

โคโตซานที่สามารถเชื่อมขวางด้วยแสงเพื่อเป็นโครงแบบสำหรับวิศวกรรมเนื้อเยื่อ



นางสาว เต็มสิริ หวังทวีทรัพย์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาปิโตรเคมีและวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2547

ISBN: 974-53-1342-4

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PHOTOCROSSLINKABLE CHITOSAN AS A SCAFFOLD
FOR TISSUE ENGINEERING



Miss Temsiri Wangtaveesab

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Petrochemistry and Polymer Science


Faculty of Science
Chulalongkorn University

Academic Year 2004


ISBN: 974-53-1342-4

Thesis Title Photocrosslinkable Chitosan as a Scaffold for Tissue Engineering
By Miss Temsiri Wangtaveesab
Field of Study Petrochemistry and Polymer Science
Thesis Advisor Assistant Professor Varawut Tangpasuthadol, Ph.D.
Thesis Co-Advisor Pawadee Methacanon, Ph.D.

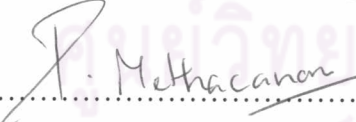
Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial
Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

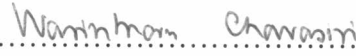

.....Dean of the Faculty of Science
(Professor Piamsak Menasveta, Ph.D.)

Thesis committee


.....Chairman
(Associate Professor Supawan Tantayanon, Ph.D.)


.....Thesis Advisor
(Assistant Professor Varawut Tangpasuthadol, Ph.D.)


.....Thesis Co-Advisor
(Pawadee Methacanon, Ph.D.)


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


.....Member
(Assistant Professor Mongkol Sukwattanasinitt, Ph.D.)

เต็มสิริ หวังทวีทรัพย์ : ไคโตซานที่สามารถเชื่อมขวางด้วยแสงเพื่อเป็นโครงแบบสำหรับวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (PHOTOCROSSLINKABLE CHITOSAN AS A SCAFFOLD FOR TISSUE ENGINEERING) อาจารย์ที่ปรึกษา: ผศ. ดร. วราวุฒิ ตั้งพลสุชาติ, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม: ดร. ภาวดี เมธะคานนท์; 70 หน้า. ISBN: 974-53-1342-4

ได้เตรียมแม่แบบที่มีรูพรุนจากไคโตซานที่เชื่อมขวางแล้วโดยใช้วิธีฟรีซไดรย์ ในส่วนแรก ได้ศึกษาตัวแปรได้แก่ ชนิดของไคโตซาน ความเข้มข้นของสารละลายไคโตซาน และอุณหภูมิของการแช่แข็ง ด้วยเทคนิคกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (เอสอีเอ็ม) พบว่าอุณหภูมิของการแช่แข็งเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อสัดส่วนวิทยาของรูพรุน โดยที่อุณหภูมิแช่แข็ง -10 องศาเซลเซียส เกิดรูพรุนที่เป็นทรงกลมที่เชื่อมต่อกัน ขนาด 30 ถึง 50 ไมโครเมตรภายในชิ้นงาน ในงานวิจัยส่วนที่สอง ได้เติมสารที่ว่องไวต่อยูวีชื่อ 1,3-ไดอะซิโด-2-โพรพานอล (ดีเอแซด) ลงในสารละลายกรดของไคโตซาน จากนั้นนำของผสมมาฉายด้วยยูวีเพื่อริเริ่มการเชื่อมขวางแล้วต่อด้วยการฟรีซไดรย์ที่ภาวะที่เหมาะสมดังได้ศึกษาในส่วนแรก โดยศึกษาอิทธิพลของชนิดของไคโตซาน อัตราส่วนโดยโมลของไคโตซานกับดีเอแซด และเวลาที่ใช้ในการฉายแสง ต่อปริมาณการเกิดการเชื่อมขวาง ติดตามปฏิกิริยาการเชื่อมขวางโดยเอฟที-ไออาร์จากสัญญาณที่ลดลงของหมู่ไฮดรอกซิลที่ $2,100\text{ cm}^{-1}$ พบว่าปริมาณการเชื่อมขวางเพิ่มมากขึ้นตามปริมาณของดีเอแซดและเวลาของการฉายแสง ในภาวะความเป็นกรด แม่แบบที่เกิดจากการเชื่อมขวางด้วยแสงสามารถคงรูปได้ดีกว่าแม่แบบที่ไม่มีการเชื่อมขวาง แต่ทั้งนี้พบว่าความสามารถต้านทานต่อแรงกดของแม่แบบที่เชื่อมขวางด้วยแสงมีค่าลดลงเมื่อปริมาณดีเอแซดเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นไปได้ว่าเกิดการเสื่อมสลายของสายโซ่ไคโตซานเนื่องจากแสง และ/หรือสารดีเอแซดที่เหลืออยู่ทำตัวเป็นสารพลาสติกไซเซอร์ ผลจากการทดสอบความเป็นพิษพบว่าแม่แบบที่เกิดจากการเชื่อมขวางด้วยแสงไม่เป็นพิษต่อเซลล์ L929 จากหนู

สาขาวิชา ปิโตรเคมีและวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์.....ลายมือชื่อนิสิต..... (เต็มสิริ) หวังทวีทรัพย์

ปีการศึกษา..... 2547.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4573405123 : MAJOR PETROCHEMISTRY AND POLYMER SCIENCE

KEYWORD: CHITOSAN/ PHOTO-CROSSLINKING/ SCAFFOLD/ TISSUE ENGINEERING

TEMSIRI WANGTAVEESAB: PHOTOCROSSLINKABLE CHITOSAN AS A SCAFFOLD FOR TISSUE ENGINEERING. THESIS ADVISOR: ASST. PROR. VARAWUT TANGPASUTHADOL, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR: PAWADEE METHACANON, Ph.D.; 70 pp. ISBN: 974-53-1342-4

UV-crosslinked chitosan was fabricated into porous scaffolds by freeze-dry method. In the first part, parameters including type of chitosan, concentration of chitosan solution, and freezing temperature to prepare uncrosslinked scaffolds were studied by scanning electron microscope (SEM). Freezing temperature was an important parameter affecting the pore morphology of the scaffolds. At the freezing temperature of -10°C , interconnecting round pores of 30-50 μm in diameter formed within the scaffold. In the second part, 1,3-diazido-2-propanol (DAZ), a UV-labile compound, was added to chitosan acidic solution. The mixture was exposed to UV light in order to initiate crosslinking, and further fabricated by optimum freeze-dry condition obtained from the first part. The influences of type of chitosan, mole ratios between chitosan and DAZ, and irradiation time on the degree of crosslinking were studied. FT-IR was used to monitor the crosslinking reaction from the decrease of azide signal at 2100 cm^{-1} . The degree of crosslinking increased with the amount of DAZ and the irradiation time. The photo-crosslinked scaffold could retain their shape in acidic pH, unlike the non-crosslinked one. Compressive modulus of the crosslinked scaffold, however, decreased when the amount of DAZ increased. This is possibly resulted from photo-degradation of chitosan chain and/or the DAZ acting as a plasticizer. For cytotoxicity testing, the photo-crosslinked scaffold was proven to be non-toxic with L929 cells.

Field of study Petrochemistry and Polymer Science. Student's signature Temsir Wangtaveesab.

Academic year 2004. Advisor's signature Varawut Tangpasuthadol.

Co-Advisor's signature Pawadee Methacanon.

ACKNOWLEDGEMENTS

Throughout 3 years, I have studied in Petrochemistry and Polymer Science for Master degree in Chulalongkorn University. I would like to thank where I have gained invaluable knowledge in Polymer Science and new experiences. Moreover, I would like to express my sincere appreciation to those who have helped me throughout this thesis. Without their help, my work would not have been possible.

First, I would like to express the grateful appreciation to my advisors, Assistant Professor Varawut Tangpasuthadol and Dr.Pawadee Methacanon for their invaluable kindness guidance, suggestions and inspiration throughout my graduate education.

I am sincerely grateful to Associate Professor Supawan Tantayanon; Assistant Professor Warinthorn Chavasiri; Assistant Professor Mongkol Sukwattanasinitt for their invaluable comments and suggestions as committee members.

I would like to thank National Metal and Materials Technology Center (MTEC) for a financial support.

I would like to acknowledge the supporters from MTEC, Mr.Thanawit Pothsree for his useful suggestions in NMR analysis, Ms.Warangkana Anuchitolarn for her advice concerning the spectroscopy work, Ms.Viyaporn Krongtong and Mr.Tomorn Srimora who provided assistance in the convenient usage of SEM and compression tester, respectively, my special thanks to Ms.Boonlom Thavornyutikarn for her kindness advice and help throughout this research.

Moreover, I appreciate comments, help, and warm friendship from all members of VT and VH groups in Organic Synthesis Research Unit and from all my teachers, colleagues and others whose names are not mentioned here.

Finally, I am deeply indebted to my family for their love, encouragement and understanding during my entire study.

CONTENTS

	Page
ABSTRACT IN THAI.....	iv
ABSTRACT IN ENGLISH.....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF FIGURES.....	x
LIST OF TABLES.....	xii
LIST OF SCHEMES.....	xiii
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xiv
CHAPTER I INTRODUCTION.....	1
1.1 Statement of Problem.....	1
1.2 Objectives.....	3
1.3 Scope of the Investigation.....	3
CHAPTER II THEORY AND LITERATURE REVIEW.....	4
2.1 Tissue Engineering.....	4
2.1.1 Scaffold on Tissue Engineering.....	4
2.1.2 Scaffold Formation Techniques.....	6
2.1.2.1 Thermally Induce Phase Separation (TIPS).....	6
2.1.2.2 Solvent Casting and Particular Leaching.....	7
2.1.2.3 Internal Bubbling Process (IBP).....	7
2.1.2.4 Gas Forming.....	8
2.1.2.5 Fiber Bonding.....	8
2.2 Chitosan.....	9
2.3 Photo-Crosslinking.....	12
2.3.1 Azides.....	13
2.3.2 Nitrenes.....	17

	Page
CHAPTER III EXPERIMENTAL.....	19
3.1 Materials.....	20
3.2 Instruments.....	20
3.2.1 Freeze Dryer.....	20
3.2.2 Scanning Electron Microscopy.....	21
3.2.3 Universal Testing Machine.....	21
3.2.4 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR).....	21
3.2.5 Elemental Analysis.....	21
3.2.6 FTIR Spectroscopy.....	21
3.2.7 Gel Permeation Chromatography (GPC).....	21
3.2.8 UV Lamp.....	22
3.3 Methodology.....	22
3.3.1 Chitosan Scaffold Formation	22
3.3.2 Preparation of Photo-Crosslinked Chitosan Scaffolds....	22
3.3.2.1 Synthesis of 1,3-Diazido-2-Propanol.....	22
3.3.2.2 Formation of Photo-Crosslinked Chitosan Scaffolds.....	23
3.3.3 Characterization of Chitosan Scaffolds	23
3.3.3.1 Microstructural Characterization.....	23
3.3.3.2 %Porosity.....	24
3.3.3.3 Mechanical Testing.....	24
3.3.4 Characterization of Photocrosslinked Chitosan Scaffolds	24
3.3.4.1 FT-IR Analysis.....	24
3.3.4.2 Determination of Degree of Crosslinking.....	24
3.3.4.3 Shape Retention.....	25
3.3.4.4 Cytotoxicity.....	25

	Page
CHAPTER IV RESULTS AND DISCUSSION.....	27
4.1 Characterization of Non-Photo-Crosslinked Chitosan Scaffolds	27
4.1.1 Morphology.....	27
4.1.2 %Porosity.....	29
4.1.3 Mechanical Property.....	30
4.2 Characterization of Photo-Crosslinked Chitosan Scaffolds.....	31
4.2.1 Synthesis of 1,3-Diazido-2-Propanol.....	31
4.2.2 FT-IR Analysis of Photo-Crosslinked Chitosan Scaffolds.....	33
4.2.3 Degradation of Chitosan by UV Irradiation.....	36
4.2.4 Degree of Crosslinking.....	37
4.2.5 Shape Retention.....	39
4.2.6 Morphology of Photo-Crosslinked Chitosan Scaffolds...	41
4.2.7 Compressive Modulus of Photo-Crosslinked Chitosan Scaffolds.....	42
4.2.8 Cytotoxicity.....	44
CHAPTER V CONCLUSIONS AND FUTURE DIRECTION.....	45
5.1 Conclusions.....	45
5.2 Future Direction.....	46
REFERENCES.....	47
APPENDICES.....	56
APPENDIX A.....	57
APPENDIX B.....	63
APPENDIX C.....	66
APPENDIX D.....	68
VITAE.....	71

	Page
CHAPTER IV RESULTS AND DISCUSSION.....	27
4.1 Characterization of Non-Photo-Crosslinked Chitosan Scaffolds	27
4.1.1 Morphology.....	27
4.1.2 %Porosity.....	29
4.1.3 Mechanical Property.....	30
4.2 Characterization of Photo-Crosslinked Chitosan Scaffolds.....	31
4.2.1 Synthesis of 1,3-Diazido-2-Propanol.....	31
4.2.2 FT-IR Analysis of Photo-Crosslinked Chitosan Scaffolds.....	33
4.2.3 Degradation of Chitosan by UV Irradiation.....	36
4.2.4 Degree of Crosslinking.....	37
4.2.5 Shape Retention.....	39
4.2.6 Morphology of Photo-Crosslinked Chitosan Scaffolds...	41
4.2.7 Compressive Modulus of Photo-Crosslinked Chitosan Scaffolds.....	42
4.2.8 Cytotoxicity.....	44
CHAPTER V CONCLUSIONS AND FUTURE DIRECTION.....	45
5.1 Conclusions.....	45
5.2 Future Direction.....	46
REFERENCES.....	47
APPENDIX.....	56
APPENDIX A.....	57
APPENDIX B.....	63
APPENDIX C.....	66
APPENDIX D.....	68
VITAE.....	71

LIST OF FIGURES

Figure	Page
2.1 Molecular structure of α - and β -form chitosan	10
2.2 Chemical structure of photo-crosslinkable Az-CH-LA	14
3.1 A diagram representation of cutting preparation of scaffold cross-section for SEM.....	23
4.1 SEM micrographs of 3%wt chitosan scaffolds prepared from different freezing temperatures: A) -10°C , B) -80°C and C) -196°C ..	28
4.2 A diagram representing pore morphologies of 3%wt chitosan scaffolds prepared from different freezing temperatures: A) -10°C , B) -80°C and C) -196°C	28
4.3 Effect of chitosan concentration and type of chitosan on average pore diameter of chitosan scaffolds fabricated at -10°C before and after re-hydration.....	29
4.4 Effect of shrimp-chitosan concentrations (1, 2 and 3 %wt) and freezing temperature (-10 , -80 and -196°C) on %porosity.....	30
4.5 Effect of chitosan concentration and type of chitosan on compressive modulus of non-photo-crosslinked chitosan scaffolds.....	31
4.6 $^1\text{H-NMR}$ spectrum of DAZ.....	32
4.7 FT-IR spectra of A)shrimp chitosan (SH), B)-D)SH:DAZ (1:0.5 mole ratio) at 0, 40 and 60 min of UV irradiation time respectively...	34
4.8 Effect of irradiation time on the degradation of shrimp chitosan.....	36
4.9 Degree of crosslinking of DAZ-added chitosan from shrimp (SH) and squid (SQ) (the mole ratio of chitosan:DAZ was 1:1) at different irradiation times.....	37
4.10 Degree of crosslinking of various mole ratios of shrimp chitosan (SH) to DAZ (1:1, 1:0.5 and 1:0.1) at various irradiation times.....	38

Figure	Page
4.11 Images of shrimp chitosan scaffolds; (A) before, (B) after swelling in pH 5 and (C) photo-crosslinked chitosan (SH:DAZ = 1:0.5) at 40 min irradiation after swelling in pH 5.....	39
4.12 Effect of mole ratios of SH:DAZ (1:1, 1:0.5 and 1:0.1) and irradiation time on shape retention of scaffolds swelling at pH 5 (comparing the results to original chitosan).....	40
4.13 Effect of mole ratios of SH:DAZ (1:1 and 1:0.1) and irradiation time on shape retention of scaffolds swelling at pH 7 (comparing the results to original chitosan).....	41
4.14 Pore size of chitosan and photo-crosslinked chitosan with various mole ratios (1:0.05, 1:0.1 and 1:1) at UV irradiation time 40 min.....	41
4.15 Effect of mole ratios of SH and DAZ, and irradiation time on compressive modulus.....	42
4.16 Optical micrographs (at original magnification x 100) of neutral red stained L929 cells after 48 h incubation in direct with: A)HDPE (negative control), B)natural rubber (positive control), C)SQ:DAZ (1:1) UV 15 min, and D)SQ:DAZ (1:1) UV 40 min. Material surfaces are seen as the area on the left.....	44

LIST OF TABLES

Table	Page
2.1 Type of cells and appropriate scaffold pore size.....	5
3.1 Physical properties of chitosan	20
4.1 Elemental analysis result of DAZ.....	33
4.2 %Degree of crosslinking of SH:DAZ (mole ratios 1:0.05, 1:0.1 and 1:0.5) at 40 and 60 min irradiation time.....	43



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF SCHEMES

Scheme	Page
2.1 Synthesis of photo-crosslinkable chitosan using 1-chloro-3-azido-2-propanol as a crosslinker.....	10
2.2 Photolysis of organic azides and the reaction of nitrene with various organic components.....	15
4.1 Ring-opening reactions of epichlorohydrin and azide ion	32
4.2 Possible mechanisms of photo-crosslinking between chitosan and DAZ by UV irradiation	35



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF ABBREVIATIONS

ECM	: Extracellular matrix
PGA	: Poly(glycolic acid)
PLLA	: Poly(L-lactic acid)
PLGA	: Poly(DL-lactic-co-glycolic acid)
Az-CH-LA	: Chitosan conjugated with <i>p</i> -azidebenzoic acid and lactobionic acid
SH	: Shrimp chitosan
SQ	: Squid chitosan
DAZ	: 1, 3-Diazido-2-propanol
NMR	: Nuclear magnetic resonance
GPC	: Gel permeation chromatography
SEM	: Scanning electron microscopy

ศูนย์วิจัยทันตวิทยา
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย