

สมบัติทางกายภาพและทางชีวภาพของ โครงเลี้ยงเซลล์ที่ทำจากเจลาตินและคอลลาเจน



นางสาวจุฑามาศ รัตนวราภรณ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-17-3771-8

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PHYSICAL AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF COLLAGEN/GELATIN SCAFFOLDS



Miss Juthamas Ratanavaraporn

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
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 2005

ISBN 974-17-3771-8

Thesis Title            PHYSICAL AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF COLLAGEN/GELATIN  
                                 SCAFFOLDS

By                            Miss Juthamas Ratanavaraporn


Field of Study            Chemical Engineering

Thesis Advisor         Associate Professor Siriporn Damrongsakkul, Ph.D.

Thesis Co-advisor     Sorada Kanokpanont, 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  
(Professor Direk Lavansiri, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

  
..... Chairman  
(Associate Professor Chirakarn Muangnapoh, Dr. Ing.)

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

  
..... Thesis Co-advisor  
(Sorada Kanokpanont, Ph.D.)

  
..... Member  
(Assistant Professor Sarawut Rimdusit, Ph.D.)

  
..... Member  
(Piyamas Sumrejkanchanakit, Ph.D.)

จุฑามาศ รัตนวราภรณ์ : สมบัติทางกายภาพและทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ทำจากเจลาตินและคอลลาเจน. (PHYSICAL AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF COLLAGEN/GELATIN SCAFFOLDS). อ. ที่ปรึกษา: รศ.ดร. ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล, อ. ที่ปรึกษา: ดร. โสรดา กนกพานนท์, 122 หน้า. ISBN 974-17-3771-8.

คอลลาเจนเป็นวัสดุที่นิยมใช้ทั่วไปในการผลิตผิวหนังทดแทนหรือโครงเลี้ยงเซลล์แต่มีราคาแพงและเก็บรักษาได้ยาก ผู้วิจัยจึงได้นำเจลาตินซึ่งเป็นวัสดุที่มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพและมีสมบัติหลายประการคล้ายคลึงกับคอลลาเจนมาใช้เป็นวัสดุหลักในการผลิตเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ และใช้คอลลาเจนเป็นวัสดุเติมแต่งเพื่อส่งเสริมสมบัติทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาติน โครงเลี้ยงเซลล์ผสมระหว่างเจลาตินกับคอลลาเจนที่ตัดส่วนการผสมต่างๆกันนี้เตรียมโดยกระบวนการทำแห้งด้วยความเย็นของสารละลายผสมและเชื่อมโยงพันธะระหว่างสายโซ่โมเลกุลโดยการใช้ความร้อนภายใต้สภาวะสุญญากาศ ในงานวิจัยนี้ได้มีการศึกษาอิทธิพลของชนิดของเจลาติน ความเข้มข้นของสารละลาย ตัดส่วนการผสมระหว่างเจลาตินกับคอลลาเจน รวมถึงระยะเวลาในการเชื่อมโยงพันธะระหว่างสายโซ่โมเลกุลที่มีต่อสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ จากผลการทดสอบพบว่าปริมาณการเชื่อมโยงพันธะระหว่างสายโซ่โมเลกุลของโครงเลี้ยงเซลล์ซึ่งตรวจวัดโดยวิธี 2,4,6-ไตรโนโตรเบนซีนซัลโฟนิค แอซิดขึ้นกับชนิดของเจลาตินและระยะเวลาในการเชื่อมโยงพันธะระหว่างสายโซ่โมเลกุลเป็นหลัก โครงเลี้ยงเซลล์ต่างชนิดกันจะมีโครงสร้างพื้นฐานที่แตกต่างกันได้ ทั้งนี้เนื่องมาจากอิทธิพลของชนิดของเจลาติน ความเข้มข้นของสารละลาย และสัดส่วนของคอลลาเจนในโครงเลี้ยงเซลล์ นอกจากนี้ค่ามอดูลัสของการกดของโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินสามารถปรับปรุงได้มากถึง 10 กิโลปาสคาลด้วยการผสมคอลลาเจน สมบัติการบวมน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์มีความสัมพันธ์โดยตรงกับโครงสร้างพื้นฐานและความสามารถในการรับแรงกดของโครงเลี้ยงเซลล์ การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์ในเอนไซม์ไลโซไซม์พบว่า การผสมคอลลาเจนไปในโครงเลี้ยงเซลล์สามารถลดอัตราการย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์ให้ช้าลงได้ โดยโครงเลี้ยงเซลล์เจลาตินอย่างเดียวจะย่อยสลายหมดภายใน 1 วัน ในขณะที่โครงเลี้ยงเซลล์ผสมระหว่างเจลาตินกับคอลลาเจนสามารถอยู่ในสารละลายไลโซไซม์ได้นานถึง 3 สัปดาห์ ผลจากการเพาะเลี้ยงโครงเลี้ยงเซลล์ในระดับห้องปฏิบัติการพบว่าเซลล์ผิวหนังของหนูสามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้บนโครงเลี้ยงเซลล์ทุกประเภท โดยที่เมื่อเวลาในการเพาะเลี้ยงผ่านไป 48 ชั่วโมง จำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นบนโครงเลี้ยงเซลล์ผสมระหว่างเจลาตินกับคอลลาเจนในทุกสัดส่วนการผสมสามารถเทียบได้กับจำนวนเซลล์บนโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจนอย่างเดียว จากผลดังกล่าวได้พิสูจน์ว่าเจลาตินสามารถใช้ทดแทนคอลลาเจนถึง 70-90% ในการผลิตโครงเลี้ยงเซลล์ ดังนั้นเราจึงสามารถลดปริมาณการใช้คอลลาเจนในการผลิตโครงเลี้ยงลงได้เป็นจำนวนมาก ซึ่งจะช่วยลดราคาวัสดุที่ใช้ลงได้มาก

ภาควิชา.....วิศวกรรมเคมี.....ลายมือชื่อนิติศ.....จุฑามาศ รัตนวราภรณ์.....  
สาขาวิชา.....วิศวกรรมเคมี.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....  
ปีการศึกษา.....2548.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

# # 4770247021: MAJOR CHEMICAL ENGINEERING

KEY WORD: GELATIN/ COLLAGEN/ SCAFFOLD/ CELL CULTURE/ TISSUE ENGINEERING

JUTHAMAS RATANAVARAPORN: PHYSICAL AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF COLLAGEN/GELATIN SCAFFOLDS. THESIS ADVISOR: ASSOC.PROF. SIRIPORN DAMRONGSAKKUL, Ph.D., THESIS COADVISOR: SORADA KANOKPANONT, Ph.D., 122 pp. ISBN 974-17-3771-8.

Biocompatible gelatin was used as a base material to produce a scaffold and to substitute a large portion of collagen, which is an expensive biomaterial mainly used in skin substitute. The collagen/gelatin scaffolds with various blending compositions were fabricated by freeze drying and dehydrothermal (DHT) crosslinking techniques. The effects of gelatin type, solution concentration, blending composition and DHT treatment time on the chemical and physical properties of the scaffolds were investigated. It was found that crosslinking degree of the scaffolds, determined by 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS) method, mainly depended on gelatin type and DHT treatment time. The different scaffolds provided different morphology depending on gelatin type, solution concentration and collagen content. In addition, compressive modulus of gelatin scaffolds could be improved by collagen blending up to 10 kPa. Swelling property of the scaffolds directly related to the morphology and compressive modulus. The *in vitro* biodegradation test by lysozyme showed that collagen blending could decrease the degradation rate of gelatin scaffolds. Crosslinked gelatin scaffolds degraded within a day while crosslinked collagen/gelatin scaffolds could remain up to 3 weeks in lysozyme solution at 37°C. The results from *in vitro* cell culture revealed that mouse fibroblasts could proliferate on all scaffolds. At 48<sup>th</sup> h after the culture, the number of proliferated cells on collagen/gelatin scaffolds prepared from different blending compositions was comparable to that on pure collagen scaffolds. The results proved that gelatin could be used to partly replace collagen by 70-90% for scaffold fabrication. Therefore, a large amount of collagen used in scaffold fabrication could be reduced leading to a much lower cost of biomaterials used.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department.....Chemical Engineering.....Student's signature.....  
Field of study.....Chemical Engineering.....Advisor's signature.....  
Academic year...2005.....Co-advisor's signature.....

## 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 Dr. Sorada Kanokpanont, the thesis co-advisor, for her kind guidance and invaluable discussions. In addition, she is also grateful to Associate Professor Dr. Chirakarn Maungnapoh, Assistant Professor Dr. Sarawut Rimdusit and Dr. Piyamas Sumrejkanchanakit 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 Pavasan and Assistant Professor Dr. Neeracha Sanchavanakit and the Department of Anatomy, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University for his and her kind attentions and suggestions in cell culture as well as facilities.

The author would like to thank the staffs of Analytical Instrument Center and Laboratory for their helps with experiments. She would like to extend his grateful thanks to all members of Polymer Engineering Research Group at the Department of Chemical Engineering as well as all members of Tissue Culture Laboratory at the Department of Dentistry, 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
ACKNOWLEDGEMENT .....	vi
CONTENTS .....	vii
LIST OF TABLES .....	xi
LIST OF FIGURES .....	xiii
<b>CHAPTER</b>	
<b>I. INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
1.1 Background .....	1
1.2 Objectives .....	2
1.3 Scope of work .....	3
<b>II. THEORY</b> .....	<b>4</b>
2.1 Skin .....	4
2.1.1 Skin biology and structure .....	4
2.1.1.1 Epidermis .....	5
2.1.1.2 Dermis .....	5
2.1.1.3 Subcutaneous fat .....	7
2.1.2 Function of skin .....	7
2.1.2.1 Function of epidermis .....	7
2.1.2.2 Function of dermis .....	7
2.1.3 Regeneration of skin .....	7
2.2 Wound .....	8
2.2.1 Types of burn .....	8
2.2.1.1 First-degree burns .....	8
2.2.1.2 Second-degree burns .....	9
2.2.1.3 Third-degree or full thickness burns .....	9
2.2.2 Mechanism of spontaneous wound healing .....	10
2.2.3 The irreversibility of wound .....	13

2.3 Skin substitute.....	14
2.3.1 History of skin graft.....	14
2.3.2 Types of skin graft.....	15
2.3.2.1 Autografting.....	15
2.3.2.2 Allografting.....	15
2.3.2.3 Xenografting.....	15
2.3.2.4 Grafting of cultured cells.....	15
2.3.2.5 Synthetic skin substitutes.....	16
2.3.3 Reasons for synthetic skin substitutes.....	16
2.3.4 Available synthetic skin substitutes.....	16
2.3.4.1 Synthetic skin substitutes for wound cover.....	16
2.3.4.2 Synthetic skin substitutes for wound closure.....	17
2.4 Extracellular matrix scaffold as a synthetic skin substitute.....	18
2.4.1 Scaffold: skin regeneration template.....	18
2.4.2 Characteristics of extracellular matrix scaffolds.....	19
2.4.2.1 Pore size and curvature.....	20
2.4.2.2 Interconnectivity, macroporosity and microporosity.....	21
2.4.2.3 Physical Attributes.....	21
2.4.2.4 Biological Attributes.....	22
2.4.3 Biomaterials for scaffold fabrication.....	22
2.4.4 Scaffold fabrication techniques.....	23
2.4.4.1 Freeze drying technique.....	24
2.4.4.2 Crosslinking methods.....	26
2.5 Biomaterials.....	28
2.5.1 Gelatin.....	28
2.5.1.1 History of gelatin.....	28
2.5.1.2 The nature of gelatin.....	28
2.5.1.3 Types of gelatin.....	29
2.5.1.4 Properties of gelatin.....	30
2.5.1.5 Amino acid composition.....	31
2.5.1.6 Characteristics and applications of gelatin.....	32
2.5.2 Collagen.....	33



2.5.2.1	Types of collagen.....	34
2.5.2.2	Amino acid composition.....	37
2.5.3	Chondroitin sulfate.....	38
2.6	In vitro cell culture.....	40
2.6.1	Nature of cells.....	40
2.6.1.1	Primary cultures.....	40
2.6.1.2	Permanent cultures or cell lines cultures.....	40
2.6.2	Cell culture techniques.....	41
2.6.2.1	Work area and equipments.....	41
2.6.2.2	Preservation and storage.....	42
2.6.2.3	Maintenance.....	42
2.6.2.4	Cell culture procedures.....	44
2.6.3	MTT cell proliferation assay.....	46
<b>III.</b>	<b>LITERATURE REVIEW</b> .....	<b>48</b>
<b>IV.</b>	<b>EXPERIMENTAL WORK</b> .....	<b>56</b>
4.1	Materials.....	56
4.2	Equipments.....	57
4.3	Methods.....	58
4.3.1	Preparation of the scaffolds.....	60
4.3.2	Morphological observation.....	62
4.3.3	Determination of crosslinking degree.....	62
4.3.4	Mechanical testing.....	63
4.3.5	PBS swelling property.....	64
4.3.6	<i>In vitro</i> biodegradation.....	64
4.3.7	<i>In vitro</i> cell culture.....	65
4.3.8	<i>In vitro</i> cell adhesion and proliferation tests.....	65
4.3.9	L929 cells spreading area observation.....	66
4.3.10	Statistical analysis.....	67
<b>V.</b>	<b>RESULTS AND DISCUSSIONS</b> .....	<b>68</b>
5.1	Chemical and physical properties of the scaffolds.....	68
5.1.1	Preparation of gelatin and collagen/gelatin solutions.....	68
5.1.2	Morphology of the scaffolds.....	68

5.1.2.1 Gelatin scaffolds.....	68
5.1.2.2 Collagen/gelatin scaffolds.....	71
5.1.3 Crosslinking degree.....	73
5.1.3.1 Gelatin scaffolds.....	73
5.1.3.2 Collagen/gelatin scaffolds.....	76
5.1.4 Mechanical properties of the scaffolds.....	80
5.1.4.1 Gelatin scaffolds.....	80
5.1.4.2 Collagen/gelatin scaffolds.....	82
5.1.5 PBS solution adsorption.....	85
5.1.5.1 Gelatin scaffolds.....	85
5.1.5.2 Collagen/gelatin scaffolds.....	88
5.2 Biological properties of the scaffolds.....	91
5.2.1 <i>In vitro</i> biodegradation behavior.....	91
5.2.2 <i>in vitro</i> cell adhesion and cell proliferation.....	95
5.2.3 L929 cells spreading area observation.....	104
5.3 Cost of scaffolds.....	109
5.4 Chondroitin-6-sulfate/collagen/gelatin scaffold.....	110
<b>VI. CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS.....</b>	<b>111</b>
6.1 Conclusions.....	111
6.2 Recommendations.....	112
<b>REFERENCES.....</b>	<b>113</b>
<b>APPENDICES.....</b>	<b>118</b>
APPENDIX A: Standard curve for TNBS.....	119
APPENDIX B: Standard curve for <i>in vitro</i> cell culture test.....	120
APPENDIX C: Calculation of scaffold cost .....	121
<b>VITAE.....</b>	<b>122</b>

## LIST OF TABLES

<b>TABLE</b>	<b>PAGE</b>
2.1 Pore size of a scaffold and the penetrable molecules.....	20
2.2 Conventional scaffold processing techniques for tissue engineering.....	23
2.3 Properties of type A and type B gelatin.....	29
2.4 Nutritional information of type A and type B gelatin.....	29
2.5 Amino acid composition in gelatin.....	31
2.6 Types of collagen and location in the body.....	36
2.7 Amino acid compositions of type I collagen from various animal species.....	37
4.1 Experiments of gelatin scaffolds and pH of the solutions.....	60
4.2 Experiments of collagen/gelatin scaffolds and pH of the solutions.....	61
4.3 Experiments of CS/collagen/gelatin scaffolds and pH of the solutions.....	62
5.1 The effect of each variable on the properties of scaffolds.....	96
5.2 Experiments for in vitro cell culture.....	96
5.3 Cost of collagen and gelatin.....	109
5.4 Cost of collagen in collagen/gelatin fabrication.....	109
B-1 Absorbance of MTT standard.....	120
C-1 Cost of gelatin and collagen in scaffold fabrication.....	121

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## LIST OF FIGURES

<b>FIGURE</b>	<b>PAGE</b>
2.1 Layers & structures of the skin.....	4
2.2 First-degree burn.....	8
2.3 Second-degree burn.....	9
2.4 Third-degree burn.....	9
2.5 Phases of wound healing.....	10
2.6 Phase I – Inflammation and debridement.....	11
2.7 Phase II – Repair or fibroplasias.....	11
2.8 Phase III – Maturation or tissue remodeling.....	12
2.9 Mechanism of wound healing.....	13
2.10 INTEGRA synthetic skin substitute.....	18
2.11 Steps of lyophilization.....	25
2.12 Examples of lyophilizers.....	25
2.13 Vacuum oven for dehydrothermal treatment.....	27
2.14 Molecular structure of gelatin.....	28
2.15 Amino acid sequence of gelatin.....	32
2.16 Applications of gelatin.....	33
2.17 The collagen triple helix.....	34
2.18 Structure of CS.....	38
2.19 Structure of chondroitin 4-sulfate.....	38
2.20 Structure of chondroitin 6-sulfate.....	39
2.21 L929 cells after four days incubation at 37°C.....	40
4.1 Diagram of the experimental procedure.....	58
4.2 TNBS reaction.....	63
4.3 Schematic diagram of cross-sectional plane prior to cells spreading area observation.....	67
5.1 SEM micrographs of vertical cross-sections of gelatin scaffolds with various types and solution concentrations (48 h DHT): (a) 0.4A, (b) 0.4B, (c) 0.6A, (d) 0.6B, (e) 0.8A and (f) 0.8B.....	70

5.2	SEM micrographs of vertical cross-sections of collagen/gelatin scaffolds with various solution concentrations and blending compositions (48 h DHT): (a) 0.4CG10/90,(b) 0.6CG10/90, (c) 0.4CG20/80, (d) 0.6CG20/80, (e) 0.4CG30/70, (f) 0.6CG30/70, (g) 0.4C100 and (h) 0.6C100.....	72
5.3	Crosslinking degree of gelatin scaffolds with various gelatin types, concentrations and DHT treatment times.....	74
5.4	Initial free amino group content in gelatin scaffolds with various gelatin types and concentrations.....	74
5.5	Crosslinking degree of collagen/gelatin scaffolds prepared from 0.4wt% solution concentration with various blending compositions and DHT treatment times.....	78
5.6	Initial free amino group content in collagen/gelatin scaffolds prepared from 0.4wt% solution concentration with various blending compositions and DHT treatment times.....	78
5.7	Crosslinking degree of collagen/gelatin scaffolds prepared from 0.6wt% solution concentration with various blending compositions and DHT treatment times.....	79
5.8	Initial free amino group content in collagen/gelatin scaffolds prepared from 0.6wt% solution concentration with various blending compositions and DHT treatment times.....	79
5.9	Compressive modulus of gelatin scaffolds with various gelatin types, concentrations and DHT treatment times.....	81
5.10	Compressive modulus of collagen/gelatin scaffolds prepared from 0.4wt% solution concentration with various blending compositions and DHT treatment times.....	83
5.11	Compressive modulus of collagen/gelatin scaffolds prepared from 0.6wt% solution concentration with various blending compositions and DHT treatment times.....	84
5.12	Swelling ratio of gelatin scaffolds with various types, concentrations and DHT treatment times at 5th h of swelling.....	87
5.13	Swelling ratio of gelatin scaffolds with various types, concentrations and DHT treatment times at 24th h of swelling.....	87

5.14 Swelling ratio of collagen/gelatin scaffolds prepared from 0.4wt% solution concentration with various blending compositions and DHT treatment times at 5th h of swelling.....	89
5.15 Swelling ratio of collagen/gelatin scaffolds prepared from 0.4wt% solution concentration with various blending compositions and DHT treatment times at 24th h of swelling.....	89
5.16 Swelling ratio of collagen/gelatin scaffolds prepared from 0.6wt% solution concentration with various blending compositions and DHT treatment times at 5th h of swelling.....	90
5.17 Swelling ratio of collagen/gelatin scaffolds prepared from 0.6wt% solution concentration with various blending compositions and DHT treatment times at 24th h of swelling.....	90
5.18 Remaining weight of collagen and collagen/gelatin scaffolds prepared from 0.4% solution concentration with various blending compositions and DHT treatment times in lysozyme solution at 37°C.....	93
5.19 Remaining weight of collagen and collagen/gelatin scaffolds prepared from 0.6% solution concentration with various blending compositions and DHT treatment times in lysozyme solution at 37°C.....	94
5.20 L929 cell adhesion on different scaffolds at 5 h after the culture (n = 3, * p < 0.05 compared with controlled collagen scaffolds at the same solution concentration, ** p < 0.05 compared between two solution concentrations of the same scaffolds).....	98
5.21 L929 cell proliferation on different scaffolds in 10%DMEM at each time after the culture (a) 24 h, (b) 48 h (n = 3, * p < 0.05 compared with controlled collagen scaffolds at the same solution concentration, ** p < 0.05 compared between two solution concentrations of the same type scaffolds).....	100
5.22 L929 cell proliferation on different scaffolds in SFM at each time after the culture (a) 24 h, (b) 48 h (n = 3, * p < 0.05 compared with controlled collagen scaffolds at the same solution concentration, ** p < 0.05 compared between two solution concentrations of the same type scaffolds).....	103

5.23 SEM micrographs of cross-sectional plane of 0.4CG20/80 scaffolds at position (a) 1 (cell seeding side), (b) 2, (c) 3, and (d) 4 (plate-exposed side)...105

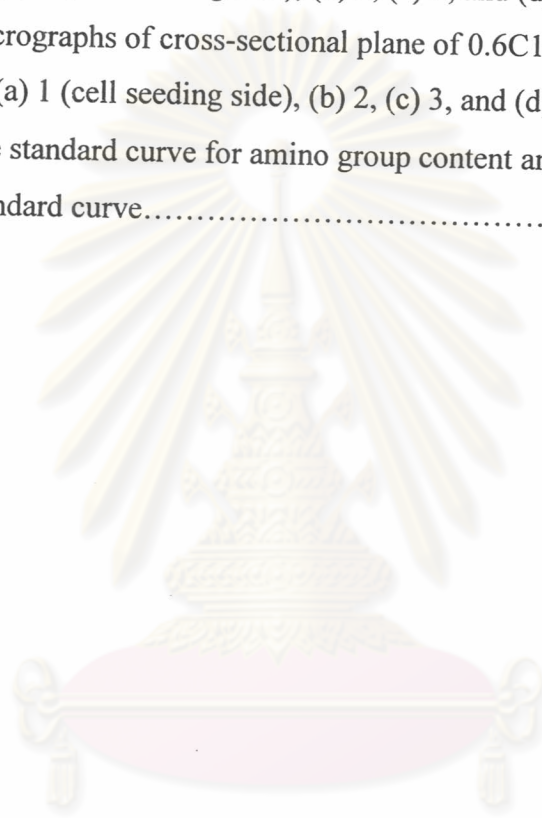
5.24 SEM micrographs of cross-sectional plane of 0.4C100 scaffolds at position (a) 1 (cell seeding side), (b) 2, (c) 3, and (d) 4 (plate-exposed side)...106

5.25 SEM micrographs of cross-sectional plane of 0.6CG20/80 scaffolds at position (a) 1 (cell seeding side), (b) 2, (c) 3, and (d) 4 (plate-exposed side)...107

5.26 SEM micrographs of cross-sectional plane of 0.6C100 scaffolds at position (a) 1 (cell seeding side), (b) 2, (c) 3, and (d) 4 (plate-exposed side)...108

A-1  $\beta$ -alanine standard curve for amino group content analysis..... 119

B-1 MTT standard curve..... 120



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย