การตรึงสารชีวโมเลกุลบนพื้นผิวของพอลิคาโปรแลกโทนสำหรับการประยุกต์เป็นผิวหนังเทียม

นางสาว วรัดดา มัตตะนาวี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาปิโตรเคมีและวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-14-1799-3

IMMOBILIZATION OF BIOMOLECULES ON SURFACE OF POLYCAPROLACTONE FOR ARTIFICIAL SKIN APPLICATION

Miss Waradda Mattanavee

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Petrochemistry and Polymer Science
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2005

ISBN 974-14-1799-3

Thesis Title	Immobilization of Biomolecules on Surface of Polycaprolactone for Artificial Skin Application
By	Miss Waradda Mattanavee
Field of Study	Petrochemistry and Polymer Science
Thesis Advisor	Assistant Professor Voravee P. Hoven, Ph.D.
Thesis Co-Advisor	Associate Professor Pitt Supaphol, Ph.D.

Accepted by 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
(Professor Pattarapan Prasassarakich, Ph.D.)

..... Thesis Advisor
(Assistant Professor Voravee P. Hoven, Ph.D.)

..... Thesis Co-Advisor
(Associate Professor Pitt Supaphol, Ph.D.)

..... Member
(Assistant Professor Varawut Tangpasuthadol, Ph.D.)

..... Member
(Assistant Professor Warinthorn Chavasiri, Ph.D.)

วรัดดา มัตตะนาวี: การตรึงสารชีวโมเลกุลบนพื้นผิวของพอลิคาโปรแลกโทนสำหรับการประยุกต์เป็นผิวหนังเทียม (IMMOBILIZATION OF BIOMOLECULES ON SURFACE OF POLYCAPROLACTONE FOR ARTIFICIAL SKIN APPLICATION) อาจารย์ที่ปรึกษา: ผศ.ดร. วรวีร์ โฮเว่น, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม: รศ.ดร. พิชญ์ ศุภผล, 87 หน้า ISBN 974-14-1799-3

เพื่อที่จะทำให้พอลิคาโปรแลกโทน (พีซีแอล) ซึ่งเป็นพอลิเอสเทอร์สายตรงสังเคราะห์ที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพและมีสมบัติความเข้ากันได้กับเซลล์ของสิ่งมีชีวิต มีสมบัติเหมาะสมต่อการนำไปประยุกต์เป็นผิวหนังเทียม งานวิจัยนี้จึงมีเป้าหมายที่จะปรับปรุงสมบัติความชอบน้ำและการตอบสนองของเซลล์ของพีซีแอลโดยใช้การดัดแปรทางเคมีตามด้วยการตรึงสารชีวโมเลกุล ในขั้นแรกฟิล์มพีซีแอลผ่านการดัดแปรทางเคมีโดยการทำปฏิกิริยาอะมิโนไลซิสของ 1,6-เฮกซะเมทิลลีนไดเอมีนหรือกราฟต์โคพอลิเมอไรเซชันของกรดอะคริลิกเพื่อทำให้พื้นผิวของฟิล์มมีหมู่อะมิโนหรือคาร์บอกซิล ตามลำดับ จากนั้นจึงจะทำการตรึงด้วยคอลลาเจนและไคโตซานโดยใช้ระบบรีเอเจนต์คู่ควบของ ไดซักซินิมิดิลคาร์บอเนต (ดีเอสซี) หรือ 1-(3-ไดเมทิลอะมิโนโพรพิล)-3-เอทิลคาร์โบไดอิไมด์ ไฮโดรคลอไรด์ (อีดีซีไอ) กับ เอ็น-ไฮดรอกซีซักซินิไมด์ (เอ็นเอชเอส) ผลจากการวิเคราะห์ด้วยเอทีอาร์-เอฟทีไออาร์และการวัดมุมสัมผัสน้ำแสดงให้เห็นว่าฟิล์มพีซีแอลมีสมบัติชอบน้ำมากขึ้นหลังจากการดัดแปรทางเคมีและสามารถตรึงสารชีวโมเลกุลบนพื้นผิวฟิล์มพีซีแอลที่ผ่านการดัดแปรทางเคมีได้ ผลจากการศึกษาการตอบสนองในห้องปฏิบัติการของเซลล์เคราติโนไซต์ (เอชอีเค001) และไฟโบรบลาสต์ (แอล929) ซึ่งแสดงในรูปของสัดส่วนการยึดเกาะและการเพิ่มจำนวนของเซลล์ พิสูจน์ให้เห็นว่าการเติมหมู่ที่ชอบน้ำตลอดจนการตรึงสารชีวโมเลกุลลงไปนั้น ช่วยปรับปรุงความเข้ากันได้กับเซลล์ของฟิล์มพีซีแอลดั่งเดิมได้เป็นอย่างดี ทั้งนี้ประสิทธิภาพในการปรับปรุงจะขึ้นอยู่กับความหนาแน่นและชนิดของสารชีวโมเลกุลที่ทำการตรึงด้วย

สาขาวิชา ปิโตรเคมีและวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์ ลายมือชื่อนิสิต.....

ปีการศึกษา 2548 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4672399023: MAJOR PETROCHEMISTRY AND POLYMER SCIENCE
KEYWORD: POLYCAPROLACTONE/ COLLAGEN/ CHITOSAN/ ARTIFICIAL SKIN/ IMMOBILIZATION

WARADDA MATTANAVEE: IMMOBILIZATION OF BIOMOLECULES ON SURFACE OF POLYCAPROLACTONE FOR ARTIFICIAL SKIN APPLICATION. THESIS ADVISOR: ASSISTANT PROFESSOR VORAVEE P. HOVEN, Ph.D, THESIS CO-ADVISOR: ASSOCIATE PROFESSOR PITT SUPAPHOL, Ph.D; 87 pp ISBN 974-14-1799-3

In order to make polycaprolactone (PCL), a biocompatible and biodegradable synthetic aliphatic polyester, more favorable for artificial skin application, this research aims to increase hydrophilicity as well as to improve cellular responses of PCL by chemical modification followed by immobilization of biomolecules. PCL film was first chemically modified by aminolysis of 1,6-hexamethylenediamine or graft copolymerization of acrylic acid (AA) to introduce amino or carboxyl groups, respectively, on its surface. The immobilization of collagen and chitosan was then carried out by using disuccinimidylcarbonate (DSC) or 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDCI)/*N*-hydroxysuccinimide (NHS), as a coupling agent. Data from ATR-FTIR analysis and water contact angle measurements indicated that PCL film became more hydrophilic after chemical modification and the immobilization of biomolecules on the surface-modified PCL film was successful. *In vitro* responses of keratinocyte (HEK001) and fibroblast (L929) cells expressed in terms of adhesion and proliferation ratios proved that introducing hydrophilic groups and further immobilizing with biomolecules can markedly improve cytocompatibility of the virgin PCL films. The degree of improvement depended upon the density and the type of immobilized biomolecules.

Field of study Petrochemistry and Polymer Science Student's signature Waradda Mattanavee

Academic year 2005 Advisor's signature V. Hoven.

Co-advisor's signature

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my heartfelt gratitude and appreciation to my advisor, Assistant Professor Dr. Voravee P. Hoven and my co-advisor, Associate Professor Dr. Pitt Supaphol for supporting me both in work and in life, and encouraging me throughout the course of my study. I am sincerely grateful to the members of the thesis committee, Professor Dr. Pattarapan Prasassarakich, Assistant Professor Dr. Varawut Tangpasuthadol and Assistant Professor Dr. Warithorn Chavasiri for their comments, suggestions and time to read thesis.

I gratefully acknowledge a research funding from the Thailand Research Fund: TRF Master Research Grants (MRG475S016) and Multidisciplinary Research Series in Tissue Engineering of Skin, National Research Council of Thailand (Principal Investigator: Dr.Tanom Bunprasert) for financial support.

Special thanks are extended to Spectroscopy Research Group and Associate Professor Dr. Sanong Egkasit for ATR-FTIR facility, National Metal and Materials Technology Center (MTEC) for contact angle goniometer, Dr. Jisheng Pan from Institute of Materials Research and Engineering, Singapore for XPS analysis, and Ms. Songchan Puthong from the Institute of Biotechnology and Genetic Engineering, Chulalongkorn University for her excellent assistance and suggestions on cell culture studies.

Many thanks go to all members of Organic Synthesis Research Unit, and all my friends, for their assistance, suggestions, comment, concerning experimental techniques during my thesis work.

Finally, I would like to especially thank my family members for their love, kindness and support throughout my entire study.

CONTENTS

Page

Page

Page

Page

LIST OF FIGURES

Figure Page

Figure Page

Figure Page

LIST OF TABLES

Table Page

Table Page

LIST OF SCHEMES

Scheme Page

LIST OF ABBREVIATION

AA	: Acrylic acid
Abs	: Absorbance
ATR-FTIR	: Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared Spectroscopy
DMSO	: Dimethylsulfoxide
DSC	: *N, N'*-Disuccinimidyl carbonate
ECM	: Extracellular matrix
EDCI	: 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride
FBS	: Fetal bovine serum
HEK001	: Keratinocyte Cell
IPA	: Isopropanol
L929	: Fibroblast Cell
MTT	: 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
NHS	: *N*-hydroxysuccinimide
OD	: Optical Density
PBS	: Phosphate buffer saline
PCL	: Polycaprolactone
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute
TCPS	: Tissue culture polystyrene
XPS	: X-ray photoelectron spectroscopy
θ_A	: Advancing contact angle
θ_R	: Receding contact angle