อนุภาคระดับนาโนเมตรของคาร์บอนออกไซด์สำหรับการนำส่งแบบควบคุมของเคอร์คิวมิน และเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิด

นางสาวสุนัดดา อารยชูเกียรติ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์มหโมเลกุล
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2556

CARBON OXIDE NANOPARTICLES FOR CONTROLLED DELIVERY OF CURCUMIN AND PEPTIDE NUCLEIC ACID

Miss Sunatda Arayachukeat

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Macromolecular Science
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2013

Thesis Title	CARBON OXIDE NANOPARTICLES FOR CONTROLLED DELIVERY OF CURCUMIN AND PEPTIDE NUCLEIC ACID
By	Miss Sunatda Arayachukeat
Field of Study	Macromolecular Science
Thesis Advisor	Associate Professor Supason Wanichwecharungruang, Ph.D.
Thesis Co-Advisor	Associate Professor Tanapat Palaga, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Doctoral Degree

.....Dean of the Faculty of Science
(Professor Supot Hannongbua, Dr.rer.nat.)

THESIS COMMITTEE

.....Chairman
(Associate Professor Voravee P. Hoven, Ph.D.)

.....Thesis Advisor
(Associate Professor Supason Wanichwecharungruang, Ph.D.)

.....Thesis Co-Advisor
(Associate Professor Tanapat Palaga, Ph.D.)

.....Examiner
(Associate Professor Nuanphun Chantarasiri, Ph.D.)

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

.....External Examiner
(Associate Professor Ubonthip Nimmannit, Ph.D.)

สุนัดดา อารยชูเกียรติ์ : อนุภาคระดับนาโนเมตรของคาร์บอนออกไซด์สำหรับการนำส่งแบบควบคุมของเคอร์คิวมินและเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิด. (CARBON OXIDE NANOPARTICLES FOR CONTROLLED DELIVERY OF CURCUMIN AND PEPTIDE NUCLEIC ACID) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร. ศุภศร วนิชเวชารุ่งเรือง, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ. ดร. ธนาภัทร ปาลกะ, 134 หน้า.

เมื่อทำการออกซิไดซ์กราไฟต์ จากนั้นแยกผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วต่างๆ และตรวจสอบรูปร่างของผลิตภัณฑ์ด้วยภาพถ่ายอิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) และ ภาพถ่ายอิเล็กตรอนแบบส่องผ่านชนิดกำลังขยายสูงและวิเคราะห์โครงสร้างด้วยรามานสเปกโตรสโกปี พบว่าสามารถสังเคราะห์และแยกอนุภาคลักษณะกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยเท่ากับ 132.1 ± 4.74 นาโนเมตรได้ โดยเป็นอนุภาค sp^2 ไฮบริดคาร์บอน โดยที่ผิวมีหมู่ไฮดรอกซีอยู่เนื่องจากอนุภาคนี้เป็นการรวมกลุ่มกันของอนุภาคคาร์บอนขนาด 5-10 นาโนเมตร จึงเรียกชื่ออนุภาคนี้ว่า Cluster of carbon oxide nanospheres (CCNs) การทดสอบในเซลล์ พบว่า CCNs ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ไตของเอ็มบริโอมนุษย์ (HEK 293T) เซลล์มะเร็งปากมดลูกมนุษย์ (CaSki) และเซลล์ไลน์มะเร็งเม็ดเลือดขาว(RAW 264.7) ที่ความเข้มข้นสูงถึง 10 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร เมื่อใช้ CCNs ที่สังเคราะห์ได้เป็นตัวนำส่งเคอร์คิวมิน (curcumin) และเปปไทด์นิวคลีอิคแอซิค (peptide nucleic acid, PNA) และตรวจสอบโดย confocal laser scanning fluorescence microscopy (CLSM) พบว่า CCNs สามารถนำส่งสารออกฤทธิ์เข้าสู่นิวเคลียสได้ในขณะที่อนุภาคนำส่งอยู่ในส่วนไซโตพลาสซึม CCNs ช่วยเพิ่มความสามารถในการนำเคอร์คิวมินเข้าสู่เซลล์ไลน์ไตของเอ็มบริโอมนุษย์และนำเปปไทด์นิวคลีอิคแอซิคเข้าสู่เซลล์ไลน์มะเร็งเม็ดเลือดขาว การนำส่งเคอร์คิวมินด้วย CCNs ช่วยเพิ่มฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งของเคอร์คิวมินให้ดีขึ้นอีกด้วย อย่างไรก็ตามการทดลองประยุกต์ใช้อนุภาคนี้นำส่ง PNA เพื่อใช้รบกวนการแสดงออกของยีนอินเตอร์ลิวคิน 6 (il-6) ยังไม่ประสบความสำเร็จ เนื่องจาก PNA ไม่สามารถจับกับดีเอ็นเอได้อย่างเสถียร

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์มหโมเลกุล ลายมือชื่อนิสิต สุนัดดา อารยชูเกียรติ์

ปีการศึกษา 2556 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

5373923023 : MAJOR MACROMOLECULAR SCIENCE
KEYWORDS: CLUSTER OF CARBON OXIDE NANOSPHERES / CURCUMIN / PEPTIDE NUCLEIC ACID (PNA) / DRUG DELIVERY SYSTEM

SUNATDA ARAYACHUKEAT: CARBON OXIDE NANOPARTICLES FOR CONTROLLED DELIVERY OF CURCUMIN AND PEPTIDE NUCLEIC ACID. ADVISOR: ASSOC. PROF. SUPASON WANICHWECHARUNGRUANG, Ph.D.,ASSOC. PROF. TANAPAT PALAGA, Ph.D., 134 pp.

Graphite was oxidized, and the resulting products were separated by centrifugation at various speeds. The obtained products were morphologically characterized by scanning electron microscopy (SEM) and high resolution transmission electron microscopy (HR-TEM), and structural characterized by Raman spectroscopy. It was found that the spherical particles with diameter of 132.1 ± 4.74 nm could be prepared. The particles were sp^2-hybridized carbon with hydroxyl functionality at the surface. Since the obtained particles consisted of aggregated 5-10 nm carbon spheres, they were named cluster of carbon oxide nanoparticles (CCNs). CCNs showed no cytotoxicity against human embryonic kidney cell line, HEK 293T, human cervical carcinoma cell line, CaSki and murine macrophage cell line, RAW 264.7, at the concentration up to 10 μg/mL. CCNs were used as carriers for curcumin and peptide nucleic acid (PNA). Confocal laser scanning fluorescence microscopy (CLSFM) showed that CCNs could deliver both actives into nucleus while CCNs remained in the cytoplasm. CCNs could increase uptake of curcumin in HEK 293T cells and of PNA in RAW 264.7 cells. The delivery of curcumin by CCNs also enhanced anticancer activity of curcumin. However, the application of CCNs for PNA delivery for the anti-IL6 gene was unsuccessful due to unstable PNA-DNA complex.

Field of Study: Macromolecular Science Student's Signature Sunatda A.

Academic Year: 2013 Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

ACKNOWLEDGEMENTS

Completing this thesis was a long and difficult task. This thesis would not have been possible without the guidance, the support and the help of several people in many different ways during the process, and it is now my pleasure to thank those who helped me in the preparation and completion of this thesis.

First of all, I would like to express my sincere appreciation and gratitude to my advisor, Assoc. Prof. Dr. Supason Wanichweacharungruang for her helpful guidance, valuable assistance and consolation throughout my thesis. My sincere thanks are extended to Assoc. Prof. Dr. Tanapat Palaga, my co-advisor, for his suggestions and many helps.

I would like to thank all members of the committee Asst. Prof. Dr. Voravee P. Hoven, Asst. Prof. Dr. Varawut Tangpasuthadol, Assoc. Prof. Dr. Nuanphun Chantarasiri, and the invited external examiner Assoc. Prof. Dr. Ubonthip Nimmannit for their time, giving helpful comments and suggestions.

Gratefully thanks are extended to the Special Task force for Activating Research (STAR) from the Centenary Academic Development Project and Chulalongkorn university for financial support on my study and this thesis.

Finally, I would like to specially thank my parents, my family, my friends for their love, advice, understanding and encouragement throughout my entire education and all the members of Dr. Supason's research group for their companionship, valuable discussion and support.

CONTENTS

Page

Page

Page

LIST OF TABLES

Table **Page**

LIST OF FIGURES

Figure **Page**

LIST OF ABBREVIATIONS

acpcPNA	(1S, 2S)-2-aminocyclopentanecarboxylic acid
ATCC	American type culture collection
ATR-FTIR	Attenuated total reflectance-fourier transform
CaSki	Human epidermoid cervical carcinoma cell lines
CCNs	Cluster of carbon oxide nanospheres
CM	Complete medium
CLSFM	Confocal laser scanning fluorescence microscopy
Da	Dalton
DLS	Dynamic light scattering
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle medium
DMF	Dimethyl formamide
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
EA	Elemental analysis
EDCI	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
eV	Electron volt
FBS	Fetal bovine serum
g	Gravity
GOShs	Graphene oxide sheets
GNP	Graphene nanopellet
h	Hours

HR-TEM	High-resolution transmission electron microscopy
HEK293T	Human embryonic kidney cell line
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2- ethanesulfonic
IL6	Interleukin 6
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2-5-diphenyltetrazolium bromide
µg	Microgram
µL	Microliter
µM	Micromolar
mW	Milliwatt
mL	Milliliter
min	Minute
MWCO	Molecular weight cut-off
NHS	N-hydroxy succunamide
NF-κB	NF-κB specific sequences; Bz-GGGATTTTCCCA-LysNH_2
ng	Nanogram
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
PBS	Phosphate buffer solution
PCR	polymerase chain reaction
PNA	Random sequences; Bz-TGTCAACTGACT-LysNH_2

ppm	Parts per million
qRT- PCR	Quantitative real time polymerase chain reaction
RAW 264.7	Mouse leukaemic monocyte macrophage cell line
RNA	Ribonucleic acid
rpm	Revolution per minute
RPMI 1640	Roswell park memorial institute 1640 medium
	acid
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SEAD	Selected area electron diffraction analysis
	infrared spectroscopy
SEM	Scanning electron microscope
TAMRA	Tetramethylrhodamine-5-carbonyl azide
TEM	Transmission electron microscope
TGA	Thermo-gravitational analysis
XRD	X-ray diffraction analysis
XPS	X-ray photoelectron spectroscopy
w/ w	Weight by weight
UV/Vis	Ultraviolet/Visible
U	Unit
^{o}C	Degree celsius
%	Percent
LE	Loading efficiency
LC	Loading capacity