



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การเตรียมเส้นใยนาโนหรือเส้นใยขนาดเล็กพิเศษของพอลิแคโพรแลคโตนด้วยกระบวนการปั่นเส้นใยแบบไฟฟ้าสถิตและความเป็นไปได้ในการใช้เส้นใยในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ
(Preparation of poly(ϵ -caprolactone) ultrafine/nanofiber by electrospinning process and its potential use in a scaffold in tissue engineering application)

โดย ดร. รัฐพล รังกุพันธุ์ และ คณะ

กรกฎาคม 2554

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การเตรียมเส้นใยนาโนหรือเส้นใยขนาดเล็กพิเศษของพอลิแคโพรแลคโตนด้วยกระบวนการปั่นเส้นใยแบบไฟฟ้าสถิตและความเป็นไปได้ในการใช้เส้นใยในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ

(Preparation of poly(ϵ -caprolactone) ultrafine/nanofiber by electrospinning process and its potential use in a scaffold in tissue engineering application)

คณะผู้วิจัย

สังกัด

ดร. รัชพล รั้งกฤษณ์

สถาบันวิจัยโลหะและวัสดุ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นพ. ถนอม บรรณประเสริฐ

ภาควิชาโสต ศอ นาสิกวิทยา คณะแพทยศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัยสกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

โครงการนี้สามารถแยกงานออกเป็น 3 ส่วนย่อยประกอบด้วย ส่วนที่หนึ่งเป็นการศึกษาอิทธิพลของปัจจัยการผลิตต่างๆ ต่อขนาดและสัณฐานวิทยาของเส้นใย PCL ที่เตรียมจากกระบวนการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต ส่วนที่สองเป็นการศึกษาเบื้องต้นถึงความเป็นพิษและการเกาะติดของเซลล์บนแผ่นเส้นใยที่พัฒนาขึ้นเพื่อประเมินศักยภาพในการใช้แผ่นเส้นใยดังกล่าวในทางการแพทย์ และส่วนที่สามเป็นการศึกษาผลของความเข้มข้นของสารละลาย และความต่างศักย์ไฟฟ้าระหว่างขั้วไฟฟ้า ต่อขนาดและสัณฐานวิทยาของเส้นใยเจลลาตินชนิด A และ B ที่เตรียมขึ้น โดยกระบวนการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต ผลการศึกษาพบว่าสามารถหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมเส้นใย PCL ให้มีขนาดในช่วงต่าง ๆ ตามที่ต้องการได้ตั้งแต่ช่วงประมาณ 0.16 -5.0 ไมโครเมตร โดยการเลือกระบบตัวทำละลาย ความเข้มข้น ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ ระยะเวลาการจัดเก็บเส้นใย รวมถึงน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ที่เหมาะสม ผลการศึกษาค่าความเป็นพิษเบื้องต้นและการเกาะติดของเซลล์ทดสอบพบว่าเส้นใยที่เตรียมได้ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ทดสอบ โดยขนาดเส้นใยมีผลต่อการเกาะติดและการกระจายตัวของเซลล์ในชิ้นงาน สำหรับการเตรียมเส้นใย สำหรับการเตรียมเส้นใยเจลลาตินทั้งชนิด A และ B พบว่าความเข้มข้นของสารละลายมีผลต่อขนาดและลักษณะของเส้นใยมาก ภายได้ปัจจัยการผลิตที่เหมาะสม เราสามารถเตรียมได้ตั้งแต่อนุภาคนาขนาดซับไมครอน และเส้นใยขนาดตั้งแต่ในช่วง 0.15 –มากกว่า 4.0 ไมโครเมตรได้ ซึ่งเส้นใยเจลลาตินนี้จะมีประโยชน์ต่อการพัฒนาโครงร่างเนื้อเยื่อเทียมและการประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์อื่นได้ต่อไป

กัญแจก้า พอลิกาโพรแลกโตน, เจลาติน, เส้นใยนาโน, กระบวนการปั่นเส้นใยแบบไฟฟ้าสถิต

ABSTRACT

This work can be separated into 3 parts: a) to evaluate influence of key processing parameters on formation, size and morphology of poly(ϵ -caprolactone) (PCL) fibers that were produced by electrospinning method, b) to preliminary evaluate potential toxicity and cell attachment of obtained PCL fiber mats, and c) to study effect of solution concentration and applied voltage on formation, size and morphology of gelatin type A and type B electrospun fibers. Experimental results showed that by choosing appropriate set of processing parameters, i.e. solution concentration, applied voltage, solvent system, collecting distance and polymer molecular weight, one can dictate the size of PCL electrospun of desired within the range of 0.16 - 5 micrometers. Preliminary study also showed that the obtained PCL fibers were nontoxic to L929 cell lines. In addition, fiber size also seemed to affect cell adhesion and distribution inside PCL matrix. For electrospun fibers of gelatin type A and B, we found that solution concentration played an important role governing formation, size and morphology of obtained objects. Under experimental condition, we can produced sub-microparticles and ultrafine fibers, which ranging in size from about 150 nm to larger than 4.0 micrometer.

Keywords: poly(ϵ -caprolactone), gelatin, nanofiber, electrospinning

บทสรุปผู้บริหาร (Executive Summary)

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาสภาวะเตรียมเส้นใยขนาดเล็กของพอลิคาโพรแลคโตน (PCL) และเจลาตินด้วยกระบวนการปั่นเส้นใยแบบไฟฟ้าสถิต โดยจะศึกษาผลของปัจจัยการผลิตต่างๆ ต่อ ขนาด ลักษณะและสัณฐานวิทยาของเส้นใยนาโนและแผ่นเส้นใยที่ได้ และเพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการนำเส้นใยนาโนของพอลิคาโพรแลคโตนไปใช้เป็นโครงสร้างเนื้อเยื่อเทียมสำหรับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อและงานการแพทย์อื่น

โครงการนี้ 3 ส่วนย่อย โดยส่วนที่หนึ่งเป็นการศึกษาอิทธิพลของปัจจัยการผลิตต่างๆ ต่อขนาดและสัณฐานวิทยาของเส้นใย PCL ที่เตรียมขึ้นโดยกระบวนการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต โดยตัวแปรที่ศึกษาประกอบด้วย ชนิดของตัวทำละลาย ความเข้มข้นของสารละลาย ความต่างศักย์ไฟฟ้าระหว่างขั้วไฟฟ้า น้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ที่ใช้ ระยะทางจากปลายเข็มถึงจากรับ ส่วนที่สองเป็นการศึกษาเบื้องต้นถึงความเป็นพิษและการเกาะติดของเซลล์บนแผ่นเส้นใยที่พัฒนาขึ้นเพื่อประเมินศักยภาพในการใช้แผ่นเส้นใยดังกล่าวในทางการแพทย์ และส่วนที่สาม เป็นการศึกษาผลของความเข้มข้นของสารละลาย และความต่างศักย์ไฟฟ้าระหว่างขั้วไฟฟ้า ต่อขนาดและสัณฐานวิทยาของเส้นใยเจลาตินชนิด A และ B ที่เตรียมขึ้นโดยกระบวนการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต จากการศึกษาพบว่า

1. สามารถหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมเส้นใย PCL ให้มีขนาดในช่วงต่าง ๆ กันตามที่ต้องการได้ โดยการเลือกระบบตัวทำละลาย ความเข้มข้น ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ ระยะการจัดเก็บเส้นใย รวมถึงน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ให้เหมาะสม อาทิ การเตรียมเส้นใย PCL ให้มีขนาดประมาณ 0.160-0.20 1.00-1.500 หรือ 4.50-5.00 ไมโครเมตร ซึ่งความสามารถดังกล่าวจะช่วยให้สามารถพัฒนาโครงสร้างเนื้อเยื่อเทียมจาก PCL ที่มีโครงสร้างสมบัติเชิงกล อัตราการย่อยสลาย ตามความต้องการเฉพาะได้
2. ผลการศึกษาการความเป็นพิษเบื้องต้นและการเกาะติดของเซลล์ทดสอบพบว่าเส้นใยที่เตรียมได้ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ทดสอบ โดยขนาดเส้นใยมีผลต่อการเกาะติดและการกระจายตัวของเซลล์ในชิ้นงาน
3. พบว่าความเข้มข้นของสารละลายมีผลต่อขนาดและลักษณะของเส้นใยเจลาตินชนิด A และ B ที่ได้มาก ภายใบบัญชีการผลิตที่เหมาะสม เราสามารถเตรียมได้ตั้งแต่อนุภาคขนาดซับไมครอน และเส้นใยขนาดตั้งแต่ในช่วง 0.15 –มากกว่า 4.0 ไมโครเมตรได้ ซึ่งเส้นใยเจลาตินนี้จะมีประโยชน์ต่อการพัฒนาโครงสร้างเนื้อเยื่อเทียมและการประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์อื่นได้ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยการสนับสนุนทุนวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ตั้งแต่วันที่ 1 มิถุนายน 2548 ถึงปัจจุบัน จึงขอขอบพระคุณมา ณ ที่นี้ด้วย

ขอขอบสถาบันวิจัยโลหะและวัสดุ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ได้ให้การสนับสนุนสถานที่และเครื่องมือสำหรับทำวิจัย และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ได้ช่วยอำนวยความสะดวกตลอดการวิจัย

ขอขอบคุณนายแพทย์ถนอม บรรพประเสริฐ ภาควิชาโสต ศอ นาสิกวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้คำปรึกษา ให้ความช่วยเหลือในหลายๆ ด้าน รวมถึงให้ความอนุเคราะห์เรื่องสถานที่สำหรับเลี้ยงทดสอบเซลล์ รศ. ดร. ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล และ ผศ. ดร. ไสรดา กนกพานนท์ ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ ศ. ดร. ยาสุธิโกะ ทาบาตะ มหาวิทยาลัยเกียวโต ประเทศญี่ปุ่น ให้ความร่วมมือต่างๆ ตลอดมา ขอขอบคุณ ดร. สิริพรรณ นิลไพรัช ดร. สรินทร ลิ้มปนาท และ ดร. ปราณิ เลิศสุทธีวงศ์ จากสถาบันวิจัยโลหะและวัสดุ รวมถึง ดร. ปัญญวัชร วัชยาว ภาควิชาวิศวกรรมโลหการ คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ให้ความช่วยเหลือที่ผมเคยได้รับในโอกาสต่าง ๆ

ขอขอบคุณคุณสุทธิพันธ์ ภาวสุปรีห์ คุณนริศรา กุลปรีชานันท์ รวมถึงนิสิตปัจจุบันและที่จบการศึกษาไปแล้วทุกท่านสำหรับการทำงานอย่างทุ่มเทด้วยความอดสาหัส

ท้ายนี้ผมขอขอบคุณคุณย่า เมย์จิ่งและโมจิน สำหรับกำลังใจ ความรักและความสุขที่ได้รับ และขอกราบขอบพระคุณแม่สำหรับความรัก ความอบอุ่น และการเป็นแบบอย่างในการครองชีวิตให้กับลูกทุกคน

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	I
บทสรุปผู้บริหาร (Executive summary)	III
กิตติกรรมประกาศ	IV
สารบัญ	V
สารบัญรูป	VII
สารบัญตาราง	VIII
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ	1
1.3 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Literature review)	1
บทที่ 2 ขอบเขตของงานวิจัย ผลการทดลองและวิจารณ์ผล	5
2.1 ขอบเขตการดำเนินงานวิจัย	5
2.1.1 การปั่นเส้นใย PCL ด้วยกระบวนการปั่นไฟฟ้าสถิต	5
2.1.2 การวิเคราะห์ขนาดและสัณฐานวิทยาของเส้นใย	5
2.1.3 การวิเคราะห์สมบัติของสารละลาย	5
2.2 อิทธิพลของปัจจัยการผลิตต่อขนาด ลักษณะและสัณฐานวิทยาของเส้นใย PCL ที่ได้	6
2.2.1 การเตรียมเส้นใย PCL โดยใช้หมทรีลีนคลอไรด์ (MC) เป็นตัวทำละลาย	6
2.2.2 การเตรียมเส้นใย PCL โดยใช้โทลูอินเป็นตัวทำละลาย	10
2.2.3 การเตรียมเส้นใย PCL โดยใช้ไดคลอโรโรมีเทน (DC) เป็นตัวทำละลาย	11
2.2.4 การเตรียมเส้นใย PCL โดยใช้คลอโรฟอร์ม (CH) เป็นตัวทำละลาย	14
2.2.5 การเตรียมเส้นใย PCL โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง Dichloromethane (DC) and N,N-dimethylformamide (DMF) เป็นตัวทำละลาย	16
2.2.6 วิจารณ์ผลของตัวแปรต่างๆ ในภาพรวมต่อการเตรียมเส้นใย PCL	18
2.3 การทดสอบอันตรกิริยาระหว่างเซลล์ L929 กับแผ่นเส้นใย PCL	20
2.3.1 การทดสอบความเป็นพิษเบื้องต้นของแผ่นเส้นใย PCL	20
2.3.2 การศึกษาอันตรกิริยาระหว่างเซลล์และแผ่นเส้นใย PCL	21
2.4 อิทธิพลของปัจจัยการผลิตต่างๆ ต่อการเตรียมเส้นใยเจลาคตินชนิด A และ B	22
บทที่ 3 บทสรุป	27
เอกสารอ้างอิง	28
ผลผลิตที่ได้จากโครงการ	29

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก	30
ภาคผนวก 1 ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติที่ได้รับทุนสนับสนุน จาก สกว. ภายใต้โครงการวิจัยนี้	
ภาคผนวก 2 ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติภายใต้เครือข่ายงานวิจัย เกี่ยวกับการพัฒนาด้าน Biomedical engineering ฉบับที่ 1	
ภาคผนวก 3 ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติภายใต้เครือข่ายงานวิจัย เกี่ยวกับการพัฒนาด้าน Biomedical engineering ฉบับที่ 2	

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1.1 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของเส้นโนนาโนของพอลิแอลกอฮอล์ผสมอัลจินเตต	2
รูปที่ 2.1 (ก และ ข) ภาพและไดอะแกรมแสดงลักษณะเครื่องปั้นเส้นใยไฟฟ้าสถิตที่ใช้ในการทดลอง	6
รูปที่ 2.2 ผลของความเข้มข้นของสารละลาย PCL ใน MC ต่อลักษณะของเส้นใยที่ได้จากการปั่นที่ศักย์ไฟฟ้า 7.5 kV ระยะเวลาเก็บเส้นใย 10 เซนติเมตร	8
รูปที่ 2.3 ผลของความต่างศักย์ไฟฟ้าต่อขนาดของเส้นใย PCL ที่เตรียมจากสารละลาย ความเข้มข้น 15% และ 17%w/v	10
รูปที่ 2.4 ผลของความเข้มข้นของสารละลายที่มีต่อขนาดของเส้นใย PCL ที่เตรียมจากสารละลาย PCL (MW 65 kDa) ใน DC ใช้ศักย์ไฟฟ้า 7 กิโลโวลต์ ระยะเวลาเก็บเส้นใย 15 ชม.	12
รูปที่ 2.5 ผลของความเข้มข้นของสารละลายที่มีต่อขนาดของเส้นใย PCL ที่เตรียมจากสารละลาย PCL (MW 80 kDa) ใน DC ใช้ศักย์ไฟฟ้า 7 กิโลโวลต์ ระยะเวลาเก็บเส้นใย 15 ชม.	14
รูปที่ 2.6 ผลของความเข้มข้นของสารละลายที่มีต่อขนาดของเส้นใย PCL ที่เตรียมจากสารละลาย PCL (MW 80 kDa) ในคลอโรฟอร์ม ใช้ศักย์ไฟฟ้า 15 กิโลโวลต์ ระยะเวลาเก็บเส้นใย 20 ชม.	15
รูปที่ 2.7 ผลของความเข้มข้นของสารละลายที่มีต่อขนาดของเส้นใย PCL ที่เตรียมจากสารละลาย PCL (MW 80 kDa) ในคลอโรฟอร์ม ใช้ศักย์ไฟฟ้า 15 กิโลโวลต์ ระยะเวลาเก็บเส้นใย 30 ชม.	15
รูปที่ 2.8 ลักษณะของเส้นใยที่ได้จากการปั่นสารละลาย PCL (MW 80 kDa) ในตัวทำละลายผสม DC/DMF ระยะเวลาเก็บเส้นใย 10 ชม. ที่ศักย์ไฟฟ้าต่างๆ กัน	17
รูปที่ 2.9 ลักษณะของเส้นใยที่ได้จากการปั่นสารละลาย PCL (MW 80 kDa) ในตัวทำละลายผสม DC/DMF ระยะเวลาเก็บเส้นใย 20 ชม. ที่ศักย์ไฟฟ้าต่างๆ กัน	17
รูปที่ 2.10 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและจำนวนเซลล์ L929 ที่เลี้ยงบนแผ่นฟิล์ม PCL และแผ่นเส้นใย PCL ที่เวลา 3 6 24 และ 48 ชั่วโมง	20
รูปที่ 2. ปริมาณเซลล์ L929 บนแผ่นเส้นใย PCL ทั้งสี่ขนาดที่เวลาต่างๆ	21
รูปที่ 2.12 ผลของความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ให้ต่อขนาดของเส้นใยที่ได้จากการปั่นสารละลายเจลาติน A และ B ที่ความเข้มข้น 25 %w/v	23
รูปที่ 2.13 ผลของความเข้มข้นสารละลายต่อลักษณะและขนาดของเส้นใยเจลาตินชนิด A และ B ที่ปั่นที่ความต่างศักย์ 20 กิโลโวลต์ (a) 5%, (b) 10%, (c) 15%, (d) 20%, (e) 40% และ (e) 60%	25
รูปที่ 2.14 ผลของความเข้มข้นสารละลายต่อความหนืด ลักษณะและขนาดของเส้นใยเจลาตินชนิด A ที่ปั่นที่ความต่างศักย์ 20 กิโลโวลต์	26

สารบัญรูป

	หน้า
ตารางที่ 2.1 ผลของศักย์ไฟฟ้าและระยะจัดเก็บเส้นใยต่อขนาดของเส้นใยที่ได้ในตัวทำละลาย MC	9
ตารางที่ 2.2 ผลของความเข้มข้นและน้ำหนักโมเลกุลต่อขนาดเส้นใยที่ได้ในตัวทำละลาย DC	11
ตารางที่ 2.4 ผลของความเข้มข้นและน้ำหนักโมเลกุลต่อขนาดเส้นใยที่ได้ในตัวทำละลายคลอโรฟอร์ม	14
ตารางที่ 2.5 ผลของค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ใช้และระยะจัดเก็บเส้นใยต่อขนาดเส้นใย PCL ในระบบตัวทำละลายผสม DC/DMF	16
ตารางที่ 2.6 สรุปผลของความเข้มข้นของสารละลายต่อลักษณะและขนาดของเส้นใยเจลาตินชนิด A และ B ที่ปั่นที่ความต่างศักย์ 20 กิโลโวลต์	

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ยุทธศาสตร์การพัฒนาประเทศที่สำคัญอันหนึ่งคือการผลักดันให้ประเทศไทยเป็นศูนย์กลางด้านการแพทย์ในระดับภูมิภาค ซึ่งหัวข้องานวิจัยในทางการแพทย์ที่สำคัญและจะมีผลกระทบต่อสังคมโลกสูงมีอยู่ด้วยกันเป็นจำนวนมาก ตัวอย่างบางส่วนได้แก่ การพัฒนาด้านสเต็มเซลล์ (Stem cell) ประสาทวิทยา (Neuroscience) การบำบัดด้วยยีน (Gene therapy) วิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue engineering) งานวิจัยด้านไบโอเทคโนโลยีเป็นต้น กระบวนการปั่นเส้นใยแบบไฟฟ้าสถิต (Electrospinning process) เป็นวิธีการผลิตเส้นใยนาโนแบบหนึ่งที่กำลังได้รับความสนใจอย่างสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งการนำไปใช้ในทางการแพทย์ การทหารและงานวิศวกรรมขั้นสูงอื่นๆ ที่มีความท้าทายหรือมีมูลค่าในเชิงพาณิชย์สูง เส้นใยที่เตรียมได้จากเทคนิคนี้มีขนาดตั้งแต่ประมาณ 50 นาโนเมตร จนถึงหลายไมโครเมตร ขึ้นกับชนิดของพอลิเมอร์และปัจจัยในการผลิตที่ใช้ แผ่นเส้นใยที่เก็บได้ตามปกติจะเป็นแผ่นเส้นใยแบบไม่ได้ทอ (Nonwoven fabric) ที่มีความพรุนสูง มีพื้นที่ผิวจำเพาะ (specific surface area) สูงและมีน้ำหนักเบา นอกจากนี้แผ่นเส้นใยดังกล่าวยังมีลักษณะคล้ายกับโครงร่างเนื้อเยื่อ (Extra cellular matrix) ของสัตว์และมนุษย์ จึงมีความสนใจในการนำไปใช้เป็นโครงร่างเนื้อเยื่อเทียมในงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อต่างๆ

สำหรับโครงการวิจัยนี้จะศึกษาการเตรียมเส้นใยนาโนและเส้นใยขนาดเล็กของพอลิเมอร์ชีวภาพ 2 ชนิดคือ พอลิแลคโตน และเจลาติน ด้วยกระบวนการปั่นเส้นใยแบบไฟฟ้าสถิต รวมถึงการศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการนำไปใช้เป็นโครงร่างเนื้อเยื่อในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

- เพื่อเตรียมเส้นใยนาโนของพอลิแลคโตนด้วยกระบวนการปั่นเส้นใยแบบไฟฟ้าสถิต โดยการศึกษาผลของปัจจัยการผลิตต่างๆ ต่อ ขนาด ลักษณะและสัณฐานวิทยาของเส้นใยนาโนและแผ่นเส้นใยที่ได้
- เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการนำเส้นใยนาโนของพอลิแลคโตนไปใช้ในงานโครงสร้างเนื้อเยื่อวิศวกรรม
- เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของสารละลาย และความต่างศักย์ไฟฟ้าระหว่างขั้วไฟฟ้า ต่อขนาดและสัณฐานวิทยาของเส้นใยเจลาตินชนิด A และ B ที่เตรียมขึ้น โดยกระบวนการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต

1.3 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Literature Review)

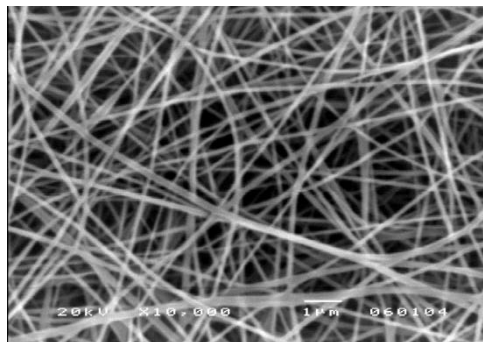
กระบวนการปั่นเส้นใยแบบไฟฟ้าสถิต (Electrospinning process)

กระบวนการปั่นเส้นใยแบบไฟฟ้าสถิต (Electrospinning process) เป็นการให้แรงดันทางไฟฟ้าเป็นแรงขับทำให้หยดพอลิเมอร์เหลวที่ปลายหัวฉีดซึ่งอยู่ภายใต้สนามไฟฟ้าที่มีความแรงมากพอจะยืดตัวออก ภายใต้แรงดันทางไฟฟ้าที่เพิ่มขึ้นตามความแรงของสนามไฟฟ้าภายนอกสายพอลิเมอร์เหลวจะพุ่งออกจากปลายหัวฉีด และเกิดการยืดตัวออกอย่างต่อเนื่องและรวดเร็วภายในระยะทางสั้น ในขณะที่เดียวกันตัวทำละลายที่อยู่ในสายพอลิเมอร์เหลวก็จะระเหยออก (ในกรณีของสารละลายพอลิเมอร์) หรือเกิดการถ่ายเทความร้อนระหว่างสายพอลิเมอร์เหลวกับสิ่งแวดล้อม (ในกรณีของพอลิเมอร์หลอมเหลว) ทำให้สายพอลิเมอร์เหลวเกิดการแข็งตัวและเปลี่ยนเป็นเส้นใย ข้อดีของกระบวนการปั่นเส้นใยแบบ

ไฟฟ้าสถิตคือ ทำได้ง่าย เครื่องมือไม่ซับซ้อน ใช้ได้กับพอลิเมอร์แทบทุกชนิด ใช้ปริมาณสารตั้งต้นน้อยได้ และมีมูลค่าการลงทุนเบื้องต้นต่ำ [1-3]

ลักษณะและจุดเด่นของเส้นใยที่ได้จากกระบวนการปั่นเส้นใยแบบไฟฟ้าสถิตเมื่อเทียบกับเส้นใยขนาดเล็กที่ได้จากการผลิตแบบอื่น มีดังต่อไปนี้

1. เส้นใยมีขนาดเล็กตั้งแต่ในช่วงไม่กี่ไมโครเมตรลงไปถึงน้อยกว่า 50 นาโนเมตร
2. แผ่นเส้นใยที่ได้มีความเป็นรูพรุนสูง
3. เส้นใยที่ได้เป็นเส้นใยยาวต่อเนื่อง
4. แผ่นเส้นใยที่ได้มีพื้นที่ผิวจำเพาะ (พื้นที่ผิวต่อน้ำหนัก) สูงมากเป็นพิเศษ
5. แผ่นเส้นใยที่ได้โดยปกติจะอยู่ในรูปของผืนผ้าไม่ได้ทอ (Non woven fabric)



รูปที่ 1.1 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของเส้นใยนาโนของพอลิแอลกอฮอล์ผสมอัลจินต

จากลักษณะเฉพาะดังกล่าว จึงมีการวิจัยและพัฒนาเพื่อนำเส้นใยนาโนไปใช้ในงานต่างๆ ตัวอย่างเช่น เป็นโครงสร้างเนื้อเยื่อวิศวกรรมสำหรับสร้างเนื้อเยื่อและอวัยวะเทียม เป็นวัสดุปิดแผลแบบฉลาด เป็นระบบนำส่งยาและสารออกฤทธิ์อื่น เป็นวัสดุประกอบนาโน เป็นตัวตรวจจับสารเคมีและชีวโมเลกุล เป็นโครงสร้างสำหรับตัวเร่งปฏิกิริยา เป็นชุดป้องกันอาวุธเคมีและอาวุธชีวภาพ เป็นตัวกรองแยกกาซ ของเหลวและอนุภาคขนาดเล็ก เหล่านี้เป็นต้น [4-8]

จากศักยภาพในการใช้งานของเส้นใยนาโน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในงานที่มีมูลค่าและโอกาสทางการตลาดสูง เช่น ในทางการแพทย์ และการทหาร ภาครัฐและเอกชนของประเทศอุตสาหกรรมหลาย ๆ ประเทศ จึงให้ความสำคัญกับเทคโนโลยีการสนับสนุนดังกล่าวทั้งในรูปแบบเงินทุนวิจัยหรือการทำวิจัยด้วยตนเอง [9-11]

พอลิเมอร์แบบย่อยสลายได้ตามธรรมชาติในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Biodegradable polymers in tissue engineering)

โครงสร้างเนื้อเยื่อ (tissue scaffold) มีความสำคัญอย่างมากในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เนื่องจากเซลล์ของสัตว์ตามธรรมชาติจะต้องเกาะติดกับโครงสร้างเนื้อเยื่อจึงจะสามารถมีชีวิตอยู่และทำงานได้ตามปกติ โครงสร้างเนื้อเยื่อตามธรรมชาติจะมีความพรุน (porosity) สูงเพื่อให้สารอาหารและเซลล์สามารถเคลื่อนที่ผ่านได้ โดยรูพรุนควรจะมีการเชื่อมต่อกันในทุกทิศทาง มีขนาดที่เหมาะสม และมีสมบัติทางเคมีที่พื้นผิวที่ช่วยให้เซลล์ยึดเกาะได้ดี (cell immobilization) แต่ในขณะเดียวกันเซลล์ต้องสามารถเคลื่อนที่ผ่านไปมาได้ (cell migration) มีสมบัติทางกายภาพที่เหมาะสมกับประเภทงานของเนื้อเยื่อนั้นๆ รูปร่าง ลักษณะการจัดเรียงตัวของรูพรุน ตลอดจนสมบัติทางเคมีของพื้นผิวก็มีผลถึงการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์ (cell differentiation) อีกด้วย ดังนั้นเทคนิคการขึ้นรูปและชนิดของวัสดุจึงมีความสำคัญอย่างสูงในการสร้างโครงสร้างเนื้อเยื่อเทียม [12]

พอลิเมอร์แบบย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ (Biodegradable polymer) หลายชนิดถูกนำมาใช้ขึ้นรูปเป็นโครงสร้างเนื้อเยื่อแบบต่างๆ เนื่องจากพอลิเมอร์นี้จะถูกย่อยสลายภายในร่างกายผู้ป่วยก่อนจะถูกดูดซึมหรือขับออกจากร่างกาย ทำให้ผู้ป่วยไม่ต้องผ่านการผ่าตัดเอาโครงสร้างเทียมที่ใช้ออก นอกจากนี้เซลล์เนื้อเยื่อยังสามารถงอกเข้ามาทดแทนโครงสร้าง

เนื้อเยื่อเทียมและสร้างเนื้อเยื่อใหม่ขึ้นได้อย่างสมบูรณ์ ตัวอย่างของพอลิเมอร์ในกลุ่มนี้ที่ใช้นานมากได้แก่ กลุ่มพอลิเอสเทอร์ เช่น พอลิไกลคอลิกแอซิด (Poly(glycolic acid)) พอลิแลคติกแอซิด (Poly(lactic acid)) และพอลิแคโพรแลคโตน (Poly(ϵ -caprolactone), PCL) กลุ่มพอลิคาร์โบไฮเดรต เช่น chitin และกลุ่มพอลิเปปไทด์ เป็นต้น

เส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อและการแพทย์ (Electrospun nanofiber in tissue engineering and biomedical applications)

ในปี 2547 Kim และคณะ ใช้การปั่นเส้นใยแบบไฟฟ้าสถิตเตรียมเส้นใยนาโนของพอลิแลคติกโคไกลโกลไลด์ (Poly(lactic-co-glycolide), PLGA) ที่บรรจุยา Cefoxitin sodium ซึ่งมีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อจุลชีพ และพบว่าเส้นใยนาโนสามารถปลดปล่อยยาออกมาได้และมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ S. aureus ในอาหารร่วนและอาหารเหลวได้ [13]

ในปี 2547 Min และคณะ ได้ทำการเตรียมเส้นใยนาโนจากเส้นใยไหม (Silk Fibroin) โดยเส้นใยที่เตรียมได้มีขนาดระหว่าง 30-120 นาโนเมตร เมื่อนำเส้นใยดังกล่าวมาศึกษาการเกาะติดและแพร่ขยายของ Keratinocyte cell และ Fibroblast cell ของมนุษย์ พบว่าเซลล์ทั้งสองชนิดมีการเกาะติดกับเส้นใยนาโนจากไหมได้ดีและยังช่วยในการแพร่ขยายของคอลลาเจนชนิดที่ 1 อีกด้วย เนื่องจากขนาดของเส้นใยที่เล็กทำให้มีพื้นที่ผิวสำหรับการเกาะติดของเซลล์อยู่มาก [14]

ในปี 2547 Min และคณะ ได้ศึกษาการเกาะติดของเซลล์ Keratinocyte บนพื้นผิววัสดุที่เตรียมจากไหมที่มีลักษณะต่างกัน 3 อย่าง ได้แก่ ฟิล์มบาง แผ่นเส้นใยแบบทอของเส้นใยไมโคร และแผ่นเส้นใยแบบไม่ทอของเส้นใยนาโน ผลการวิจัยพบว่า การเกาะติดของเซลล์และการแพร่กระจายของคอลลาเจนชนิดที่ 1 บนแผ่นเส้นใยนาโนดีที่สุด เนื่องจากมีพื้นที่ผิวและความพรุนสูง [15]

ในปี 2548 Lee และคณะ ได้ทำการศึกษาผลของจัดเรียงตัวของเส้นใยนาโนต่อการสร้าง Extra cellular matrix (ECM) ของ Human ligament fibroblast (HLF) โดยเส้นใยนาโนของพอลิยูรีเทน (PU) ถูกเตรียมจากสารละลาย PU ใน N,N dimethyl formamide เส้นใยที่ได้มีขนาดประมาณ 600-800 นาโนเมตร เมื่อนำ HLF มาเลี้ยงบนเส้นใยที่มีการเรียงตัวในทิศทางเดียวกันพบว่า เซลล์ HLF มีลักษณะเป็นรูปกระสวย ตัวเซลล์และ ECM ที่สร้างขึ้นมีการเรียงตัวตามทิศทางของเส้นใย ในขณะที่เซลล์ HLF บนเส้นใยที่มีการเรียงตัวแบบทุกทิศทางไม่มีการเปลี่ยนรูปร่างและไม่มีการเรียงตัวของเซลล์และ ECM ที่แน่นอน นอกจากนี้ปริมาณคอลลาเจนที่เซลล์สร้างขึ้นหลังจากเกาะติดบนเส้นใยที่มีการจัดเรียงตัวมีปริมาณสูงกว่าในกรณีของเส้นใยที่มีการเรียงตัวแบบทุกทิศทาง [16]

ในปี 2547 Mo และคณะ ได้ทำการศึกษาผลของปัจจัยการผลิตต่อการเตรียมเส้นใยนาโนของ พอลิ(แอล-แลคติก-โค-แคโพรแลคโตน) โดยพบว่าความเข้มข้นของสารละลายและความต่างศักย์ทางไฟฟ้าระหว่างขั้วอิเล็กโทรดมีผลต่อขนาดของเส้นใย เมื่อนำเส้นใยที่ได้ไปทดลองเพาะเลี้ยง endothelial cell และ smooth muscle cell พบว่าเซลล์ทั้งสองชนิดสามารถเจริญเติบโตและแบ่งตัวได้ดี และยังรักษารูปร่างลักษณะดั้งเดิมไว้ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเซลล์ดังกล่าวน่าจะมีการทำงานได้ตามปกติ [17]

ในปี 2546 Yoshimoto และคณะ ได้ศึกษาความเป็นไปได้ในการนำเส้นใยนาโนของพอลิแคโพรแลคโตนไปใช้เป็นโครงร่างเนื้อเยื่อสำหรับกระดูก โดยการเพาะเลี้ยง Mesenchymal stem cells จากไขกระดูกของหนู Neonatal บนแผ่นเส้นใยนาโน หลังจากหนึ่งสัปดาห์ พบการเคลื่อนย้ายของเซลล์และการสร้าง Extra cellular matrix เป็นจำนวนมาก หลังจาก 4 สัปดาห์พบว่ามีการสร้างเซลล์ซ้อนกันหลายชั้น และยังตรวจพบการสร้างคอลลาเจนชนิดที่ 1 และการสะสมของแร่ธาตุ (Mineralization) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเส้นใยนาโนของพอลิแคโพรแลคโตนน่าจะเป็นวัสดุที่ดีสำหรับใช้สร้างเนื้อเยื่อเทียมของกระดูก [18]

ในปี 2547 ลีรอร์ พวงมาลี และคณะได้เตรียมเส้นใยนาโนพอลิคาโพรแลคโตนและ โดยใช้เทคนิคการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต โดยใช้เมทิลีนคลอไรด์เป็นตัวทำละลาย ศักย์ไฟฟ้า 7.5 kV. และระยะห่างระหว่างปลายเข็มถึงจากรองรับเส้นใย 15 cm. จากนั้นได้เตรียมและศึกษาการปลดปล่อยยาของเส้นใยนาโนที่ผสมยาไดโคลฟีแนคโซเดียมที่มีความเข้มข้นต่างๆกัน ในสภาวะอะซิเตดบัฟเฟอร์ pH 5.5 ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าที่ปริมาณยาไดโคลฟีแนคโซเดียม 0.01 กรัม สามารถปลดปล่อยยาออกมาได้มากที่สุดเท่ากับ 60 % [19]

Joseph L. Lowery ศึกษาผลกระทบของขนาดของเส้นใยและขนาดรูพรุนของแผ่นเส้นใย electrospun PCL ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ Human Dermal Fibroblasts (HDF) โดยการปั่นเส้นใย PCL ให้มีขนาดเส้นใยเท่ากับแต่นขนาดรูพรุนต่างกัน โดยพบว่าเมื่อขนาดของรูพรุนมีขนาดมากกว่า 6 ไมโครเมตร เซลล์มีการเจริญเติบโตแบ่งเซลล์ได้เร็วกว่าบนโครงเลี้ยงเซลล์เส้นใยอื่น และเมื่อขนาดของรูพรุน 12-23 ไมโครเมตร เซลล์จะเริ่มalign ไปตามเส้นใยเดี่ยวๆและข้ามไปยังเส้นใยอื่นๆ ซึ่งผลกระทบของ void architecture ซึ่งจากการศึกษานี้สามารถนำไปสู่การศึกษาพัฒนาเพื่อการเพิ่มประสิทธิภาพของโครงเลี้ยงเซลล์เส้นใยในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ [20].

ในปี 2009 Jang Ho Kim ทำการศึกษาโครงเลี้ยงเซลล์ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อระดับนาโนของ poly(ϵ -caprolactone) (PCL) จากกระบวนการไฟฟ้าสถิต เนื่องจาก PCL มีสมบัติความไม่ชอบน้ำสูง (High hydrophobicity) เป็นข้อจำกัดในการใช้งานของเส้นใยโครงเลี้ยงเซลล์ ดังนั้นในการศึกษานี้จึงทำการเตรียมเส้นใยโครงเลี้ยงเซลล์โดยการผสมกันระหว่าง PCL/polyethylenimine (PEI) เพื่อช่วยลดข้อจำกัดสมบัติความไม่ชอบน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์ เนื่องจาก PEI เป็น cationic polymer สามารถทำให้เพิ่มอัตราการยึดเกาะระหว่างเซลล์กับโครงเลี้ยงเซลล์นอกจากนั้นยังสามารถปรับปรุงสมบัติความเป็น electrospinnability ของ PCL ได้อีกด้วย ในการวิจัยนี้ทำการศึกษาโครงสร้าง สมบัติเชิงกล และ biological activity ของเส้นใย PCL/PEI electrospun พบว่า ขนาดของเส้นใยในช่วง 150.4 \pm 33 ถึง 220.4 \pm 32 nm. แสดงสมบัติเชิงกลและมีขนาดความพรุนตัวที่เหมาะสม โดย PEI ช่วยเพิ่มสมบัติความชอบน้ำ การยึดเกาะและการเจริญของเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์เส้นใย PCL [21]

บทที่ 2

ขอบเขตของงานวิจัย ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

2.1 ขอบเขตขอบเขตการดำเนินงานวิจัย

รายงานฉบับนี้แบ่งเนื้อหาที่ได้ศึกษาออกได้เป็น 3 ส่วนหลักคือ

- การศึกษาอิทธิพลของปัจจัยการผลิตต่างๆ ต่อขนาดและลักษณะของเส้นใย PCL
- การศึกษาเบื้องต้นถึงความเป็นพิษและการเกาะติดของเซลล์ทดสอบบนแผ่นเส้นใย PCL
- การศึกษาการเตรียมเส้นใยเจลลาตินสำหรับประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์

ทั้งนี้ ขั้นตอนการเตรียมและวิเคราะห์เส้นใยโดยทั่วไปมีดังต่อไปนี้

2.1.1 การปั่นเส้นใย PCL ด้วยกระบวนการปั่นไฟฟ้าสถิต

เตรียมสารละลาย PCL ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (น้ำหนักโดยปริมาตร) ในตัวทำละลายที่สนใจ จนได้สารละลายเนื้อเดียวกัน นำสารละลายมาบรรจุใส่หลอดฉีดแบบใช้แล้วทิ้งขนาด 5 มิลลิลิตร ที่ต่อกับเข็มปลายตัดขนาดที่เหมาะสมที่ทำหน้าที่เป็นหัวปั่นเส้นใย (โดยขอบเข้มนอกมีการฝนลบคมเพื่อลดการเกิด corona discharged ในระหว่างการปั่นเส้นใย) ทำการปั่นเส้นใยที่ความต่างศักย์ไฟฟ้าต่าง ๆ ด้วยอุปกรณ์ปั่นเส้นใยแบบไฟฟ้าสถิตที่มีลักษณะตามรูปที่ 2.1 อุปกรณ์สร้างไฟฟ้าแรงดันสูงที่ใช้เป็นชนิดขั้วบวกของบริษัท Gamma High Voltage รุ่น RC10-30 (ชนิดประจุบวก) จากประเทศสหรัฐอเมริกา เก็บเส้นใยด้วยแผ่นอลูมิเนียมฟอยล์และกระจกสไลด์ หรือลูกกลิ้งเก็บเส้นใย โดยใช้ระยะห่างระหว่างหัวปั่นกับตามที่กำหนด ทำการเก็บเส้นใยเป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมงสำหรับการนำไปวิเคราะห์ขนาด หรือนานเท่าที่จำเป็นจนได้ความหนาเท่าที่ต้องการ

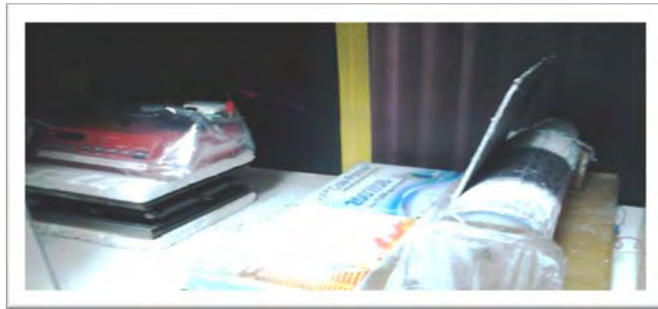
ทั้งนี้เนื่องจากข้อจำกัดของครุภัณฑ์ในขณะที่ทำการทดลอง สำหรับการทดลองส่วนที่ 2.1 และ 2.2 จะควบคุมอัตราการไหลของสารละลายให้คงที่ด้วย hydrostatic pressure และขนาดหัวเข็มที่ใช้ ในขณะที่การทดลองส่วนที่ 2.3 ทำการควบคุมอัตราการไหลของสารละลายให้คงที่ด้วย Syringe pump

2.1.2 การวิเคราะห์ขนาดและลักษณะของเส้นใย

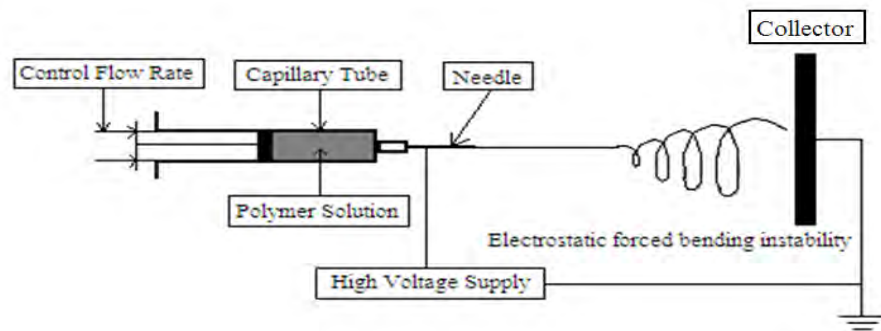
นำแผ่นเส้นใยที่ได้ไปเคลือบเพิ่มการนำไฟฟ้าก่อนนำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ยี่ห้อ Philips รุ่น XL30 ที่กำลังขยายต่าง ๆ และทำการวัดหาขนาดเฉลี่ยของเส้นใยด้วยโปรแกรม Semafore จากเส้นใยที่มีตำแหน่งต่างกันหรือปรากฏเป็นเส้นใยคนละเส้นอย่างน้อยที่สุด 50 ตำแหน่ง

2.1.3 การวิเคราะห์สมบัติของสารละลาย

ทำการวัดค่าความหนืดและค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายพอลิเมอร์ที่เตรียมได้ด้วยเครื่องวัดความหนืด ยี่ห้อ Brookfield รุ่น LVDV-II และเครื่องวัดค่าการนำไฟฟ้า ยี่ห้อ EUTECH รุ่น CON501 ตามลำดับ



(ก)



(ข)

ภาพที่ 2.1 (ก และ ข) ภาพและไดอะแกรมแสดงลักษณะเครื่องปั้นเส้นใยไฟฟ้าสถิตที่ใช้ในการทดลอง

2.2 อิทธิพลของปัจจัยการผลิตต่อขนาด ลักษณะและสัญญาณวิทยาของเส้นใยและแผ่นเส้นใย PCL ที่ได้

ตัวแปรที่ศึกษา ได้แก่

- ชนิดของตัวทำละลาย (methylenechloride (MC) , dichloromethane (DC) , chloroform, toluene, mix solvent of dichloromethane and N,N-dimethylformamide (DMF) (1:1))
- ความเข้มข้นของสารละลาย
- ความต่างศักย์ไฟฟ้าระหว่างขั้วไฟฟ้า
- ระยะทางจากปลายเข็มถึงฉากรับ
- น้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ (65, 80 kDa),

เนื่องจากการศึกษาได้ทำการศึกษากันด้วยในตัวทำละลายแต่ละชนิด ซึ่งไม่ได้กำหนดให้เท่ากันเสมอไป จึงขอสรุปผลการทดลองที่ได้ตามชนิดของตัวทำละลาย และจะได้วิจารณ์สรุปถึงผลของระยะทางจากปลายเข็มถึงฉากรับ ความต่างศักย์ไฟฟ้าระหว่างขั้วไฟฟ้า น้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ และความเข้มข้นของสารละลาย ในตอนท้าย

2.2.1 การเตรียมเส้นใย PCL โดยใช้เมทธิลีนคลอไรด์ (MC) เป็นตัวทำละลาย

ผลของความเข้มข้นของสารละลาย

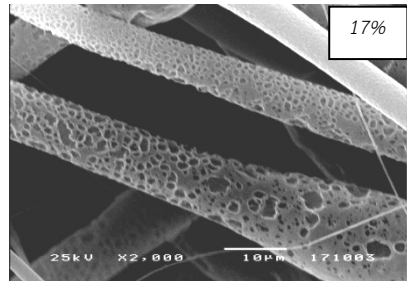
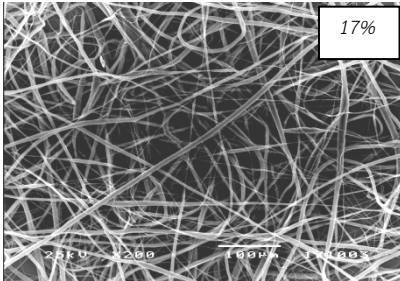
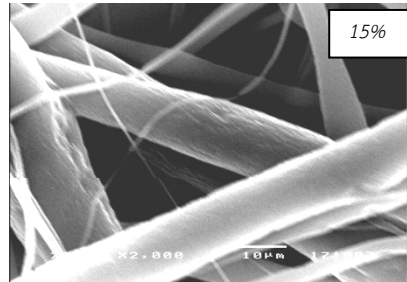
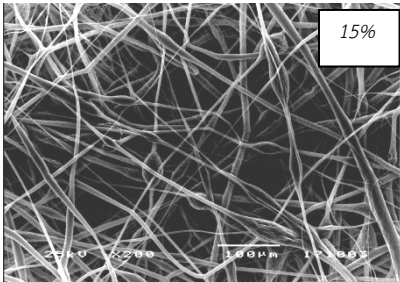
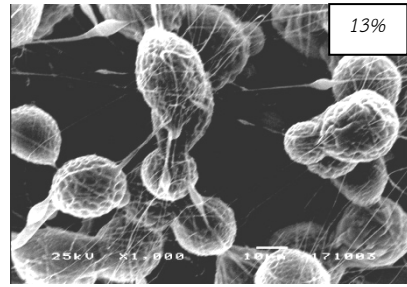
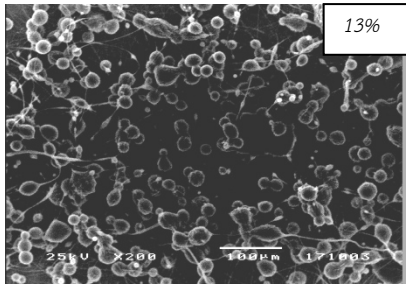
เมื่อนำสารละลาย PCL ใน MC ที่ความเข้มข้น 5 10 13 15 และ 17 %w/v นำมาปั่นเป็นเส้นใย โดยใช้ศักย์ไฟฟ้า 7.5 kV และระยะทางระหว่างปลายเข็มถึงฉากรองรับเส้นใย 10 เซนติเมตร พบว่า สารละลายที่มีความเข้มข้น 5% และ 10% ไม่เกิดการปั่นออกมาของเส้นใยเนื่องจากสารละลาย PCL มีความหนืดน้อยมาก ไม่สามารถเตรียมเป็นเส้นใยได้ ส่วนที่ความเข้มข้น 13% - 17% เกิดการปั่นเส้นใยอย่างต่อเนื่อง โดยได้เส้นใยลักษณะดังที่แสดงในรูป 2.2 ซึ่งจะพบว่าสารละลาย PCL ที่ความเข้มข้น 15% และ 17 %w/v จะเห็นเป็นเส้นใยขนาดเล็กใหญ่ปะปนกัน ส่วนสารละลาย PCL ที่ความเข้มข้น 13 %w/v จะสังเกตเห็นเป็นอนุภาคขนาดไมโครเมตรจำนวนมาก แต่มีเส้นใยจำนวนน้อย

ผลของความต่างศักย์และระยะทางจากปลายเข็มถึงฉากรองรับ

เมื่อนำสารละลาย PCL ใน MC ความเข้มข้น 15 % และ 17%w/v มาปั่นเป็นเส้นใยโดยใช้ค่าความต่างศักย์เท่ากับ 7.5 8.5 และ 9.5 กิโลโวลต์ และระยะทางจากปลายเข็มถึงฉากรองรับเส้นใย 10 15 และ 20 เซนติเมตร พบว่าขนาดของเส้นใยจะมีแนวโน้มลดลงจากประมาณ 2.60-3.10, 2.60-2.90 จนถึงประมาณ 1.80 – 2.40 ไมโครเมตรเมื่อศักย์ไฟฟ้าเพิ่มขึ้นจาก 7.5 เป็น 8.5 และ 9.5 กิโลโวลต์ ตามลำดับ ในขณะที่ผลของการเพิ่มขึ้นของระยะการเก็บเส้นใยต่อขนาดเส้นใยไม่มีแนวโน้มชัดเจน ดังแสดงตามตารางที่ 2.1 และรูป 2.3

สรุปผลการทดลอง

สถานะของการเตรียมเส้นใย PCL ในตัวทำละลาย MC ที่เหมาะสม คือ สารละลาย PCL ความเข้มข้น 15%w/v ศักย์ไฟฟ้า 7.5 kV. และระยะทางระหว่างปลายเข็มถึงฉากรองรับเส้นใยเท่ากับ 15 cm. เนื่องจากได้เส้นใยที่มีความต่อเนื่องไม่ฉีกขาด มีขนาดสม่ำเสมออยู่ในช่วงประมาณ 1.90-2.60 ไมโครเมตร



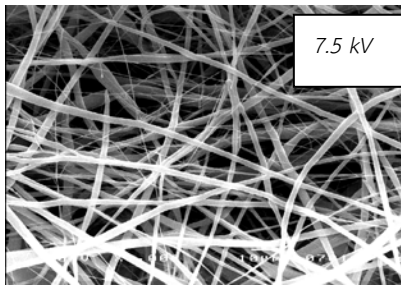
รูปที่ 2.2 ผลของความเข้มข้นของสารละลาย PCL ใน MC ต่อลักษณะของเส้นใยที่ได้จากการปั่นที่ศักย์ไฟฟ้า 7.5 kV ระยะจัดเก็บเส้นใย 10 เซนติเมตร

ตารางที่ 2.1 ผลของศักย์ไฟฟ้าและระยะจัดเก็บเส้นใยต่อขนาดของเส้นใยที่ได้ในตัวทำละลาย MC

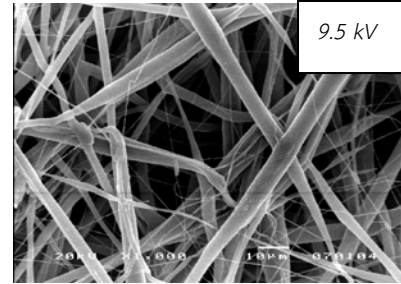
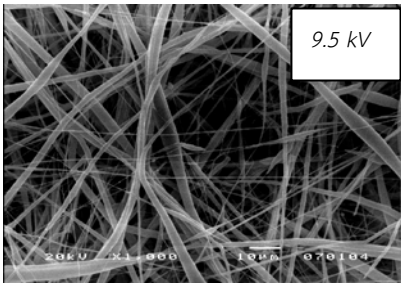
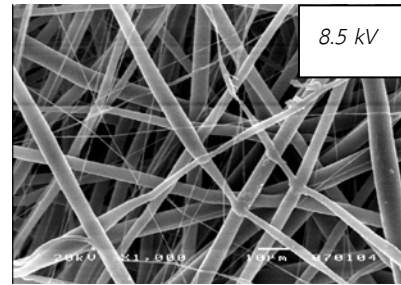
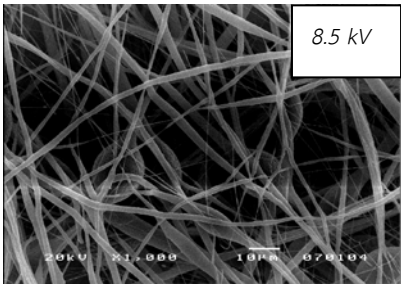
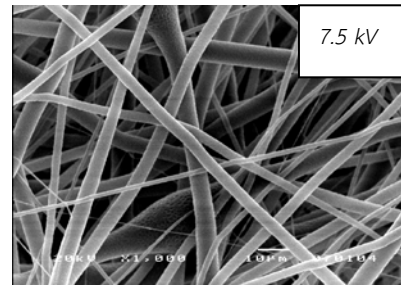
ความเข้มข้นของ PCL	ศักย์ไฟฟ้า (kV)	ระยะทาง (cm)	ขนาดเส้นใยเฉลี่ย (nm)
15%	7.5	10	2,600 – 3,100
	8.5	10	วัดขนาดไม่ได้
	9.5	10	2,500 – 2,600
17%	7.5	10	2,600 – 3,100
	8.5	10	2,600 – 2,900
	9.5	10	1,800 – 2,400
15%	7.5	15	1,900 – 2,600
	8.5	15	2,000 – 2,500
	9.5	15	1,900 – 2,400
17%	7.5	15	4,500 – 4,700
	8.5	15	3,400 – 4,200
	9.5	15	3,000 – 3,900
15%	7.5	20	2,300 – 3,200
	8.5	20	2,000 – 2,300
	9.5	20	1,900 – 2,300
17%	7.5	20	2,900 – 3,500
	8.5	20	2,300 – 3,400
	9.5	20	2,000 – 3,000

หมายเหตุ วัดขนาดไม่ได้เนื่องจากสารละลายรวมตัวเป็นกลุ่มก้อนก่อนไม่มีความเป็นเส้นใย

PCL/MC 15%w/v



PCL/MC 17%w/v



รูปที่ 2.3 ผลของความต่างศักย์ไฟฟ้าที่มีต่อขนาดของเส้นใย PCL ที่เตรียมจากสารละลายความเข้มข้น 15% และ 17%w/v

2.2.2 การเตรียมเส้นใย PCL โดยใช้โทลูอีนเป็นตัวทำละลาย

ผลของความเข้มข้นสารละลาย ความต่างศักย์และระยะจัดเก็บเส้นใย

เมื่อนำสารละลาย PCL (MW 65 kDa และ 80 kDa) ใน โทลูอีน ที่ความเข้มข้น 15, 18, 21, 24 และ 30%w/v มาปั่นเส้นใยด้วยกระบวนการปั่นไฟฟ้าสถิต โดยใช้ศักย์ไฟฟ้าตั้งแต่ 8-20 kV ระยะจัดเก็บเส้นใย 20 และ 30 cm และใช้เข็มฉีดยาหัวตัดเบอร์ 21 พบว่าไม่มีการปั่นเป็นเส้นใยที่ทุกสภาวะ โดยจะพบเพียงหยดสารละลายเป็นจำนวนมากกระจายอยู่อย่างสม่ำเสมอเท่านั้น

สรุปผลการทดลอง

โทลูอีนไม่ใช่ตัวทำละลายที่เหมาะสมในการเตรียมเส้นใย PCL จากการปั่นเส้นใยโดยใช้ไฟฟ้าสถิต

2.2.3 การเตรียมเส้นใย PCL โดยใช้ไดคลอโรมีเทน (DC) เป็นตัวทำละลาย

ผลของความเข้มข้นสารละลายและน้ำหนักโมเลกุล

เตรียมสารละลาย PCL (น้ำหนักโมเลกุล 65 kDa และ 80 kDa) ในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนให้มีความเข้มข้น 10%, 12%, 15%, 18%, 20%, 22%, 25%, 28%, 30%, 35% และ 40% w/v นำมาทำการปั่นเส้นใยที่ระยะทาง 15 cm ให้ศักย์ไฟฟ้า 7 kV และใช้เข็มหัวตัดเบอร์ 20 เป็นหัวปั่นเส้นใย ได้ผลสรุปตามตารางที่ 2.2 และรูปที่ 2.4 และ 2.5 ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า

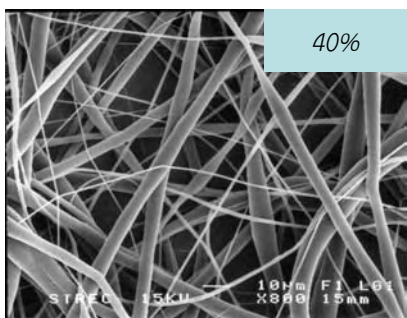
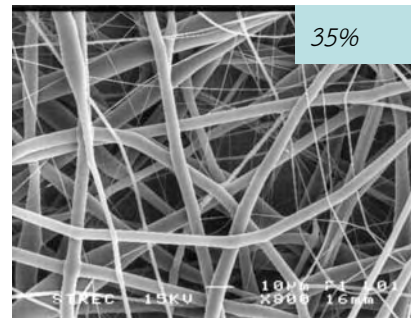
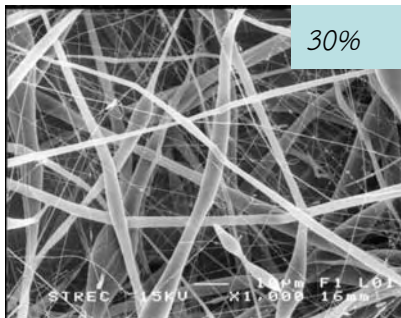
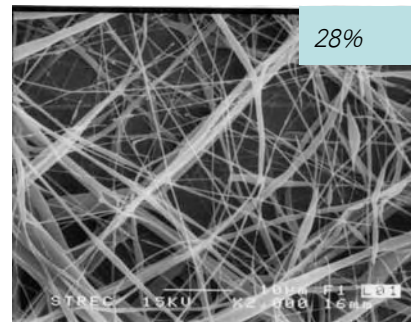
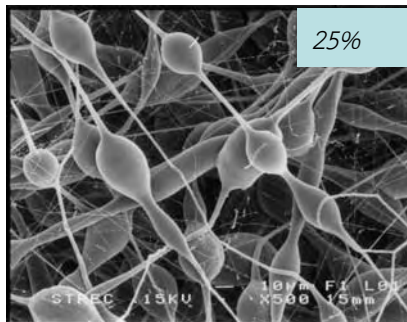
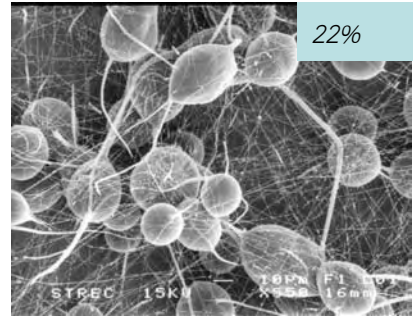
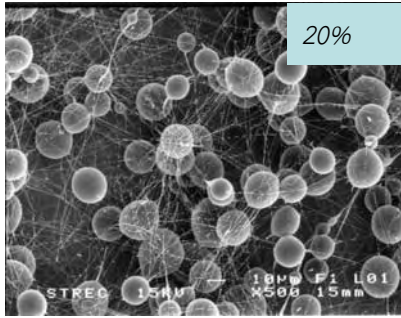
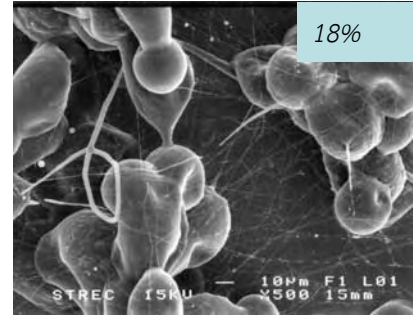
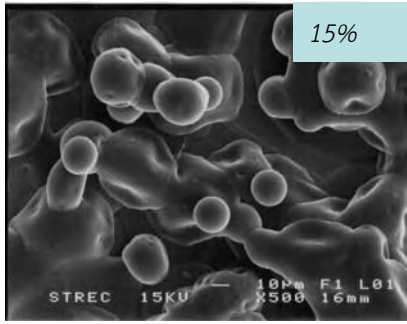
สำหรับ PCL ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 65 kDa พบว่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่ทำให้เริ่มเกิดเส้นใยคือ 18 %w/v ซึ่งยังเป็นการเกิดเส้นใยร่วมกับการเกิดอนุภาค เส้นใยมีขนาดไม่สม่ำเสมอ ที่ความเข้มข้นของสารละลายต่ำความเข้มข้นนี้ พบว่าจะเกิดเป็นอนุภาคนานค่อนข้างใหญ่ เมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้น การเกิดบิดของเส้นใยมีแนวโน้มลดลง แต่ขนาดเส้นใยไม่ค่อยสม่ำเสมอ นักสังเกตได้จากที่มีเส้นใยทั้งใหญ่และเล็กเกิดผสมกัน ซึ่งอาจเกิดขึ้นเนื่องจากการระเหยของตัวทำละลายที่หัวปั่นทำให้อัตราการไหลของสารละลายไม่คงที่ สำหรับ PCL ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 80 kDa นั้นสังเกตพบปรากฏการณ์ในลักษณะเดียวกัน คือเกิดอนุภาค เส้นใยที่มีเม็ดบิด แต่จะเกิดขึ้นที่ความเข้มข้นสารละลายต่ำกว่า PCL-65 kDa เนื่องจากการเกี่ยวพันกันของสายโซ่โมเลกุลพอลิเมอร์ได้มากกว่า นอกจากนี้ยังพบว่าในบางสภาวะเส้นใยที่ได้จะมีลักษณะเรียบ มีขนาดสม่ำเสมอ

สรุปผลการทดลอง

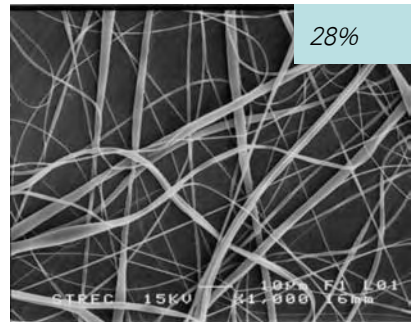
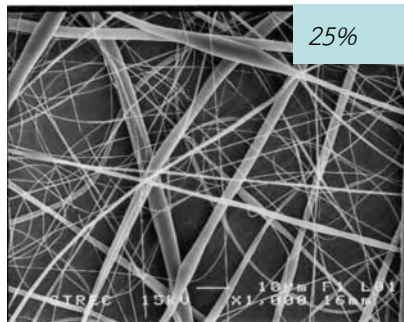
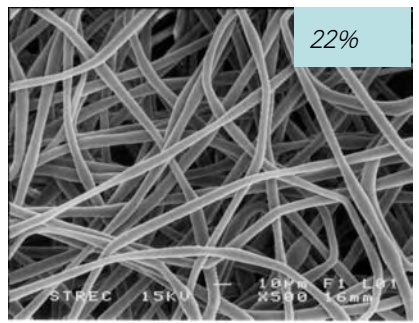
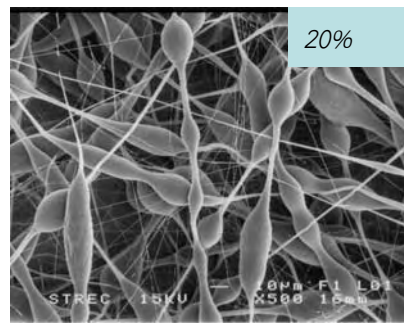
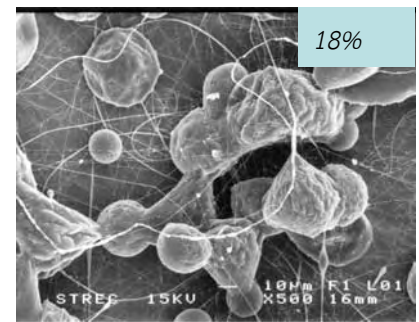
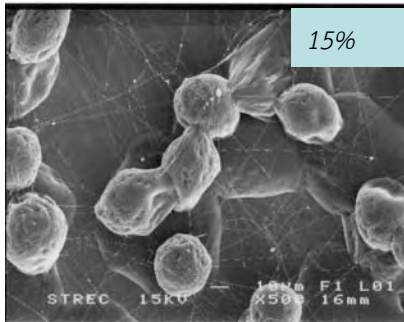
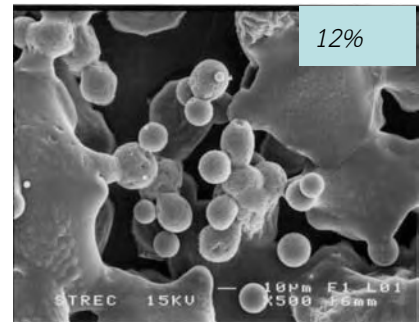
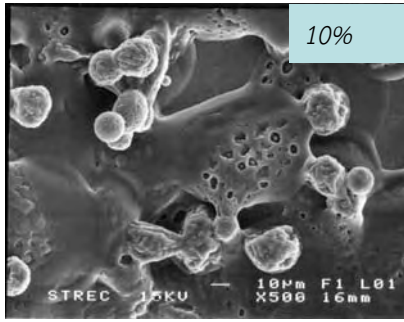
สภาวะที่ดีที่สุดในการเตรียมเส้นใย PCL ในไดคลอโรมีเทน คือ ใช้สารละลาย PCL (น้ำหนักโมเลกุล 80 kDa) ความเข้มข้นเท่ากับ 22% w/v ใช้ระยะทางจากปลายเข็มถึงฉากรับเท่ากับ 15 cm และใช้ศักย์ไฟฟ้า 7 kV ซึ่งจะส่งผลให้ได้เส้นใยที่มีขนาดสม่ำเสมอปราศจากเม็ดบิดโดยมีขนาดเส้นใยประมาณ 5 ไมโครเมตร

ตารางที่ 2.2 ผลของความเข้มข้นและน้ำหนักโมเลกุลต่อขนาดเส้นใยที่ได้ในตัวทำละลาย DC

ความเข้มข้นของสารละลาย %w/v	น้ำหนักโมเลกุลของ PCL ที่ใช้ละลายในไดคลอโรมีเทน	
	65,000	80,000
10	ไม่เกิดเส้นใย	ไม่เกิดเส้นใย
12	ไม่เกิดเส้นใย	ไม่เกิดเส้นใย
15	ไม่เกิดเส้นใย	เกิดเส้นใยขนาดเล็ก ร่วมกับอนุภาค
18	เกิดเส้นใยขนาดเล็ก ร่วมกับอนุภาค	723
20	เกิดเส้นใยขนาดเล็ก ร่วมกับอนุภาค	1,956
22	เกิดเส้นใยขนาดเล็ก ร่วมกับอนุภาค	4,868
25	2,134	799
28	3,085	846
30	2,853	1,096
35	2,974	ไม่ได้เตรียมสารละลาย
40	2,766	ไม่ได้เตรียมสารละลาย



รูปที่ 2.4 ผลของความเข้มข้นของสารละลายที่มีต่อขนาดของเส้นใย PCL ที่เตรียมจากสารละลาย PCL (MW 65 kDa) ใน DC ใช้ศักย์ไฟฟ้า 7 กิโลโวลต์ ระยะเก็บเส้นใย 15 ซม.



รูปที่ 2.5 ผลของความเข้มข้นของสารละลายที่มีต่อขนาดของเส้นใย PCL ที่เตรียมจากสารละลาย PCL (MW 80 kDa) ใน DC ใช้ศักย์ไฟฟ้า 7 กิโลโวลต์ ระยะเก็บเส้นใย 15 ซม.

2.2.4 การเตรียมเส้นใย PCL โดยใช้คลอโรฟอร์ม (CH) เป็นตัวทำละลาย

ผลของน้ำหนักโมเลกุลของ PCL และความเข้มข้นของสารละลาย

เตรียมสารละลาย PCL (น้ำหนักโมเลกุล 65 kDa) ในตัวทำละลายคลอโรฟอร์มให้มีความเข้มข้น 15%, 18%, 21%, 24% และ 30% w/v ตามลำดับและนำมาทำการปั่นเส้นใยที่ระยะจัดเก็บเส้นใย 20 และ 30 cm ให้ศักย์ไฟฟ้าตั้งแต่ 8 จนถึง 25 kV ตามลำดับ และใช้หัวปั่นเส้นใยเป็นเข็มหัวตัดขนาด 20G ผลการทดลองพบว่าในทุกสภาวะไม่สามารถเตรียมเป็นเส้นใยที่ขนาดสม่ำเสมอและปราศจากปมปมได้ นอกจากนี้ยังพบหยดสารละลายเป็นจำนวนมากปะปนอยู่กับเส้นใยที่มีปมปมตลอดตัวเส้นใยได้เช่นกัน นอกจากนี้ยังประสบปัญหาการอุดตันของหัวปั่นซึ่งเป็นผลมาจากที่ตัวทำละลายมีจุดเดือดต่ำ

เมื่อทำการเตรียมสารละลาย PCL จากพอลิเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเพิ่มเป็น 80 kDa โดยใช้ศักย์ไฟฟ้าเท่ากับ 15 กิโลโวลต์ และระยะจัดเก็บเส้นใย 20 และ 30 เซนติเมตร พบว่าสามารถเตรียมเป็นเส้นใยได้ โดยที่ความเข้มข้นต่ำกว่าจะเกิดทั้งอนุภาคและเส้นใยผสมกัน โดยมีขนาดและลักษณะดังแสดงในตารางที่ 2.4 และรูป 2.6 และ 2.7

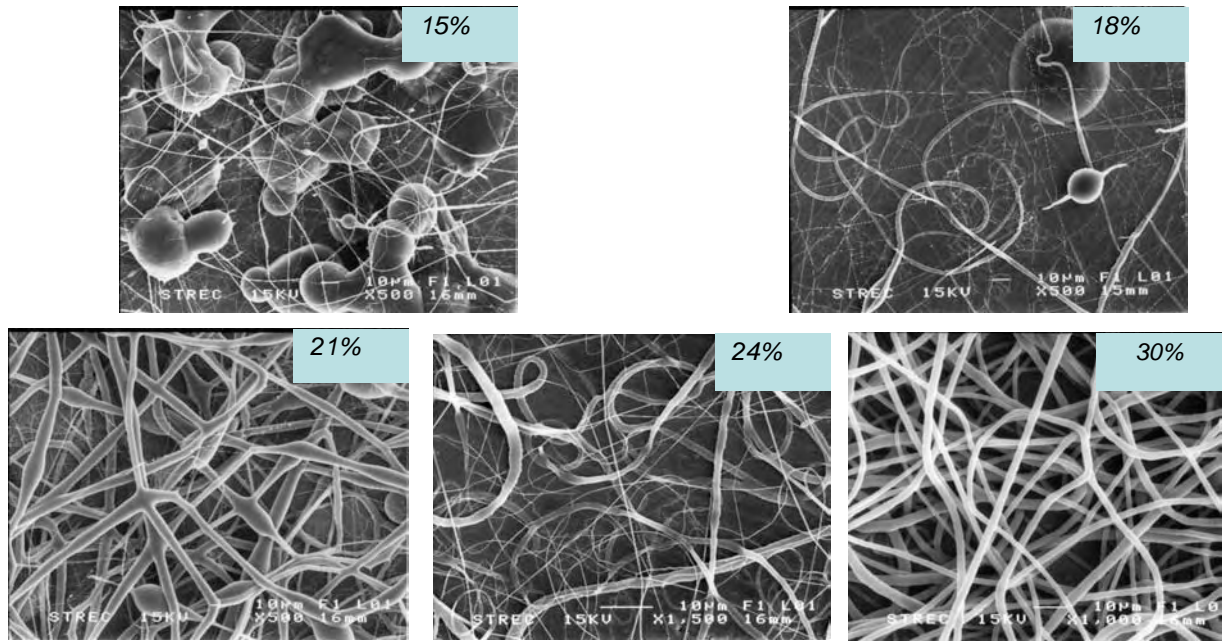
ตารางที่ 2.4 ผลของความเข้มข้นและน้ำหนักโมเลกุลต่อขนาดเส้นใยที่ได้จากตัวทำละลายคลอโรฟอร์ม

ความเข้มข้นของสารละลาย %w/v	ขนาดเส้นใย PCL (nm)	
	ระยะทาง 20 cm	ระยะทาง 30 cm
15	1,044	457
18	1,581	1,013
21	3,845	4,344
24	1,055	3,917
30	2,300	2,177

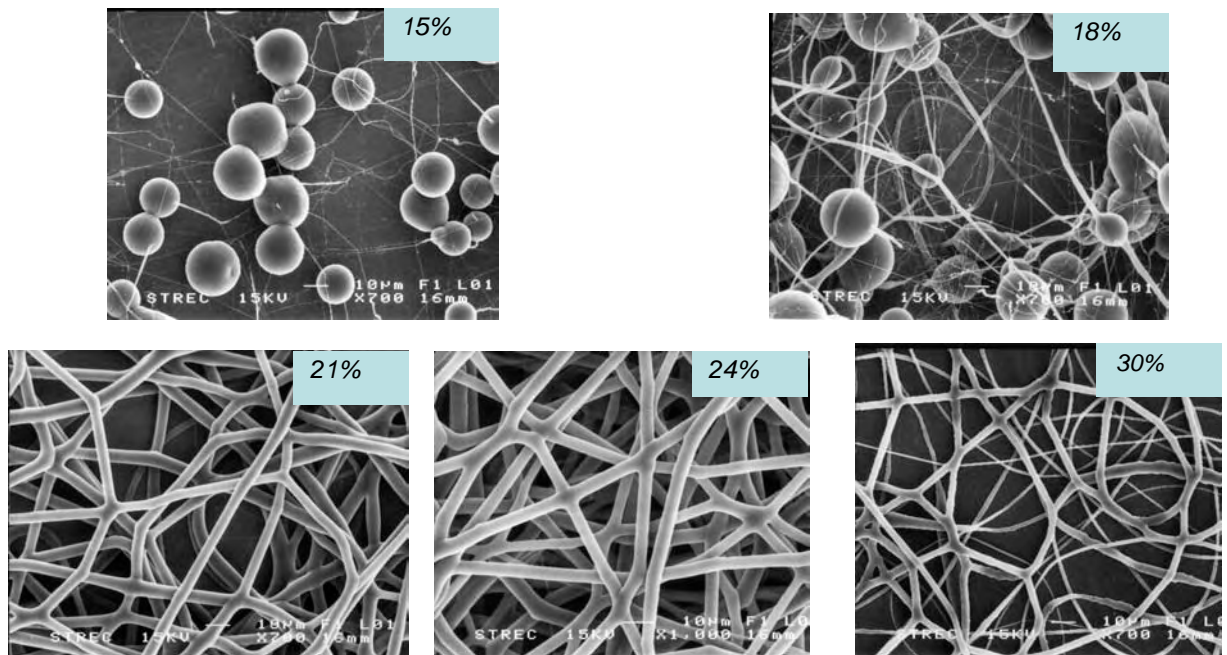
สรุปผลการทดลอง

สภาวะการเตรียมเส้นใย PCL ที่ดีที่สุดโดยได้เส้นใยที่มีขนาดสม่ำเสมอและปราศจากเม็ดบีดจะต้องใช้ PCL ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 80 kDa ซึ่งทำการปั่นเส้นใยที่ 3 สภาวะดังนี้

- ใช้ความเข้มข้นของ PCL เท่ากับ 30% w/v ในคลอโรฟอร์ม ระยะทางเก็บเส้นใยเท่ากับ 20 cm และใช้ศักย์ไฟฟ้า 15 kV ซึ่งจะได้เส้นใยที่มีขนาดประมาณ 2.3 ไมโครเมตร
- ใช้ความเข้มข้นของ PCL เท่ากับ 21% w/v ในคลอโรฟอร์ม ระยะทางเก็บเส้นใยเท่ากับ 30 cm และใช้ศักย์ไฟฟ้า 15 kV ซึ่งจะได้เส้นใยที่มีขนาดประมาณ 4.3 ไมโครเมตร
- ใช้ความเข้มข้นของ PCL เท่ากับ 24% w/v ในคลอโรฟอร์ม ระยะทางจากปลายเข็มถึงฉากรับเท่ากับ 30 cm และใช้ศักย์ไฟฟ้า 15 kV ซึ่งจะได้เส้นใยที่มีขนาดประมาณ 4 ไมโครเมตร



รูปที่ 2.6 ผลของความเข้มข้นของสารละลายที่มีต่อขนาดของเส้นใย PCL ที่เตรียมจากสารละลาย PCL (MW 80 kDa) ในคลอโรฟอร์ม ใช้ศักย์ไฟฟ้า 15 กิโลโวลต์ ระยะเก็บเส้นใย 20 ซม.



รูปที่ 2.7 ผลของความเข้มข้นของสารละลายที่มีต่อขนาดของเส้นใย PCL ที่เตรียมจากสารละลาย PCL (MW 80 kDa) ในคลอโรฟอร์ม ใช้ศักย์ไฟฟ้า 15 กิโลโวลต์ ระยะเก็บเส้นใย 30 ซม.

2.2.5 การเตรียมเส้นใย PCL โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง Dichloromethane (DC) and N,N-dimethylformamide (DMF)

ผลของศักย์ไฟฟ้าและระยะจัดเก็บเส้นใย

เมื่อนำสารละลาย PCL ในตัวทำละลายผสมระหว่าง DC และ DMF ในสัดส่วน 1:1 โดยใช้ PCL ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 80 kDa ที่ความเข้มข้น 15%w/v บั่นเส้นใยโดยใช้ศักย์ไฟฟ้าตั้งแต่ 10 15 20 และ 25 กิโลโวลต์ ตามลำดับ ที่ระยะจัดเก็บเส้นใย 10 และ 20 cm พบว่าเส้นใยที่ได้มีขนาดโดยรวมอยู่ในช่วงประมาณ 150-180 นาโนเมตร ดังแสดงในตารางที่ 2.5 โดยมีลักษณะตามที่แสดงไว้ในรูป 2.8 และ 2.9

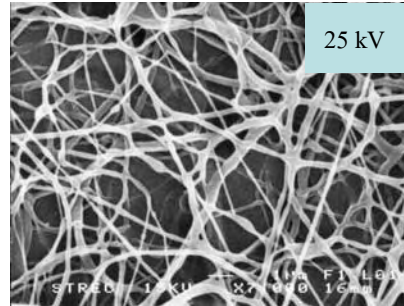
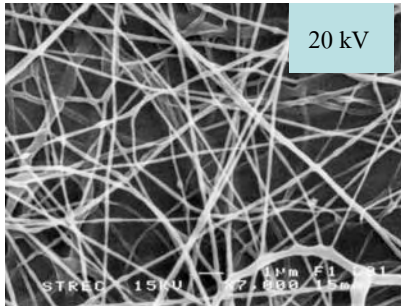
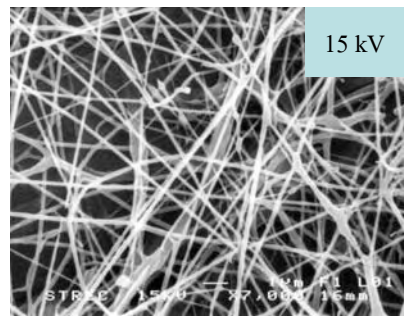
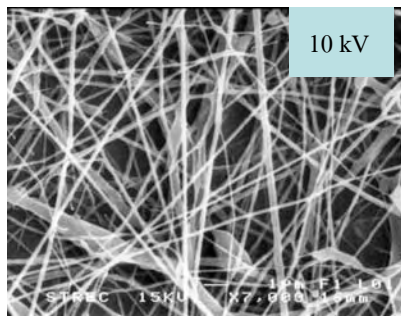
ที่ระยะจัดเก็บเส้นใยเท่ากับ 10 เซนติเมตร พบว่าเมื่อเพิ่มความต่างศักย์ไฟฟ้า ขนาดเส้นใยมีแนวโน้มจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ในขณะที่เมื่อเพิ่มระยะจัดเก็บเส้นใยเป็น 20 เซนติเมตร พบว่าเมื่อเพิ่มความต่างศักย์ไฟฟ้า ขนาดเส้นใยมีแนวโน้มจะลดลง ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากการเพิ่มความแรงของสนามไฟฟ้า เมื่อทำการบั่นเส้นใยที่ระยะเก็บเส้นใย 10 เซนติเมตร ซึ่งการเพิ่มศักย์ไฟฟ้าจะทำให้ความแรงของสนามไฟฟ้าเพิ่มขึ้นมาก เส้นใยที่บั่นออกจากหัวถักจึงไปถึงแผ่นเก็บเส้นใยในเวลาเร็วขึ้น จึงไม่สามารถยืดตัวออกได้เต็มที่ ทำให้เส้นใยที่ได้มีขนาดเพิ่มขึ้น ในขณะที่เมื่อใช้ระยะเก็บเท่ากับ 20 เซนติเมตร สนามไฟฟ้าที่เพิ่มขึ้นช่วยเพิ่มแรงผลักระหว่างประจุให้มากขึ้น ผนวกกับมีระยะทางให้ลำพอลิเมอร์ได้ยืดตัวออกอย่างเต็มที่ จึงทำให้ขนาดเส้นใยเล็กลง

ตารางที่ 2.5 ผลของค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ใช้และระยะจัดเก็บเส้นใยต่อขนาดเส้นใย PCL ในระบบตัวทำละลายผสม DC/DMF

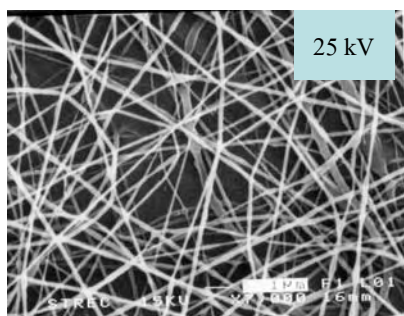
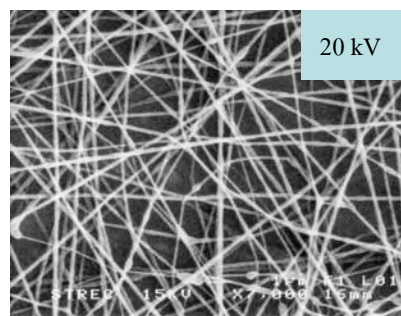
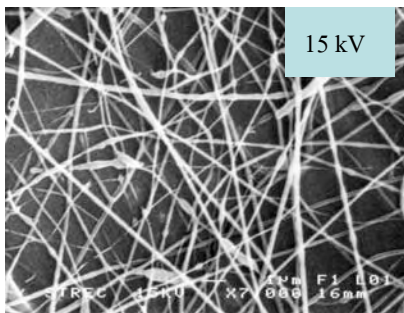
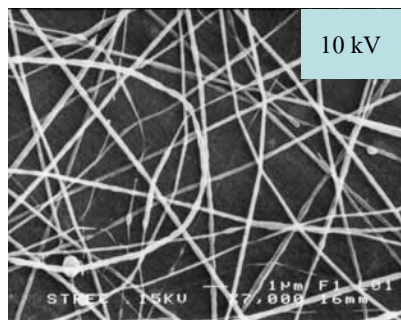
Applied voltage (kV)	ขนาดเส้นใย PCL (nm)	
	ระยะทาง 10 cm	ระยะทาง 20 cm
10	152	181
15	150	163
20	158	145
25	175	162

สรุปผลการทดลอง

สภาวะที่ดีที่สุดในการเตรียมเส้นใย PCL ในตัวทำละลายผสมระหว่าง DC และ DMF ในสัดส่วน 1:1 คือ จะต้องใช้ PCL น้ำหนักโมเลกุล 80,000 และทำการบั่นเส้นใยที่มีการใช้ความเข้มข้นของ PCL เท่ากับ 15%w/v ใช้ระยะทางจากปลายเข็มถึงฉากรับเท่ากับ 20 cm และใช้ศักย์ไฟฟ้า 25 kV ซึ่งจะส่งผลให้ได้เส้นใยที่มีขนาดสม่ำเสมอปราศจากปมปม โดยมีขนาดเส้นใยเท่ากับ 162 nm



รูปที่ 2.8 ลักษณะของเส้นใยที่ได้จากการปั่นสารละลาย PCL (MW 80 kDa) ในตัวทำละลายผสม DC/DMF ระยะเก็บเส้นใย 10 ซม. ที่ศักย์ไฟฟ้าต่างๆ กัน



รูปที่ 2.9 ลักษณะของเส้นใยที่ได้จากการปั่นสารละลาย PCL (MW 80 kDa) ในตัวทำละลายผสม DC/DMF ระยะเก็บเส้นใย 20 ซม. ที่ศักย์ไฟฟ้าต่างๆ กัน

2.2.6 วิจัยผลของตัวแปรต่างๆในภาพรวมต่อการเตรียมเส้นใย PCL

ผลของความเข้มข้นของสารละลายและน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์

โดยทั่วไปเมื่อเมื่อนำสารละลายความเข้มข้นต่ำมาปั่นเป็นเส้นใยด้วยกระบวนการปั่นไฟฟ้าสถิต จะพบว่า ลักษณะของชิ้นงานที่ได้จะเป็นอนุภาคขนาดต่าง ๆ (ตั้งแต่ต่ำกว่า 100 นาโนเมตร จนถึงระดับไมโครเมตร ขึ้นกับปัจจัยอื่น ๆ) เนื่องจากที่ความเข้มข้นต่ำนั้น polymer chain entanglement ยังเกิดขึ้นน้อยหรือไม่มีเลย หากแรงดึงผิวที่ทำหน้าที่ต้านแรงผลักทางไฟฟ้าจากประจุที่พื้นผิวไม่เพียงพอ (หรือล้าพอลิเมอร์ในที่นี้) จะแตกตัวออกเป็นละอองขนาดเล็ก กระบวนการนี้จะเรียกว่า electrostatic atomization

เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายให้สูงขึ้นเส้นใยที่ได้จะเป็นเส้นใยขนาดเล็กที่มีเม็ดปิดกระจายอยู่ตามเส้นใยในลักษณะคล้ายกับสร้อยไข่มุก (bead on string morphology) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายไปเรื่อย ๆ จะพบว่าสัดส่วนของขนาดเม็ดปิดต่อขนาดเส้นใยจะใกล้เคียงกันมากขึ้น รวมถึงความถี่ที่เม็ดปิดปรากฏ ต่อเมื่อความเข้มข้นของสารละลายถึงจุด ๆ หนึ่ง เส้นใยที่ได้จะไม่เม็ดปิดอีกต่อไป เนื่องจากเพิ่มความเข้มข้น จะทำให้ polymer chain entanglement เกิดมากขึ้น viscoelastic force ในล้าพอลิเมอร์เหลวที่ถูกยืดตัวออก มีค่าสูงขึ้นและค่อย ๆ ลดอิทธิพลของแรงดึงผิวซึ่งทำให้เกิด capillary instability และเม็ดปิดลดลง จนเมื่อความเข้มข้นสูงมากพอ แรงที่เกี่ยวข้องกับ viscoelastic force กับแรงผลักทางไฟฟ้าระหว่างประจุบนพื้นผิวมีค่าสูงกว่าแรงดึงผิวมาก capillary instability จึงถูกยับยั้งโดยสมบูรณ์ จึงทำให้เส้นใยที่ได้ไม่มีเม็ด

ทั้งนี้ที่เมื่อใช้สารละลายที่มีความเข้มข้นสูง เส้นใยที่ได้อาจปรากฏเป็นลักษณะเส้นใยแบน (ribbon like morphology) เนื่องจากการแข็งตัวก่อนของเปลือกด้านนอกที่แข็งตัวก่อน มีความแข็งแรงไม่เพียงพอ เมื่อเนื้อสารด้านในเส้นใยมีการแข็งตัวตามในภายหลัง (จากการแพร่ผ่านของตัวทำละลายด้านใน และมาระเหยออกไปเมื่ออยู่ที่ผิวด้านนอก) ทำให้เกิดภาวะสูญญากาศภายในเส้นใยและแรงดันอากาศภายนอกบีบอัดจนเส้นใยตัวลงมากลายเป็นเส้นใยแบน

น้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ มีผลในลักษณะเดียวกันกับการเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายเนื่องจากเมื่อน้ำหนักโมเลกุลเพิ่ม จะเพิ่มความยาวสายโซ่และ chain entanglement ไปด้วยนั่นเอง

ผลของความต่างศักย์ไฟฟ้า

โดยทั่วไปเมื่อเพิ่มความต่างศักย์ไฟฟ้าระหว่างหัวปั่นกับแผ่นเก็บเส้นใย โดยรักษาระยะห่างให้คงที่ จะเป็นการเพิ่มความแรงของสนามไฟฟ้า ซึ่งจะทำได้สามารถเหนี่ยวนำให้มีปริมาณประจุที่พื้นผิวของหยดสารละลายที่หัวปั่นให้มากขึ้น อันเป็นผลให้แรงผลักทางไฟฟ้าสูงขึ้น และจะมีผลเพิ่มการยืดตัวออกของล้าพอลิเมอร์เหลว ซึ่งจะมีผลทำให้เส้นใยที่ได้มีขนาดเล็กลง อย่างไรก็ตามการเพิ่มสนามไฟฟ้าก็จะมีผลทำให้อัตราการไหลออกของสารละลายที่จุดยอดของโคน (ซึ่งเป็นจุดที่เส้นใยถูกดึงหรือดันออกมา) เพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งหากควบคุมอัตราการไหลของพอลิเมอร์ไม่เหมาะสม เส้นใยที่ได้ อาจจะมีขนาดใหญ่ขึ้นแทน

ผลของระยะห่างระหว่างหัวปืนกับแผ่นเก็บเส้นใย

การเพิ่มระยะจัดเก็บเส้นใย โดยทั่วไปจะมีผลทำให้ความแรงของสนามไฟฟ้าลดลงซึ่งมีผลต่อเนื่องไปทำให้ปริมาณประจุที่ถูกเหนี่ยวนำไปยังผิวนอกสุดของหยดสารละลายลดลงด้วย ถ้าพอลิเมอร์เหลวจึงมีการยืดตัวน้อยลงและจะทำให้เส้นใยที่ได้มีขนาดใหญ่ขึ้น ขณะเดียวกันระยะจัดเก็บเส้นใยที่สั้นแม้ว่าจะมีสนามไฟฟ้าสูง แต่ระยะทางที่สั้นจะทำให้ลำเส้นใยยืดตัวออกไม่สมบูรณ์ อาจมีผลทำให้ได้เส้นใยที่มีขนาดใหญ่ขึ้นได้

ผลของชนิดของตัวทำละลาย

ความเข้ากันได้ของโมเลกุลพอลิเมอร์กับตัวทำละลายมีผลต่อ hydrodynamic volume และการเกิด chain entanglement ของ โมเลกุลพอลิเมอร์ในสารละลาย ซึ่งจะมีผลในลักษณะเดียวกับการเพิ่มหรือลดความเข้มข้นของสารละลาย นอกจากนี้อัตราการระเหยของตัวทำละลาย ความสามารถในการนำไฟฟ้า ค่า dielectric constant ของตัวทำละลายเองก็มีผลต่อขนาดเส้นใยด้วย โดยทั่วไป

ทั้งนี้ในการการแยกพิจารณาผลของปัจจัยการผลิตต่าง ๆ ต่อขนาดและการเกิดเส้นใยในกระบวนการนี้ จะต้องคำนึงถึงว่าปัจจัยต่าง ๆ มีความเกี่ยวเนื่องกันไม่ทางใดก็ทางหนึ่ง เช่น การเปลี่ยนระยะจัดเก็บหรือความต่างศักย์ไฟฟ้า จะมีผลต่อความแรงสนามไฟฟ้าและปริมาณประจุที่ถูกเหนี่ยวนำมาอยู่ที่ผิวหน้าของสารละลาย ซึ่งจะมีผลต่อแรงผลักทางไฟฟ้าที่ทำให้เส้นใยยืดตัวออก รวมถึงจะมีผลต่อขนาดลำพอลิเมอร์เริ่มต้นที่หัวปืน ซึ่งจะมีผลต่อขนาดเส้นใยที่ได้ในตอนสุดท้ายด้วย เป็นต้น

สรุปผลการทดลอง

สามารถหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมเส้นใย PCL ให้มีขนาดในช่วงต่าง ๆ กันตามที่ต้องการได้ โดยการเลือกระบบตัวทำละลาย ความเข้มข้น ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ ระยะการจัดเก็บเส้นใย รวมถึงน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ให้เหมาะสม อาทิ การเตรียมเส้นใย PCL ให้มีขนาดในช่วงประมาณ 0.160-0.20 1.00-1.500 2.00-2.50 หรือ 4.00-5.00 ไมโครเมตร ซึ่งความสามารถดังกล่าวจะช่วยให้สามารถพัฒนาโครงสร้างเนื้อเยื่อเทียมจาก PCL ที่มีโครงสร้าง สมบัติเชิงกล อัตราการย่อยสลาย ตามความต้องการเฉพาะได้

2.3 การทดสอบอันตรกิริยาระหว่างเซลล์ L929 กับแผ่นเส้นใย PCL

2.2.1 การทดสอบความเป็นพิษเบื้องต้น

วิธีการทดลอง

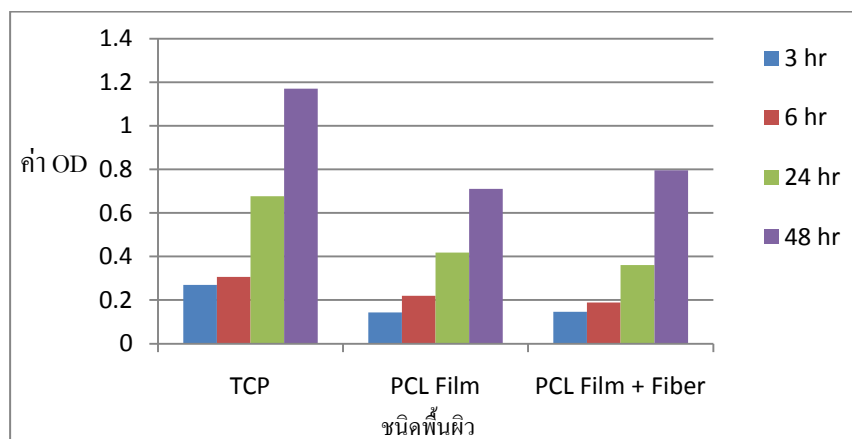
เตรียมฟิล์มและเส้นใย PCL โดยใช้สภาวะการเตรียมดังนี้

- ฟิล์ม PCL โดยการหลอม PCL ให้ละลาย กดทับและทิ้งในเย็นตัวในอุณหภูมิห้อง
- เส้นใย PCL บนแผ่นฟิล์ม PCL ที่เตรียมได้ จากสารละลาย PCL ในตัวทำละลายผสมระหว่าง DC และ DMF (สัดส่วน 1:1 v/v) ความเข้มข้น 15%w/v ใช้ศักย์ไฟฟ้า 25 kV ระยะทางจากปลายเข็มถึงฉากรับ 20 ซม.

นำแผ่นวัสดุที่ได้ใส่ใน Treated tissue culture plate (TCP) และฆ่าเชื้อด้วยเอทานอล 70% ล้างด้วยน้ำ (DI autoclave) 3 รอบ ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง วางทับด้วยวงแหวนสแตนเลสสตีลเพื่อกันแผ่นเส้นใย ลอยตัว เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ (10% DMEM) หลุมละ 400 μ l ถ้วยเซลล์ L929 จำนวน 100,000 เซลล์ต่อหลุม เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C ในบรรยากาศ 5% แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ เมื่อครบ 3 6 24 และ 48 ชั่วโมงทำการนับจำนวนเซลล์ด้วย MTT assay

ผลการทดลอง

รูปที่ 2.10 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและจำนวนเซลล์ L929 ที่เลี้ยงบนวัสดุต่าง ๆ และที่เวลา 3 6 24 และ 48 ชั่วโมง จำนวนเซลล์ที่เกาะบนแผ่นฟิล์ม PCL และ เส้นใย PCL (ขนาดประมาณ 160-170 นาโนเมตร) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้จำนวนเซลล์บนวัสดุทั้งสองมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อใช้เวลานานขึ้น อย่างไรก็ตาม จำนวนเซลล์ที่เลี้ยงบน TCP มีปริมาณมากกว่าบนวัสดุทั้งสองที่ทุกช่วงเวลาอย่างมีนัยสำคัญ



รูปที่ 2.10 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและจำนวนเซลล์ L929 ที่เลี้ยงบนแผ่นฟิล์ม PCL และแผ่นเส้นใย PCL ที่เวลา 3 6 24 และ 48 ชั่วโมง

สรุปผลการทดลอง

แผ่นเส้นใยที่เตรียมได้หรือตัวทำละลายที่อาจตกค้างอยู่ในแผ่นเส้นใยไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ L929 ภายในกรอบเวลาที่ศึกษา

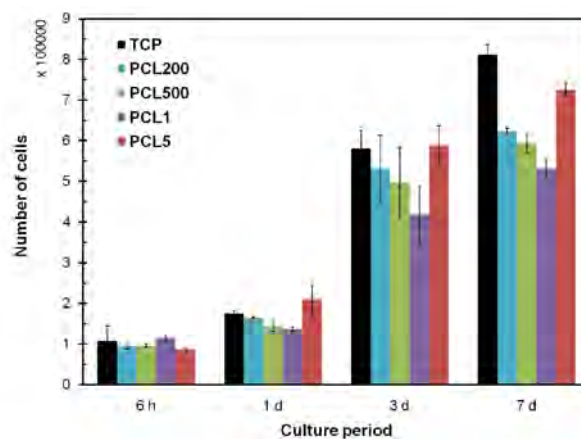
2.3.2 การศึกษาอันตรกิริยาระหว่างเซลล์และแผ่นเส้นใย PCL

วิธีการทดลอง

เตรียมเส้นใย PCL ขนาดเฉลี่ยประมาณ 0.2, 0.5, 1.0 และ 5.0 ไมโครเมตร โดยใช้สภาวะการเตรียมที่ศึกษาได้จากส่วนที่ 1 ตัดด้วยแม่พิมพ์วงกลมขนาด 14 มิลลิเมตร วัดความหนาเพื่อคัดเลือกให้ได้ชิ้นงานที่มีความหนาและน้ำหนักใกล้เคียงกัน นำไปฆ่าเชื้อด้วยเอทานอล 70% ล้างด้วยน้ำกลั่น และ สารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ อย่างละ 2 ครั้ง เก็บไว้ในจานเพาะเชื้อพลาสติกที่ปลอดเชื้อ จากนั้นทิ้งไว้ให้แห้งในตู้ Laminar flow hood นำแผ่นเส้นใยที่แห้งแล้วใส่ใน Treated tissue culture plate (tTCP) วางทับด้วยวงแหวนสแตนเลสสตีลเพื่อกันแผ่นเส้นใยลอยตัว เติมน้ำเลี้ยงเซลล์ (DMEM + 10% FBS) ประมาณ 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 คืน จากนั้นถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์ออก ทำการถ่ายเซลล์ L929 จำนวน 50,000 เซลล์ต่อหลุม เพราะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C ในบรรยากาศ 5% ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เมื่อครบ 6 ชั่วโมง 1 3 และ 7 วัน ทำการนับจำนวนเซลล์ด้วย MTT assay และศึกษาลักษณะของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ทำการทดลองตัวอย่างอย่างน้อย 4 ซ้ำ และเปลี่ยนอาหารทุก 3 วัน โดยมี TCP เป็นชุดควบคุม

ผลการทดลอง

ตารางที่ 2.11 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเซลล์ L929 บนแผ่นเส้นใย PCL ที่ใช้ทดสอบที่เวลาต่าง ๆ จากผลการทดลองจะเห็น ในช่วงเริ่มต้น การเกาะติดของเซลล์บนแผ่นเส้นใยขนาดต่าง ๆ รวมทั้ง TCP ที่เวลา 6 ชั่วโมง ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเวลาเพิ่มขึ้นเป็น 3 และ 7 วัน จะพบว่าในภาพรวมเส้นใยที่มีขนาดเล็กกว่ามีแนวโน้มจะทำให้เซลล์เพิ่มปริมาณได้มากกว่า ซึ่งอาจจะเป็นผลมาจากพื้นที่ผิวที่ทำให้เซลล์ยึดเกาะของเส้นใยขนาดเล็กมีมากกว่าเส้นใยขนาดใหญ่ อย่างไรก็ตามเมื่อเส้นใยมีขนาดประมาณ 5 ไมโครเมตร เราพบว่าเซลล์มีการเพิ่มจำนวนสูงกว่าเส้นใยขนาดอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญ โดยมีปริมาณเกือบเทียบเท่ากับชุดควบคุม TCP ซึ่งอาจจะเป็นผลมาจากการที่ขนาดรูพรุนระหว่างเส้นใยมีขนาดใหญ่ ทำให้เซลล์สามารถเคลื่อนย้ายเข้าไปเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนได้มากกว่าเส้นใยขนาดเล็กที่จำกัดให้เซลล์เพิ่มจำนวนเฉพาะที่พื้นผิวด้านบนสุดของแผ่นเส้นใยเท่านั้น นอกจากนี้รูพรุนที่ใหญ่ขึ้นนี้อาจช่วยให้เซลล์บางส่วนแทรกตัวเข้าไปอยู่ด้านในของแผ่นเส้นใยในขั้นตอนการ seed เซลล์แล้ว ทั้งนี้ในผู้วิจัยยังอยู่ระหว่างการการศึกษาลักษณะของเซลล์จาก SEM และการกระจายตัวของเซลล์ในแผ่นเส้นใยเพิ่มเติมเพื่อให้ผลงานมีความสมบูรณ์เพียงพอ



รูปที่ 2.11 แสดงปริมาณเซลล์ L929 บนแผ่นเส้นใย PCL ทั้งสี่ขนาดที่เวลาต่าง ๆ

สรุปผลการทดลอง

เส้นใย PCL มีความเหมาะสมสำหรับนำไปพัฒนาเป็นโครงร่างเทียมในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ ผลการศึกษาเบื้องต้นบ่งชี้ว่าขนาดเส้นใยมีผลต่อการเกาะติดและการเพิ่มจำนวนของเซลล์

2.4 การศึกษาการเตรียมเส้นใยเจลลาตินสำหรับใช้ในทางการแพทย์

เตรียมสารละลายเจลาติน ชนิด A (MW 100 kDa) และชนิด B (MW 100 kDa) ละลายในกรดฟอร์มิก (98%, Carlo Erba reagent) ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 2.5 ถึง 60 %w/v จากนั้นนำสารละลายเจลาติน ที่เตรียมได้ใส่ในกระบอกเข็มฉีดยา ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใช้เข็มปลายตัดเบอร์ 23 ต่อกับขั้วศักย์ไฟฟ้าแรงสูง จากเครื่องกำเนิดศักย์ไฟฟ้าแรงสูง (Gamma High Voltage Model : ES30P – 5W, USA) โดยให้ปลายเข็มห่างจากอุปกรณ์รับเส้นใยที่หมุนได้ 20 เซนติเมตร นำเส้นใยที่ได้ไปศึกษาสัณฐานวิทยาด้วย SEM

ในการศึกษาผลของความต่างศักย์ไฟฟ้าต่อขนาดเส้นใยจะทำการปั่นสารละลายเจลาตินความเข้มข้น 15 และ 25 %w/v ที่ศักย์ไฟฟ้า 10, 15, 20 และ 25 กิโลโวลต์

ในการศึกษาผลของความเข้มข้นของสารละลายต่อขนาดเส้นใยจะทำการปั่นสารละลายเจลาตินความเข้มข้น 15 และ 25 %w/v ที่ศักย์ไฟฟ้า 10, 15, 20 และ 25 กิโลโวลต์

ผลการทดลอง

1. ผลของความต่างศักย์ไฟฟ้าต่อขนาดเส้นใย

รูปที่ 2.12 แสดงขนาดของเส้นใยเจลาตินชนิด A และ B ที่ได้จากการปั่นสารละลายเจลาตินความเข้มข้น 25 %w/v ที่ศักย์ไฟฟ้า 10, 15, 20 และ 25 กิโลโวลต์ เส้นใยที่ได้มีลักษณะผิวเรียบ ไม่มีเม็ดบิด มีความสม่ำเสมอค่อนข้างดี โดยเส้นใยเจลาตินชนิด A มีขนาดประมาณ 190-300 นาโนเมตร และเส้นใยเจลาตินชนิด B มีขนาดประมาณ 130-190 นาโนเมตร ผลการทดลองนี้แม้จะบ่งชี้ว่าศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ไม่มีผลที่ชัดเจนต่อขนาดเส้นใยที่ได้ อย่างไรก็ตามขนาดเส้นใยที่เตรียมที่ความต่างศักย์ไฟฟ้าในช่วง 15-20 กิโลโวลต์มีขนาดเล็กกว่าช่วงความต่างศักย์อื่น จึงเลือกใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 20 กิโลโวลต์ สำหรับการทดลองการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารละลายเจลาติน ต่อไป

2. ผลของความเข้มข้นของสารละลายเจลาตินต่อขนาดและลักษณะเส้นใยที่ได้

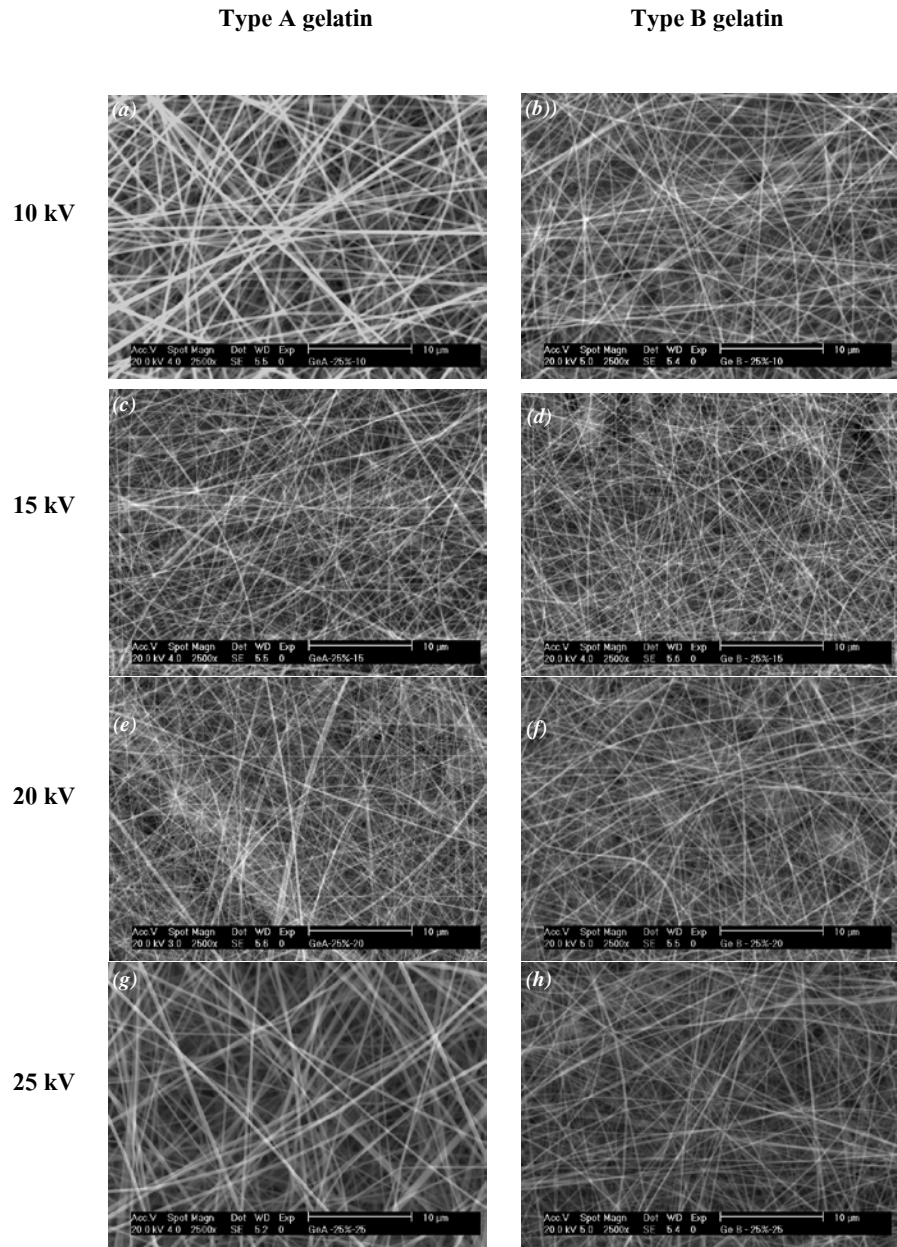
เมื่อทำการปั่นเส้นใยจากสารละลายเจลาตินชนิด A และ B ความเข้มข้นตั้งแต่ 2.5 - 70 %w/v โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าเท่ากับ 20 กิโลโวลต์ พบว่าเส้นใยและวัสดุที่ได้มีลักษณะและขนาดดังแสดงไว้ในตารางที่ 2.6 รูปที่ 2.13 และรูปที่ 2.14

ผลการศึกษาพบว่าสำหรับสารละลายเจลาตินชนิด A การปั่นเส้นใยจากสารละลายความเข้มข้น 2.5-5% จะไม่พบเส้นใย แต่ปรากฏ *sub microparticles* กระจายอยู่ทั่วไป เนื่องจากที่ความเข้มข้นช่วงดังกล่าวการเกี่ยวพันของสายโซ่พอลิเมอร์ยังมีไม่เพียงพอที่จะยึดลำพอลิเมอร์ไว้ให้เป็นเส้นใยได้ การดึงยึดจากแรงผลักรังสีประจุไฟฟ้า เป็นผลทำให้เกิดเป็นหยดสารละลายออกมา เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 7.5 - 15% พบว่า มีเส้นใยผสมเม็ดบิดเกิดขึ้น โดยเส้นใยที่เชื่อมต่อระหว่างเม็ดบิด จะมีขนาดเล็กมาก เนื่องจากในช่วงความเข้มข้นดังกล่าวการเกี่ยวพันของสายโซ่พอลิเมอร์มีเพิ่มมากขึ้น จนเพียงพอที่จะยึดลำพอลิเมอร์เหลวไว้ด้วยกันแต่ยังไม่มากพอที่จะยับยั้งการเกิด Capillary instability บนลำเส้นใย ซึ่งทำให้เกิดการยืดตัวออกเป็นช่วง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นมากขึ้น จนถึง 50% จะได้เส้นใยที่มีลักษณะเรียบเป็นสายยาวต่อเนื่องที่ไม่มีเม็ดบิด เนื่องจากความหนืดของสารละลายเจลาตินอยู่ในช่วงที่เหมาะสม โดยขนาดเส้นใยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นจนถึง 60-70% เส้นใยที่ได้จะมีลักษณะแบน คล้ายริบบิ้นอย่างชัดเจน ซึ่งอาจเกิดเนื่องจากการระเหยออกอย่างรวดเร็วของตัวทำละลายในขณะที่เกิดการยืดเป็นเส้นใยก่อนจะถึงที่เก็บเส้นใย นอกจากนี้เราพบว่า ผลของความเข้มข้นของสารละลายต่อขนาดและลักษณะเส้นใยที่เตรียมได้ของเจลาตินชนิด B เป็นไปใน

ลักษณะเดียวกันกับกัลป์เจลาตินชนิด A ที่ได้วิจารณ์ไปแล้ว โดยช่วงความเข้มข้นที่เกิดเส้นใยลักษณะต่าง ๆ อาจแตกต่างจากเจลาตินชนิด A บ้าง

วิธีการทดลอง

ซึ่งผลการทดลองจะเห็นได้ชัดว่าขนาดของเส้นใยจะเพิ่มขึ้นตามการเพิ่มความเข้มข้นของสารละลาย โดยเส้นใยที่สามารถผลิตได้ในช่วงความเข้มข้นสารละลายเจลาตินประมาณ 20% - 50% มีขนาดเส้นใยประมาณ 150 นาโนเมตร ถึง ประมาณ 1,000 นาโนเมตร

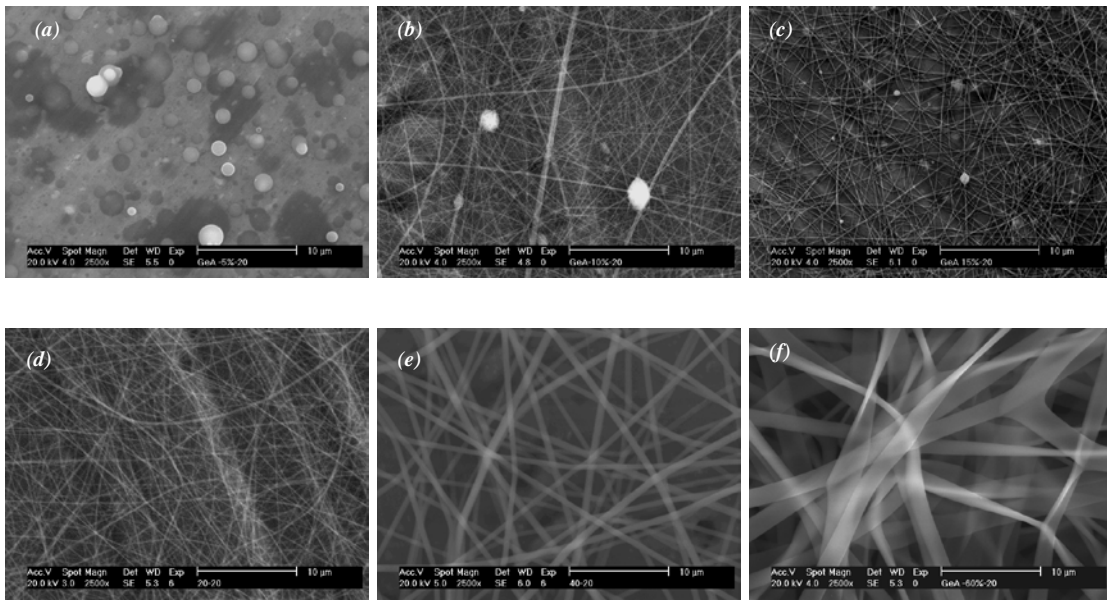


รูปที่ 2.12 ผลของความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ให้ต่อขนาดของเส้นใยที่ได้จากการปั่นสารละลายเจลาติน A และ B ที่ความเข้มข้น 25 %w/v

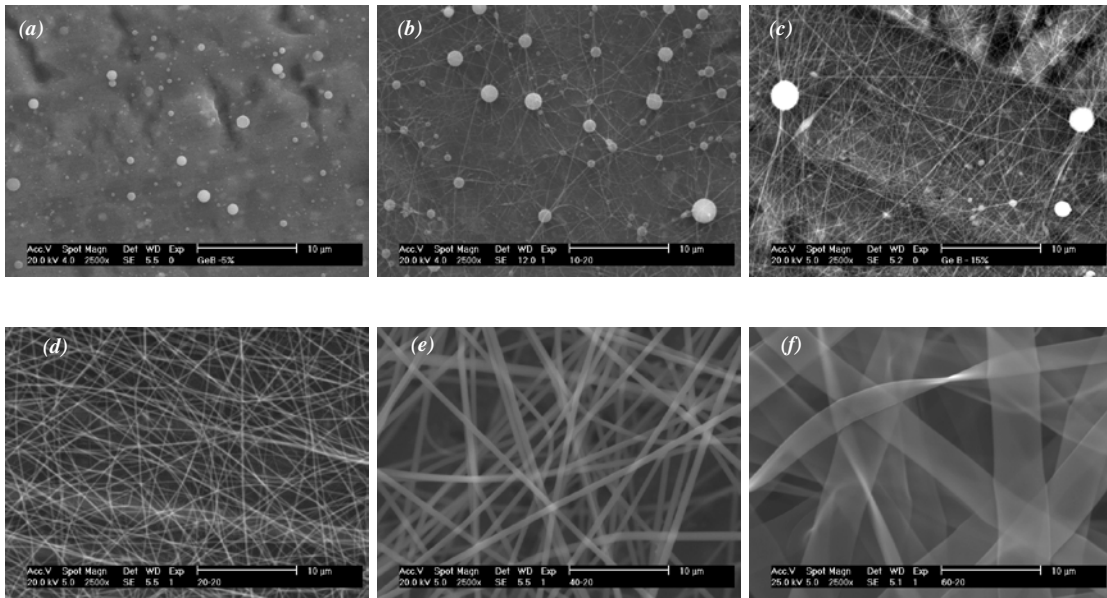
ตารางที่ 2.6 สรุปผลของความเข้มข้นของสารละลายต่อลักษณะและขนาดของเส้นใยเจลาตินชนิด A และ B ที่ปั่นที่ความต่างศักย์ 20 กิโลโวลต์

Concentration (%w/v)	Morphology of Obtained Structure	Size (nm)			
		Particle/Bead on Fiber		Fiber	
		Average	SD	Average	SD
Gelatin Type A					
2.5	Particle	667	309	-	-
5.0	Particle	435	243	-	-
7.5	Bead on string	675	205	52	10
10.0	Bead on string	670	263	98	24
12.5	Bead on string	737	157	132	33
15.0	Bead on string	1,370	773	75	24
20.0	Fiber	-	-	124	29
25.0	Fiber	-	-	143	49
30.0	Fiber	-	-	252	107
40.0	Fiber	-	-	593	109
50.0	Fiber	-	-	898	244
60.0	Fiber (ribbon)	-	-	1,507	303
70.0	Fiber (ribbon)	-	-	1,954	494
Gelatin Type B					
5.0	Particle	431	202	-	-
7.5	Particle	2,525	608	-	-
10.0	Bead on string	561	292	73	24
12.5	Bead on string	1,218	592	100	23
15.0	Bead on string	1,180	754	117	27
20.0	Fiber	-	-	149	21
25.0	Fiber	-	-	128	24
30.0	Fiber	-	-	226	58
40.0	Fiber	-	-	616	134
50.0	Fiber (ribbon)	-	-	997	187
60.0	Fiber (ribbon)	-	-	4,373	622

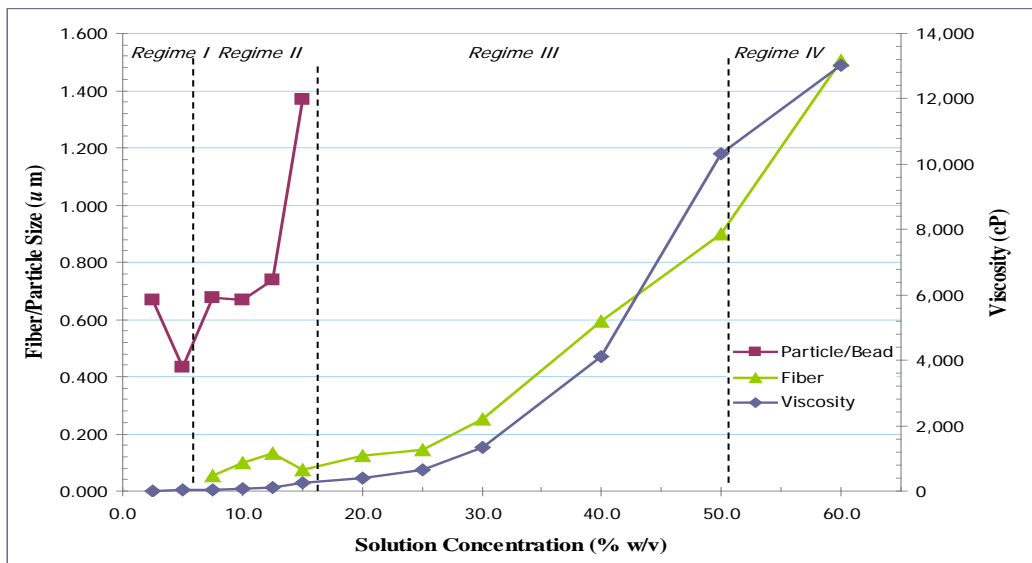
Type A gelatin fibers



Type B gelatin fibers



รูปที่ 2.13 ผลของความเข้มข้นสารละลายต่อลักษณะและขนาดของเส้นใยเจลาตินชนิด A และ B ที่ปั่นที่ความต่างศักย์ 20 กิโลโวลต์ (a) 5%, (b) 10%, (c) 15%, (d) 20%, (e) 40% และ (e) 60%



รูปที่ 2.14 ผลของความเข้มข้นสารละลายต่อความหนืด ลักษณะและขนาดของเส้นใยเจลาตินชนิด A ที่ปั่นที่ความต่างศักย์ 20 กิโลโวลต์

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาเตรียมเส้นใยเจลาตินชนิด A และ B ในตัวละลายกรดฟอร์มิกด้วยกระบวนการปั่นไฟฟ้าสถิตพบว่า ภายใต้สภาวะการทดลองที่ใช้การเปลี่ยนแปลงความต่างศักย์ไฟฟ้า จะพบว่าไม่มีผลอย่างชัดเจนต่อขนาดของเส้นใย และเมื่อทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้น พบว่า ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 5% มีอนุภาคระดับซัพไมครอนเกิดขึ้น เมื่อความเข้มข้นสูงกว่า 5% จนถึง 15% จะเกิดเส้นใยที่มีขนาดเล็ก เชื่อมต่อระหว่างเม็ดปิด และเมื่อความเข้มข้นสูงเกินกว่า 15% เกิดเส้นใยระดับนาโนที่ไม่มีเม็ดปิด และขนาดของเส้นใยจะเพิ่มมากขึ้นตามความเข้มข้นของสารละลายที่เพิ่มขึ้น และในความเข้มข้นที่สูงถึง 60% (สำหรับเจลาตินชนิด A) และ 50% (สำหรับเจลาตินชนิด B) เส้นใยที่เกิดขึ้นจะมีลักษณะเป็นเส้นแบน คล้ายริบบิ้น ทั้งนี้ขนาดเส้นใยแบบไม่มีปิดที่เตรียมได้อยู่ในช่วงประมาณ 150-1,000 นาโนเมตร ทั้งนี้ขนาดของอนุภาคและเส้นใยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามการเพิ่มของความเข้มข้นของสารละลาย

ผลจากการศึกษานี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในการเตรียมเส้นใยเจลาติน เพื่อการประยุกต์ใช้ในการทางการแพทย์และวิศวกรรมเนื้อเยื่อในอนาคต

(หมายเหตุ ผู้วิจัยและคณะได้ทำการศึกษถึงการเชื่อมขวางเส้นใยที่ได้ด้วยเทคนิคต่าง ๆ เพิ่มเติม และได้รวบรวมเนื้อหาทั้งสองส่วนเข้าด้วยกันเพื่อตีพิมพ์บทความตามเอกสารแนบที่ 1)

บทที่ 3

บทสรุป

ผลการศึกษาในส่วนงานต่าง ๆ ทั้งสามส่วน สามารถสรุปได้ดังนี้

1. สามารถหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมเส้นใย PCL ให้มีขนาดในช่วงต่าง ๆ กันตามที่ต้องการได้ โดยการเลือกระบบตัวทำละลาย ความเข้มข้น ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ ระยะเวลาจัดเก็บเส้นใย รวมถึงน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ที่เหมาะสม อาทิ การเตรียมเส้นใย PCL ให้มีขนาดในช่วงต่างกันตั้งแต่ประมาณ 0.160-0.20 1.00-1.500 2.00-2.50 หรือ 4.50-5.00 ไมโครเมตร ซึ่งความสามารถดังกล่าวจะช่วยให้สามารถพัฒนาโครงร่างเนื้อเยื่อเทียมจาก PCL ที่มีโครงสร้าง สมบัติเชิงกล อัตราการย่อยสลาย ตามความต้องการเฉพาะได้
2. ผลการศึกษาการความเป็นพิษเบื้องต้นและการเกาะติดของเซลล์ทดสอบพบว่าเส้นใยที่เตรียมได้ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ทดสอบ โดยขนาดเส้นใยมีผลต่อการเกาะติดและการกระจายตัวของเซลล์ในชิ้นงาน
3. ความเข้มข้นของสารละลายมีผลต่อขนาดและลักษณะของเส้นใยเจลาตินชนิด A และ B ที่ได้มาก ภายใต้อุปกรณ์การผลิตที่เหมาะสม เราสามารถเตรียมได้ตั้งแต่อนุภาคนาโนขนาดซับไมครอน และเส้นใยขนาดตั้งแต่ในช่วง 0.15 – มากกว่า 4.0 ไมโครเมตรได้ ซึ่งเส้นใยเจลาตินนี้จะมีประโยชน์ต่อการพัฒนาโครงร่างเนื้อเยื่อเทียมและการประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์อื่นได้ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. J. Doshi and D. H. Reneker, Proceeding of IEEE-Industry Applications Society, 1993 Annual Meeting, Toronto, Canada, 1698, 1993
2. J. Doshi, Ph.D. Dissertation, The University of Akron, 1994
3. R. Rangkupan, Ph.D. Dissertation, The University of Akron, 1994
4. A. Franot, I. S.Chronakis, Current Opinion in Colloid and Interface Science, **8**, 64, 2003
5. Huang, Z. M., Y.Z. Zhang, M. Kotaki, S. Ramakrishna, Composites Science and Technology, **63**, 2223, 2003
6. L. Wenxia, et al., The Fiber Society Fall Technical Meeting: Book of Abstracts -Poster, October, Natick, MA,43, 2002
7. H. Schreuder-Gibson and P. Gibson, The Fiber Society Fall Technical Meeting: Book of Abstracts-Poster, October, Natick, MA, 51 ,2002
8. G. Verreck, I. Chun, J. Rosenblatt, J. Peeters, A. van Dijek, J. Mensch, M. Noppe, and M.E. Brewster, Journal of Controlled Release, **92**, 349, 2003
9. A. Leo, An MIT Enterprise Technology Review, www.mit.edu, March 20, 2002
10. เอกสารแนะนำสถาบัน แผนปฏิบัติการและแผนการพัฒนาเทคโนโลยี ของ Institute of Soldier Nanotechnologies
11. Kin Sung-jin, Nanofiber development plan unveiled, The Korea Times Info-Tech, November 07, 2001
12. A. Atala and D. J. Mooney, Editors, Synthetic Biodegradable Polymer Scaffolds, Birkhäuser, Boston, 1997
13. K. Kim, Y. K. Luu, C. Chang, D. Fang, B.S. Hsiao, B. Chu,, M. Hadjiargyrou, Journal of Controlled Release, **98**, 47, 2004
14. B.M. Min, G. Lee, S. H. Kim, Y. S. Nam, T. S. Lee, W. H. Park, Biomaterials, **25**, 1289, 2004
15. B.M. Min, L. Jeong, Y. S. Nam, J. M. Kim, J. Y. K., W. H. Park, International Journal of Biological Macromolecules, **34**, 223, 2004
16. C. H. Lee, H. J. Shin, I. H. Cho, Y.M. Kanga, I. A. Kim,K.D. Park, J.W. Shin, Biomaterials, **26** , 1261, 2005
17. X.M. Mo, C.Y. Xu, , M. Kotaki, S. Ramakrishna, Biomaterials, **25** , 1883, 2004
18. H. Yoshimoto, Y.M. Shin , H. Terai, J.P. Vacanti, Biomaterials, **24**, 2077, 2003
19. สิริอร พวงมาลี, วิชชุพร อุทก, Biomedical in electrospinning of Nanofibers: Preparation and Characterization of PCL Fibers for Wound Dressing, โครงการงานพิเศษระดับวิทยาศาสตร์บัณฑิต สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ 2546
20. J.L. Lowery, N.Datta, G.C. Rutledge, Biomaterials 31 (2010) 491–504.
21. J.H. Kim, P.H. Choung, I.Y. Kim, K.T. Lim, H.M. Son, Y.H. Choung, C.S. Cho, J.H. Chung, Materials Science and Engineering C 29 (2009) 1725–1731

ผลผลิตที่ได้จากโครงการ

1. วิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท 1 ฉบับ เรื่อง “การเตรียมเส้นใยเจลาตินโดยการปั่นแบบไฟฟ้าสถิตและการเชื่อมขวางแผ่นเส้นใยเจลาตินด้วยวิธีต่างๆ” นักศึกษาผู้ทำการวิจัย: นางสาวหทัยรัตน์ จีระธวัชชัย ภาควิชา วิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2550 อาจารย์ที่ปรึกษา: รศ. ดร. ศิริพร คำรงค์ศักดิ์กุล, ดร. รัฐพล รังกูพันธุ์
2. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติที่ได้รับทุนสนับสนุนจาก สกว. ภายใต้โครงการนี้จำนวน 1 ฉบับ Influences of physical and chemical crosslinking techniques on electrospun type A and B gelatin fiber mats, **International Journal of Biological Macromolecules**, Volume 47, Issue 4, 1 November 2010, Pages 431-438 (ภาคผนวก 1)
3. การสร้างเครือข่ายงานวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาด้าน Biomedical engineering โดยมีผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติที่ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากแหล่งทุนอื่นจำนวน 2 ฉบับ (ภาคผนวก 2 และ 3)

ภาคผนวก

ภาคผนวก 1

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติที่ได้รับทุนสนับสนุนจาก สกว. ภายใต้โครงการนี้จำนวน 1 ฉบับ

Influences of physical and chemical crosslinking techniques on electrospun type A and B gelatin fiber mats, **International Journal of Biological Macromolecules**, Volume 47, Issue 4, 1 November 2010, Pages 431-438 (IF 2.502)

ภาคผนวก 2

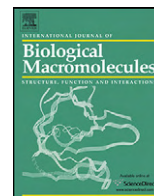
ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติที่ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากแหล่งทุนอื่นภายใต้
เครือข่ายงานวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาด้าน Biomedical engineering ฉบับที่ 1

Preparation of Thai silk fibroin/gelatin electrospun fiber mats for controlled release applications, *International Journal of Biological Macromolecules*, Volume 46, Issue 5, 1 June 2010, Pages 544-550 (IF = 2.502)

ภาคผนวก 3

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติที่ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากแหล่งทุนอื่นภายใต้
เครือข่ายงานวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาด้าน Biomedical engineering ฉบับที่ 2

Coating of Polyelectrolyte Multilayer Thin Films on Nanofibrous Scaffolds to Improve Cell Adhesion, **Journal of Applied Polymer Science**, Vol. 114, 1574–1579 (2009) (IF= 1.240)



Influences of physical and chemical crosslinking techniques on electrospun type A and B gelatin fiber mats

Juthamas Ratanavaraporn^a, Ratthapol Rangkupan^{b,c,**}, Hathairat Jeeratawatchai^a, Sorada Kanokpanont^a, Siriporn Damrongsakkul^{a,d,*}

^a Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Chulalongkorn University, PhayaThai Road, Pathumwan, Bangkok 10330, Thailand

^b Metallurgy and Materials Science Research Institute, Chulalongkorn University, PhayaThai Road, Bangkok 10330, Thailand

^c Center of Innovative Nanotechnology, Chulalongkorn University, PhayaThai Road, Bangkok 10330, Thailand

^d Plasma Technology and Nuclear Fusion Research Unit, Chulalongkorn University, PhayaThai Road, Bangkok 10330, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 April 2010

Received in revised form 16 June 2010

Accepted 21 June 2010

Available online 14 July 2010

Keywords:

Gelatin

Fiber

Electrospinning

Physical crosslinking

Chemical crosslinking

ABSTRACT

This work has investigated the factors influencing the production of electrospun gelatin fibers including electrical potential and concentration of gelatin solution. Electrospun gelatin fibers were prepared from both type A and B gelatin solutions at the concentration of 2.5–60% w/v and 10–25 kV. Concentration of gelatin solution at 20–40% w/v was found to be the optimized range to produce the gelatin fibers with smooth surface throughout the fiber length. The electrical potential did not exhibit a dominant effect on the gelatin fibers obtained. Further study of the different crosslinking techniques for the gelatin fiber mats showed the various effects on the crosslinking degrees and fiber structure. Physical crosslinking such as dehydrothermal treatment, plasma treatment and their combination resulted in low crosslinking extent of gelatin fiber mats due to the crosslinking occurring only at the surface of the material. Combination of dehydrothermal and chemical crosslinking using 1-ethyl-3-(3-dimethylamino propyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) or glutaraldehyde (GA) indicated higher crosslinking degree since both the surface and the bulk of the material were crosslinked. Spraying/immersion in EDC solution, a modified technique, resulted in swollen fibers while interconnected pores remained. Merged fibers were obtained from the crosslinking by GA vapor. We concluded that crosslinking is one of the key methods to control structure and degradation of the gelatin fiber mats. Various structures of gelatin fiber mats are expected to be useful for numerous applications.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Electrospun fiber mat has emerged as a useful platform for various advanced application developments in many fields especially in biomedical application, for example as a media for drug delivery system, smart wound dressing material, and artificial scaffold for tissue engineering [1–4]. During the past few years, numerous biopolymers, more specifically, synthetic polymers such as poly(lactide), poly(glycolic acid), poly(caprolactone), and poly(ethylene glycol), naturally derived biopolymers such as collagen, silk fibroin, alginate, gelatin and chitin and a blend of various biocompatible polymer pairs, have been under extensive investigation for their processing characteristics and the influence of the obtained fibrous media on cellular activ-

ities of several cell lineage [5–8]. Results indicated promising use of electrospun fiber mat as an artificial scaffold for tissue engineering and controlled release applications [9]. Despite its advantages and potential, the electrospun fiber of some biopolymers still is constrained by fast degradation, total dissolution, or mediocre mechanical properties. Thus, further treatment to improve these drawbacks such as crosslinking is required. The treatment can improve not only the water-resistant ability but also the thermo-mechanical performance of the treated nanofiber, leading to an enhanced mechanical strength. Crosslinking can be performed via several methods including physical crosslinking such as dehydrothermal treatment (DHT), plasma treatment and ultraviolet (UV) treatment, and chemical crosslinking by some crosslinking agents such as glutaraldehyde (GA) and 1-ethyl-3-(3-dimethylamino propyl) carbodiimide hydrochloride (EDC). Generally, physical treatment results in a low crosslinking degree because the reaction occurs only at the surface of the materials. Chemical treatment provides a higher extent of crosslinking but sometimes changes the material structure [10]. Selection of suitable crosslinking technique for the electrospun nanofiber

* Corresponding author. Tel.: +66 2 218 6862; fax: +66 2 218 6877.

** Corresponding author.

E-mail addresses: ratthapol.r@chula.ac.th (R. Rangkupan), siriporn.d@chula.ac.th (S. Damrongsakkul).

Table 1
Groups of gelatin fiber mats treated with various physical and chemical crosslinking techniques.

Group	Crosslinking technique	Name
1	Dehydrothermal	DHT
2	Pulsed inductively coupled plasma (PICP)	PLAS
3	Dehydrothermal followed by PICP technique	DHT/PLAS
4	Dehydrothermal followed by immersion in EDC/NHS in water	DHT/EDCw
5	Dehydrothermal followed by immersion in EDC/NHS in absolute ethanol	DHT/EDCe
6	Dehydrothermal followed by spraying and immersion in EDC/NHS in water	DHT/sEDCw
7	Dehydrothermal followed by spraying and immersion in EDC/NHS in absolute ethanol	DHT/sEDCe
8	Dehydrothermal followed by incubation in vapor of glutaraldehyde (GA)	DHT/vGA

mats is then necessary in order to reach the aim of a particular application.

In this study, gelatin, a protein derived from partial hydrolysis of collagen, was chosen to prepare the electrospun fiber mat because of its wealth of merits such as biological origin, biocompatibility, bioresorbability, non-immunogenicity, biodegradability and commercial availability. Generally, gelatin is divided, based on the production process, into 2 types: A and B. Type A gelatin is produced from an acid process while type B gelatin is obtained from an alkaline process. Different processes lead to differences in the isoelectric point (*pI*) and the pH of gelatin. Because gelatin is water soluble and mechanically weak, its electrospun mat must be crosslinked, especially for use in biomedical implants. The techniques widely used to crosslink gelatin are DHT, GA and EDC [11–13]. Electrospun gelatin fiber mats were reported to be successively crosslinked by GA vapor and could be used as carriers for drug delivery [14,15].

This work aimed to study the influences of various crosslinking techniques on the degradation rate of electrospun type A and type B gelatin fiber mats. The crosslinking techniques included physical methods, i.e. DHT, plasma, and combined methods of DHT and chemicals such as EDC and GA. The electrical potential and the concentration of gelatin solution which are factors influencing the structure of electrospun type A and B gelatin fibers were also investigated.

2. Experimental procedures

2.1. Materials

Type A (*pI* 9) and type B (*pI* 5) gelatin were purchased from Nitta Gelatin Inc. (Osaka, Japan). Glutaraldehyde solution was procured from Ajax Finechem (New Zealand). N-hydroxysuccinimide (NHS) and 1-ethyl-3-(3-dimethylamino propyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) were obtained from Nacalai tesque (Kyoto, Japan). All reagents used were analytical grade.

2.2. Electrospinning

The gelatin solution was prepared by dissolving gelatin in formic acid at various concentrations (2.5–60% w/v for type A gelatin and 5–60% w/v for type B gelatin). For electrospinning, the gelatin solution in a 10 ml-syringe was delivered into a blunted medical needle spinneret (ID 0.6 mm). A polarity reversible high voltage power supply was used to charge the spinning dope of gelatin by directly clamping one electrode to the metal needle spinneret, and another to an aluminum foil wrapped on a roller. The distance between the needle tip and the aluminum foil was set at 20 cm. An electric potential was controlled between 10 and 25 kV. The gelatin fiber mats obtained after 24 h of electrospinning were air-dried and then transferred to a desiccator prior to further investigations.

2.3. Viscosity and conductivity of gelatin solutions

The viscosities and conductivities of the gelatin solutions in formic acid at various concentrations were measured by a viscometer (DV-II+, Brookfield, USA) and an electric conductivity meter (LC116, Mettler, Toledo, USA), respectively.

2.4. Morphological observation

The shape and size of the electrospun gelatin fibers were examined under a scanning electron microscope (SEM, Phillip Model, Japan) with an accelerating voltage of 10–20 kV. The average diameter (\pm SD) was randomly estimated from 100 fibers. All of the samples were sputter-coated with gold prior to SEM observation.

2.5. Crosslinking of gelatin fiber mats

Both type A and B gelatin fiber mats were cut into sizes of 5 cm \times 5 cm and divided into 8 groups for various crosslinking methods using the physical and chemical treatments summarized in Table 1. In brief, the first three groups were crosslinked via physical techniques while the combination of physical and chemical treatments was applied to the other five groups. Group #1 was crosslinked by dehydrothermal treatment at 140 °C for 48 h (DHT). The gelatin fiber mats in group #2 were crosslinked by pulsed inductively coupled plasma (PICP) treatment under argon gas (Ar) at a pressure of 5 Pa and for 1 pulse (PLAS). The details of PICP treatment were reported elsewhere [16,17]. Group #3 was the DHT treated gelatin fiber mats that were further crosslinked via PICP technique at the same conditions described for group #2 (DHT/PLAS). Groups #4 and #5 were the DHT treated gelatin fiber mats (group #1) that were further crosslinked by immersion into 14 mM EDC/5.5 mM NHS for 2 h in water (DHT/EDCw) and in absolute ethanol (DHT/EDCe), respectively. Group #6 was treated similar to group #4 except that the fiber mat was sprayed with 14 mM EDC/5.5 mM NHS in water and left to dry for 5 cycles before immersion in the same EDC solution for 2 h (DHT/sEDCw) [10]. Group #7 was treated by the same method as for group #6 but the EDC/NHS in absolute ethanol was used instead of DHT/sEDCw. After EDC crosslinking, all gelatin fiber mats were washed in phosphate buffered saline (PBS) and deionized water to eliminate the excess of carbodiimide groups. The last group (#8) was the DHT treated gelatin fiber mat that was further incubated in the vapor of GA (0.06% in 75/25 of Acetone/HCl) under dark vacuum at 4 °C for 48 h (DHT/vGA). The GA crosslinked fiber mats were washed with 0.1 M glycine for 1.5 h, followed by deionized water to eliminate the aldehyde residual.

2.6. Determination of crosslinking degree

The determination of crosslinking degree was carried out using a modified TNBS (2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid) method described by Nagai et al. [18]. The concept of this method was to

Table 2

Summary of electrical conductivity and viscosity of type A and B gelatin solution at various concentrations; and morphological appearance and size of the obtained structure electrospun from these solutions at 20 kV applied electrical potential.

Concentration (%w/v)	Electrical conductivity ($\times 10^3$ S)	Viscosity (cP)	Morphology of obtained structure	Size (nm)			
				Particle/Bead on fiber		Fiber	
				Average	SD	Average	SD
Type A gelatin							
2.5	1.67	13	Particle	667	309	–	–
5.0	2.05	23	Particle	435	243	–	–
7.5	2.54	54	Bead on string	675	205	52	10
10.0	3.00	70	Bead on string	670	263	98	24
12.5	3.45	93	Bead on string	737	157	132	33
15.0	3.36	238	Bead on string	1370	773	75	24
20.0	4.10	384	Fiber	–	–	124	29
25.0	4.58	643	Fiber	–	–	143	49
30.0	4.67	1,338	Fiber	–	–	252	107
40.0	4.74	4,131	Fiber	–	–	593	109
50.0	5.25	10,303	Fiber (ribbon)	–	–	898	244
60.0	7.31	13,017	Fiber (ribbon)	–	–	1507	303
Type B gelatin							
5.0	2.31	22	Particle	431	202	–	–
7.5	2.91	40	Particle	2525	608	–	–
10.0	3.41	68	Bead on string	561	292	73	24
12.5	3.85	118	Bead on string	1218	592	100	23
15.0	4.20	173	Bead on string	1180	754	117	27
20.0	4.74	329	Fiber	–	–	149	21
25.0	5.00	599	Fiber	–	–	128	24
30.0	5.14	913	Fiber	–	–	226	58
40.0	5.55	2,042	Fiber	–	–	616	134
50.0	6.15	8,908	Fiber (ribbon)	–	–	997	187
60.0	7.5	27,504	Fiber (ribbon)	–	–	4373	622

quantify the free amide ends of gelatin (which indicate uncrosslinking groups) by their reactions with 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS). Briefly, 5 mg of gelatin sample was weighed into a test tube. 1 ml of 0.5% w/v TNBS solution and 1 ml of 4% w/v sodium hydrogen carbonate (NaHCO_3 , pH 8.5) were added. It was then heated at 40 °C for 2 h. The solution was further treated with 2 ml of 6N HCl at 60 °C for 1.5 h. The absorbance of the solutions was determined at 415 nm after suitable dilution spectrophotometrically. The degree of crosslinking was then calculated using the following equation and the values were expressed as the mean \pm standard deviation ($n = 3$).

$$\text{Crosslinking degree (\%)} = \left(1 - \frac{A_c}{A_n}\right) \times 100$$

where A_c and A_n represent the absorbance of the crosslinked and non-crosslinked gelatin solutions, respectively.

2.7. Degradation tests

The gelatin fiber mats were degraded in PBS containing 0.02 units/ml of Type I collagenase (1 mg = 2.69 units, Sigma, St. Louis, MO) at 37 °C [19]. At 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180 and 210 min after degradation, the remaining gelatin fiber mats were collected by centrifugation and dried in an oven at 60 °C. The dried mats were weighed and calculated for the weight loss using the following equation:

$$\text{Weight loss (\%)} = \frac{W_i - W_t}{W_i} \times 100$$

where W_i and W_t represent the weight of the gelatin fiber mats before and after crosslinking, respectively ($n = 4$).

2.8. Statistical analysis

All statistical calculations were performed using MINITAB (Statistical software, version 13.2, PA, USA). The differences of

the data analyzed using 2 sample *t*-test were considered at $p < 0.05$.

3. Results and discussion

3.1. Electrospinning of gelatin solution

3.1.1. Effect of electric field

Viscosities and conductivities of type A and B gelatin solutions at various concentrations along with morphological appearance and size of structures obtained from electrospinning these solutions at 20 kV applied potential were examined and summarized in Table 2. The viscosities of both gelatin solutions were gradually increased (from around 10 cP to about 600 cP) at low to medium solution concentrations (2.5–25%, w/v) before rising up rapidly at higher concentrations (around 27,000 cP at 60% w/v solution concentration). The conductivities of both gelatin solutions, on the other hand, rose up gradually from around 1.6 mS to around 7.5 mS as the solution concentration increased. Fig. 1 shows the structure of the electrospun type A and B gelatin fibers prepared from 25% w/v solution at various electrical potentials from 10 to 25 kV. Spinning of both types of gelatin solutions at all voltage resulted in smooth fibers without any beads. The diameter of type A gelatin fibers was approximately 190–300 nm while that of type B gelatin fibers was 127–187 nm. However, the electrical potential seemed not to affect the smoothness of gelatin fibers. This observation agrees with the work of Ki et al. in which it was reported that the gelatin nanofibers in the mean size of 76–95 nm prepared by controlling the electric field between 0.75 and 2.5 kV/cm [7].

3.1.2. Effect of solution concentration

Viscoelastic property of polymeric fluid is arguably the most important material parameter needed to be considered in the electrospinning process operation. The viscoelastic force within the polymer charged jet is the key force acting against the Coulombic repulsion which is the main force causing elongation of the jet after

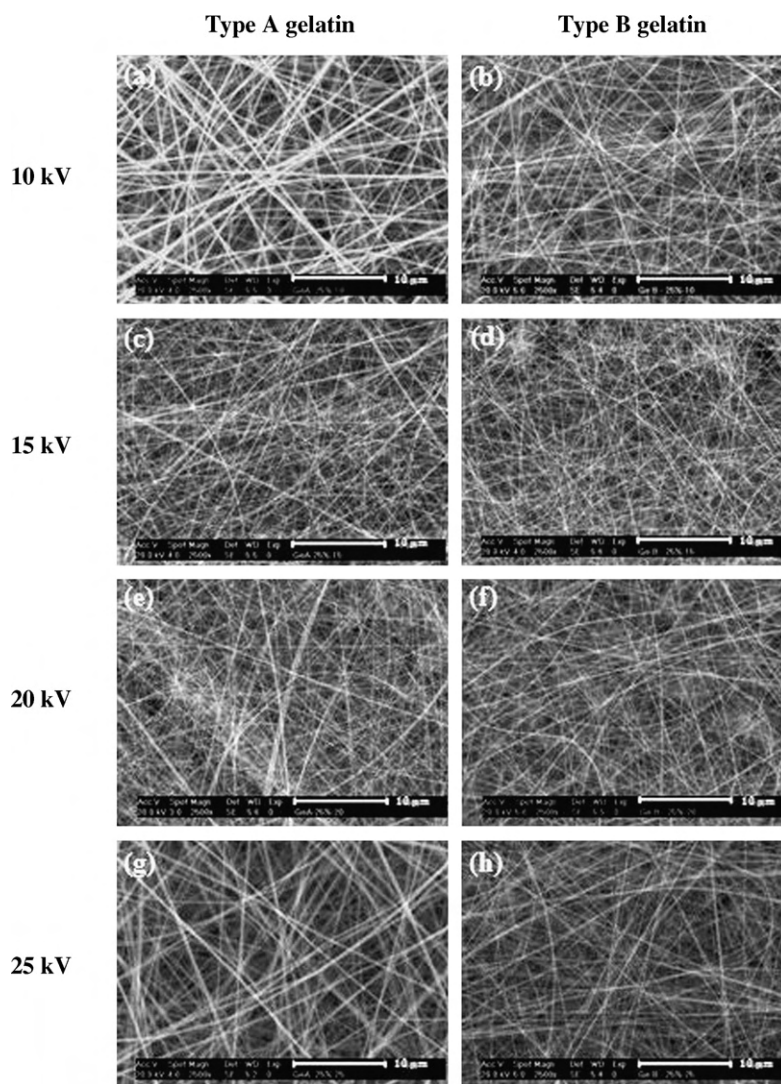


Fig. 1. SEM photographs of electrospun type A and B gelatin fibers prepared from 25% w/v solution at various electrical potentials from 10 to 25 kV (a) type A gelatin at 10 kV, (b) type B gelatin at 10 kV, (c) type A gelatin at 15 kV, (d) type B gelatin at 15 kV, (e) type A gelatin at 20 kV, (f) type B gelatin at 20 kV, (g) type A gelatin at 25 kV and (h) type B gelatin at 25 kV (scale bar = 10 μm).

emission from the Taylor cone apex. While it is impractical to measure the necessary viscoelastic property of the polymer solution during the operation as it continually changes due to the solvent evaporation, a simple measurement of solution viscosity could provide a good indication of spinnability, size and morphology of the structure obtained being fiber or particle. Numerous studies have shown the effect of the solution viscosity on the size of the fiber obtained. In general, the greater the viscosity is, the larger the fiber size will be.

In this study, the effect of gelatin concentration on size and morphology of fiber electrospun at 20 kV applied potential was investigated. The results were summarized in Table 2 and Fig. 2 elucidates the relationship between solution viscosity and size of the structures produced. Based on the morphology of the structure obtained, the process is classified into 4 regimes, i.e. (I) microparticles, (II) particle/bead on fiber, (III) fiber, and (IV) ribbon fiber formation.

In regime I, where the solution concentration was 5% w/v or less, only microparticles and sub-microparticles were found for both types of gelatin solution, as shown in Fig. 2(a). The solution viscosities were also very low which suggested that an entanglement between gelatin molecules at these concentrations was not suffi-

cient to prevent a break up of the charged jet into small droplets via Rayleigh's instability [20].

In regime II, when the range of concentration was approximately 7.5–15% w/v, the combination of beads and fibers was noticed as seen in Fig. 2(b) and (c). As the viscosity of the solution rose, the molecular entanglement of the gelatin chains was also increased to a high enough level to prevent a complete break up of the charged jet, but not high enough to suppress capillary instability to occur, resulting in the formation of bead on the string morphology.

In regime III, where the concentration of both type A and type B gelatin solution was increased to 20–40% w/v, long smooth fibers without beads were obtained as shown in Fig. 2(d) and (e). The viscoelastic force from the entanglement became dominant, and suppressed the capillary instability occurrence resulting in a formation of smooth fiber. The size of the fibers also depended on the concentration, the higher solution concentration produced fibers with larger diameters. The solution concentration in this range should be the most appropriate concentration of gelatin solution for the production of electrospun gelatin fiber at the electrical potential of 20 kV.

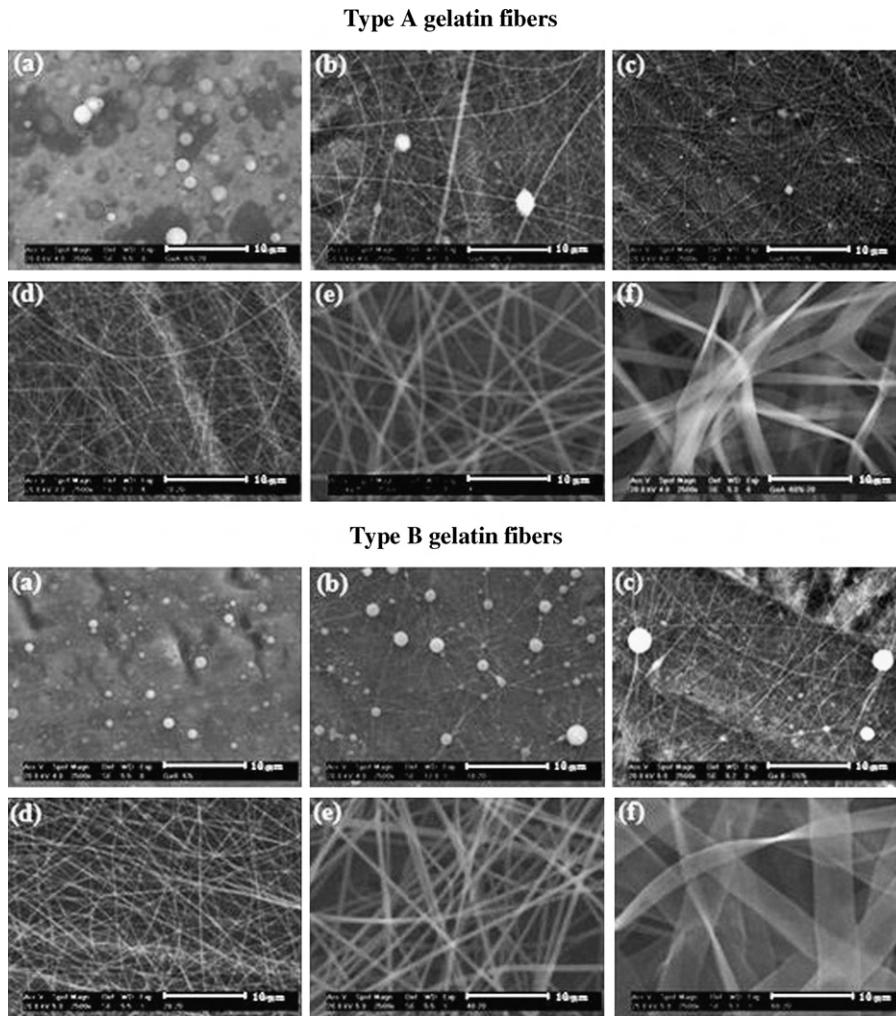


Fig. 2. SEM photographs of electrospun type A and B gelatin fibers prepared from various solution concentrations (a) 5%, (b) 10%, (c) 15%, (d) 20%, (e) 40% and (f) 60% w/v at electrical potential of 20 kV (scale bar = 10 μm).

In regime IV, with the polymer concentration above 40% w/v, ribbon-like fibers of both type A and type B gelatin were generated. As described by Koombhongse et al. [21], this observation might be the result of the rapid evaporation of formic acid from the fibers

before reaching the counter electrode. The surface of those fibers was then solidified and the hollow fibers were obtained instead. The resulting hollow fibers were collapsed, resulting in the ribbon-like fibers.

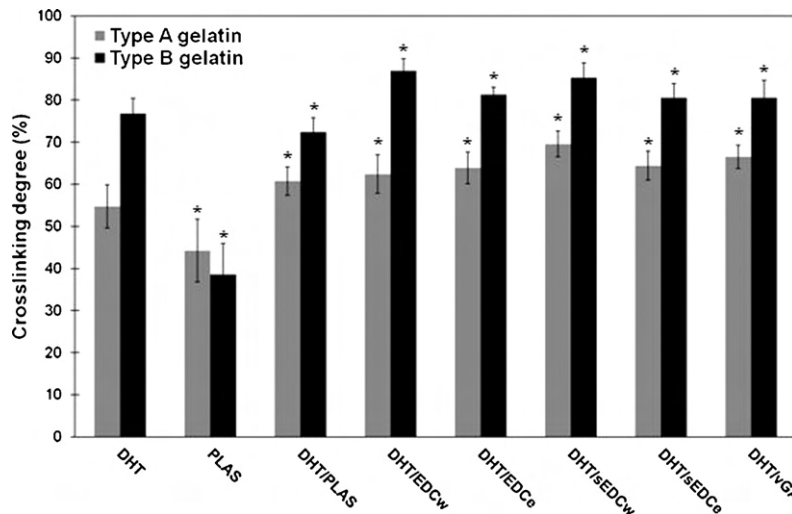


Fig. 3. Crosslinking degrees of electrospun type A and B gelatin fiber mats after crosslinking with different techniques: DHT, PLAS, DHT/PLAS, DHT/EDCw, DHT/EDCe, DHT/sEDCw, DHT/sEDCe and DHT/vGA (*presented significant difference relative to DHT #1 within same gelatin type at $p < 0.05$).

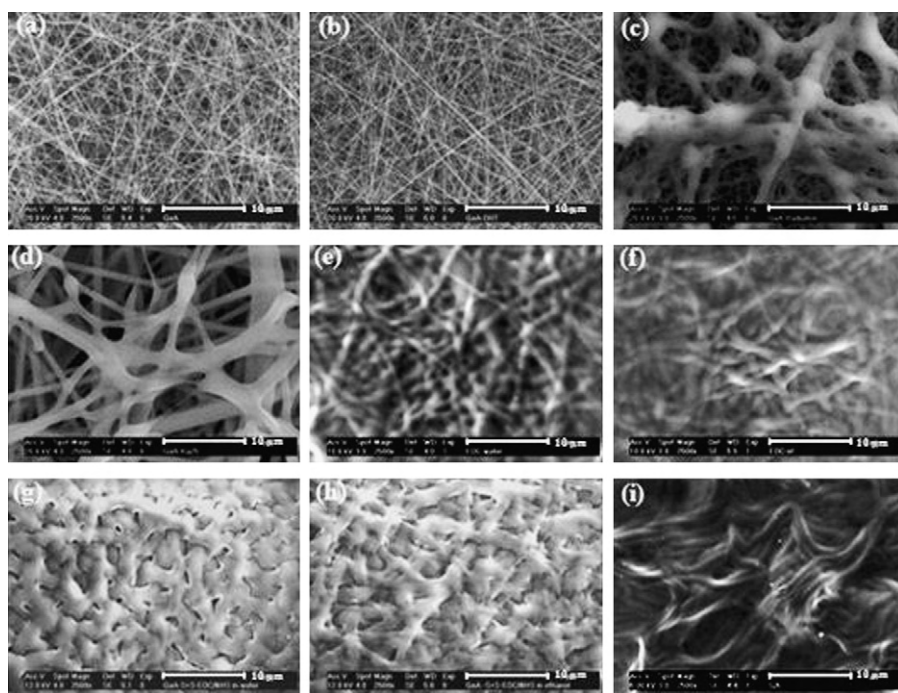


Fig. 4. SEM photographs of electrospun type A gelatin fiber mats before and after crosslinking with different techniques (a) non-crosslinked, (b) DHT, (c) PLAS, (d) DHT/PLAS, (e) DHT/EDCw, (f) DHT/EDCe, (g) DHT/sEDCw, (h) DHT/sEDCe and (i) DHT/vGA (scale bar = 10 μm).

From the study above on electrical potential and gelatin concentration, the electrospun gelatin fibers from 40% w/v at 20 kV were selected for further investigation on the effects of crosslinking methods. As-spun gelatin fibers dissolved quickly in aqueous media, which limited its potential utilization in biomedical applications. Further investigation on the effect of crosslinking methods on degradation time of gelatin electrospun fiber mat were studied using the mat electrospun from 40% w/v gelatin solution at 20 kV.

3.2. Crosslinking of electrospun fiber

3.2.1. Effect of crosslinking methods on degree of crosslinking

In this study, physical treatments (DHT and plasma) and chemical treatments (EDC and GA) were combined to crosslink the gelatin fiber mats. Fig. 3 demonstrates crosslinking degrees of electrospun type A and B gelatin fiber mats after crosslinking with 8 different techniques. For type A gelatin fiber mats, DHT and PLAS treatments yielded a crosslinking degree of 55 and 45%, respectively.

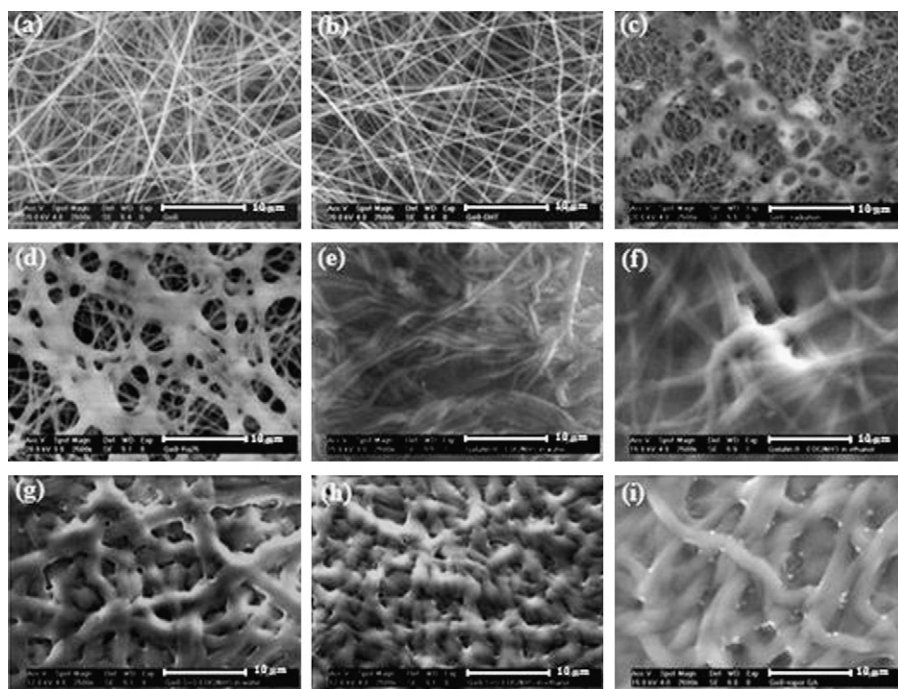


Fig. 5. SEM photographs of electrospun type B gelatin fiber mats before and after crosslinking with different techniques (a) non-crosslinked, (b) DHT, (c) PLAS, (d) DHT/PLAS, (e) DHT/EDCw, (f) DHT/EDCe, (g) DHT/sEDCw, (h) DHT/sEDCe and (i) DHT/vGA (scale bar = 10 μm).

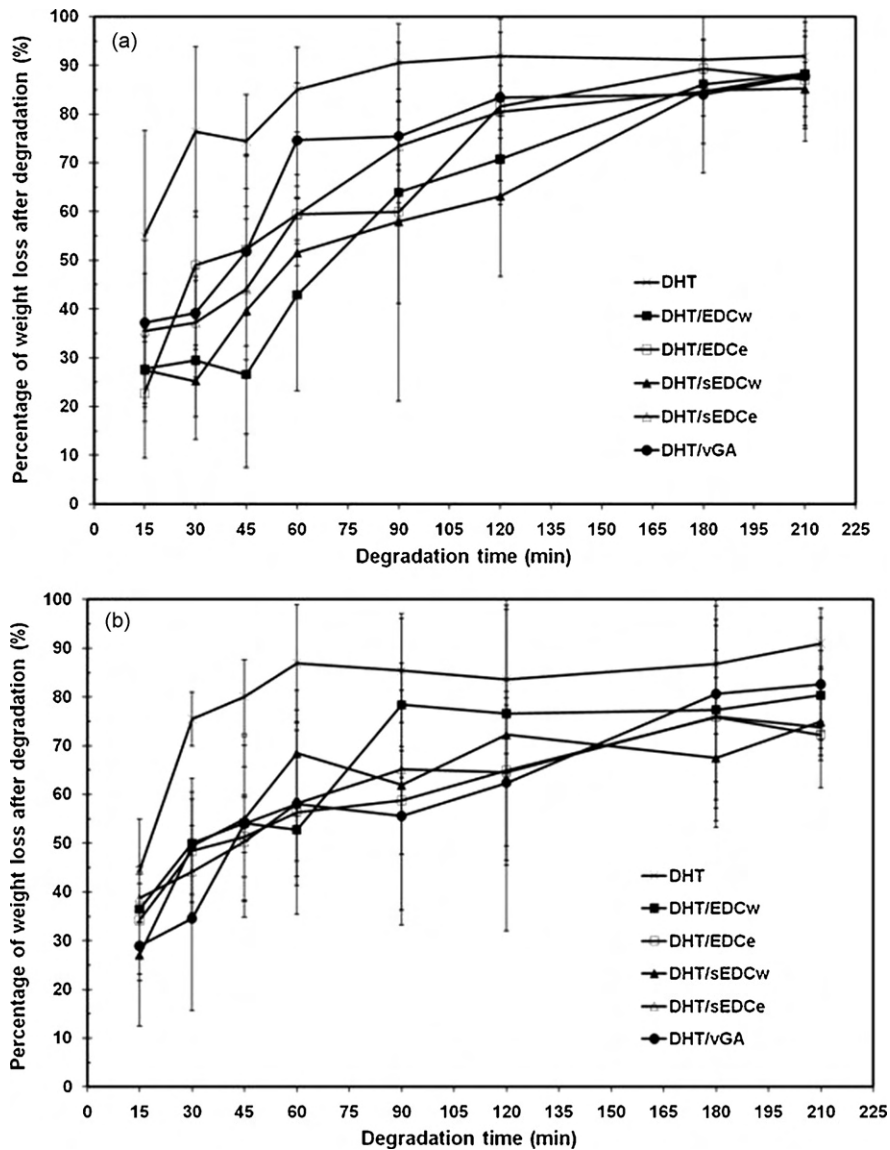


Fig. 6. Percentage of weight loss of electrospun (a) type A and (b) type B gelatin fiber mats crosslinked with different techniques after degradation in collagenase solution at 37 °C for various time periods.

DHT treatment generates chemical bonding between the amino and carboxyl groups of collagen molecules due to thermal dehydration. Crosslinking by DHT can occur only when the amino and carboxyl groups are close to each other [11]. Plasma treatment was reported to be able to crosslink the surface of the materials since it produces activated species having sufficient energy to create radicals to interact within polymeric chain [22]. In this work, plasma treatment generated radicals at the aromatic residuals of gelatin amino acids such as tyrosine and phenylalanine, resulted in crosslinking formation. When the combined technique of DHT/PLAS was employed, a slightly higher crosslinking degree of type A gelatin and an unchanged crosslinking degree of type B gelatin, compared to DHT alone were observed. This implied that PLAS treatment could not further crosslink fiber mats, due to the limitation of this physical method.

The crosslinking degrees of type A gelatin fiber mats, which were treated by the combination of DHT and chemical crosslinkings with different techniques, increased up to 60–70%. For type B gelatin fiber mats, DHT treatment yielded a crosslinking degree of approximately 78%. The combination of DHT and chemical crosslinkings resulted in higher crosslinking degrees of type B gelatin fiber mats

(80–90%) than those treated by DHT alone. The combination of physical and chemical treatments allowed the crosslinking to occur both at the surface and in the bulk of the gelatin fiber mats, resulting in improved crosslinking compared to the physical treatment alone [10]. EDC/NHS is known to crosslink between amino and carboxyl groups while GA is widely used to crosslink between amino groups [11,23]. However, the significant difference in crosslinking degree obtained from different combinations of physical and chemical crosslinking techniques was not noticed. Considering the gelatin type crosslinked using each treatment, the crosslinking degrees of type B gelatin fiber mats were higher than those of type A gelatin fiber mats, except for the case of the PLAS treatment. This might be due to the fact that type B gelatin was produced from the alkaline hydrolysis of collagen, resulting in more carboxyl groups than type A gelatin obtained from acid hydrolysis [24,25]. Then, the higher in the carboxyl groups led to the higher crosslinking degree, especially for the crosslinking with EDC/NHS. On the contrary, crosslinking degree obtained from the PLAS treatment did not depend on the amount of carboxyl groups because its crosslinking mechanism was explained by the free radical generation, as discussed previously. Furthermore, we noticed that EDC/NHS in water tended to

be slightly more active than EDC/NHS in ethanol, leading to the better crosslinking extent in both gelatin types.

Structures of electrospun gelatin fiber mats before and after crosslinking with different techniques are shown in Figs. 4 and 5. Figs. 4(a) and 5(a) present the as-spun type A and B gelatin fiber mats, respectively. It was found that crosslinking by DHT did not affect the morphology of the fiber mats, as shown in Figs. 4(b) and 5(b). The structures of the fiber mats after PLAS and DHT/PLAS treatments were similar. The fibers at the surface melted while the fibers inside remained the same, as seen in Figs. 4(c, d) and 5(c, d). This could be the result of surface effect from high temperature plasma [16]. Chemical crosslinking by immersion in EDC/NHS after DHT treatment caused fibers to become swollen as shown in Figs. 4(e, f) and 5(e, f). However, some small interconnected pores among the swollen fibers remained. The spraying technique could be used to induce the gelatin fiber mats with a basket-weave structure as presented in Figs. 4(g, h) and 5(g, h). The structures of the gelatin fiber mats obtained from the crosslinking using the vapor of GA after DHT treatment were different from the others. The fibers fused and merged. In this case, the interconnected pores could not be observed, as demonstrated in Figs. 4(i) and 5(i).

From the results of both gelatin types, it could be concluded that the crosslinking using DHT and plasma treatments occurred only on the surface of the fiber mats resulting in a limited crosslinking degree, while chemical crosslinking by direct immersion in EDC/NHS allowed for more crosslinking between free amino and carboxyl groups within the whole fiber mat [10]. Spray crosslinking was introduced in this study in order to improve swelling and reduce solubility of the fiber mats during the chemical crosslinking. Crosslinking with the vapor of GA was occurred in a closed system under vacuum in which the vapor of GA could permeate to crosslink the whole fiber mat, not only at the surface. The crosslinking degree from this technique was then as high as that from other EDC spray/immersion techniques but a deformed structure of the fiber mats was observed.

3.2.2. Degradation time

The percentages of weight loss of electrospun type A and B gelatin fiber mats crosslinked with different techniques after biodegradation in collagenase at 37 °C for various time periods are shown in Fig. 6. It was noted that only the dehydrothermal crosslinked gelatin fiber mats were selected as the physical crosslinking model for this test. For both type A and B gelatin, the fiber mats crosslinked by DHT exhibited the fastest degradation. Other combinations of DHT and chemical crosslinking techniques reduced the degradation of gelatin fiber mats. Also, type B gelatin fiber mats showed a slightly slower degradation rate than type A gelatin, i.e. after 210 min, % weight loss of type A and type B gelatin fiber mats were 80–90 and 70–80%, respectively. This result agrees well with the results of crosslinking degree of these samples.

4. Conclusions

This work has shown that the concentration of gelatin solution had a strong influence on the production of electrospun gelatin

fibers by electrospinning technique while the electrical potential did not induce a significant effect. Concentration range of gelatin solution at 20–40% w/v was the optimized concentration to produce the electrospun gelatin fibers with smooth surface throughout the fiber length. Crosslinking of the electrospun gelatin fiber mats by different techniques resulted in different crosslinking degrees and structures. Gelatin fiber mats crosslinked by DHT or plasma treatments showed a low crosslinking degree but kept to the original structure of fiber mats. High crosslinking degrees of swollen fiber mats with interconnected pores were obtained from the crosslinking by DHT followed with spaying/immersion in EDC/NHS in water or ethanol. DHT followed by GA vapor resulted in merged fibers without interconnected pores. This result emphasizes the important role that crosslinking plays in controlling the structure and degradation of the electrospun gelatin fiber mats.

Acknowledgments

Financial supports from Chulalongkorn University Centenary Academic Development Project and Thailand Research Fund are gratefully acknowledged. The use of PICP device supported by Asian African Association for Plasma Training (AAART) is acknowledged

References

- [1] A. Seema, H.W. Joachim, G. Andreas, *Polymer* 49 (2008) 5603–5621.
- [2] A.C. Lee, V.M. Yu, J.B. Lowe III, M.J. Brenner, D.A. Hunter, S.E. Mackinnon, S.E. Sakiyama-Elbert, *Exp. Neurol.* 184 (2003) 295–303.
- [3] X. Xu, W.C. Yee, P.Y. Hwang, H. Yu, A.C. Wan, S. Gao, K.L. Boon, H.Q. Mao, K.W. Leong, S. Wang, *Biomaterials* 24 (2003) 2405–2412.
- [4] R. Ikeguchi, R. Kakinoki, T. Matsumoto, T. Yamakawa, K. Nakayama, Y. Morimoto, H. Tsuji, J. Ishikawa, T. Nakamura, *Brain Res.* 1090 (2006) 51–57.
- [5] D.M. Bin, J.Y. Wang, S. Gang, *Sensor* 9 (2009) 1609–1624.
- [6] M.M. Steavens, J.H. George, *Science* 310 (2005) 1135–1138.
- [7] C.S. Ki, D.H. Baek, K.D. Gang, K.H. Lee, I.C. Um, Y.H. Parka, *Polymer* 46 (2005) 5094–5102.
- [8] K.T. Shalumon, N.S. Binulal, N. Selvamurugan, S.V. Nair, D. Menon, T. Furuide, H. Tamura, R. Jayakumar, *Carbohydr. Polym.* 77 (2009) 863–869.
- [9] H.J. Jin, J. Chen, V. Karageorgiou, G.H. Altman, D.L. Kaplan, *Biomaterials* 25 (2004) 1039–1047.
- [10] N. Chaitaworn, Master Thesis, Faculty of Engineering, Chulalongkorn University, 2009.
- [11] M. Ozeki, Y. Tabata, *J. Biomater. Sci. Polym. E* 16 (2005) 549–561.
- [12] Y. Akagawa, T. Kubo, K. Koretake, K. Hayashi, K. Doi, A. Matsuura, K. Morita, R. Takeshita, Q. Yuan, Y. Tabata, *J. Prosthodont. Res.* 53 (2009) 41–47.
- [13] C.H. Liang, W.H. Chang, H.F. Liang, M.H. Lee, H.W. Sung, *J. Appl. Polym. Sci.* 91 (2004) 4017–4026.
- [14] P. Sikareepaisan, A. Suksamrarn, P. Supaphol, *Nanotechnology* 19 (2008) 015102 (10 pp).
- [15] P. Rujitanaroj, N. Pimpha, P. Supaphol, *Polymer* 49 (2008) 4723–4732.
- [16] F.S. Denes, S. Manolache, *Prog. Polym. Sci.* 29 (2004) 815–885.
- [17] I. Prasertsung, R. Mongkolnavin, S. Kanokpanont, S. Damrongsakkul, *Int. J. Biol. Macromol.* 46 (2010) 72–78.
- [18] N. Nagai, S. Yunoki, T. Suzuki, M. Sakata, K. Tajima, M. Munekata, *Biosci. Bioeng.* 97 (2004) 389–394.
- [19] Y.S. Pek, M. Spector, I.V. Yannas, L.J. Gibson, *Biomaterials* 25 (2004) 473–482.
- [20] S.L. Shenoya, D.W. Batesa, H.L. Frischb, G.E. Wnek, *Polymer* 46 (2005) 3372–3384.
- [21] S. Koombhongse, W. Liu, D.H. Reneker, *J. Polym. Sci. Polym. Phys.* 39 (2001) 2598–2606.
- [22] N.V. Bhat, D.J. Upadhyay, *J. Appl. Polym. Sci.* 86 (2002) 925–936.
- [23] J. Chamchongkaset, S. Kanokpanont, D.L. Kaplan, S. Damrongsakkul, *Adv. Mater. Res.* 55–57 (2008) 685–688.
- [24] Y. Tabata, Y. Ikada, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 31 (1998) 287–301.
- [25] S. Young, M. Wong, Y. Tabata, A.G. Mikos, *J. Control. Rel.* 109 (2005) 256–274.

Coating of Polyelectrolyte Multilayer Thin Films on Nanofibrous Scaffolds to Improve Cell Adhesion

Stephan T. Dubas,¹ Paveenuch Kittitheeranun,² Ratthapol Rangkupan,¹ Neeracha Sanchavanakit,³ Pranut Potiyaraj^{2,4}

¹Metallurgy and Materials Science Research Institute, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand 10330

²Center of Excellence in Textiles, Department of Materials Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand 10330

³Department of Anatomy, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand 10330

⁴National Center of Excellence for Petroleum, Petrochemicals, and Advanced Materials, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand 10330

Received 24 February 2009; accepted 28 April 2009

DOI 10.1002/app.30690

Published online 23 June 2009 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

ABSTRACT: The adhesion of L929 cells to poly(ϵ -caprolactone) (PCL) nanofibers was successfully improved via coating with polyelectrolyte multilayer thin films (PEMs), which enhanced the potential of this material as a scaffold in tissue engineering applications. With the electrostatic self-assembly technique, poly(diallyldimethylammonium chloride) (PDADMAC) and poly(sodium 4-styrene sulfonate) (PSS) were formed as four-bilayer PEMs on electrospun PCL nanofiber mats. Because PDADMAC and PSS are strong polyelectrolytes, they provided stable films with good adhesion on the fibers within a wide pH range suitable for the subsequent processes and conditions. PDADMAC and gelatin were also constructed as four-bilayer PEMs on top of the PDADMAC- and PSS-coated nanofibers with the expectation that the gelatin would improve the cell adhesion. L929 cells from mouse fibroblasts were then seeded on both uncoated and coated scaffolds to study the cytocompatibility and *in*

vitro cell behavior. It was revealed by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay that both the uncoated and coated nanofiber mats were non-toxic as the cell viability was comparable to that of those cultured in the serum-free medium that was used as a control. The MTT assay also demonstrated that cells proliferated more efficiently on the coated nanofibers than those on the uncoated ones during the 48-h culture period. As observed by scanning electron microscopy, the cells spread well on the coated nanofibers, especially when gelatin was incorporated. The surface modification of PCL nanofiber mats described in this research is therefore an effective technique for improving cell adhesion. © 2009 Wiley Periodicals, Inc. *J Appl Polym Sci* 114: 1574–1579, 2009

Key words: biocompatibility; fibers; polyelectrolytes; self-assembly; thin films

INTRODUCTION

Tissue engineering, an emerging field in the area of human health care, has attracted growing interest in the last few decades. One of the challenges in the development of tissue engineering applications is the need to preserve a cell's ability to grow on synthetic scaffolds and maintain tissue-specific function; both depend critically on factors such as cell/scaffold and cell/cell interactions.¹ The key factors involved during the *in vivo* growth of tissue formation and maturation are the viability, proliferation, and spreading of cells. To improve each of these pa-

rameters, increasing efforts have been made to develop new coatings to improve the biocompatibility of a given surface.² Surface modification using polyelectrolyte multilayer thin films (PEMs) to develop biocompatible materials has attracted attention lately because of several advantages.³ This technique is very simple because it relies only on a dipping process, and it can be applied to surfaces with a very complex morphology and variable chemistry. The assembly occurs most of the time in aqueous media and does not require the use of organic solvents, which can be a problem in further cytocompatibility studies. Finally, biopolymers, oligomers, and other proteins, which are key components of biocompatible surfaces, can be readily used because of their electrostatic nature. The stability of the coating is important especially when one tries to achieve surface modification before cell adhesion. A loss of electrostatic interaction due to the neutralization of polyelectrolytes in PEMs can lead to decomposition or excessive swelling of the coating, as previously

Correspondence to: P. Potiyaraj (pranut.p@chula.ac.th).

Contract grant sponsor: Graduate School of Chulalongkorn University [through the 90th Anniversary of Chulalongkorn University Fund (Ratchadphiseksomphot Endowment Fund)].

reported.⁴ In this article, we suggest that PEMs assembled from a less pH-sensitive polyelectrolyte such as poly(diallyldimethylammonium chloride) (PDADMAC) could lead to more stable films. The non-pH dependence of PDADMAC provides fully charged polyelectrolytes in a pH range of 1–14.⁵ Although enhanced stability is of interest, the overall cell interaction with the film should be as good in the case of PDADMAC and gelatin.^{6,7}

Meanwhile, several researches have indicated that electrospun nanofibers are very promising as cell scaffolding materials because nanofibrous scaffolds provide a high level of surface area to which cells can attach on account of their three-dimensional feature and high surface area to volume ratio.⁸ Among the various types of nanofibrous scaffolds, poly(ϵ -caprolactone) (PCL) is one of the most interesting materials because of its biocompatibility, low cost, easy processability, and slow hydrolytic degradation rate. It has been reported that PCL is a good substrate for promoting cell attachment and proliferation.^{9,10} Its application as a scaffold in cell transplantation is of great interest.

To explore the possibility of using PCL nanofibers as nanofibrous scaffolds for tissue engineering, this work was aimed at improving cell adhesion on PCL nanofibers by coating them with PEMs from PDADMAC, poly(sodium 4-styrene sulfonate) (PSS), and gelatin. L929 cells were used to study the cytocompatibility of the nanofibers and the PEMs. The effects of PEMs on L929 cell behavior in terms of cell attachment and proliferation were also investigated.

EXPERIMENTAL

Electrospinning of PCL nanofibers

It is commonly known that the concentration of a polymer solution or the corresponding viscosity is one of the most important variables in controlling fiber morphology¹¹ as well as other electrospinning parameters, including the applied voltage, the distance between the needle tip and collector, the solution flow rate, the syringe and needle configuration, and the rotational speed. In this study, the process parameters were selected from preliminary work done in the laboratory and in a previous study¹⁰ that identified a 10.5% (w/v) PCL solution (Sigma, St. Louis, MO) in 1 : 3 (v/v) methanol/chloroform (Labscan, Bangkok, Thailand), a distance of 20 cm from the needle tip, and an applied voltage of 13 kV as the acceptable spinning parameters to obtain continuous and bead-free PCL fibers. The morphology of the obtained nanofiber mats was observed with a Phillips (Eindhoven, The Netherlands) XL-30CP scanning electron microscope.

PEM formation by the electrostatic self-assembly technique

PDADMAC, PSS, and gelatin (type B from bovine skin) were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO). The uncoated and coated nanofiber mats were manually immersed alternately at pH 7 in a 10 mM PDADMAC solution as a positively charged polyelectrolyte for 2 min and in a 10 mM PSS solution as a negatively charged polyelectrolyte for 2 min. After each was dipped in the polyelectrolyte, the nanofiber mats were rinsed for 20 s three times in deionized water to remove excess polyelectrolyte. The dipping was repeated until four bilayers of PEMs (a total of eight layers of polyelectrolytes) had been obtained, and these were labeled PDADMAC/PSS. Our preliminary study indicated that PDADMAC/PSS was stable within a wide range of pHs because both are strong polyelectrolytes. With the same procedure, four-bilayer PEMs were constructed from 10 mM PDADMAC and gelatin at pH 9 on top of the previously coated nanofibers, and these were labeled PDADMAC/PSS+PDADMAC/gelatin. It was expected that when gelatin was incorporated, the cell adhesion would be enhanced. Our preliminary study also pointed out that, although PDADMAC/gelatin was not as stable as PDADMAC/PSS because gelatin is a weaker electrolyte, the primer coating with PDADMAC/PSS provided film stability suitable for subsequent processes and conditions.

Cell culture

L929 mouse fibroblasts were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Hyclone, Logan, UT) supplemented by 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco, Invitrogen, Grand Island, NY), 1% L-glutamine (Invitrogen), and a 1% antibiotic and antimycotic formulation containing penicillin G sodium, streptomycin sulfate, and amphotericin B (Invitrogen), and they were incubated at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ until the cells reached 80% confluence.

Cytocompatibility test

Extraction media were prepared by the immersion of samples cut from the uncoated and coated fiber mats into a serum-free medium (SFM) containing the same composition as DMEM but without FBS for 24 h. L929 cells were cultured in DMEM for 16 h and then in SFM for 24 h. The cells were then reincubated for 24 h in the extraction media. The viability of the cells cultured with fresh SFM (as a control) and with extraction media was determined with a 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium

bromide (MTT) assay to evaluate the cytocompatibility.

Cell viability by the MTT assay

For the MTT assay, the culture medium was aspirated and replaced with 0.5 mg/mL 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide obtained from Sigma–Aldrich. After that, the plate was incubated for 30 h at 37°C. The yellow tetrazolium salt was reduced to purple formazan crystals by the dehydrogenase enzymes secreted from the mitochondria of metabolically active cells. The solution was then aspirated, and dimethyl sulfoxide (DMSO; 900 μ L/well) containing a glycine buffer (125 μ L/well) was added to dissolve the formazan crystals. After 10 min of rotary agitation, the absorbance of the DMSO solution at 540 nm was measured with a Thermospectronic (Rochester, NY) Genesis 10 ultraviolet–visible spectrophotometer to determine the amount of purple formazan crystals formed, which was proportional to the number of viable cells.

Cell adhesion and proliferation assessments

The uncoated and coated nanofiber mats were cut into circular specimens 15 mm in diameter. The specimens were placed in wells of a 24-well tissue-culture polystyrene plate (TCPS; Nunc, Rockford, IL), which were later sterilized in 70% ethanol for 10 min. The specimens were then rinsed with autoclaved deionized water and subsequently air-dried. L929 cells were seeded in the wells containing the uncoated and coated nanofiber specimens as well as the empty wells of TCPS, which were used as controls, at an initial density of 5×10^4 cells per well. After seeding for 4, 8, 24, and 48 h, each specimen was rinsed with phosphate-buffered saline (PBS; Sigma–Aldrich) to remove unattached cells before the MTT assay. Cell attachment was evaluated at 4–8 h, whereas cell proliferation was evaluated at 24 and 48 h.

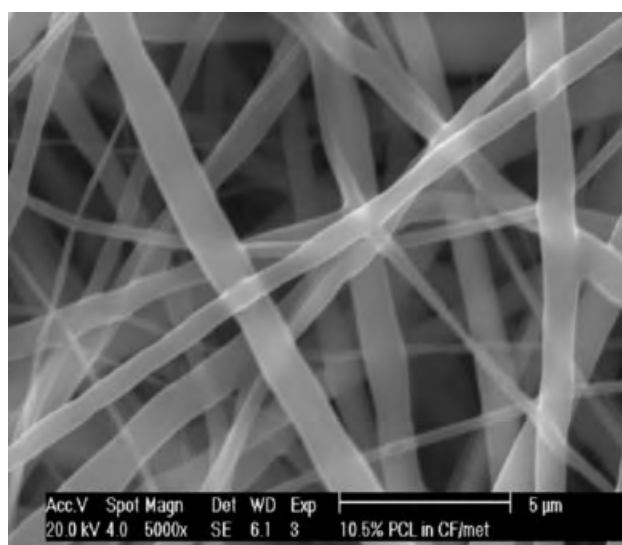
Morphological analysis by scanning electron microscopy (SEM)

The morphological appearance of the cells during the attachment and proliferation periods was observed with a JEOL (Tokyo, Japan) JSM-6400 scanning electron microscope. The cell-seeded scaffolds were rinsed twice with PBS and fixed with 3% glutaraldehyde in 1% calcium chloride for 30 min at 5°C. After being washed in PBS, the scaffolds were dehydrated consecutively in 30, 50, 70, 90, and 100% ethanol for 2 min for each concentration. Furthermore, substitution with hexamethyl disiloxane

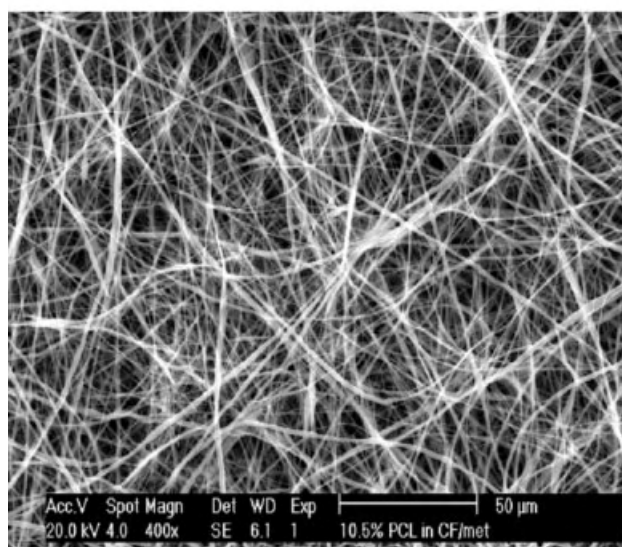
(Sigma–Aldrich) was done. Samples were then critically point-dried and covered with a thin layer of gold–palladium through sputtering under an argon atmosphere before SEM observation.

RESULTS AND DISCUSSION

SEM micrographs of bead-free PCL nanofibers are shown in Figure 1. The three-dimensional fibrous mesh consisted of fibers with diameters ranging from 400 nm to 2 μ m. Most of the fiber diameters were less than 1 μ m, and the average diameter was 507 ± 251 nm. In addition to the broad fiber diameter distribution, the fibers often had a nonuniform



(a)



(b)

Figure 1 SEM micrographs of PCL nanofibrous scaffolds: (a) 5000 \times (scale bar = 5 μ m) and (b) 400 \times (scale bar = 50 μ m).

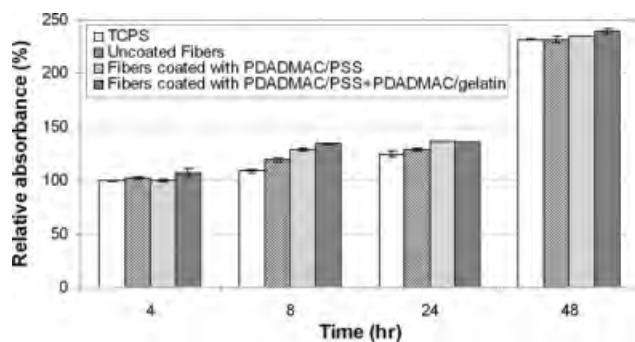


Figure 2 Viability of the L929 cell culture on fibrous scaffolds at 4, 8, 24, and 48 h as indirectly quantified by relative absorbance.

diameter; that is, the diameter varied along an individual fiber. The fibers were randomly oriented, and interconnected voids were presented.

The cytocompatibility evaluation, based on the viability of L929 cells as determined indirectly by the MTT assay, indicated that, when the relative absorbance in the case of L929 cells cultured with fresh

SFM for 24 h was normalized at 100%, the relative absorbance in the case of L929 cells cultured for the same period of time in the extraction media from the uncoated nanofibers, the nanofibers coated with PDADMAC/PSS, and the nanofibers coated with PDADMAC/PSS+PDADMAC/gelatin was comparable at 103.5, 110.2, and 108.8%, respectively. The absorbance values implied the cytocompatibility of the uncoated and coated nanofiber mats with L929 cells.

The attachment and proliferation of L929 cells on the uncoated and coated nanofiber mats were signified by the viability of the attached L929 cells at 4, 8, 24, and 48 h after seeding on the uncoated and coated scaffolds and on TCPS as the control. The number of viable cells for each sample was quantified by its relative absorbance, as shown in Figure 2. During the first 24 h, the attachment of L929 cells on nanofiber mats was comparable to that on TCPS. The proliferation of L929 cells could be assessed from the absorbance values after the cells were cultured for 24 and 48 h. At 24 h after seeding, the viability of attached L929 cells on the nanofiber mats

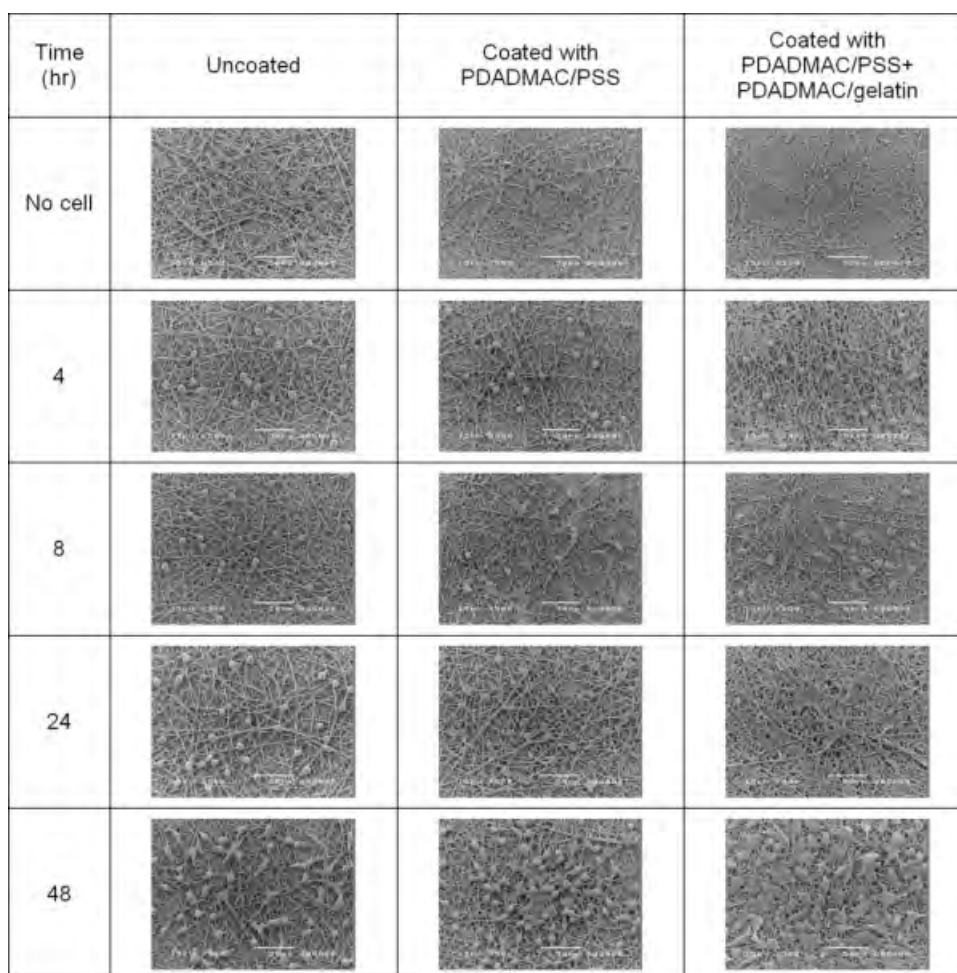


Figure 3 SEM micrographs of the L929 cells on nanofibrous scaffolds after culture periods of 4, 8, 24, and 48 h at 500 \times (scale bar = 50 μ m).

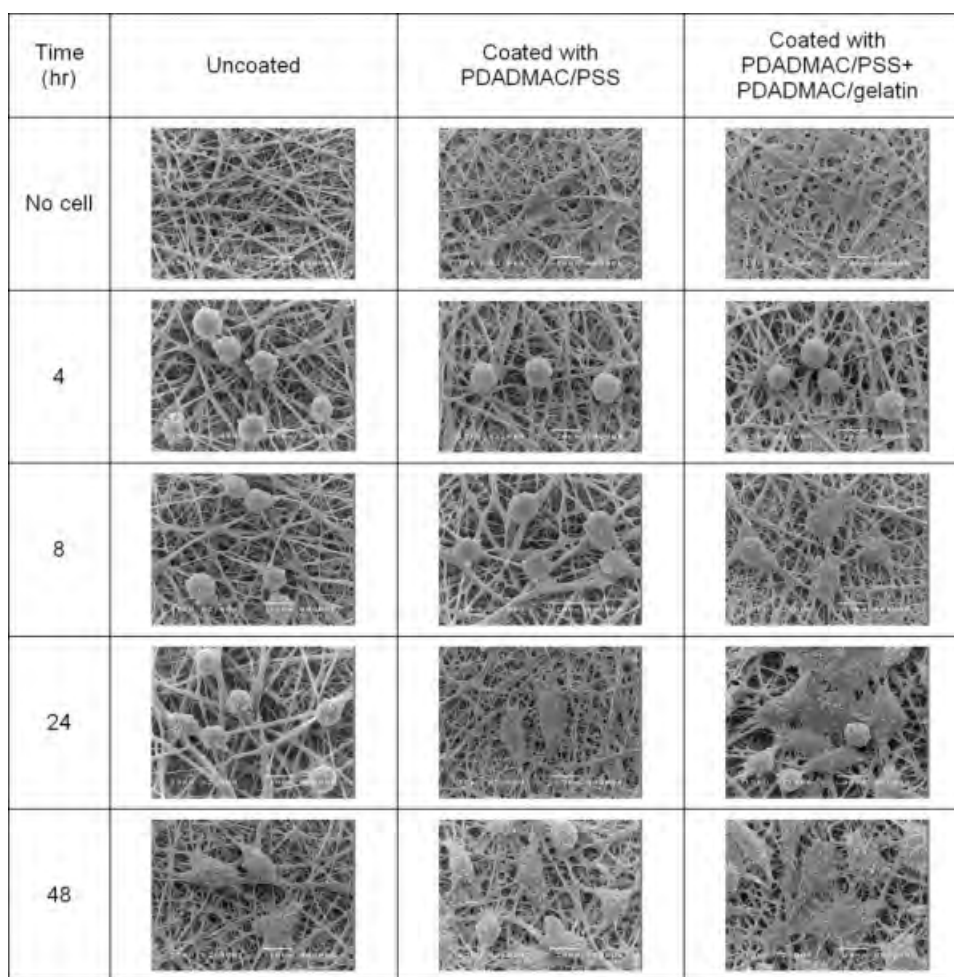


Figure 4 SEM micrographs of the L929 cells on nanofibrous scaffolds after culture periods of 4, 8, 24, and 48 h at 2000 \times (scale bar = 10 μ m).

was comparable to that on TCPS. At 48 h, the number of viable attached cells on TCPS and all the nanofiber mats increased significantly. It was obvious that the viability of the attached cells on the coated nanofiber mats was greater than that on TCPS and the uncoated one, especially for the nanofibers coated with PDADMAC/PSS+PDADMAC/gelatin. This noticeable increase in cell proliferation when gelatin was incorporated into the PEMs may be explained by the presence of basic, negatively charged lysine and arginine residues in the denatured collagen molecule, which promoted electrostatic interactions with the cell surface, and the presence of specific cell adhesion sites such as RGD sequences. Moreover, fibroblast binding to gelatin-modified PCL fibers was anticipated directly via the prominent $\alpha_1\beta_1$ and $\alpha_2\beta_2$ integrin receptors.¹²

It can be observed from the SEM micrographs shown in Figures 3 that the area on the nanofiber mats that the cells occupied increased with increasing culture time. In Figure 3, the SEM micrographs at a low magnification of 500 \times show the morpholo-

gies of cells that were cultured on the uncoated nanofibers, the nanofibers coated with PDADMAC/PSS, and the nanofibers coated with PDADMAC/PSS+PDADMAC/gelatin for different culture periods. After the first 8 h, some of the cells were spread and flattened, but many were still round, and this indicated an absence of strong cell–fiber interaction at this time point. After 48 h, the adherence of cells to the nanofibers coated with PDADMAC/PSS+PDADMAC/gelatin was densely distributed in comparison with that of the uncoated nanofibers.

SEM micrographs at a higher magnification of 2000 \times are shown in Figure 4. Clearly, during the first 4 h of cell culture, the morphology of the cells was mostly round with a slight trace of filopodia. At a longer time, the cells on coated nanofiber mats, especially those coated with PDADMAC/PSS+PDADMAC/gelatin, expanded more, with evidence of the anchoring ligands reaching out to help support them on the fiber surface.

The high porosity of nanofibrous scaffolds provides more structural space for cell accommodation

and makes the exchange of nutrient and metabolic waste between the scaffold and environment more efficient. The reason that cells enter the matrix through small pores may be that the pores in an electrospun structure are formed by differently oriented fibers lying loosely on one another.¹¹ When cells perform an amoeboid movement to migrate through the pores, they can push the surrounding fibers aside to expand the holes as the small fibers offer little resistance to cell movement. These characteristics are fundamental criteria for successful tissue engineering scaffolds. According to the results, cells seeded on the nanofibrous scaffolds had an appropriate interaction with their environment on the basis of the following observations. First, the cells maintained a normal phenotypic shape, and this suggested that the cells functioned biologically within this structure. Second, the cells favored this structure, so they attached to the fibers and proliferated in the nanofibrous network. Third, these cells crosslinked the nanofibers and integrated with the surrounding fibers to form a three-dimensional cellular network.

From this evidence, it can be concluded that cell adhesion on PCL nanofibrous scaffolds can be improved via coating with PDADMAC/PSS as the primer to provide film stability and via further coating with PDADMAC/gelatin as a top coating to promote cell attachment, cell proliferation, and proper cell spreading.

CONCLUSIONS

Bead-free PCL nanofibers were successfully prepared by electrospinning. With the electrostatic self-assembly technique, the as-spun nanofiber mats were coated with four bilayers of PEMs constructed from PDADMAC and PSS (denoted PDADMAC/

PSS) and with four bilayers of PEMs constructed from PDADMAC/gelatin on top of four bilayers of PEMs constructed from PDADMAC and PSS (denoted PDADMAC/PSS+PDADMAC/gelatin). These uncoated and coated nanofiber mats exhibited cytocompatibility with L929 cells. Various cell behaviors revealed by the MTT assay and SEM—cell attachment, proliferation, spreading, and morphology—demonstrated an outstanding improvement of cell adhesion on the coated nanofiber mats over the uncoated ones, especially when the nanofibers were coated with PDADMAC/PSS+PDADMAC/gelatin. These results suggest that surface modification with PEMs is an effective technique for increasing the potential for using electrospun fiber mats as nanofibrous scaffolds for tissue engineering.

References

1. Li, M.; Mondrinos, M. J.; Gandhi, M. R.; Ko, F. K.; Weiss, A. S.; Lelkes, P. *Biomaterials* 2005, 26, 5999.
2. Kim, J. H.; Fujita, S.; Shiratori, S. *Colloids Surf A* 2006, 284, 290.
3. Boura, C.; Muller, S.; Vautier, D.; Dumas, D.; Schaaf, P.; Voegel, J. C.; Stoltz, J. F.; Menu, P. *Biomaterials* 2005, 26, 4568.
4. Berger, J.; Reist, M.; Mayer, J. M.; Felt, O.; Peppas, N. A.; Gurny, R. *Eur J Pharm Biopharm* 2004, 57, 19.
5. Germain, M.; Balaguer, P.; Nicolas, J. C.; Lopez, F.; Esteve, J. P.; Sukhorukov, G. B.; Winterhalter, M.; Richard-Foy, H.; Fournier, D. *Biosens Bioelectron* 2006, 21, 1566.
6. Lin, Y.; Wang, L.; Zhang, P.; Wang, X.; Chen, X.; Jing, X.; Su, Z. *Acta Biomater* 2006, 2, 155.
7. Mao, J. S.; Cui, Y. L.; Wang, X. H.; Sun, Y.; Yin, Y. J.; Zhao, H. M.; Yao, K. D. *Biomaterials* 2004, 25, 2973.
8. Yoshimoto, H.; Shin, Y. M.; Terai, H.; Vacanti, J. P. *Biomaterials* 2003, 24, 2077.
9. Chen, F.; Lee, C. N.; Teoh, S. H. *Mater Sci Eng C* 2007, 24, 325.
10. Venugopal, J.; Ma, L. L.; Yong, T.; Ramakrishna, S. *Cell Biol Int* 2005, 29, 861.
11. Bhattarai, S. R.; Bhattarai, N.; Yi, H. K.; Hwang, P. H.; Cha, D.; Kim, H. Y. *Biomaterials* 2004, 25, 2595.
12. Hynes, R. O. *Cell* 1992, 69, 11.