การใช้เส้นใยไหมไฟโบรอินที่ได้จากการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต เป็นวัสดุโครงสร้างสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ชวานน์

นางสาวตติยา ลักษณะงาม

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์ประยุกต์และเทคโนโลยีสิ่งทอ ภาควิชาวัสดุศาสตร์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-14-2001-3

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

UTILIZATION OF ELECTROSPUN SILK FIBROIN FIBERS AS SCAFFOLDING MATERIAL FOR SCHWANN CELL CULTURE

Miss Tatiya Laksana-ngam

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Applied Polymer Science and Textile Technology
Department of Materials Science
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2005

ISBN 974-14-2001-3

Thesis Title	Utilization of Electrospun Silk Fibroin Fibers as Scaffolding Material for Schwann Cell Culture
By	Miss Tatiya Laksana-ngam
Field of Study	Applied Polymer Science and Textile Technology
Thesis Advisor	Assistant Professor Duangdao Aht-ong, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Associate Professor Pitt Supaphol, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

.....Dean of The Faculty of Science

(Professor Piamsak Menasveta, Ph. D.)

THESIS COMMITTEE

.....Chairman

(Associate Professor Saowaroj Chuayjuljit)

.....Thesis Advisor

(Assistant Professor Duangdao Aht-ong, Ph.D.)

..... Thesis Co-advisor

(Associate Professor Pitt Supaphol, Ph.D.)

.....Member

(Associate Professor Paiparn Santisuk)

.....Member

(Associate Professor Khemchai Hemachandra, Ph.D.)

ตติยา ลักษณะงาม : การใช้เส้นใยไหมไฟโบรอินที่ได้จากการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิตเป็นวัสดุโครงสร้างสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ชวานน์. (UTILIZATION OF ELECTROSPUN SILK FIBROIN FIBERS AS SCAFFOLDING MATERIAL FOR SCHWANN CELL CULTURE) อ. ที่ปรึกษา : ผศ.ดร. ดวงดาว อาจองค์, อ. ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร. พิชญ์ ศุภผล, 70 หน้า. ISBN 974-14-2001-3

จุดประสงค์ของงานวิจัยนี้คือการหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเส้นใยไหมไฟโบรอินขนาดนาโนเมตรจากหนอนไหมชนิด *Bombyx mori* ด้วยกระบวนการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต โดยทำการเปลี่ยนแปลงค่าความเข้มข้นของสารละลายไฟโบรอินตั้งแต่ 42 ถึง 52 เปอร์เซ็นโดยน้ำหนักต่อปริมาตร และเปลี่ยนแปลงค่าศักย์ไฟฟ้าที่ให้ตั้งแต่ 15 ถึง 30 กิโลโวลต์ จากการวิเคราะห์สัณฐานวิทยาของเส้นใยนาโนด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดทำให้ทราบว่า เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารละลายไหมไฟโบรอินที่ 50 เปอร์เซ็นโดยน้ำหนักต่อปริมาตรและค่าศักย์ไฟฟ้าที่ 25 กิโลโวลต์ สามารถผลิตเส้นใยไหมไฟโบรอินขนาดนาโนเมตรได้โดยไม่มีปุ่มปมเกิดขึ้น เมื่อทำการวิเคราะห์สมบัติทางความร้อนและลักษณะโครงสร้างโมเลกุลของเส้นใยนาโนที่ผลิตได้ด้วยเทคนิคเทอร์โมกราวิเมทรีและวิธีฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปคโตรสโครปีพบว่า ช่วงอุณหภูมิที่ทำให้เส้นใยนาโนเกิดการสูญเสียมวลอย่างชัดเจนคือที่อุณหภูมิ 270 ถึง 370 องศาเซลเซียส และเส้นใยนาโนมีการจัดเรียงโครงสร้างโมเลกุลแบบ β - sheet นอกจากนั้นยังได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์ชวานน์บนวัสดุโครงสร้างสองแบบคือ ไหมไฟโบรอินแบบแผ่นเส้นใยนาโนและแบบฟิล์ม วิธีที่นำมาวิเคราะห์ความเข้ากันได้ระหว่างเซลล์ชวานน์กับวัสดุโครงสร้างและพฤติกรรมของเซลล์ก็คือ การทดสอบความเป็นพิษของวัสดุโครงสร้างต่อเซลล์ และ การทดสอบการยึดเกาะและการเพิ่มจำนวนของเซลล์บนวัสดุโครงสร้าง โดยใช้สารละลาย MTT หรือ 3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) ในการวัดปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต ลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์ชวานน์บนวัสดุโครงสร้างสามารถวิเคราะห์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด จากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่า แผ่นเส้นใยนาโนสามารถส่งเสริมหรือกระตุ้นให้ชวานน์เซลล์มีการเจริญเติบโตได้ดีกว่าฟิล์ม แต่เซลล์ชวานน์บนแผ่นเส้นใยนาโนนั้นไม่สามารถที่จะคงลักษณะทางด้านกายวิภาคเดิมของเซลล์เอาไว้ได้ จากข้อมูลของงานวิจัยนี้เสนอแนะได้ว่า แผ่นเส้นใยนาโนที่ได้จากไหมไฟโบรอินสามารถพัฒนาให้เป็นวัสดุโครงสร้างที่ดีและเหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์ชวานน์ได้ต่อไปในอนาคต

ภาควิชาวัสดุศาสตร์ ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์พอลิเมอร์ประยุกต์และเทคโนโลยีสิ่งทอ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2548 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4772301523 : MAJOR APPLIED POLYMER SCIENCE AND TEXTILE TECHNOLOGY
KEYWORD : ELECTROSPINNING / SILK FIBROIN FIBERS / SCAFFOLD

TATIYA LAKSANA-NGAM : UTILIZATION OF ELECTROSPUN SILK FIBROIN FIBERS AS SCAFFOLDING MATERIAL FOR SCHWANN CELL CULTURE. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. DUANGDAO AHT-ONG, Ph.D, CO–ADVISOR : ASSOC. PROF. PITT SUPAPHOL, Ph.D, 70 pp.
ISBN 974 -14 -2001-3

The objective of this research was to determine the appropriate condition of the electrospinning process of the silk *Bombyx mori* to produce silk fibroin nanofibers by using formic acid as a solvent. The concentrations of silk fibroin solution and the applied voltages were varied from 15 to 30 kV and 42 to 52 % w/v, respectively. The morphology of electrospun silk fibroin nanofibers was determined by scanning electron microscopy (SEM). The appropriate condition of electrospinning process that could generate the nanofibers without the presence of beads were 25 kV and 50% w/v, respectively. The thermal properties and the structural characteristics of electrospun silk fibroin nanofibers were investigated through thermogravimetry analysis (TGA) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), respectively. The electrospun silk fibroin nanofibers exhibited mass loss over a temperature range of 270 to 370 °C and had the β-sheet conformation. In addition, two types of scaffolds, electrospun fibrous mats and films, were fabricated for the Schwann cells culture. Biological response of the cells towards the scaffolds was tested by observing the cytotoxicity, the attachment, and the proliferation of Schwann cells that were seeded on the scaffolds. The MTT solution or 3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) was used to quantify the viability of the cells. The Schwann cell morphology on the scaffolds was examined by SEM. The obtained results indicated the fibrous mat scaffold promoted better growth of Schwann cells than the film did, although Schwann cells could not maintain their phenotypes on the fibrous scaffold. These data suggested that the electrospun silk fibroin fibers could be more further studied and developed to be a preferable scaffold for Schwann cell culture.

Department of Materials Science Student's signature Tatiya Laksana-ngam
Field of study Applied Polymer Science and Textile Technology Advisor's signature Duangdao Aht-ong
Academic year 2005 Co-Advisor's signature

ACKNOWLEDGEMENTS

First, I would like to express greatest gratitude to my advisor, Assistant Professor Dr. Duangdao Aht-ong, and co-advisor Associate Professor Dr. Pitt Supaphol, not only for their advice, assistance and generous encouragement, but also for kindly reviewing throughout this thesis.

I would also like to express deep appreciation to Associate Professor Saowaroj Chuayjuljit, Associate Professor Paiparn Santisuk, and Associate Professor Dr. Khemchai Hemachandra for serving as the chairman and members of my thesis committee, respectively, including valuable suggestions and comments.

The appreciation is also extended to Program of Applied Polymer Science and Textile Technology, Department of Materials Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University for all lecturers and staffs to fulfill this study.

In addition, I am specially thankful to the Petroleum and Petrochemical College including the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University for provision of experimental facilities.

Finally, I would like to extend special appreciation to all of my friends and my family for their endless support and love throughout my life. Thanks also to my classmates, every student in Applied Polymer Science and Textile Technology Program.

CONTENTS

	PAGE
ABSTRACT (IN THAI)	iv
ABSTRACT (IN ENGLISH)	v
ACKNOWLEDGEMENTS	vi
CONTENTS	vii
LIST OF FIGURES	ix
LIST OF TABLES	x
CHAPTER I INTRODUCTION	1
CHAPTER II THEORY AND LITERATURE REVIEW	3
2.1 Biodegradable scaffold for tissue engineering	3
2.1.1 Tissue engineering	3
2.1.2 Engineering materials	4
2.1.3 Biodegradable scaffolds	5
2.1.4 Fabrication of biodegradable scaffolds	6
2.2 Electrospinning technique	8
2.3 Silkworm silk	10
2.4 Schwann cell	17
2.4.1 Nervous system	17
CHAPTER III EXPERIMENT	22
3.1 Materials	22
3.2 Experimental details	24
3.2.1 Preparation of silk fibroin solution	24
3.2.2 Preparation of electrospun silk fibroin fibers	24
3.2.3 Preparation of silk fibroin scaffolds	24
3.2.4 Schwann cell culture and seeding on silk fibroin scaffold	25
3.2.4.1 Quantification of viable cells (MTT assay)	26
3.2.4.2 Cytotoxicity tests between Schwann cells and the scaffolds	26
3.2.4.3 Schwann cell attachment and proliferation	27
3.2.5 Preparation of the scaffolds coating for SEM	27

PAGE

3.3 Characterization 28
3.3.1 Thermogravimetric Analysis (TGA)..... 28
3.3.2 Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)..... 28
3.3.3 Scanning Electron Microscopy (SEM)..... 28
3.4 Flow charts..... 29
3.4.1 Experimental summary..... 29
3.4.2 Scaffold fabrications..... 30
3.4.3 Cytotoxicity tests between Schwann cells and the scaffolds..... 31
3.4.4 Schwann cell attachment and proliferation..... 32
CHAPTER IV RESULTS AND DISCUSSION..... 33
4.1 Morphology and microstructure of electrospun silk fibroin fibers 33
4.2 Thermogravimetry analysis of electrospun silk fibroin fibers..... 38
4.3 Infrared analysis of electrospun silk fibroin fibers..... 39
4.4 Cytotoxicity tests..... 40
4.5 Schwann cell attachment and proliferation..... 43
CHAPTER V CONCLUSION 49
REFERENCES..... 51
APPENDICES..... 55
APPENDIX A..... 56
APPENDIX B..... 64
VITA..... 70

LIST OF FIGURES

FIGURE		PAGE
2.1	The schematic of electrospinning system.....	9
2.2	Structure of a raw silk filament.....	12
2.3	The crystalline structure of the polypeptide chains in silk fibroin...	13
2.4	The pyramidal cell – A common neuron.....	18
2.5	An axon coated with myelin sheath.....	19
2.6	Formation and structure of myelin sheath.....	19
4.1	SEM micrographs of electrospun silk fibroin fibers obtained with the different applied voltages ranging from 15 to 30 kV.....	37
4.2	Thermogravimetric analytical curve of electrospun silk fibroin fibers.....	38
4.3	ATR-FTIR spectrum of electrospun silk fibroin fibers.....	39
4.4	Viability of Schwann cells (A) Indirect and (B) direct cytotoxicity evaluation of control, silk fibroin fibrous mat, and as - cast silk fibroin film scaffold.....	42
4.5	Viability of Schwann cell attachment on control, silk fibroin fibrous mat, and as-cast silk fibroin film scaffold.....	45
4.6	Viability of Schwann cell proilferation on control, silk fibroin fibrous mat, and as-cast silk fibroin film scaffold.....	46

LIST OF TABLES

TABLE		PAGE
2.1	The composition of amino acid in silk fiber (%).....	14
2.2	Comparison of mechanical properties of silks (silkworm) to several types of biomaterial fibers and tissues commonly used today.....	15
3.1	Chemical reagents and suppliers used for preparation of electrospun silk fibroin fibers.....	22
3.2	Chemical reagents and suppliers used for preparation of Schwann cell culture.....	23
3.3	Instruments used for characterization.....	23
4.1	SEM micrographs and average fiber diameter of electrospun silk fibroin fibers from silk fibroin solutions with the concentration ranging from 42 to 52% w/v.....	34
4.2	The UV absorbance both of indiect and direct cytotoxicity tests on the various types of substrates.....	42
4.3	The UV absorbance of Schwann cell attachment on the various types of substrates.....	45
4.4	The UV absorbance of Schwann cell proliferation on the various types of substrates.....	46
4.5	The SEM images of Schwann cell cultured on the control, film and fibrous mat at the different times in culture.....	47