

การใช้เส้นใยไหมไฟโบรอินที่ได้จากการปั่นด้วยไฟฟ้าสถิต

เป็นวัสดุโครงสร้างสำหรับสร้างเนื้อเยื่อผิวหนัง



นางสาวศิริพร เหลืองอนันต์คุณ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์ประยุกต์และเทคโนโลยีสิ่งทอ ภาควิชาวัสดุศาสตร์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-14-2885-5

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

UTILIZATION OF ELECTROSPUN SILK FIBROIN FIBERS AS SCAFFOLDING
MATERIAL FOR SKIN REGENERATION

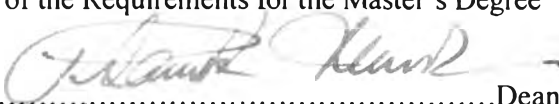
Miss Siriporn Leanganankhun

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Applied Polymer Science and Textile Technology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2005
ISBN 974-14-2885-5

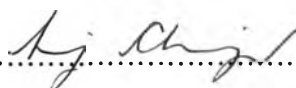
481912


Thesis Title Utilization of Electrospun Silk Fibroin Fibers as Scaffolding
Material for Skin Regeneration
By Miss Siriporn Leanganankhun
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.

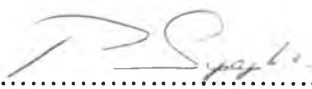
Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in
Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

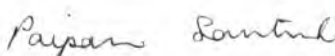

.....Dean of The Faculty of Science
(Professor Piamsak Menasveta, Ph. D.)

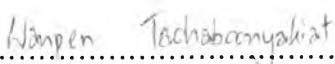
THESIS COMMITTEE


.....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
(Wanpen Tachaboonyakiat, Ph.D.)

ศิริพร เหลืองอนันต์คุณ : การใช้เส้นใยไหมไฟโบรอินที่ได้จากการปั่นด้วยไฟฟ้าสถิตเป็นวัสดุโครงสร้างสำหรับสร้างเนื้อเยื่อผิวหนัง. (UTILIZATION OF ELECTROSPUN SILK FIBROIN FIBERS AS SCAFFOLDING MATERIAL FOR SKIN REGENERATION) อ.ที่ปรึกษา : ผศ. ดร. ดวงดาว อัจจงค์, อ.ที่ปรึกษาร่วม: รศ. ดร. พิชญ์ สุภผล , 82 หน้า. ISBN 974-14-2885-5.

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาตัวแปรในการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิตซึ่งตัวแปรดังกล่าว คือ ความเข้มข้นของสารละลายเส้นใยไหมไฟโบรอิน (SF) และ ค่าศักย์ไฟฟ้าที่มีต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยที่ได้จาก regenerated silk ของ ไหมพันธุ์ *Bombyx mori* (*B.mori*) โดยศึกษาความเข้มข้นของสารละลายไหมไฟโบรอินในช่วงความเข้มข้นที่ ร้อยละ 42 ถึง 52 โดยมวลต่อปริมาตร และ ศึกษาผลของค่าศักย์ไฟฟ้าในช่วง 15 ถึง 30 กิโลโวลต์ จากผลการทดลองพบว่าภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเส้นใยไหมไฟโบรอินที่ให้เส้นใยในระดับนาโนและมีความสม่ำเสมอปราศจากปม คือ ความเข้มข้นของสารละลายเส้นใยไหมไฟโบรอินที่ร้อยละ 50 โดยมวลต่อปริมาตร ด้วยค่าศักย์ไฟฟ้า 25 กิโลโวลต์ และระยะห่างของการปั่นเส้นใย คือ 15 เซนติเมตรโดยใช้หัวเข็มฉีดยาเบอร์ 20 ซึ่งลักษณะทางสัณฐานวิทยา สมบัติทางความร้อน และ ลักษณะทางพื้นผิวของแผ่นเส้นใยทั้งที่ไม่มีและมีการเคลือบของกรดไฮอะลูโรนิก (hyaluronic acid, HA) จะถูกตรวจสอบด้วยเทคนิค SEM, TGA และ ATR-IR ตามลำดับ สำหรับความเป็นไปได้ในการใช้แผ่นเส้นใยไหมไฟโบรอินในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อผิวหนังได้ถูกประเมินโดยเปรียบเทียบผลที่ได้กับแผ่นเส้นใยไหมไฟโบรอินที่เคลือบด้วยกรดไฮอะลูโรนิก และแผ่นฟิล์มไหมไฟโบรอินที่ได้จากการหล่อขึ้นรูป การวิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเซลล์ของวัสดุเหล่านี้ได้อ้างอิงถึงวิธีการวิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเซลล์แบบอ้อมโดยใช้เซลล์ผิวหนังหนู (L929) เป็นเซลล์อ้างอิง ในขณะที่การศึกษาการยึดเกาะและการเพิ่มจำนวนของเซลล์ได้ถูกศึกษาโดยใช้ human foreskin fibroblasts (HFF) primary cells และ immortalized human keratinocyte (HaCaT) ผลการทดลองยืนยันว่าวัสดุทุกประเภทไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ อีกทั้งแผ่นเส้นใยไหมไฟโบรอินที่เคลือบด้วยกรดไฮอะลูโรนิกสามารถรองรับการยึดเกาะและการเพิ่มจำนวนของเซลล์ได้ดีกว่าวัสดุชนิดอื่น ทั้งนี้เนื่องจากกรดไฮอะลูโรนิกเป็นองค์ประกอบหลักหนึ่งของระบบโครงสร้างภายนอกเซลล์ (extracellular matrix, ECM) ดังนั้น แผ่นเส้นใยไหมไฟโบรอินทั้งที่มีกรดไฮอะลูโรนิกเคลือบอยู่หรือไม่ก็ตาม มีศักยภาพในการใช้งานเป็นวัสดุตกแต่งแผล และ/หรือ วัสดุโครงร่างเทียมสำหรับการปลูกถ่ายผิวหนังได้

ภาควิชา วัสดุศาสตร์

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์พอลิเมอร์ประยุกต์และเทคโนโลยีสิ่งทอ

ปีการศึกษา 2548

ลายมือชื่อนิติกร.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

#4772499123 : MAJOR APPLIED POLYMER SCIENCE AND TEXTILE TECHNOLOGY

KEY WORD: SILK FIBROIN / ELECTROSPINNING / HYALURONIC ACID / KERATINOCYTE / FIBROBLAST

SIRIPORN LEANGANANKHUN : UTILIZATION OF ELECTROSPUN SILK FIBROIN FIBERS AS SCAFFOLDING MATERIAL FOR SKIN REGENERATION. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. DUANGDAO AHT-ONG, Ph.D. THESIS COADVISOR : ASSOC. PROF. PITT SUPAPHOL, Ph.D., 82 pp. ISBN 974-14-2885-5.

In this research, the effects of electrospinning parameters [silk fibroin (SF) solution concentrations and applied voltages] on the morphology and diameters of electrospun SF fibers from *Bombyx mori* (*B.mori*) were investigated. The range of SF solution concentration studied was from 42 % (w/v) to 52% (w/v) and the range of applied voltage studied was from 15 kV to 30 kV. The results indicated that the optimal condition for fabrication of the uniform SF nanofibers without beads was 50% (w/v) SF solution with an applied voltage of 25 kV over a collection distance of 15 cm using a gauge 20 needle. The morphology, thermal properties, and surface characteristic of as-prepared and hyaluronic acid (HA) coating electrospun silk fibroin were investigated by SEM, TGA, and ATR-IR, respectively. Potential use of the electrospun SF fiber mats as scaffolding materials for skin regeneration was evaluated in comparison with HA-coated electrospun SF fiber mats and solution-cast SF films. The cytotoxicity evaluation of these materials was carried out based on the indirect cytotoxicity evaluation procedure using a mouse fibroblasts (L929), while the attachment and the proliferation evaluation was carried out using human foreskin fibroblasts (HFF; primary cells) and immortalized human keratinocytes (HaCaT). It was observed that all of the fibrous and the film scaffolds posed no threat to the cells and HA-coated electrospun SF fiber mats supported both the attachment and the outgrowth of cells better than the other types of the scaffolds at initial stage of culture, because HA is a major constituent of the extracellular matrix (ECM). Moreover, electrospun SF fiber mats provided a higher level of surface area-to-volume ratio and porosity for cells to attach. Therefore, electrospun SF fiber mats with or without HA coating exhibited a reasonably good potential for wound dressing and/or skin scaffolding applications.

Department of Materials Science

Field of study Applied Polymer Science and Textile Technology

Academic year 2005

Student's signature.....*Siriporn Leanganankhun*

Advisor's signature.....*Duangdao Aht-ong*

Co-advisor's signature.....*Pitt Supaphol*

ACKNOWLEDGEMENTS

The author wishes to express their gratitude to Asst. Prof. Dr. Duangdao Aht-ong, Assoc. Prof. Dr. Pitt Supaphol, and Assoc. Dr. Prasit Pavasant for their advice, kind help, and assistance throughout the course of this research. In addition, the author wishes to express deep appreciation to Assoc. Prof. Saowaroj Chuayjuljit, Assoc. Prof. Paiparn Santisuk, and Dr. Wanpen Tachaboonyakiat for serving as the chairman and members of her thesis committee, respectively, for their valuable suggestions and comments

Appreciation is also extended to Program of Applied Polymer Science and Textile Technology, and the Department of Materials Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University for granting financial support to fulfill this study and provision of experimental facilities.

The author would like to thank Ph.D. students at Faculty of Dentistry, and Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University, for their help, providing the indispensable equipment, instrument training, and suggestion. Finally, the author is very appreciated to her family and her good friends whose names are not mentioned here for their love, assistance and encouragement throughout her entire education. Without them, the author would have never been able to achieve this goal.

CONTENTS

	PAGE
ABSTRACT (IN THAI)	iv
ABSTRACT (IN ENGLISH)	v
ACKNOWLEDGEMENT	vi
CONTENTS	vii
LIST OF FIGURES	ix
LIST OF TABLES	x
LIST OF ABBREVIATIONS	xi
CHAPTER I INTRODUCTION	1
1.1 Introduction.....	1
1.2 The objectives of the thesis.....	2
CHAPTER II THEORY AND LITERATURE REVIEWS	3
2.1 Tissue engineering	3
2.1.1 Biomaterials used in tissue engineering.....	3
2.1.1.1 The biomaterial scaffold	4
2.1.1.2 Scaffold properties.....	6
2.1.1.3 Scaffold fabrication techniques.....	6
2.1.2 Tissue engineering applications.....	8
2.2 Electrospinning.....	9
2.3 Silks.....	11
2.4 Skin.....	15
CHAPTER III EXPERIMENTAL	20
3.1 Materials.....	20
3.2 Experimental.....	22
3.2.1 Preparation of silk fibroin (SF) spinning solution	23
3.2.2 Preparation of electrospun silk fibroin fibers.....	23
3.2.3 Preparation of silk fibroin scaffolds	23
3.2.4 Keratinocyte and fibroblast cell culture and testing of - cell response onto scaffolding materials	24
3.2.4.1 Cell cytotoxicity test.....	25
3.2.4.2 Cell attachment and proliferation test.....	26

	PAGE
3.2.5 Preparation of scaffolds for SEM.....	26
3.3 Characterization and testing.....	26
3.3.1 Scanning electron microscope (SEM).....	26
3.3.2 Attenuated total reflection (ATR)-Fourier transform- infrared spectrophotometer (FTIR)	27
3.3.3 Thermogravimetric analysis (TGA).....	27
CHAPTER IV RESULTS AND DISCUSSION.....	28
4.1 Morphology of electrospun SF nanofibers.....	28
4.1.1 Effect of silk polymer concentration on fiber diameter....	28
4.1.2 Effect of applied voltage on fiber diameter.....	31
4.2 Surface characteristic of as-electrospun SF and HA coating.....	34
4.3 Thermogravimetric analysis (TGA).....	36
4.4 Cytotoxicity.....	38
4.5 Cell attachment and proliferation.....	39
4.5.1 HaCaT cells.....	39
4.5.2 HFF cells.....	47
CHAPTER V CONCLUSION AND SUGGESTION.....	56
REFERENCES.....	58
APPENDICES.....	62
APPENDIX A.....	63
APPENDIX B.....	77
VITA.....	82

LIST OF FIGURES

FIGURE	PAGE
2.1 The formation of fiber by the electrospinning.....	10
2.2 The polypeptide chain of SF	13
2.3 The skin structure	15
2.4 The shape of fibroblast	16
2.5 The structure of hyaluronic acid (HA) or hyaluronan	19
3.1 Overview of this research	22
4.1 ATR-IR and FT-IR spectra of (A) neat as-spun SF fibers, (B) HA-coated as-spun SF fibers, and (C) pure HA powder.....	35
4.2 Thermogravimetric diagram of as-spun SF fibers, pure HA powder (HA), and HA-coated as-spun SF fibers (SF-HA).....	37
4.3 Cytotoxicity of as-prepared materials to L929 cells in comparison with control.....	39
4.4 Attachment of HaCaT on control, SF film, as-spun SF fibers and HA-coated SF fibers scaffolds as a function of time in culture.....	42
4.5 Proliferation of HaCaT cell on control, SF film, as-spun SF and HA-coated as-spun SF fibrous scaffolds as a function of time in culture.....	46
4.6 Attachment of HFF cell on control, SF film, as-spun SF and HA-coated as-spun SF fibrous scaffolds as a function of time in culture.....	50
4.7 Proliferation of HFF cell on control, SF film, as-spun SF and HA-coated as-spun SF fibrous scaffolds as a function of time in culture....	54

LIST OF TABLES

TABLE	PAGE
2.1 The composition of elements in silk fibroin	12
3.1 Chemical reagents and supplies.....	20
3.2 Instruments.....	21
4.1 SEM micrographs and fiber diameter of as-spun SF by electrospinning at various SF concentrations with a constant electrospinning distance of 15 cm at applied voltage of 25 kV.....	29
4.2 SEM micrographs (2000X) and fiber diameter of as-spun SF fabricated by electrospinning at various applied voltages, the concentration of 50 % (w/v) with a constant electrospinning distance of 15cm.....	32
4.3 Data shows the quantities (%) of percentage of viable L929 cells on each scaffolding material compared with control.....	38
4.4 SEM micrographs (3500X) of HaCaT cells attached on the surface of SF film, as-spun SF and HA-coated SF fibrous (SF-HA) scaffolds comparison with control. The scale bar shown is 5 μm	40
4.5 Data shows the quantities (%) of the number of living HaCaT cell attached on each scaffolding material comparison with control.....	42
4.6 SEM micrographs (500X) of the HaCaT cell proliferate on the surface of SF film, as-spun SF and SF-HA scaffolds comparison with control. The scale bar shown is 50 μm	44
4.7 Data shows the quantities (%) of percentage of viable HaCaT cell proliferated on each scaffolding material comparison with control.....	46
4.8 SEM micrographs of HFF attached on the surface of SF film, as-spun SF and SF-HA scaffolds comparing with control.....	48
4.9 Data shows the quantities (%) of percentage of viable HFF cell attached on each scaffolding material comparison with control.....	50
4.10 SEM micrographs (500X) of HFF cells proliferated on the surface of SF film, as-spun SF and SF-HA scaffolds comparison with control.....	52
4.11 Data shows the quantities (%) of percentage of viable HFF cell proliferated on each scaffolding material comparison with control.....	54

LIST OF ABBREVIATIONS

SF	silk fibroin
<i>B.mori</i>	<i>Bombyx mori</i> silk cocoon
ECM	extracellular matrix
HA	Hyaluronic acid or hyaluronan
°C	degree Celsius
cm ⁻¹	unit of wavenumber
ml	milliliter
g	gram (s)
N	normality
h	hour(s)
SD	Standard deviation
HFF	human foreskin fibroblasts primary cells
L929	the mouse fibroblast cell lines
HaCaT	immortalized human keratinocyte cell line
SF-HA	Hyaluronic acid (HA)-coated SF fibrous