

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ



E47328

การพัฒนาโครงข่ายเซลล์แสงอาทิตย์ที่ทำจากโฟโบรินจากไหมไหมและเอเลดิน

นางสาวอติมา ขำของเกษร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2550

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

600254816

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ



E47328

การพัฒนาโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่ทำจากไฟโบรอินจากไหมไทยและเจลาติน



นางสาวจิตติมา ชำของเกษตร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2550

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



4 8 7 0 2 5 1 5 2 1

DEVELOPMENT OF THREE-DIMENSIONAL GELATIN/THAI SILK FIBROIN SCAFFOLDS

Miss Jitima Chamchongkaset

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 2007

Copyright of Chulalongkorn University

Thesis Title	DEVELOPMENT OF THREE-DIMENSIONAL GELATIN/THAI SILK FIBROIN SCAFFOLDS
By	Miss. Jitima Chamchongkaset
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

DL Lavansi
.....Dean of the Faculty of Engineering
(Professor Direk Lavansiri, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

Prasert Pavasant
.....Chairman
(Associate Professor Prasert Pavasant, Ph.D.)

Siriporn Damrongsakkul
.....Thesis Advisor
(Associate Professor Siriporn Damrongsakkul, Ph.D.)

Sorada Kanokpanont
.....Member
(Sorada Kanokpanont, Ph.D.)

Uracha Ruktanonchai
.....Member
(Uracha Ruktanonchai, Ph.D.)

จิตติมา ชำของเกษตร : การพัฒนาโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่ทำจากไฟโบรอินจากไหมไทย และเจลาติน. (DEVELOPMENT OF THREE-DIMENSIONAL GELATIN/THAI SILK FIBROIN SCAFFOLDS) อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร.ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล, อ.ที่ปรึกษาร่วม : PROF.DAVID L. KAPLAN, Ph.D., 106 หน้า.

E47328

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นพัฒนาโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่ทำจากไฟโบรอินจากไหมไทย โดยนำเจลาติน ซึ่งเป็นอนุพันธ์ย่อยของคอลลาเจน ที่มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ ไม่ก่อให้เกิดการต่อต้านภายในร่างกาย มาผสมเพื่อช่วยเพิ่มคุณสมบัติทางชีวภาพให้กับโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติไฟโบรอิน โดยโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติจะเตรียมโดย 2 วิธีคือ วิธีการทำแห้งด้วยความเย็นและวิธีการกำจัดเกลือออก (salt-leaching) โครงเลี้ยงเซลล์สามมิติแบบทำแห้งด้วยความเย็น ถูกเตรียมจากสารละลายผสมและเชื่อมโยงพันธะระหว่างสายโซ่โพลีเมอร์โดยการให้ความร้อนภายใต้สภาวะสุญญากาศและการใช้สารเคมี ซึ่งพบว่า ลักษณะพื้นฐานของโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติไฟโบรอินมีรูพรุนที่มีความเชื่อมต่อกัน ส่วนการกำจัดเกลือออกหลังจากไฟโบรอินเกิดการเจล จะได้โครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่มีขนาดรูพรุนประมาณ 600-710 ไมครอนตามขนาดของผลึกเกลือที่ใช้ ภายหลังการปรับปรุงพื้นผิวด้วยการคอนจูเกตกับเจลาตินพบว่า ลักษณะพื้นฐานของโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติไฟโบรอินมีลักษณะเป็นเส้นใยที่เชื่อมโยงต่อกันอย่างมาก ผลการทดสอบด้วยเทคนิคฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปีและเอ็กซ์เรย์ดิฟแฟรกชัน พิสูจน์ให้เห็นว่าโครงสร้างของไฟโบรอินที่ขึ้นรูปด้วยวิธีทำแห้งด้วยความเย็นเป็น random coil ในขณะที่การขึ้นรูปด้วยวิธีการกำจัดเกลือออกโครงสร้างของไฟโบรอินมีลักษณะเป็น β -sheet จากการทดสอบค่ามอดูลัสของการกดพบว่าโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติที่มีปริมาณไฟโบรอิน 80-100 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ที่ขึ้นรูปโดยการทำแห้งด้วยความเย็นมีค่ามอดูลัสประมาณ 350 กิโลปาสคาล และความสามารถในการบวมน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติลดลงเมื่อปริมาณไฟโบรอินเพิ่มขึ้น ในกรณีโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตโดยการกำจัดเกลือออกพบว่า การคอนจูเกตเจลาตินและการสะสมของไฮดรอกซีเอปาทาइट ช่วยเสริมความแข็งแรงให้กับโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติไฟโบรอิน ผลการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกของหนู และเซลล์กระดูก (MC3T3-E1) ในระดับห้องปฏิบัติการพบว่า เซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกของหนู สามารถเจริญเติบโตได้ดีบนโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่ผลิตโดยการทำแห้งด้วยความเย็น นอกจากนี้พบว่า เจลาตินมีส่วนส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์กระดูกบนโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอิน เห็นได้จากจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นและลักษณะพื้นฐานของเซลล์บนพื้นผิวของโครงเลี้ยงเซลล์ ซึ่งชัดเจนอย่างมากในกรณีของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตโดยการกำจัดเกลือออกและคอนจูเกตกับเจลาติน ผลการทดลองแสดงถึงความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้ไฟโบรอินจากไหมไทยในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ

ภาควิชา.....วิศวกรรมเคมี.....ลายมือชื่อนิสิต.....จิตติมา ชำของเกษตร.....
 สาขาวิชา.....วิศวกรรมเคมี.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
 ปีการศึกษา.....2550.....

4870251521 : MAJOR CHEMICAL ENGINEERING

KEY WORD: SILK FIBROIN / GELATIN / SCAFFOLD / OSTEOBLAST / TISSUE ENGINEERING

JITIMA CHAMCHONGKASET : DEVELOPMENT OF THREE-DIMENSIONAL
GELATIN/THAI SILK FIBROIN SCAFFOLDS. THESIS ADVISOR :
ASSOC.PROF.SIRIPORN DAMRONGSAKKUL, Ph.D., THESIS COADVISOR :
PROF.DAVID L. KAPLAN, Ph.D., 106 pp.

E47328

The aim of this study was to develop three-dimensional silk fibroin-based (SF) scaffolds from Thai yellow cocoon "Nangnoi-Srisaket" of *Bombyx mori* silkworms. To enhance the biological properties of Thai silk fibroin-based scaffolds, type A gelatin, the denature from of collagen having good biocompatibility, was used to blend with silk fibroin. Three-dimensional scaffolds were prepared by two methods; freeze-drying and salt-leaching. Freeze-dried scaffolds were prepared from blended solutions and crosslinked by dehydrothermal and chemicals. It was found that pure silk fibroin scaffolds possessed highly interconnected porous network. For salt-leached scaffolds, the pore size of silk fibroin scaffold structure represented the size of salt crystals used (600-710 μ m). After gelatin conjugating, gelatin was partly formed fibers inside the pores of silk fibroin scaffolds resulting in fiber-like structure with highly interconnection. The results on ATR-FTIR and XRD proved that the structure of freeze-dried silk fibroin scaffolds was random coil while that of salt-leached silk fibroin scaffolds was β -sheet. The compressive modulus of freeze-dried scaffolds having high silk fibroin contents (80-100wt%) was about 350 kPa. Swelling ability of freeze-dried scaffolds decreased as increasing silk fibroin content. For salt-leached scaffolds, gelatin conjugating and hydroxyapatite deposition enhanced the compressive modulus of silk fibroin scaffolds. The results on *in vitro* culture using bone-marrow derived mesenchymal stem cells (MSCs) on freeze-dried silk fibroin showed that silk fibroin scaffolds were more effective to promote cell proliferation than pure gelatin and blended scaffolds. Mouse osteoblast-like cells (MC3T3-E1) culture showed that gelatin blending and gelatin conjugating could enhance the cell proliferation on silk fibroin scaffolds as noticed from the number of cells and the cell morphology on the surface of scaffolds. This was more distinct in the case of conjugated gelatin/silk fibroin scaffolds. The results implied that Thai silk fibroin looked promising to be applied in tissue engineering.

Department..... Chemical Engineering.....Student's signature.....
Field of study..... Chemical Engineering.....Advisor's signature.....
Academic year... 2007.....

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. She wishes to give her gratitude to Professor Dr. David L. Kaplan, the thesis co-advisor, for his kind guidance and invaluable discussions. In addition, she is also grateful to Associate Professor Dr. Prasert Pavasant, Dr. Sorada Kanokpanont and Dr. Uracha Ruktanonchai 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 Associate Professor Dr. Prasit Pavasant and the Department of Anatomy, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University for his assistance in cell sources and Associate Professor Dr. Sanong Ekgasit and the Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University for his provision of Fourier Transform Infrared (FTIR) spectrophotometer.

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	xii
CHAPTER	
I. INTRODUCTION.....	1
1.1 Background.....	1
1.2 Objectives.....	2
1.3 Scopes of research.....	3
II. RELEVANT THEORY.....	4
2.1 Three-dimensional scaffolds.....	4
2.2 Biomaterials for scaffold fabrication.....	4
2.2.1 Synthetic polymers.....	5
2.2.2 Inorganic materials or ceramics.....	5
2.2.3 Natural macromolecules.....	5
2.2.3.1 Silk.....	6
2.2.3.2 Gelatin.....	13
2.3 Scaffold fabrication techniques.....	16
2.3.1 Particulate leaching.....	16
2.3.2 Gas foaming.....	17
2.3.3 Fiber meshes/fiber bonding.....	17
2.3.4 Phase separation.....	18
2.3.5 Melt molding.....	18
2.3.6 Freeze drying.....	19
2.4 Crosslinking techniques.....	19
2.4.1 Ultraviolet irradiation.....	19

2.4.2 Electron beam irradiation.....	20
2.4.3 Dehydrothermal crosslinking.....	20
2.4.4 Chemical crosslinking	20
2.5 <i>In vitro</i> cell culture.....	21
2.5.1 Types of cell cultures.....	21
2.5.1.1 Primary cell cultures.....	21
2.5.1.2 Permanent cultures or cell lines cultures.....	22
2.5.2 MTT assay for cell viability.....	22
III. LITERATURE REVIEWS.....	24
IV. EXPERIMENTAL WORK.....	39
4.1 Materials and reagents.....	39
4.2 Equipments.....	40
4.3 Experimental procedures.....	41
4.3.1 Preparation of silk fibroin and gelatin solutions.....	42
4.3.1.1 Preparation of silk fibroin solution.....	42
4.3.1.2 Preparation of gelatin solution.....	42
4.3.2 Preparation of silk fibroin and silk fibroin-based scaffolds.....	42
4.3.2.1 Preparation of silk fibroin and gelatin/silk fibroin scaffolds via freeze-drying.....	42
4.3.2.2 Preparation of silk fibroin and conjugated gelatin/silk fibroin scaffolds via salt-leaching.....	43
4.3.2.3 Preparation of hydroxyapatite/silk fibroin and hydroxyapatite-conjugated gelatin/silk fibroin scaffolds.....	43
4.3.3 Characterization of scaffolds.....	44
4.3.3.1 Chemical characterization.....	44
4.3.3.1.1 Attenuated total reflection fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectrophotometric measurements.....	44
4.3.3.1.2 X-ray diffraction (XRD) measurements.....	44
4.3.3.2 Physical characterization.....	44
4.3.3.2.1 Morphology.....	44

4.3.3.2.2 Compressive modulus.....	45
4.3.3.2.3 Swelling property.....	45
4.3.3.3 Biological characterization.....	45
4.3.3.3.1 MSCs isolation and culture.....	46
4.3.3.3.2 MC3T3-E1 culture.....	46
4.3.3.3.3 <i>In vitro</i> cell proliferation tests.....	46
4.3.3.3.4 MC3T3-E1 Migration and morphological observation	47
4.3.4 Statistical analysis.....	47
V. RESULTS AND DISCUSSION.....	49
5.1 Degummed silk fiber.....	49
5.2 Chemical characteristics of silk fibroin scaffolds.....	51
5.2.1 Structural analysis of silk fibroin scaffolds.....	51
5.2.1.1 Attenuated total reflection fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectrophotometric analysis.....	51
5.2.1.2 X-ray diffraction (XRD) analysis.....	52
5.2.2 LiBr residual in silk fibroin scaffolds.....	55
5.3 Comparison of type A and type B gelatin blending in silk fibroin.....	55
5.4 Silk fibroin and gelatin/silk fibroin scaffolds via freeze-drying.....	61
5.4.1 Compressive modulus of scaffolds.....	61
5.4.2 Swelling property of scaffolds.....	62
5.4.3 Biological property of scaffolds.....	64
5.4.3.1 MSCs proliferation tests.....	64
5.4.3.2 MC3T3-E1 proliferation tests.....	64
5.4.3.3 MC3T3-E1 migration and morphological observation.....	67
5.5 Silk fibroin and conjugated gelatin/silk fibroin scaffolds via salt-leaching.....	71
5.5.1 Morphology of scaffolds.....	72
5.5.1.1 Hydroxyapatite/silk fibroin scaffolds.....	72
5.5.1.2 Hydroxyapatite-conjugated gelatin/silk fibroin scaffolds.....	73

5.5.2 Compressive modulus of scaffolds.....80

5.5.3 Swelling property of scaffolds.....82

5.5.4 Biological property of scaffolds.....83

5.5.4.1 MC3T3-E1 proliferation tests.....83

5.5.4.2 MC3T3-E1 migration and morphological
observation.....84

VI. CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS.....90

6.1 Conclusions.....90

6.2 Recommendations.....92

REFERENCES.....93

APPENDICES.....99

APPENDIX A: Raw data of compressive modulus100

APPENDIX B: Raw data of swelling ratios102

APPENDIX C: Standard curve of *in vitro* cell culture test.....104

VITAE.....106

LIST OF TABLES

TABLE	PAGE
2.1 Amino Acid Compositions of <i>Bombyx mori</i> silk fibroin	8
2.2 Typical specifications for gelatins	14
2.3 Amino acids essential for humans	15
5.1 pI and charges of silk fibroin and gelatin	56
5.2 Salt-leached scaffolds prepared in this work	72
A-1 Mean and SD of Compressive modulus of gelatin/silk fibroin scaffolds with DHT treatment for 24 h.....	100
A-2 Mean and SD of Compressive modulus of gelatin/silk fibroin scaffolds with DHT treatment for 48 h	100
A-3 Mean and SD of compressive modulus of hydroxyapatite/silk fibroin scaffolds	100
A-4 Mean and SD compressive modulus of hydroxyapatite-conjugated gelatin/silk fibroin scaffolds.....	101
B-1 Mean and SD of swelling ratios of gelatin/silk fibroin scaffolds with DHT treatment for 24 h	102
B-2 Mean and SD of swelling ratios of gelatin/silk fibroin scaffolds with DHT treatment for 48 h.....	102
B-3 Mean and SD of swelling ratios of hydroxyapatite/silk fibroin scaffolds.....	102
B-4 Mean and SD of swelling ratios of hydroxyapatite-conjugated gelatin/silk fibroin scaffolds.....	103
C-1 Absorbance at 570 nm from MTT assay for standard curve of bone-marrow derived mesenchymal stem cells (MSCs).....	104
C-2 Absorbance at 570 nm from MTT assay for mouse osteoblast-like cells (MC3T3-E1).....	105

LIST OF FIGURES

FIGURE	PAGE
2.1 β -sheet secondary structure of silk	6
2.2 Structure of raw silk fiber	7
2.3 SEM micrographs of fiber (a) cocoon raw material, and (b) degummed fiber...10	
2.4 Illustration of a Donnan dialysis experiment to separate and concentrate uranyl nitrate, $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2$	12
2.5 Charge mosaic membranes, consisting of finely dispersed domains containing fixed negatively and fixed positively charged groups, are salt permeable	13
2.6 The structural unit of gelatin	14
2.7 Applications of gelatin	16
2.8 Porous polymer foams produced by different techniques. (a) phase separation, (b) particulate leaching, (c) solid freeform fabrication technique, and (d) microsphere sintering	17
2.9 Crosslinking of protein with EDC and NHS	21
2.10 Molecular structure of MTT (3-(4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5- diphenyl tetrazolium bromide).....	23
4.1 Diagram of experimental procedures.	41
4.2 Schematic diagram of cross-sectional plane prior to observe cell-scaffold interaction.....	48
5.1 SEM micrographs of silk fiber: (a)-(b) cocoon fiber, (c)-(d) degummed silk fiber with Na_2CO_3 , and (e)-(f) degummed silk fiber with NaOH	50
5.2 ATR-FTIR spectra of freeze-dried silk fibroin scaffolds from dialyzed solution (a) after freeze-drying (before any treatments), (b) after DHT treatment for 48 h, (c) after DHT and EDC treatments, and (d) air-dried silk fibroin obtained after gelling.....	53
5.3 XRD patterns of freeze-dried silk fibroin scaffolds from dialyzed solution (a) after freeze-drying (before any treatments), (b) after DHT treatment for 48 h, (c) after DHT and EDC treatment, and (d) air-dried silk fibroin	

obtained after gelling.....	54
5.4 XRD pattern of lithium bromide (LiBr) powder	55
5.5 SEM micrographs of freeze-dried type B gelatin/silk fibroin (GB/SF) scaffolds (a), (b) 0/100, (c)-(e) 20/80, (f)-(h) 40/60, (i)-(k) 60/40, (l)-(n) 80/20, and (o), (p) 100/0.....	57
5.6 SEM micrographs of freeze-dried type A gelatin/silk fibroin (GA/SF) scaffolds (a) 0/100, (b) 20/80, (c) 40/60, (d) 60/40, (e) 80/20, and (f) 100/0.....	60
5.7 Compressive modulus of freeze-dried gelatin/silk fibroin scaffolds with various DHT treatment periods: (♦) 24 h, and (■) 48 h.....	62
5.8 Swelling ratios of freeze-dried gelatin/silk fibroin scaffolds with various DHT treatment periods: (♦) 24 h, and (■) 48 h.....	63
5.9 Number of MSCs on freeze-dried gelatin/silk fibroin scaffolds after 3 and 7 days of the culture (seeding: 2×10^4 cells/scaffold).....	66
5.10 Number of MC3T3-E1 on freeze-dried gelatin/silk fibroin scaffolds after 1, 7 and 14 days of the culture (seeding: 2×10^4 cells/scaffold).....	67
5.11 SEM micrographs of cross-sectional plane of freeze-dried 20/80 gelatin/silk fibroin scaffolds at position (a) 1 (cell seeding side), (b) 2, (c) 3, and (d) 4 (plate-exposed side) after 14 days of MC3T3-E1 culture	68
5.12 SEM micrographs of cross-sectional plane of freeze-dried pure silk fibroin scaffolds at position (a) 1 (cell seeding side), (b) 2, (c) 3, and (d) 4 (plate- exposed side) after 14 days of MC3T3-E1 culture	69
5.13 SEM micrographs of MC3T3-E1 morphology after 14 days cultured on freeze-dried gelatin/silk fibroin scaffolds: (a) 20/80, and (b) 0/100	70
5.14 SEM micrograph of NaCl crystals.....	71
5.15 SEM micrographs of silk fibroin scaffolds (a)-(c) before soaking, after (d)-(f) 2 cycles, (g)-(i) 4 cycles, and (j)-(l) 6 cycles of alternate soaking in calcium and phosphate solutions.....	75
5.16 SEM micrographs of hydroxyapatite crystals in silk fibroin scaffolds (a)-(b) 2 cycles, (c)-(d) 4 cycles, and (e)-(f) 6 cycles of alternate soaking.....	76
5.17 SEM micrographs of conjugated gelatin/silk fibroin scaffolds (a)-(c) before soaking, after (d)-(f) 2 cycles, (g)-(i) 4 cycles, and (j)-(l) 6 cycles of alternate soaking in calcium and phosphate solutions.....	77

5.18 SEM micrographs of hydroxyapatite crystals in conjugated gelatin/ silk fibroin scaffolds (a)-(b) 2 cycles, (c)-(d) 4 cycles, and (e)-(f) 6 cycles of alternate soaking.....	78
5.19 Increasing weights of scaffolds as a function of alternate soaking cycles (♦) silk fibroin scaffolds, and (■) conjugated gelatin/silk fibroin scaffold.....	79
5.20 Compressive modulus of (♦) hydroxyapatite/silk fibroin scaffolds, and (■) hydroxyapatite-conjugated gelatin/silk fibroin scaffolds.....	81
5.21 Swelling properties of (♦) hydroxyapatite/silk fibroin scaffolds, and (■) hydroxyapatite-conjugated gelatin/silk fibroin scaffolds.....	83
5.22 Number of MC3T3-E1 on hydroxyapatite/silk fibroin scaffolds, and hydroxyapatite-conjugated gelatin/silk fibroin scaffolds after 1, 7 and 14 days of the culture (seeding: 2×10^4 cells/scaffold).....	86
5.23 SEM micrographs of cross-sectional plane of silk fibroin scaffolds at position (a) 1 (cell seeding side), (b) 2, (c) 3, and (d) 4 (plate-exposed side) after 14 days of MC3T3-E1 culture	87
5.24 SEM micrographs of cross-sectional plane of conjugated-gelatin silk fibroin scaffolds at position (a) 1 (cell seeding side), (b) 2, (c) 3, and (d) 4 (plate- exposed side) after 14 days of MC3T3-E1 culture	88
5.25 SEM micrographs of cell morphology on scaffolds: (a) silk fibroin, and (b) conjugated-gelatin silk fibroin after 14 days of MC3T3-E1 culture	89
C-1 Standard curve for MSCs.....	104
C-2 Standard curve for MC3T3-E1.....	105