ผลของการเชื่อมขวางทางเคมีและไฮดรอกซีอะพาไทต์ต่อสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมจากไฟโบรอินไหมไทยและเจลาติน

สำนักงานวิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นางสาวพนิดา เจตบำเพ็ญกุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5070361421

EFFECTS OF CHEMICAL CROSSLINKING AND HYDROXYAPATITE ON THE PROPERTIES OF THAI SILK FIBROIN/GELATIN SCAFFOLDS

Miss Panida Jetbumpenkul

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Engineering Program in Chemical Engineering

Department of Chemical Engineering

Faculty of Engineering

Chulalongkorn University

Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn University

522158

Thesis Title	EFFECTS OF CHEMICAL CROSSLINKING AND HYDROXYAPATITE ON THE PROPERTIES OF THAI SILK FIBROIN/GELATIN SCAFFOLDS
By	Miss Panida Jetbumpenkul
Field of Study	Chemical Engineering
Thesis Advisor	Associate Professor Siriporn Damrongsakkul, Ph.D.

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

..... Dean of the Faculty of Engineering

(Associate Professor Boonsom Lerdhirunwong, Dr.Ing.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman

(Professor Suttichai Assabumrungrat, Ph.D.)

..... Thesis Advisor

(Associate Professor Siriporn Damrongsakkul, Ph.D.)

..... Examiner

(Assistant Professor Sorada Kanokpanont, Ph.D.)

..... Examiner

(Assistant Professor Nattaporn Tonanon, Ph.D.)

Nuttaporn Pimpha ..... External Examiner

(Nuttaporn Pimpha, Ph.D.)

พนิดา เจตบำเพ็ญกุล : ผลของการเชื่อมขวางทางเคมีและไฮดรอกซีอะพาไทต์ต่อสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมจากไฟโบรอินไหมไทยและเจลาติน. (EFFECTS OF CHEMICAL CROSSLINKING AND HYDROXYAPATITE ON THE PROPERTIES OF THAI SILK FIBROIN/GELATIN SCAFFOLDS) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ.ดร. ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล, 97 หน้า.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการเชื่อมขวางทางเคมี และไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่มีต่อสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์ผสมระหว่างไฟโบรอินไหมไทยและเจลาตินชนิดเอ โดยการเติมอีดีซี/เอ็นเอชเอสโดยตรงในสารละลายผสมของไฟโบรอินและเจลาติน และนำไปขึ้นรูปโดยวิธีการทำแห้งแข็งด้วยความเย็น ทั้งนี้ได้ทำการศึกษาอิทธิพลของสัดส่วนผสมโดยน้ำหนักระหว่างไฟโบรอินและเจลินติน พบว่าลักษณะสัณฐานของโครงเลี้ยงเซลล์ผสมระหว่างไฟโบรอินไหมไทยและเจลาตินในทุกสัดส่วนผสม ทั้งที่ผ่านและไม่ผ่านการเชื่อมขวางนั้นล้วนแต่มีรูพรุนสม่ำเสมอทั้งสิ้น นอกจากนี้ยังพบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ผสมระหว่างไฟโบรอินไหมไทยและเจลาตินที่ผ่านการเชื่อมขวางจะมีค่าน้ำหนักที่หายไปต่ำกว่า และค่ามอดูลัสของการกดสูงกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ผ่านการเชื่อมขวาง เป็นที่น่าสังเกตว่า ในกรณีของโครงเลี้ยงเซลล์ผสมระหว่างไฟโบร อินไหมไทยและเจลาตินที่อัตราส่วน 50/50 โดยน้ำหนัก จะมีค่าน้ำหนักที่หายไปต่ำที่สุด และมีความสามารถในการทนแรงกดได้ดี โดยมีค่าใกล้เคียงกันทั้งในกรณีที่ผ่านและไม่ผ่านการเชื่อมขวาง ทั้งนี้เนื่องมาจากที่สัดส่วนผสมนี้ทำให้เกิดแรงดึงดูดระหว่างประจุของไฟโบรอินและเจลาตินอย่างเหมาะสมนั่นเอง ผลการทดสอบการสลายตัวทางชีวภาพในระดับห้องปฏิบัติการในสารละลายเอนไซม์คอลลาจีเนสพบว่า ไฟโบรอินและการเชื่อมขวางมีส่วนช่วยยืดระยะเวลาการสลายตัวของโครงเลี้ยงเซลล์ให้นานยิ่งขึ้น และเมื่อตรวจสอบโครงสร้างด้วยเทคนิคเอ็กซเรย์ดิฟแฟรกชันพบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ผสมระหว่างไฟโบรอินไหมไทยและเจลาตินที่ผ่านและไม่ผ่านการเชื่อมขวาง ทั้งก่อนและหลังการทดสอบการสลายตัวทางชีวภาพนั้น มีโครงสร้างอสัณฐานเหมือนกันทั้งสิ้น ผลการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกของหนูในระดับห้องปฏิบัติการพบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ผสมระหว่างไฟโบรอินไหมไทยและเจลาตินที่มีปริมาณเจลาตินมากกว่าจะมีการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ดีกว่า นอกจากนี้ในส่วนของการศึกษาผลของการเติมอนุภาคไฮดรอกซีอะพาไทต์นั้น งานวิจัยนี้ได้เลือกวิธีการทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน (Homogenization) ในการขึ้นรูป ซึ่งพบว่ามีการกระจายตัวของไฮดรอกซีอะพาไทต์อย่างสม่ำเสมอภายในโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมขึ้น ผลการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกของหนูในระดับห้องปฏิบัติการพบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ผสมระหว่างไฟโบรอินไหมไทยและเจลาติน ทั้งที่เติมและไม่เติมไฮดรอกซีอะพาไทต์ล้วนไม่ส่งเสริมการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ทั้งสิ้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากข้อจำกัดทางด้านการถ่ายเทมวลสารภายในโครงเลี้ยงเซลล์และความเป็นพิษของคลอโรฟอร์มที่ตกค้างอยู่ภายในโครงเลี้ยงเซลล์ นอกจากนี้ยังพบว่า ความสามารถในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูกของเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์ทั้งสองนั้นมีความคล้ายคลึงกัน อย่างไรก็ตามในงานวิจัยต่อไปควรมีการศึกษาและพิสูจน์ข้อจำกัดดังกล่าว เพื่อพัฒนาโครงเลี้ยงเซลล์ให้มีความเหมาะสมสำหรับการประยุกต์ใช้งานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อต่อไป

ภาควิชา วิศวกรรมเคมี ลายมือชื่อนิสิต พนิดา เจตบำเพ็ญกุล

สาขาวิชา วิศวกรรมเคมี ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ปีการศึกษา 2552

5070361421 : MAJOR CHEMICAL ENGINEERING

KEYWORDS : THAI SILK FIBROIN / GELATIN / CROSSLINKING / HYDROXYAPATITE

PANIDA JETBUMPENKUL: EFFECTS OF CHEMICAL CROSSLINKING AND HYDROXYAPATITE ON THE PROPERTIES OF THAI SILK FIBROIN/GELATIN SCAFFOLDS. THESIS ADVISOR:

ASSOC. PROF. SIRIPORN DAMRONGSAKKUL, Ph.D., 97 pp.

This research aimed to investigate the effects of chemical crosslinking and hydroxyapatite on the properties of Thai silk fibroin/gelatin scaffolds. Crosslinked Thai silk fibroin/gelatin scaffolds were prepared by directly adding EDC/NHS in blended solution and subsequently fabricating via freeze-drying method. The effect of the weight blending ratios of Thai silk fibroin/gelatin was examined. It was found that all Thai silk fibroin/gelatin scaffolds possessed uniform porous structure. Crosslinked Thai silk fibroin/gelatin scaffolds showed lower weight loss (%) and higher compressive modulus than those of non-crosslinked scaffolds. Interestingly, non-crosslinked Thai silk fibroin/gelatin scaffold at the weight blending ratio of 50/50 showed the lowest weight loss (%) with excellent mechanical strength as good as the crosslinked scaffold due to the suitable electrostatic interactions between silk fibroin and gelatin. The results on *in vitro* biodegradability using collagenase solution revealed that Thai silk fibroin and crosslinking could delay the biodegradability of scaffolds. XRD results proved that all Thai silk fibroin/gelatin scaffolds before and after biodegradation possessed similar amorphous structure. The results on *in vitro* cell culture using bone marrow-derived stem cells showed that Thai silk fibroin/gelatin scaffolds containing high amount of gelatin were more effective to promote cell proliferation. Furthermore, in the study of the effect of hydroxyapatite adding, Thai silk fibroin/gelatin scaffolds were added with hydroxyapatite using homogenization method. Homogeneous distribution of hydroxyapatite granules in the scaffolds was observed. Homogenized Thai silk fibroin/gelatin scaffolds with and without hydroxyapatite incorporation did not support proliferation. This might be the result of mass transfer limit and the toxicity of chloroform residue in scaffolds. The result of osteogenic differentiation suggested that osteoconductive potential of both scaffolds was similar. However, these should be investigated and clarified in further study to obtain suitable scaffolds for tissue engineering application.

Department : Chemical Engineering Student's Signature ปณิดา เจริญบัญญ

Field of Study : Chemical Engineering Advisor's Signature

Academic Year : 2009

ACKNOWLEDGEMENTS

This research is completed with the aid and support of many people. The author would like to express her deepest gratitude to Associate Professor Dr. Siriporn Damrongsakkul, her advisor, for her continuous guidance, helpful suggestions and warm encouragement. In addition, she is also grateful to Professor Dr. Suttichai Assabumrungrat, Assistant Professor Dr. Sorada Kanokpanont, Assistant Professor Dr. Nattaporn Tonanon, and Dr. Nuttaporn Pimpha for serving as the chairman and the members of the thesis committee, respectively, whose comments were constructively and especially helpful.

The author would like to thank Miss. Juthamas Ratanavaraporn for her kind attentions and suggestions in cell culture as well as facilities and Mr. Isarawut Prasertsung for his helps and suggestions with experiments.

The author would like to thank the staffs of Analytical Instrument Center and Laboratory for their helps with experiments. She would like to extend her grateful thanks to all members of Polymer Engineering Research Group and Center of Excellence on Catalysis and Catalytic Reaction Engineering at the Department of Chemical Engineering as well as all members of i-Tissue Laboratory at the Department of Medicine, Chulalongkorn University.

Finally, the author expresses her sincere thanks to her parents and everyone in her family for their unfailing understanding and affectionate encouragement.

CONTENTS

PAGE

ABSTRACT (IN THAI) iv

ABSTRACT (IN ENGLISH) v

ACKNOWLEDGEMENTS vi

CONTENTS vii

LIST OF TABLES xi

LIST OF FIGURES xiii

CHAPTER

I INTRODUCTION 1

1.1 Background 1

1.2 Objectives 2

1.3 Scopes of research 3

II RELEVANT THEORY AND LITERATURE REVIEWS 4

2.1 Relevant theory 4

2.1.1 Biomaterials 4

2.1.1.1 Silk 4

2.1.1.2 Gelatin 9

2.1.1.3 Hydroxyapatite 13

2.1.2 Tissue-engineered scaffolds 14

2.1.3 Scaffold fabrication techniques 15

2.1.3.1 Freeze drying technique 15

2.1.3.2 Porogen-leaching technique 16

2.1.3.3 Gas foaming technique 17

2.1.4 Crosslinking techniques 17

2.1.4.1 Chemical crosslinking 17

2.1.4.2 Ultraviolet irradiation 19

2.1.4.3 Electron beam irradiation 19

2.1.4.4 Dehydrothermal treatment (DHT) 19

2.1.5 Nature of cells 20

2.1.5.1 Primary cell cultures 20

CHAPTER

2.1.5.2 Permanent cultures or cell lines cultures.....21
2.2 Literature reviews.....22
2.2.1 Preparation and characterization of crosslinked gelatin and silk fibroin.....22
2.2.2 Preparation and characterization of gelatin/silk fibroin and collagen/silk fibroin systems.....24
2.2.3 Preparation and characterization of hydroxyapatite/silk fibroin, hydroxyapatite/gelatin and hydroxyapatite/collagen biomaterials.....26
III EXPERIMENTAL WORK.....32
3.1 Materials and reagents.....32
3.2 Equipments.....33
3.3 Experimental procedures.....34
3.3.1 Preparation of Thai silk fibroin and gelatin solutions.....36
3.3.1.1 Preparation of Thai silk fibroin solution.....36
3.3.1.2 Preparation of gelatin solution.....36
3.3.2 Preparation of Thai silk fibroin/gelatin scaffolds.....36
3.3.3 Preparation of homogenized Thai silk fibroin/gelatin scaffold with hydroxyapatite incorporation.....37
3.3.4 Characterization of scaffolds.....38
3.3.4.1 Morphology.....38
3.3.4.2 Weight loss (%).....38
3.3.4.3 Compressive modulus (dry and wet condition).....38
3.3.4.4 *In vitro* biodegradability.....39
3.3.4.4.1 Remaining weight (%).....39
3.3.4.4.2 Conformational structure by X-Ray Diffraction (XRD).....40
3.3.4.5 *In vitro* biocompatibility using bone marrow-derived stem cells (MSCs).....40
3.3.4.5.1 MSCs isolation and culture.....40
3.3.4.5.2 Cell cuture.....40

CHAPTER

3.3.4.5.3 MSCs initial attachment and proliferation tests by DNA assay.....41
3.3.4.5.4 Osteogenic differentiation test by ALP activity and calcium content.....41
3.3.4.5.5 The observation of cultured cells.....42
3.3.5 Statistical analysis.....43
IV RESULTS AND DISCUSSION.....44
4.1 Non-crosslinked and crosslinked Thai silk fibroin/gelatin scaffolds.....44
4.1.1 Physical characterization.....44
4.1.1.1 Morphology of scaffolds.....45
4.1.1.2 Weight loss (%) of scaffolds.....47
4.1.1.3 Compressive modulus of scaffolds.....49
4.1.2 Biological characterization.....52
4.1.2.1 *In vitro* biodegradability.....52
4.1.2.1.1 Remaining weight (%).....52
4.1.2.1.2 Conformational structure by X-Ray Diffraction (XRD).....57
4.1.2.2 *In vitro* biocompatibility using bone marrow-derived stem cells (MSCs).....61
4.1.2.2.1 MSCs initial attachment and proliferation tests.....61
4.1.2.2.2 MSCs morphological observation.....63
4.2 Homogenized Thai silk fibroin/gelatin scaffolds with and without hydroxyapatite incorporation.....65
4.2.1 Morphology of scaffolds.....65
4.2.2 *In vitro* biocompatibility using bone marrow-derived stem cells (MSCs).....69
4.2.2.1 MSCs initial attachment and proliferation tests.....69
4.2.2.2 Osteogenic differentiation test.....72
V CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS.....77
5.1 Conclusions.....77
5.2 Recommendations.....78
REFERENCES.....80

CHAPTER

APPENDICES.....85

APPENDIX A: Raw data of weight loss (%).....86

APPENDIX B: Raw data of compressive modulus.....87

APPENDIX C: Raw data of physical properties at various contents of EDC/NHS.....88

APPENDIX D: Raw data of remaining weight (%).....91

APPENDIX E: Standard curve of *in vitro* cell culture test.....94

Biography.....97

LIST OF TABLES

TABLE **PAGE**

2.1 Amino acid compositions (%) of silk fibroins extracted from different *Bombyx mori* cocoons.....6

2.2 Typical specifications for gelatins 11

2.3 Amino acid compositions of gelatin 12

3.1 The concentration and volume of Thai silk fibroin and gelatin solution at each weight blending ratio of Thai silk fibroin/gelatin scaffolds.....37

4.1 The acronym of non-crosslinked and crosslinked Thai silk fibroin/gelatin scaffolds at various weight blending ratios.....44

4.2 Zeta potential (mV) of non-crosslinked Thai silk fibroin/gelatin solution at pH 5.6 (blended solution in DI water) and pH7.4 (blended solution in PBS (-)).....48

4.3 Degradation time at 50% remaining weight of non-crosslinked and crosslinked Thai silk fibroin/gelatin scaffolds at the weight blending ratios of 40/60, 50/50, and 60/40.....56

A-1 Mean and SD of weight loss (%) of Thai silk fibroin/gelatin scaffolds (SF/G).....86

B-1 Mean and SD of compressive modulus of Thai silk fibroin/gelatin scaffolds (SF/G) in dry condition.....87

B-2 Mean and SD of compressive modulus of Thai silk fibroin/gelatin scaffolds (SF/G) in wet condition.....87

C-1 Mean and SD of weight loss (%) of Thai silk fibroin/gelatin scaffolds (SF/G) at various contents of EDC/NHS.....88

C-2 Mean and SD of compressive modulus in dry condition of Thai silk fibroin/gelatin scaffolds (SF/G) at various contents of EDC/NHS....89

C-3 Mean and SD of compressive modulus in wet condition of Thai silkfibroin/gelatin scaffolds (SF/G) at various contents of EDC/NHS.....90

D-1 Mean and SD of remaining weight (%) of crosslinked Thai silk fibroin/gelatin scaffolds at the weight blending ratios of 0/100, 20/80, and 40/60 (SF/G) during the enzymatic degradation for 168h.....91

D-2 Mean and SD of remaining weight (%) of crosslinked Thai silk fibroin/gelatin scaffolds at the weight blending ratios of 50/50, 60/40, 80/20, and 100/0 (SF/G) during the enzymatic degradation for 168 h.....92

D-3 Mean and SD of remaining weight (%) of non-crosslinked Thai silk fibroin/gelatin scaffolds at the weight blending ratios of 40/60, 50/50, and 60/40 (SF/G) during the enzymatic degradation for 168 h.....93

D-4 Mean and SD of remaining weight (%) of crosslinked Thai silk fibroin/gelatin scaffolds at the weight blending ratios of 80/20 and 100/0 (SF/G) during the enzymatic degradation for 14, 21, and 28 days.....93

E-1 Fluorescence intensity at the excitation and emission wavelengths of 355 and 460 nm, respectively from DNA assay for standard curve of number of cells.....94

E-2 Absorbance at 405 nm from ALP activity for standard curve of p-nitrophenol standard solution.....95

E-3 Absorbance at 570 nm from calcium content for standard curve of $CaCO_3$ standard solution.....96

LIST OF FIGURES

FIGURE **PAGE**

2.1 Structure of raw silk fiber 4

2.2 Structure of silk fibroin.....5

2.3 Schematic representation of the primary structure of *Bombyx mori* silk fibroin.....7

2.4 Applications of silk.....8

2.5 Preparation process for acidic and basic gelatins from collagen.....10

2.6 The structural unit of gelatin.....11

2.7 Applications of gelatin.....13

2.8 Structure of hydroxyapatite.....13

2.9 Chemical structure of EDC.....18

2.10 Crosslinking of protein with EDC and NHS.....19

2.11 Bone marrow-derived stem cells (MSCs).....21

2.12 L929 mouse skin fibroblast.....22

3.1 Diagram of experimental procedures.....35

4.1 SEM micrographs of Thai silk fibroin/gelatin scaffolds (SF/G); non-crosslinked scaffolds (a) 0/100, (b) 20/80, (c) 40/60, (d) 50/50, (e) 60/40, (f) 80/20, (g) 100/0 and crosslinked scaffolds with EDC/NHS (h) 0/100, (i) 20/80, (j) 40/60, (k) 50/50, (l) 60/40, (m) 80/20, (n) 100/0. (— scale bar = 100 μm).....46

4.2 Weight loss (%) of non-crosslinked and crosslinked Thai silk fibroin/gelatin scaffolds (SF/G).....47

4.3 Compressive modulus of non-crosslinked and crosslinked Thai silk fibroin/gelatin scaffolds (SF/G) in (a) dry condition and (b) wet condition.....51

4.4 The remaining weight (%) of crosslinked Thai silk fibroin/gelatin scaffolds (SF/G) during the enzymatic degradation for 168 h.....54

4.5 The remaining weight (%) of crosslinked Thai silk fibroin/gelatin scaffolds at the weight blending ratios of 80/20 and 100/0 (SF/G) during the enzymatic degradation for 7, 14, 21, and 28 days.....54

4.6 The remaining weight (%) of non-crosslinked and crosslinked Thai silk fibroin/gelatin scaffolds at the weight blending ratios of 40/60, 50/50, and 60/40 (SF/G) during the enzymatic degradation for 168 h.....56
4.7 XRD patterns of non-crosslinked Thai silk fibroin/gelatin scaffolds at the weight blending ratios of 40/60, 50/50, and 60/40 (SF/G) before biodegradation.....59
4.8 XRD patterns of non-crosslinked Thai silk fibroin/gelatin scaffolds at the weight blending ratios of 40/60, 50/50, and 60/40 (SF/G) after biodegradation in collagenase solution.....59
4.9 XRD patterns of crosslinked Thai silk fibroin/gelatin scaffolds at the weight blending ratios of 40/60, 50/50, and 60/40 (SF/G) before biodegradation.....60
4.10 XRD patterns of crosslinked Thai silk fibroin/gelatin scaffolds at the weight blending ratios of 40/60, 50/50, and 60/40 (SF/G) after biodegradation in collagenase solution.....60
4.11 Number of MSCs attached and proliferated on non-crosslinked and crosslinked Thai silk fibroin/gelatin scaffolds at the weight blending ratios of 40/60, 50/50, and 60/40 (SF/G) under proliferating medium for 6 h, 1, 3, and 5 days, determined by DNA assay.....61
4.12 Morphology of MSCs cultured under proliferating medium for 5 days on Thai silk fibroin/gelatin scaffolds (SF/G); non-crosslinked scaffolds (a) 40/60, (b) 50/50, (c) 60/40 and crosslinked scaffolds (d) 40/60, (e) 50/50, (f) 60/40.....63
4.13 Schematic diagram of cross-sectional plane from the top (air-exposed side) through the bottom (plate-exposed side) of scaffolds.....66
4.14 SEM micrographs of homogenized Thai silk fibroin/gelatin 50/50 scaffold without hydroxyapatite incorporation at (a) top, (b) middle, and (c) bottom positions of the scaffold.....67
4.15 SEM micrographs of homogenized Thai silk fibroin/gelatin 50/50 scaffold with hydroxyapatite incorporation at (a) top, (b) middle, and (c) bottom positions of the scaffold.....68

4.16 Number of MSCs attached and proliferated on homogenized Thai silk fibroin/gelatin 50/50 scaffolds with and without hydroxyapatite incorporation under proliferating medium for 6 h, 1, 3, and 5 days, determined by DNA assay.....70

4.17 Morphology of MSCs cultured under proliferating medium for 5 days on (a, b) homogenized Thai silk fibroin/gelatin 50/50 scaffold without hydroxyapatite incorporation and (c, d) homogenized Thai silk fibroin/gelatin 50/50 scaffold with hydroxyapatite incorporation.....71

4.18 Number of MSCs cultured on homogenized Thai silk fibroin/gelatin 50/50 scaffolds with and without hydroxyapatite incorporation under osteogenic medium for 7, 14, 21, and 28 days, determined by DNA assay.....74

4.19 Morphology of MSCs cultured under osteogenic medium for 28 days on (a, b) homogenized Thai silk fibroin/gelatin 50/50 scaffold without hydroxyapatite incorporation and (c, d) homogenized Thai silk fibroin/gelatin 50/50 scaffold with hydroxyapatite incorporation.....75

4.20 (a) ALP activity and (b) calcium content of MSCs cultured on homogenized Thai silk fibroin/gelatin 50/50 scaffolds with and without hydroxyapatite incorporation under osteogenic medium for 7, 14, 21, and 28 days.....76

C-1 Weight loss (%) of Thai silk fibroin/gelatin scaffolds (SF/G) at various contents of EDC/NHS.....88

C-2 Compressive modulus in dry condition of Thai silk fibroin/gelatin scaffolds (SF/G) at various contents of EDC/NHS.....89

C-3 Compressive modulus in wet condition of Thai silk fibroin/gelatin scaffolds (SF/G) at various contents of EDC/NHS.....90

E-1 Standard curve of number of cells for DNA assay.....94

E-2 Standard curve of p-nitrophenol standard solution for ALP activity.....95

E-3 Standard curve of $CaCO_3$ standard solution for calcium content.....96