

ABSTRACT

Hydrogels from the *Bombyx mori* silk fibroin (SF) are of great interest for drug delivery and tissue engineering applications because of their biocompatibility, water absorbability, controllable biodegradation rate and processability into different formats. Despite these, unmodified SF samples normally display poor mechanical strength with prolonged gelation kinetics thus, limiting their practical use in biomedical applications. To overcome these drawbacks, the new all-aqueous crosslinking methods to form the three-dimensional (3D) porous SF hydrogel network were developed. The physically crosslinked SF hydrogels were prepared by mixing different aqueous SF solutions (2-10% w/v) with poly(ethylene glycol)diacrylate (PEGDA). All formulations were then, incubated at room temperature until there is a pronounced increase in the apparent viscosity. Results indicated that PEGDA (30% w/v) could successfully shorten the silk gelation time and stabilize the silk hydrogels in aqueous media. This was associated with a formation of the interconnected sheet-like structure, as observed by Scanning Electron Microscopy (SEM). Data interpretation of Fourier Transform Infrared (FTIR) spectra suggested that the PEGDA-induced gelation was driven by a conformational transition of SF from α -helix into the β -sheet structure. Furthermore, the process was affected by the type of extraction solvent and the utilization of sonication. Surprisingly, the physically crosslinked hydrogels exhibited moderate antibacterial activity against gram positive *Bacillus cereus*, MRSA-SK1 and *Staphylococcus aureus*, as evidenced by the diameters of the inhibition zone between 9.2-10.9, 5.7-6.1 and 5.7-6.2 mm, respectively. This finding highlighted another unexploited property of the hybrid in biomedical fields.

Apart from a physical method, a new chemical modification by using a protein crosslinker, *O*'*O*-bis[2-(*N*-succinimidyl succinylamino)ethyl]polyethylene glycol (NHSP), was also employed to fabricate the more stable SF hydrogels. For this, appropriate amounts of NHSP was mixed with an aqueous SF solution at room temperature in the presence of poly(*L*-lysine) (PLL) as a gel enhancer. A network formation was accelerated by the using of ultrasonication and noticed within 24 hours, depending on the silk concentration. A crosslink reaction was convinced by the

appearance of a new ether linkage observed in the Fourier-transform Infrared (FTIR) spectra, and the presence of a new thermal decomposition temperature (T_d) in the Thermogravimetric Analysis (TGA) thermograms. Such crosslinking contributed to the improved hydrogel properties, such as a structural integrity, thermal stability and water-resistance. Also, this produced an interconnected porous structure with higher β -pleated sheet content, comparing to the physically crosslinked ones. These two new methods thus, proven to be capable of improving both gelation kinetics and physicochemical properties of SF, making it more suitable for both biomedical and tissue engineering applications.



บทคัดย่อ

ไฮโดรเจลจากไหมบอมบิกซ์ มอริ ไฟโบรอิน (SF) กำลังได้รับความสนใจในการนำมาใช้งานด้านการขนส่งตัวยา และวิศวกรรมเนื้อเยื่อ ทั้งนี้ เนื่องมาจากความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์ การดูดซึมน้ำ อัตราการย่อยสลายทางชีวภาพที่ควบคุมได้ และการขึ้นรูปได้อย่างหลากหลาย นอกเหนือไปจากข้อดีดังกล่าว ตัวอย่างไฟโบรอินที่ไม่ได้ถูกดัดแปลง มักจะมีค่าความแข็งแรงเชิงกลต่ำ อีกทั้ง ยังมีกลไกการเกิดเจลที่ค่อนข้างจะยาวนาน ทำให้การประยุกต์ใช้งานทางการแพทย์ของวัสดุไฟโบรอินมีขอบเขตจำกัด งานวิจัยนี้ ได้พัฒนาวิธีการแบบใหม่ สำหรับใช้เตรียมไฮโดรเจลไฟโบรอินที่มีโครงสร้างแบบเชื่อมขวาง และมีรูพรุนถักทอกันเป็นแบบสามมิติ วิธีการแรก เป็นการใช้เตรียมไฮโดรเจลไฟโบรอินที่มีการเชื่อมขวางทางกายภาพ โดยการผสมสารละลายไฟโบรอิน (ร้อยละ 2-10 โดยมวลต่อปริมาตร) เข้ากับ พอลิ(เอทิลีน ไกลคอล) ไดอะคริเลต (PEGDA) แล้วทำการบ่ม ณ อุณหภูมิห้อง จนกว่าสารละลายจะมีความหนืดที่สูงขึ้นที่สามารถต้านทานการไหลของของเหลวได้ ผลการทดลองพบว่า การเติม PEGDA (ร้อยละ 30 โดยมวลต่อปริมาตร) ช่วยลดระยะเวลาในการเกิดเจล และช่วยเพิ่มเสถียรภาพของไฮโดรเจลไฟโบรอินในตัวอย่างที่เป็นน้ำ ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากการเกิดโครงสร้างแบบแผ่นทับซ้อนที่มีการเชื่อมโยงอย่างทั่วถึงกันของไฟโบรอิน ซึ่งสามารถพิสูจน์ให้เห็นได้จากเทคนิคกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด การวิเคราะห์ผลจากเทคนิคอินฟราเรดสเปกโตรสโคปี ยังแสดงให้เห็นอีกว่า การเปลี่ยนโครงรูปของไฟโบรอินจากแบบเกลียวไปเป็นแบบแผ่นทับซ้อน เป็นแรงผลักดันที่สำคัญต่อกระบวนการเร่งให้เกิดเจลโดย PEGDA นอกจากนี้แล้ว ชนิดของสารละลายที่ใช้ในกระบวนการสกัดไฟโบรอิน ตลอดจนการกระตุ้นโดยใช้คลื่นอัลตราโซนิกส์ ล้วนแล้วแต่มีผลต่อกลไกการเกิดเจลของไฟโบรอิน สิ่งที่น่าสนใจอีกประการหนึ่งของไฮโดรเจลไฟโบรอินที่มีโครงสร้างแบบเชื่อมขวางทางกายภาพ คือ ความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้ก่อโรค 3 ชนิด คือ *Bacillus cereus*, MRSA-SK1 and *Staphylococcus aureus*

โดยทำให้เกิดบริเวณของการยับยั้งในช่วง 9.2-10.9, 5.7-6.1 และ 5.7-6.2 ม.ม. ตามลำดับ คุณสมบัติที่ค้นพบใหม่นี้ ทำให้วัสดุผสมไฟโบรอินมีความเป็นไปได้ และมีความเหมาะสมเป็นอย่างยิ่งต่อการใช้งานทางการแพทย์

นอกเหนือไปจากการเชื่อมขวางทางกายภาพแล้ว การศึกษานี้ ยังได้พัฒนาอีกหนึ่งวิธีการ สำหรับใช้เตรียมไฮโดรเจลไฟโบรอินที่มีการเชื่อมขวางโดยพันธะเคมี ที่มีทั้งความแข็งแรงและเสถียรภาพที่สูงมากขึ้น ในการนี้ ได้ทำการผสมสารละลายไฟโบรอินเข้ากับสารเชื่อมขวาง O'-O-Bis[2-(N-succinimidyl succinylamino)ethyl]polyethylene glycol (NHSP) และ พอลิแอลโลซิน (PLL) ณ อุณหภูมิห้อง จากการศึกษาพบว่า คลื่นอุลตราโซนิกสามารถเร่งให้เกิดโครงสร้างแบบเชื่อมขวางได้ภายในระยะเวลา 24 ชม. ซึ่งก็ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารละลายไฟโบรอินที่ใช้ด้วยเช่นกัน การเชื่อมขวางของไฟโบรอินโดย NHSP ถูกพิสูจน์ได้จากการตรวจพบการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดของหมู่ฟังก์ชันใหม่ คือ อีเทอร์ และการพบสัญญาณการสลายตัวทางความร้อนใหม่ ณ อุณหภูมิที่สูงขึ้น โครงสร้างแบบเชื่อมขวางโดยพันธะเคมีที่เกิดขึ้น ทำให้ไฮโดรเจลไฟโบรอินมีเสถียรภาพทางโครงสร้าง ทางความร้อน และการละลายน้ำที่ดีขึ้น นอกจากนี้แล้ววิธีการเชื่อมขวางดังกล่าว ยังสามารถทำให้เกิดรูพรุนสามมิติที่ต่อเนื่อง ที่มีปริมาณแผ่นซ้อนทับของไฟโบรอินที่มากกว่าวิธีการเชื่อมขวางแบบกายภาพอีกด้วย การศึกษาครั้งนี้ จึงแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของวิธีการเชื่อมขวางทั้งสอง ที่สามารถนำมาใช้เพื่อเร่งงานศาสตร์การเกิดเจลของโปรตีนไฟโบรอิน และเพื่อปรับปรุงคุณสมบัติทางกายภาพเคมีของไฮโดรเจลไฟโบรอินให้มีความเหมาะสมต่อการประยุกต์ใช้งานด้านการแพทย์และวิศวกรรมเนื้อเยื่อ