

**ELECTROSPUN POLY (1,4-BUTYLENE SUCCINATE) EXTENDED WITH  
1,6-DIISOCYANATOHEXANE FIBER MATS AND THEIR POTENTIAL  
USE AS BONE SCAFFOLDS**



Sasipim Sutthiphong

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

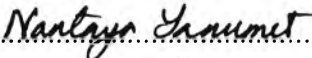
2008

512029


**Thesis Title:** Electrospun Poly (1,4-butylene succinate) extended with 1,6-diisocyanatohexane Fiber mats and their Potential Use as Bone Scaffolds  
**By:** Sasipim Sutthiphong  
**Program:** Polymer Science  
**Thesis Advisor:** Assoc. Prof. Pitt Supaphol

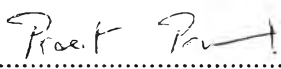
---

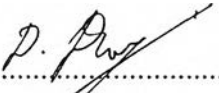
Accepted by the Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University, in partial fulfilment of the requirements for the Degree of Master of Science.

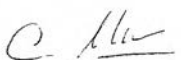
  
..... College Director  
( Assoc. Prof. Nantaya Yanumet )

**Thesis Committee:**

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

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

  
.....  
( Dr. Damrong Damrongsri )

  
.....  
( Asst. Prof. Chidchanok Meechaisue )

## ABSTRACT

4972029063: Polymer Science Program

Sasipim Sutthiphong: Electrospun Poly(1,4-butylene succinate) extended with 1,6-diisocyanatohexane Fiber mats and their Potential Use as Bone Scaffolds.

Thesis Advisor: Assoc. Prof. Pitt Supaphol 60 pp.

Keywords: Electrospinning/ Poly(butylene succinate)/ Scaffold/ Osteoblast

Ultrafine Poly(butylene succinate) extended with 1,6-diisocyanatohexane (PBSu-DCH) fibers were successfully fabricated by electrospinning from 22% PBSu-DCH dissolved in 90:10 dichloromethane / trifluoroacetic acid co-solvent system. The effects of processing parameters including, solution concentration, applied electric field, and collecting distance on morphological appearance and size of as-spun fibers were evaluated. Indirect cytotoxicity evaluation of the electrospun fiber mats of PBS based on human osteoblasts (SaOS-2) and mouse fibroblasts (L929) revealed that the as-spun mats did not release substances detrimental to the cells. The potential use of the as-spun PBS fiber mats as bone scaffolding materials was evaluated *in vitro* with human osteoblasts (SaOS-2) in terms of biocompatibility, cell attachment, cell proliferation, and alkaline phosphatase (ALP) activity of the cells that were cultured directly on the scaffolds. The results were compared with those on solvent-cast film scaffolds and tissue-culture polystyrene plate (TCPS). It was found that the as-spun PBSu-DCH scaffolds promoted much better adhesion and proliferation of the cells than the solvent-cast film scaffolds and TCPS. Scanning electron microscopy (SEM) images confirm that the phenotype of SaOS-2 was maintained during the cell culture. Interestingly, the cells that were cultured on the fibrous scaffolds exhibited the expanded shape with discrete branches on their surface after only about 1 hr in culture, while those cultured on the film scaffolds and glass substrate were still round. This evidence implies the possibility of using the as-spun PBSu-DCH fiber mats as bone scaffolds.

## บทคัดย่อ

ศศิพิมพ์ สุทธิพงษ์ : เส้นใยพอลิบิวทีลีนซัคซิเนตจากกระบวนการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิตและการประยุกต์เพื่อใช้เป็นวัสดุโครงร่างสำหรับกระดูก (Electrospun Poly(1,4-butylene succinate)extended with 1,6-diisocyanatohexane Fiber mats and their Potential Use as Bone Scaffolds) อ. ที่ปรึกษา : รศ. ดร. พิชญ์ ศุภผล 60 หน้า

แผ่นเส้นใยพอลิบิวทีลีนซัคซิเนตสามารถเตรียมได้จากกระบวนการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต โดยใช้พอลิบิวทีลีนซัคซิเนตความเข้มข้น 22 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ละลายในสารละลายผสมระหว่างไคคลอโรมีเทนและไตรฟลูออโรอะซิติกแอซิก ในอัตราส่วน 90:10 โดยงานวิจัยจะทำการศึกษาถึงผลของตัวแปรต่างๆที่มีอิทธิพลต่อสัณฐานวิทยาและขนาดของเส้นใย ผลจากการทดสอบความเป็นพิษแบบอ้อมต่อเซลล์ออสทีโอเบลาจากกระดูกของมนุษย์ (SaOS-2) และเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากผิวหนังของหนู (L929) พบว่าแผ่นเส้นใยพอลิบิวทีลีนซัคซิเนตไม่มีการปลดปล่อยสารพิษที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ นอกจากนี้งานวิจัยได้ศึกษาถึงคุณสมบัติในการใช้เป็นวัสดุโครงร่างสำหรับกระดูกในสภาวะนอกร่างกายด้วยเซลล์ออสทีโอเบลาจากกระดูกของมนุษย์ (SaOS2) โดยได้ทำการศึกษายืดเกาะ การเจริญเติบโต และอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสแอคติวิตีของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนแผ่นเส้นใย เปรียบเทียบกับแผ่นฟิล์มจากการหล่อและงานเพาะเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีน (TCPS) พบว่าเซลล์ยึดเกาะและเจริญเติบโตบนแผ่นเส้นใยได้ดีกว่าบนแผ่นฟิล์มและงานเพาะเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีน ส่วนในกรณีของอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสแอคติวิตี พบว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนแผ่นเส้นใยอิเล็กโทรสปิน ให้ค่าอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสแอคติวิตีมากกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนแผ่นฟิล์มแต่น้อยกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนงานเพาะเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีน รูปจากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดบ่งชี้ว่าเซลล์ออสทีโอเบลาจากกระดูกของมนุษย์ (SaOS-2) ยังคงรูปร่างและลักษณะของเซลล์ตลอดการเพาะเลี้ยง อีกทั้งยังพบว่าเพียง 1 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงตัวเซลล์บนแผ่นเส้นใยมีการยึดขยายออก ในขณะที่ตัวเซลล์บนแผ่นฟิล์มและงานเพาะเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีนยังคงมีรูปร่างกลมมน ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการนำแผ่นเส้นใยอิเล็กโทรสปินของพอลิบิวทีลีนซัคซิเนตมาใช้เป็นวัสดุโครงร่างสำหรับกระดูกต่อไป

## ACKNOWLEDGEMENTS

The author would like to express her sincere gratefulness to her advisor, Assoc. Prof. Pitt Supaphol, for his guidance, useful advices, kind and constructive criticism, inspiration and great encouragement throughout this thesis.

The author would like to give her thankfulness to Assoc. Prof. Prasit Pavasant, Asst. Prof. Chidchanok Meechaisue, and Dr. Damrong Damrongsri for being as her thesis committees and giving her the useful comments and suggestions. Highly gratitude goes to Assoc. Prof. Prasit Pavasant for his kindness in giving her valuable theoretical and technical knowledge in cell culture and providing her the instruments and the convenient laboratory room.

This thesis work is partially funded by the National Excellence center. The author would like to thank the Petroleum and Petrochemical College (PPC), Chulalongkorn University where the author have gained the precious knowledge in the Polymer Science program and the author greatly appreciates all faculty and staff members who have tendered knowledge and favourableness for her. The author also appreciates for the support and suggestions from all of her friends at the PPC and at Department of Anatomy, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University.

Last and most of all, the author would like to express her deep grateful to her parents, and brother for their love, understanding, caring and supporting her at all times.

## TABLE OF CONTENTS

	<b>PAGE</b>
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
<b>CHAPTER</b>	
<b>I INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>II LITERATURE REVIEW</b>	<b>4</b>
<b>III EXPERIMENTAL</b>	<b>13</b>
3.1 Electrospinning of PBSu-DCH Fiber Mats	
3.1.1 Materials and Preparation and Characterization of Spinning Solutions	13
3.1.2 Electrospinning and Characterization of as-spun Fiber Mats	13
3.2 Cell Culture Studies	16
3.2.1 Cell Culture and Cell Seeding	16
3.2.2 Indirect Cytotoxicity Evaluation	16
3.2.3 Cell Attachment and Proliferation	17
3.2.4 Quantification of viable cells (MTT assay)	17
3.2.5 Morphological Observation of Cultured Cells	18
3.2.6 Production of Characteristic Protein of Cultured Cells	18

<b>CHAPTER</b>	<b>PAGE</b>
3.3 Statistic Analysis	19
<b>IV RESULTS AND DISCUSSION</b>	<b>20</b>
4.1 Preparation and Characterization of as-spun PBSu-DCH fibers	
4.1.1 Effect of polymer concentration on the morphology of as-spun fibers	20
4.1.2 Effect of collection distance and applied electrical potential on the morphology of as-spun fibers	21
4.2 Mechanical and Physical Characteristics of the as-spun PBSu-DCH fibers	23
4.3 Thermal Characteristics of the as-spun PBSu-DCH fibers	25
4.4 Cell Study	27
4.4.1 Indirect Cytotoxicity Evaluation	27
4.4.2 Cell Attachment and Proliferation	28
4.4.3 Alkaline phosphatase (ALP) activity	31
<b>V CONCLUSIONS</b>	<b>36</b>
<b>REFERENCES</b>	<b>38</b>
<b>APPENDICES</b>	<b>44</b>
<b>Appendix A</b> Polymer Solution Properties	44
<b>Appendix B</b> Average Fiber Diameter of Electrospun PBSu-DCH Fibers	45
<b>Appendix C</b> Mechanical and Physical Characteristics	46
<b>Appendix D</b> Thermal Characteristics	51
<b>Appendix E</b> Cell Studies	54
<b>CURRICULUM VITAE</b>	<b>60</b>

**LIST OF TABLES**

<b>TABLE</b>		<b>PAGE</b>
4.1	SEM images of the as-spun PBSu-DCH fibers from 22% w/v PBSu-DCH in dichloromethane/trifluoroacetic acid (90/10) at various applied electrical potential (kV) and collection distance (cm)	23
4.2	Mechanical characteristic of the as-spun PBSu-DCH fiber mats of about 120 $\mu\text{m}$ thick as well as those of solution-cast films of PBSu-DCH	24
4.3	Thermal characteristics of the electrospun fiber mats and solution-cast film of PBSu-DCH as well as those of the as-received pellets of PBSu-DCH	26
4.4	Selected SEM images of SaOS-2 cultured on fibrous scaffolds of PBSu-DCH as a function of time in culture	32
4.5	Selected SEM images of SaOS-2 cultured on film scaffolds of PBSu-DCH as a function of time in culture	33
4.6	Selected SEM images of SaOS-2 cultured on glass substrates as a function of time in culture	34



**LIST OF FIGURES**

<b>FIGURE</b>		<b>PAGE</b>
2.1	A schematic drawing of the electrospinning apparatus	4
2.2	Electrospinning jet in electrospinning process	5
3.1	The electrospinning apparatus utilized in the production of ultrafine fibers	14
4.1	Selected SEM images (scale bar = 1 $\mu$ m and magnification = 2000x) illustrating the effect of solution concentration on morphology of PBSu-DCH fibers that were electrospun from PBSu-DCH solutions in dichloromethane/trifluoroacetic acid (90/10) at various concentrations.	21
4.2	Selected SEM images of PBSu-DCH fibers electrospun from 22% PBSu-DCH solution in dichloromethane/trifluoroacetic acid (90/10) at the applied electrical potential of 17 kV and a collection distance of 20 cm	22
4.3	Indirect cytotoxicity evaluation of film and fibrous PBSu-DCH scaffolds based on viability of human osteoblasts (SaOS-2) and mouse fibroblasts (L929)	27
4.4	Attachment and proliferation of SaOS-2 on TCPS, and film and fibrous PBSu-DCH scaffolds as a function of time in culture	28
4.5	Attachment of SaOS-2 on TCPS, and film and fibrous PBSu-DCH scaffolds as a function of time in culture	29
4.6	Proliferation of SaOS-2 on TCPS, and film and fibrous PBSu-DCH scaffolds as a function of time in culture	30
4.7	ALP activity of SaOS-2 cultured on TCPS and film and fibrous PBSu-DCH scaffolds after 3, 5, and 10 days in culture	35