

**ELECTROSPUN POLYHYDROXYALKANOATE (PHA) FIBERS FOR
NERVE REGENERATION**

Suchada Waleetorncheepsawat

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 Institute Français du Pétrole
2006

ISBN 974-9990-04-8

Thesis Title: Electrospun Polyhydroxyalkanoate (PHA) Fiber for Nerve Regeneration
By: Suchada Waleetorncheepsawat
Program: Polymer Science
Thesis Advisors: Assoc. Prof. Pitt Supaphol
Asst. Prof. Poonlarp Cheepsunthorn
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:

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

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

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

ABSTRACT

4772026063: Polymer Science Program

Suchada Waleetorncheepsawat: In Vitro Study of Electrospun
Polyhydroxyalkanoate Fibers for Nerve Regeneration

Thesis Advisors: Assoc. Prof. Pitt Supaphol 55 pp. ISBN 974-9990-
04-8

Keywords: Electrospinning/Polyhydroxyalkanoate/PHB/PHBV/Scaffold/
Schwann cell

Polyhydroxybutyrate (PHB) and polyhydroxybutyrate-*co*-hydroxyvalerate (PHBV) are interesting materials for use in tissue engineering applications due to their biocompatibility and biodegradability. In the present work, ultrafine fibrous scaffolds were fabricated by electrospinning. The effects of polymer concentration, applied electrical potential and collective distance on the morphological appearance of the as-spun fibers were investigated. In this study, PHB and PHBV fibers were prepared by electrospinning of the corresponding solutions (14 wt.%) under an applied electrical potential of 12 kV and a fixed collection distance of 20 cm. The average fiber diameters were in the range of 2.0-4.0 μm . The suitability of the PHB and PHBV fibrous and corresponding film scaffolds were evaluated by *in vitro* cell studies using RT4-D6P2T cell line of Schwann cells (SCs). The studies covered indirect cytotoxicity, adhesion, and proliferation by measuring the metabolic activity cells using MTT assay. It was found that PHB and PHBV posed no threat to the cells. The number of cells attached on fibrous scaffolds promoted less adhesion and proliferation of cells than the corresponding solution-cast films and PLA. Cell morphology was observed by scanning electron microscope (SEM), which showed that SCs often encircled the fibers or grew between neighboring fibers while they flattened, extended, and even connected to adjacent cells on the film counterparts.

บทคัดย่อ

ศุชาดา วลีธรชีพสวัสดิ์ : การผลิตเส้นใยพอลิเมอร์อิเล็กโทรสปินของพอลิอัลคาโนเอต เพื่อการเสริมสร้างเซลล์ประสาท (In Vitro study of Electrospun Polyhydroxyalkanoate (PHA) Fibers for Nerve Regeneration) อ. ที่ปรึกษา : รศ. ดร.พิชญ์ สุภผล 55 หน้า ISBN 974-9990-04-8

พอลิไฮดรอกซีบีวทีเรต และ ไฮดรอกซีบีวทีเรต-ไฮดรอกซีวาลีเรต โคพอลิเมอร์เป็นพอลิเมอร์ชีวโมเลกุลชนิดใหม่ที่กำลังได้รับความสนใจสำหรับนำไปใช้ประโยชน์ในด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เนื่องจากมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ และสามารถย่อยสลายทางชีวภาพ ในงานวิจัยนี้ผลิตร่างแหเส้นใยอิเล็กโทรสปินเตรียมจากการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต โดยศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของสารละลายและศักย์ไฟฟ้าสถิตที่มีอิทธิพลต่อสัณฐานวิทยาและขนาดของเส้นใยเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสม จากการศึกษาพบว่าความเข้มข้นของสารละลาย 14 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักและศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมคือ 12 กิโลโวลต์ ซึ่งเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยที่ผลิตได้อยู่ในช่วง 2.0 ถึง 4.0 ไมโครเมตร งานวิจัยได้ศึกษาถึงการตอบสนองทางชีววิทยาของร่างแหเส้นใยอิเล็กโทรสปินของพอลิไฮดรอกซีบีวทีเรต และ ไฮดรอกซีบีวทีเรต-ไฮดรอกซีวาลีเรต ต่อความเป็นไปได้ในการใช้เป็นวัสดุโครงร่างด้วยการทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (Biocompatibility) ความสามารถในการยึดเกาะ (Cell Attachment) และความสามารถในการเพิ่มประชากรของเซลล์ (Cell proliferation) ผลของการทดสอบความเป็นพิษแบบทางอ้อมต่อเซลล์ประสาท (Schwann cells) และเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากผิวหนังของหนู (L929) พบว่าร่างแหเส้นใยอิเล็กโทรสปินทั้งสามชนิดไม่เป็นพิษต่อเซลล์ แม้ว่าเส้นใยอิเล็กโทรสปินเหล่านี้สนับสนุนการเกาะและแบ่งตัวของเซลล์น้อยกว่าฟิล์มที่ผลิตจากการหล่อและพอลิแอลเอ รูปภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดบ่งชี้ว่าเซลล์ประสาทยังมีรูปร่างแบบไบโโพลาร์ (bipolar) และยังคงแสดงให้เห็นถึงอิทธิพลของลักษณะพื้นผิวที่มีผลต่อรูปร่างและลักษณะของเซลล์ตลอดการเพาะเลี้ยง

ACKNOWLEDGEMENTS

This work would not have been possible without the assistance of the following.

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

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

The author would like to thank the Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University where the author have gained the valuable 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.

Finally, the author would like to take this opportunity to thank all instructors, PCC staffs, PPC Ph.D. students and all her PPC friends for their friendly assistance, cheerfulness, creative suggestions, and encouragement. The author had the most enjoyable time working all of them. Also, the author is greatly indebted to her parent and her family for their support, love, care and understanding.

TABLE OF CONTENTS

	PAGE
Title Page	i
Abstract (in English)	iii
Abstract (in Thai)	iv
Acknowledgements	v
Table of Contents	vi
List of Tables	viii
List of Figures	ix
CHAPTER	
I INTRODUCTION	1
II LITERATURE REVIEW	4
2.1 Electrospinning	4
2.1.1 Experimental Set Up	4
2.1.2 Polymer Type	5
2.1.3 Microstructure and Morphology	6
2.1.4 Applications	6
2.2 Nerve Regeneration	6
2.3 Hydroxyalkanoate Biopolymers (PHAs)	9
2.3.1 Physical Properties of PHB/PHBV	9
2.3.2 Degradation of PHB/PHBV	9
2.3.3 Applications of PHB/PHBV	10
III EXPERIMENTAL	11
3.1 Materials	11
3.2 Material Preparation	11
3.2.1 Electrspinning	11
3.2.2 Film Casting	12
3.3 Characterization	12

CHAPTER	PAGE
3.4 Cell Culture and Seeding	13
3.5 Morphology of Schwann Cells	13
3.6 Cytotoxicity Tests	14
3.7 Cell Adhesion Tests	14
3.8 Cell Proliferation Assay	14
3.9 MTT Assays	15
IV RESULTS AND DISCUSSION	16
4.1 Electrospinning	16
4.1.1 Effect of Solution Concentration	16
4.1.2 Effect of Electrostatic Field Strength	19
4.1.3 Mechanical Properties	23
4.1.4 Contact Angle	24
4.2 Cells Growth	25
4.2.1 Indirect Cytotoxicity	26
4.2.2 Cell Attachment	27
4.2.3 Cell Proliferation	30
V CONCLUSIONS	37
REFERENCES	39
APPENDICES	42
Appendix A Polymer Solution Properties	42
Appendix B Influence of Solution properties on Fiber Sizes	44
Appendix C Mechanical Evaluation	46
Appendix D Physical Evaluation	49
Appendix E Cell Study	52
CURRICULUM VITAE	55

LIST OF TABLES

TABLE		PAGE
2.1	Comparison of some key properties of PHB/PHBV and polypropylene	10
4.1	Solution properties of electrospun fibers	17
4.2	Average diameter and bead size of as-spun fibers from 10 and 16% w/v solutions of PHB and PHBV in chloroform with various applied electric field strength	22
4.3	Mechanical properties of electrospun fibers and films	24
4.4	Contact angle of distilled water with films and electrospun fibers of PHB and PHBV	24

LIST OF FIGURES

FIGURE		PAGE
4.1	SEM images (500x) of as-spun fibers from (a) 10, (b) 12, (c) 14 and (d) 16% w/v solutions of PHB in chloroform. The applied electrostatic field strength was 12 kV/ 20 cm and the collection time was 5 min (scale bar = 50 μ m, 500x)	18
4.2	SEM images (500x) of as-spun fibers from (a) 10, (b) 12, (c) 14 and (d) 16% w/v solutions of PHBV in chloroform. The applied electrostatic field strength was 12 kV/20 cm and the collection time was 5 min (scale bar = 50 μ m, 500x)	19
4.3	SEM images (500x) of as-spun fibers from 14% w/v PHB solutions in chloroform at various applied electrostatic field strengths of (a) 8, (b) 10, (c) 12 and (d) 14 kV/20 cm. The collection time was 5 min. (scale bar = 50 μ m, 500x)	20
4.4	SEM images (500x) of as-spun fibers from 14% w/v PHBV solutions in chloroform at various applied electrostatic field strengths of (a) 8, (b) 10, (c) 12 and (d) 14 kV/20 cm. The collection time was 5 min (scale bar = 50 μ m, 500x)	21
4.5	SEM images (5000x) of as-spun fibers from (a) PHB, (b) PHBV at 14% w/v solutions of PHB in chloroform. The applied electrostatic field strength was 12 kV with the collective distance 20 cm (scale bar = 5 μ m, 5000x)	23
4.6	The viable metabolic activity of (a) Schwann RT4-D6P2T (b) mouse connective tissue, fibroblast L929 cells cultured for 24 h with PHB and PHBV	26
4.7	The viable metabolic activity of (a) Schwann RT4-D6P2T (b) mouse connective tissue, fibroblast L929 cells cultured for 24 h with PHB and PHBV	27

FIGURE		PAGE
4.8	The attachment of RT4-D6P2T on TCP (i.e. controls), PHB and PHBV film and fibrous scaffolds at 2, 4, 8, and 16h, as determined by the activity of viable cells.	29
4.9	SEM images (2000x) of Schwann cells culture on (a) PHB fiber, (b) PHBV fiber, (c) PHB film (d) PHBV film for 2h showing a spherical shape	31
4.10	The Morphological appearances of SCs cultures on PHB and PHBV fibrous scaffolds, film and TCP at 2, 4, 8 and 16h after seeding. (Scale bar = 50 μ m, 500x)	33
4.11	The Morphological appearances of SCs cultures on PHB and PHBV fibrous scaffolds, film and TCP at 2, 4, 8 and 16h after seeding. (Scale bar = 10 μ m, 1500x)	34
4.12	The Morphological appearances of SCs cultures on PHB and PHBV fibrous scaffolds, film and TCP at 1, 3 and 5 days after seeding. (Scale bar = 50 μ m, 500x)	35
4.13	Morphological appearances of SCs cultures on PHB and PHBV fibrous scaffolds, film and TCP at 1, 3 and 5 days after seeding. (Scale bar = 10 μ m, 1500x)	36