ELECTROSPUN POLYHYDROXYALKANOATE (PHA) FIBERS FOR BONE REGENERATION

Korakot Sombatmankhong

A Thesis Submitted in Partial Fulfilment of the Requirements
for the Degree of Master of Science
The Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University
in Academic Partnership with
The University of Michigan, The University of Oklahoma,
Case Western Reserve University and Institut Français du Pétrole
2006

ISBN 974-9937-93-7

Thesis Title:	Electrospun Polyhydroxyalkanoate (PHA) Fibers for Bone Regeneration
By:	Korakot Sombatmankhong
Program:	Polymer Science
Thesis Advisors:	Assoc. Prof. Pitt Supaphol
	Assoc. Prof. Prasit Pavasant

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

Nantaya Yanumet ..... College Director

(Assoc. Prof. Nantaya Yanumet)

Thesis Committee:

.....

(Assoc. Prof. Pitt Supaphol)

.....

(Assoc. Prof. Prasit Pavasant)

.....

(Asst. Prof. Ratana Rujiravanit)

490368

ABSTRACT

4772010063: Polymer Science Program
Korakot Sombatmankhong: Electrospun Polyhydroxyalkanoate (PHA) Fibers for Bone Regeneration
Thesis Advisors: Assoc. Prof. Pitt Supaphol and Assoc. Prof. Prasit Pavasant 62 pp. ISBN 974-9937-93-7
Keywords: Electrospinning/Poly(3-hydroxyalkanoate)/PHB/PHBV/Scaffold/Osteoblast

Electrospinning of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB), poly(3-hydroxybutyrate -*co*-3-hydroxyvalerate) (PHBV) and their blends in chloroform was investigated in order to develop non-woven biodegradable ultrafine fibrous scaffolds for tissue engineering. All of the spinning dopes were obtained at a concentration of 14wt.% (at 12kV) and the resulting fiber diameters were in the range of 2.0-4.0 μm. PHBV was found to be completely miscible with PHB at all blend compositions investigated. The electrospun scaffolds made from PHB/PHBV blends exhibited better tensile properties than their pure constituents. The fibrous scaffold from 50:50 w/w PHB/PHBV was then chosen to be tested for its biological response, along with those from pure constituents. Indirect cytotoxicity evaluation of the electrospun mats of PHB, PHBV, and their blend based on human osteoblasts (SaOS2) and mouse fibroblasts (L929) revealed that these as-spun mats posed no threats to the cells. It was found that all of the fibrous scaffolds promoted much better adhesion and proliferation of cells than the corresponding solution-cast film scaffolds and tissue-culture polystyrene plate (TCPS). Selected scanning electron microscopy (SEM) images showed that SaOS2 cells maintained their phenotype during the cell culture, which implies possible utilization of these materials as bone scaffolds.

บทคัดย่อ

กรกช สมบัติมั่นคง : การผลิตเส้นใยพอลิเมอร์อิเล็กโทรสปันของพอลิอัลคาโนเอตเพื่อการเสริมสร้างเซลกระดูก (Electrospun Polyhydroxyalkanoate (PHA) Fibers for Bone Regeneration) อ.ที่ปรึกษา: รศ. ดร.พิชญ์ ศุภผล และ รศ.ดร.ประสิทธิ์ ภวสันต์ 62 หน้า ISBN974-9937-93-7

เส้นใยพอลิเมอร์อิเล็กโทรสปันของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตทั้งสองชนิดได้แก่ พอลิไฮดรอกซีบิวทีเรต ไฮดรอกซีบิวทีเรต-ไฮดรอกซีวาลีเรต โคพอลิเมอร์ และพอลิเมอร์ผสมระหว่างพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรตกับไฮดรอกซีบิวทีเรต-ไฮดรอกซีวาลีเรต โคพอลิเมอร์ ถูกเตรียมขึ้นโดยวิธีการปั่นด้วยกระแสไฟฟ้าสถิตย์ โดยใช้คลอโรฟอร์มเป็นตัวทำละลาย เส้นใยที่ได้จะอยู่ในลักษณะเส้นใยไม่ถักไม่ทอซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ จากการศึกษาพบว่าความเข้มข้นของสารละลาย รวมทั้งศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมแก่การปั่นเส้นใยด้วยกระแสไฟฟ้าสถิตย์คือ 14 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักและ 12 กิโลโวลต์ ตามลำดับ ซึ่งเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยที่ผลิตได้อยู่ในช่วง 2.0 ถึง 4.0 ไมโครเมตร การศึกษาผลของการผสมพอลิเมอร์ทั้งสองชนิดนี้พบว่า พอลิไฮดรอกซีบิวทีเรตสามารถผสมเข้ากับไฮดรอกซีบิวทีเรต-ไฮดรอกซีวาลีเรต โคพอลิเมอร์ อย่างสมบูรณ์ ซึ่งสอดคล้องกับสมบัติการทนแรงดึงของเส้นใยไม่ถักไม่ถอพอลิเมอร์ผสมที่มีค่าเหนือกว่าเส้นใยไม่ถักไม่ทอพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรต และไฮดรอกซีบิวทีเรต-ไฮดรอกซีวาลีเรต โคพอลิเมอร์ นอกจากนี้ งานวิจัยได้ศึกษาถึงการตอบสนองทางชีววิทยาของร่างแหเส้นใยอิเล็กโทรสปันของพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรต ไฮดรอกซีบิวทีเรต-ไฮดรอกซีวาลีเรต โคพอลิเมอร์ และพอลิเมอร์ผสมระหว่างพอลิเมอร์สองชนิดนี้ในอัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนัก ผลของการทดสอบความเป็นพิษแบบทางอ้อมต่อเซลออสทีโอบลาสจากกระดูกของมนุษย์ (SaOS2) และเซลไฟโบรบลาสจากผิวหนังของหนู (L929) พบว่าร่างแหเส้นใยอิเล็กโทรสปันทั้งสามชนิดไม่เป็นพิษต่อเซล รวมทั้งร่างแหเส้นใยอิเล็กโทรสปันเหล่านี้ยังสนับสนุนการเกาะและแบ่งตัวของเซลมากกว่าร่างแหที่ผลิตมาจากการหล่อและแผ่นพอลิสไตรีนสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ รูปภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดบ่งชี้ว่าเซล SaOS2 ยังคงรูปร่างและลักษณะของเซลตลอดการเพาะเลี้ยง ซึ่งช่วยสนับสนุนความเป็นไปได้ในการนำพอลิเมอร์ชนิดนี้มาใช้เป็นร่างแหสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูกต่อไป

ACKNOWLEDGEMENTS

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

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

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

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

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

Ultimately, extreme appreciation is to her family for their love, understanding, constant encouragement, and financial support during her studies and thesis work.

TABLE OF CONTENTS

		PAGE
Title Page		i
Abstract (in English)		iii
Abstract (in Thai)		iv
Acknowledgements		v
Table of Contents		vi
List of Tables		viii
List of Figures		ix
CHAPTER		
I	**INTRODUCTION**	1
II	**LITERATURE SURVEY**	4
	2.1 Electrospun Fibers for Tissue Engineering	4
	2.2 Polyhydroxyalkanoates (PHAs)	8
	2.2.1 Introduction	8
	2.2.2 Polyhydroxybutyrate	9
	2.2.3 Polyhydroxybutyrate-co-Hydroxyvalerate	10
	2.2.4 Application	12
III	**EXPERIMENTAL**	16
	3.1 Materials and Preparation and Characterization of Spinning Solutions	16
	3.2 Electrospinning and Characterization of as-Spun Fiber Mats	16
	3.3 Biological Compatibility Evaluation	18

CHAPTER		PAGE
IV	**RESULTS AND DISCUSSION**	20
	4.1 Electrospinning of PHB and PHBV Solutions	21
	4.2 Electrospinning of PHB/PHBV Solutions	24
	4.2.1 Thermal and Physical Properties	27
	4.2.2 Mechanical Integrity	31
	4.3 Cell Study	33
	4.3.1 Indirect Cytotoxicity Test	33
	4.3.2 Cell Attachment and Proliferation	34
V	**CONCLUSIONS**	39
	REFERENCES	40
	APPENDICES	45
	Appendix A Polymer Solution Properties	45
	Appendix B Contact Angle	47
	Appendix C Mechanical Evaluation	49
	Appendix E Cell Study	55
	CURRICULUM VITAE	62

LIST OF TABLES

TABLE		PAGE
2.1	Thermal properties of some biosynthesized polymers	9
2.2	Potential applications of PHA in medicine	13
4.1	Viscosity and conductivity of the as-prepared PHB and PHBV solutions at 25°C as a function of concentration	21
4.2	Selected SEM images illustrating the effect of applied electrical potential and solution concentration on morphology of fibers that were electrospun from PHB solutions in chloroform as well as average values of fiber diameters, bead sizes, number of fibers per unit area and number of beads per unit area.	23
4.3	Viscosity and conductivity of the as-prepared PHB/PHBV blend solutions at 25°C as a function of blend composition.	25
4.4	Selected SEM images illustrating the effect of blend composition on morphology of fibers that were electrospun from PHB, PHBV, and PHB/PHBV solutions in chloroform as well as average values of fiber diameters.	26
4.5	Thermal characteristics and apparent crystallinity of as-spun PHB, PHBV, and PHB/PHBV fiber mats of about 85 ± 5 μm thick as well as those of PHB and PHBV powder	28
4.6	Static contact angle of distilled water on surfaces of as-spun PHB, PHBV, and PHB/PHBV fiber mats of about 105 ± 5 μm thick	30
4.7	Selected SEM images SaOS2 cultured on fibrous PHB/PHBV (50wt%PHBV) blend scaffolds at different times in culture	37
4.8	Selected SEM images SaOS2 cultured on various types of PHA scaffolds at different times in culture	38

LIST OF FIGURES

FIGURE		PAGE
1.1	The electrospinning apparatus utilized in the production of ultrafine fibers.	2
2.1	Chemical structure of poly(3-hydroxyalkanoate).	8
2.2	Electron microscope view of the accumulation of polymer granules, PHB in cells of the species *Alcaligenes entrophus*.	10
2.3	Chemical structure of Poly(3-hydroxybutyric acid)	11
2.4	Chemical structure of polyhydroxyvaleric acid (PHV).	11
4.1	Mechanical properties of fiber mats of about 105 ± 5 μm thick that were electrospun from PHB, PHBV, and PHB/PHBV solutions in chloroform.	32
4.2	Indirect cytotoxic evaluation of fibrous scaffolds from electrospun mats of PHB and PHBV and their blend fibers based on viability of human osteoblasts (SaOS2) and mouse fibroblasts (L929).	33
4.3	Attachment of SaOS2 on TCPS, films and fibrous scaffolds as a function of time in culture.	34
4.4	Proliferation of SaOS2 on TCPS, films and fibrous scaffolds as a function of time in culture.	35