

Thesis Title	Temperature Responsive Poly (<i>N</i> -isopropylacrylamide-co-acrylamide) Grafted Culture Surface for Cell Sheet Engineering
Thesis Credits	12
Candidate	Miss Sopita Wong-in
Thesis Advisor	Asst.Prof.Dr.Kwanchanok Pasuwat
Program	Master of Science
Field of Study	Biological Engineering
Department	Biological Engineering
Faculty	Engineering
B.E.	2554

Abstract

A novel temperature-responsive tissue culture dish is prepared by using ultraviolet irradiation to graft poly *N*-isopropylacrylamide-co-acrylamide (PNIAM-co-AM) onto commercial tissue culture polystyrene surface (TCPS). These surfaces are able to promote cell adhesion/detachment by controllable hydrophobicity of the surface. The physical properties of this temperature-responsive surface were investigated by dynamic contact angle measurement, Atomic Force Microscopy (AFM) and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). The *in vitro* toxicity of polymer grafted surface was evaluated by using MTT assay. The PNIAM-co-AM was found to be non-toxic. The cell attachment/detachment on the graft copolymer film was investigated by using the mouse fibroblast cell line (L929), mouse pre-osteoblast cell line (MC3T3-E1), and human chondrocyte primary cells as cell models. Our results demonstrated that L929, MC3T3-E1, and chondrocyte cells could adhere and grow on the grafted surface similar to those on the ungrafted TCPS under normal condition at 37°C. When temperature was reduced below 32°C, the confluent L929, MC3T3-E1 cells, and chondrocyte cells could be detached as single cells and L929, MC3T3-E1 sheet without any enzymatic treatment. The harvested cells could be grown on a new tissue culture dish to promote reattachment of the cells. The cell sheet harvested using the low temperature treatment which is preserved the ECM and adhesive factors, allowing the sheet to adhere to another culture surface or other cell sheets as a double-layered sheet. This cell sheet was in a good condition as indicated by LIVE/DEAD stain.

Keywords: temperature-responsive polymer / UV grafting / L929 cells / MC3T3-E1 cells / human chondrocyte cell / cell attachment / cell detachment / single layer cell sheet /double layer cell sheet

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การสังเคราะห์พื้นผิวที่ตอบสนองต่ออุณหภูมิด้วยโคพอลิเมอร์ชนิด Poly (N-isopropylacrylamide-co-acrylamide) เพื่อนำไปใช้ในการสร้างเซลล์ชีว
หน่วยกิต	12
ผู้เขียน	นางสาวโสภิตา วงศ์อินทร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.ขวัญชนก พสุวัต
หลักสูตร	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	วิศวกรรมชีวภาพ
คณะ	วิศวกรรมศาสตร์
พ.ศ.	2554

บทคัดย่อ

ภาชนะเลี้ยงเซลล์แบบใหม่ที่สามารถตอบสนองต่ออุณหภูมิได้ ถูกสร้างขึ้นโดยการกราฟต์โคพอลิเมอร์ชนิดพอลิเอ็นไอโซโพรพิลอะคริลาไมด์โคอะคริลาไมด์ (poly (N-isopropylacrylamide-co-acrylamide) (PNIAM-co-AM)) ลงบนภาชนะเลี้ยงเซลล์แบบพอลิสไตรีน (TCPS) โดยภาชนะเลี้ยงเซลล์แบบใหม่นี้มีคุณสมบัติเหมาะสมในการเกาะและการหลุดออกของเซลล์เมื่อมีการควบคุมความชอบน้ำและไม่ชอบน้ำของพื้นผิวนิดนี้ได้ การตรวจสอบคุณสมบัติทางกายภาพของภาชนะเลี้ยงเซลล์ที่สามารถตอบสนองต่ออุณหภูมินี้ทำได้โดยใช้การวิเคราะห์ค่ามุมสัมผัส การวิเคราะห์พื้นผิวด้วยแรงอะตอม และการตรวจสอบเอกลักษณ์เฉพาะ โดยเปรียบเทียบระหว่างพื้นผิวการเลี้ยงเซลล์ปกติแบบพอลิสไตรีนและพื้นผิวที่ถูกกราฟต์ด้วยโคพอลิเมอร์ วิเคราะห์ความเป็นพิษของพื้นผิวที่ถูกกราฟต์ก่อนนำมาใช้ศึกษาเกี่ยวกับเซลล์โดยการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay ซึ่งผลการทดสอบพบว่าพื้นผิวไม่เป็นพิษสามารถนำมาใช้ในการเลี้ยงเซลล์ได้ การศึกษาการเกาะ (cell attachment) และการหลุดออก (cell detachment) ของเซลล์ ได้ทดสอบกับเซลล์ไลน์สองชนิด คือ mouse fibroblast cell line (L929) และ pre-osteoblast cell line (MC3T3-E1) รวมทั้งได้มีการทดสอบกับเซลล์ปฐมภูมิหนึ่งชนิด คือเซลล์กระดูกอ่อนของมนุษย์ (human chondrocyte cell) จากการศึกษาพบว่า เซลล์ทั้งสองชนิดสามารถเกาะแผ่และเจริญเติบโตบนพื้นผิวที่ถูกกราฟต์ด้วยโคพอลิเมอร์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับภาชนะเลี้ยงเซลล์ปกติที่ไม่ถูกกราฟต์ เมื่อลดอุณหภูมิลงต่ำกว่า 32 องศาเซลเซียส เซลล์สามารถหลุดออกจากพื้นผิวที่ถูกกราฟต์เป็นเซลล์เดี่ยว (single cells) และเซลล์ชีต (cell sheet) ได้ โดยไม่ต้องอาศัยเอนไซม์ ซึ่งเซลล์ชีตที่หลุดออกมาสามารถสร้างเป็นสองชั้นโดยการวางเซลล์ชีตแผ่นแรกลงบนเซลล์ชีตแผ่นอื่นโดยใช้เมมเบรน เซลล์ที่หลุดออกเป็นเซลล์ชีต (cell sheet) สามารถนำไปถ่ายเลี้ยงบนพื้นผิวที่เคลือบด้วยโปรตีนใหม่ได้ โดยที่เซลล์ยังคงมีชีวิตรอดเมื่อทำการทดสอบด้วยการย้อมสีเซลล์

คำสำคัญ: พอลิเมอร์ที่ตอบสนองต่ออุณหภูมิ / การกราฟต์ด้วยรังสียูวี / เซลล์ L929 / เซลล์ MC3T3-E1 / เซลล์กระดูกอ่อน / การเกาะของเซลล์ / การหลุดของเซลล์ / เซลล์ซีทแบบหนึ่งชั้น / เซลล์ซีทแบบสองชั้น