERVE REGENERATION



Pakakrong Sangsanoh

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

2006

ISBN 974-9937-97-X

Thesis Title: Electrospun Chitosan Fibers for Nerve Regeneration
By: Pakakrong Sangsanoh
Program: Polymer Science
Thesis Advisors: Assoc. 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.

Nantaya Yanumet
.....College Director
(Assoc. Prof. Nantaya Yanumet)

Thesis Committee:

Pitt Supaphol
.....
(Assoc. Prof. Pitt Supaphol)

Poonlarp Cheepsunthorn
.....
(Asst. Prof. Poonlarp Cheepsunthorn)

Prasit Pavasant
.....
(Assoc. Prof. Prasit Pavasant)

บทคัดย่อ

ผลการอง สังข์เสนาะ: การประยุกต์ใช้เส้นใยไคโตซานที่ได้จากการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิตในกระบวนการสร้างใหม่ของเซลล์ประสาท (Electrospun Chitosan Fibers for Nerve Regeneration) อ.ที่ปรึกษา: รศ. ดร.พิชญ์ ศุภผล 66 หน้า ISBN 974-9937-97-X

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาความเป็นไปได้ในการนำเส้นใยไคโตซานที่เตรียมจากกระบวนการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิตมาประยุกต์ใช้เป็นวัสดุโครงร่าง (Scaffolding material) ในกระบวนการสร้างใหม่ของเซลล์ประสาท โดยงานวิจัยจะทำการศึกษาผลของตัวแปรต่างๆ ที่มีอิทธิพลต่อสัญญาณวิทยาและขนาดของเส้นใยเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมเส้นใยไคโตซาน จากงานศึกษาพบว่าเส้นใยไคโตซานสามารถเตรียมได้จากการใช้ไคโตซานความเข้มข้น 7% ละลายในสารละลายผสมระหว่างไตรฟลูออโรอะซิติก (Trifluoroacetic acid) และไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane) ในอัตราส่วน 70:30 ซึ่งเส้นใยไคโตซานที่เตรียมได้นั้นมีขนาดอยู่ในช่วง 120-140 นาโนเมตร จากนั้นเส้นใยไคโตซานจะถูกประเมินความเป็นไปได้ในการใช้เป็นวัสดุโครงร่างด้วยการทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (Biocompatibility) ความสามารถในการยึดเกาะ (Cell Attachment) และความสามารถในการเพิ่มประชากรของเซลล์ (Cell Proliferation) เมื่อทำการเลี้ยงเซลล์ลงบนเส้นใยไคโตซาน โดยใช้เซลล์ชวานและเซลล์ไฟโบรบลาสต์เป็นเซลล์ทดสอบ ผลจากการศึกษาพบว่าเส้นใยไคโตซานไม่มีการปลดปล่อยสารพิษที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ทดสอบ อีกทั้งลักษณะที่เป็นเส้นใยยังช่วยเพิ่มความสามารถในการยึดเกาะของเซลล์ (Cell Attachment) ในขณะที่ไม่มีต่อความสามารถในการเพิ่มประชากรของเซลล์ (Cell proliferation) เมื่อทำการทดสอบเปรียบเทียบกับวัสดุโครงร่างที่เป็นฟิล์ม อีกทั้งภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM) ยังแสดงให้เห็นถึงอิทธิพลของลักษณะพื้นผิวที่มีผลต่อรูปร่างและลักษณะของเซลล์ตลอดการเพาะเลี้ยง

ABSTRACT

4772017063: Polymer Science Program

Pakakrong Sangsanoh: Electrospun Chitosan Fibers for
Nerve Regeneration

Thesis Advisors: Assoc. Prof. Pitt Supaphol, 66 pp. ISBN 974-9937-
97-X

Keywords: Electrospinning/Chitosan/Scaffold/Schwann cells

Electrospinning of chitosan, a naturally-available polysaccharide obtained from N-deacetylation of chitin, to arrive at a nanofibrous scaffold for nerve tissue engineering, was investigated. The average diameter of chitosan nanofibers electrospun from 7% chitosan dissolved in 70:30 trifluoroacetic acid (TFA)/dichloromethane (DC) was 130 ± 10 nm. The as-spun chitosan nanofibrous matrix was neutralized to improve the physical integrity of the fibrous structure in a cell culture condition. Cytocompatibility, cell adhesion and cell proliferation on these as-spun mats were examined using the Schwann cell line RT4-D6P2T (SCs) and the mouse fibroblast cell line L929 as reference cells. Experimental results from MTT assay showed that the as-spun chitosan mats did not release substances detrimental to Schwann cells and mouse fibroblasts, and indicated much better for cell attachment due to its high surface area. However, the ability to promote the cell proliferation of fibrous scaffold was not observed when comparing with the film scaffold. Interestingly, from SEM images, Schwann cells exhibited a spindle-like shape when they were cultured on the flat substrate, while exhibited the expanded shape with discrete branches on their surface when they were seeded on the fibrous scaffold. This evidence indicated the influence of surface morphology of scaffolding materials on the cell behaviors.

ACKNOWLEDGEMENTS

The author would like to express her sincere gratitude to her advisors and committees, Assoc. Prof. Pitt Supaphol and Asst. Prof. Poonlarp Sonthorncheep, for their sincere assistances. They have provided the very useful guidance and the great encouragement throughout this research.

The author is grateful for the partial scholarship and partial funding of the thesis work provided by Postgraduate Education and Research Programs in Petroleum and Petrochemical Technology (PPT Consortium)

The author would like to thank the Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University where the author have gained the invaluable knowledge in the Polymer Science program and the author greatly appreciates all professors, lecturers and staffs who have tendered knowledge and technical support during her stay in this college.

Special thank goes to Ms. Pastra Somboonthanate, a researcher of the Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University, for valuable equipment, instrument training both in theory and practice, particularly for her kindness.

The author also would like to forward her recognition to her entire friends for their helps and suggestions.

Ultimately, extreme appreciation is to her family for their love, understanding, constant encouragement, and financial support during her studies and thesis 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	x
CHAPTER	
I INTRODUCTION	1
II LITERATURE REVIEWS	3
2.1 Electrospinning	3
2.1.1 Fundamentals of Electrospinning	3
2.1.2 Polymer Types	5
2.1.3 Fibers Characterization	6
2.2 Peripheral Nerve Regeneration	6
2.2.1 Nerve System	6
2.2.2 Wallerian Degeneration Process	8
2.2.3 The Role of Schwann Cells in Nerve Regeneration	9
2.2.4 Nerve Regeneration	12
2.3 Chitin and Chitosan	15
2.3.1 Processing of Chitin and Chitosan	16
2.3.2 Properties of Chitin and Chitosan	16
2.3.3 Physical and Chemical Characterization	18
III EXPERIMENTAL	20
3.1 Electrospinning of Chitosan Fiber	20
3.1.1 Materials	20

CHAPTER	PAGE
3.1.2 Electrospinning Setup	20
3.1.3 Preparation of Stock Solution for Electrospinning	21
3.1.4 Electrospinning Process	21
3.1.5 Preparation of Chitosan Membranes	22
3.1.6 Characterization of as-Spun Fiber	22
3.2 Schwann Cell Culture Studies	23
3.2.1 Cell and Cell Culture	23
3.2.2 Cytotoxicity Tests	24
3.2.3 Cell Adhesion Tests	25
3.2.4 Cell Proliferation Test	25
3.2.5 MTT Assays	25
IV RESULTS AND DISCUSSION	26
4.1 Preparation and Characterization of as-Spun Chitosan Nanofibers Scaffold	 26
4.1.1 Effect of polymer Concentration on as-Spun Fibers	27
4.1.2 Effect of Trifluoroacetic Acid (TFA)/ Dichloromethane (MC) Ratios on Morphology of as-Spun Fibers	 29
4.1.3 Effect of Collecting Distance and Applied Voltage on The Fibers Morphology of as-Spun Fibers	 30
4.2 Physical Characterization of as-Spun Scaffold	32
4.2.1 Weight Loss and Swelling Behaviors of Fibrous Scaffold	 32
4.3 In Vitro Nerve Regeneration	34
4.3.1 Biocompatible Test	35
4.3.2 Cell Attachment and Proliferation	36
V CONCLUSIONS	42

CHAPTER	PAGE
REFERENCES	43
APPENDICES	47
Appendix A Average Fiber Diameter of Chitosan Fibers	46
Appendix B Weight Loss, Degree of Swelling, and Porosity of Scaffold	60
Appendix C Indirect Cytotoxicity, Cell Attachment, and Cell Proliferation	64
CURRICULUM VITAE	66

LIST OF TABLES

TABLE		PAGE
4.1	SEM images of schwann cells culture on various scaffolding materials at different times in culture.	38
4.2	The number of living cells obtained by counting under the optical microscopy.	40

LIST OF FIGURES

FIGURE	PAGE
2.1 Schematic of the electrospinning setup	4
2.2 The structure of a PNS neuron	7
2.3 Summary of functional substances produced by activated Schwann cells	9
2.4 Structures of cellulose, chitin and chitosan	15
2.5 The structure of deacetylated chitosan	16
3.1 Experimental set up in electrospinning method.	21
4.1 Morphological changes in the electrospun chitosan nanofibers dissolved in trifluoroacetic acid (TFA) at various concentrations. Chitosan concentration were 5 wt.-%(panel a; magnification, x 2000), 6 wt.-%(panel b; magnification, x 2000), 7 wt.-%(panel c; magnification, x 2000), 8 wt.-%(panel d; magnification, x 2000)	28
4.2 SEM images of chitosan fibers at 7 wt.-% chitosan-TFA solution; a) magnification, x 2000, b) magnification, x 7500.	29
4.3 SEM images of chitosan fibers at 7 wt.-% chitosan in TFA:DC at various ratio; a) 90:10 (magnification, x 2000, b) 80:20 (magnification, x 2000), c) 70:30 (magnification, x 2000).	30
4.4 SEM images of chitosan fibers at 7 wt.-% chitosan in TFA:DC = 70:30 at various applied voltage (kV) and collecting distance (cm)	31
4.5 Percentage of weight loss of (-●-) chitosan fibers and (-O-) chitosan film after the neutralization with 5M of Na ₂ CO ₃	33
4.6 Degree of swelling of (-●-) chitosan fibers and (-O-) chitosan film after the neutralization with 5M of Na ₂ CO ₃ .	33
4.7 MTT-tetrazolium (MTT) assay. The mitochondrial metabolic activity of mouse fibroblast L929 and Schwann cells line RT4-D6P2T cultured for 24 h in the extracted media of chitosan fiber, chitosan film and PLLA film.	36

FIGURE**PAGE**

- 4.8 Attachment of schwann cell on bare culture plate, chitosan fiber, chitosan film, and PLLA film as a function of time in culture. The number of living cells was determined by MTT-tetrazolium (MTT) assay. 37
- 4.9 Proliferation of schwann cell on bare culture plate, chitosan fiber, chitosan film, and PLLA film as a function of time in culture. The number of living cells was determined by MTT-tetrazolium (MTT) assay. 40