

**DEVELOPMENT OF POROUS HYDROXYAPATITE PARTICLES AS
CARRIERS OF PROTEINS IN A POLYCAPROLACTONE SCAFFOLD FOR
BONE TISSUE ENGINEERING**

Sujitra Chaisuntharanon

A Thesis Submitted in Partial Fulfilment of the Requirements
for the Degree of Master of Science
The Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University
in Academic Partnership with
The University of Michigan, The University of Oklahoma,
and Case Western Reserve University
2010

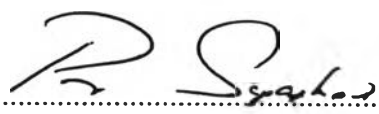
I28375336

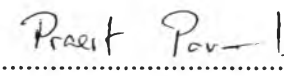
Thesis Title: Development of Porous Hydroxyapatite Particles as Carriers of Proteins in a Polycaprolactone Scaffold for Bone Tissue Engineering
By: Sujitra Chaisuntharanon
Program: Polymer Science
Thesis Advisors: Prof. Pitt Supaphol

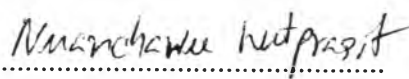
Accepted by the Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University, in partial fulfilment of the requirements for the Degree of Master of Science.



..... College Dean
(Asst. Prof./Pomthong Malakul)

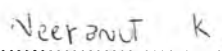
Thesis Committee:


.....
(Prof. Pitt Supaphol)


.....
(Assoc. Prof. Prasit Pavasant)


.....
(Assoc. Prof. Nuanchawee Wetprasit)


.....
(Asst. Prof. Hathaikarn Manuspiya)


.....
(Dr. Neeranut Kuanchertchoo)

ABSTRACT

5172034063: Polymer Science Program

Sujittra Chaisuntharanon: Development of Porous Hydroxyapatite Particles as Carriers of Proteins in Polycaprolactone Scaffold for Bone Tissue Engineering.

Thesis Advisor: Prof. Pitt Supaphol, Assoc. Prof. Prasit Pavasant and Dr. Neeranut Kuanchertchoo 100 pp.

Keywords: Hydroxyapatite/ Bone scaffolds/ Controlled release/ Gelatin/ Ovalbumin/ Bovine serum albumin/ Crude Bone Protein/ Polycaprolactone

This study aimed to develop the porous hydroxyapatite (HAp) particles as a controlled release carrier of proteins were embedded in polycaprolactone (PCL) to fabricate porous HAp-PCL scaffolds. Proteins (Ovalbumin, Gelatin type B, Bovine serum albumin and Crude bone protein from pork bone) had been entrapped within the HAp particles. HAp particles were synthesized by coprecipitation technique from dicalcium phosphate dihydrate ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, DCPD) and calcium carbonate (CaCO_3). Incorporation of proteins was accomplished during the coprecipitation of the two reactants. The porous HAp-PCL scaffolds were prepared by solvent casting/particulate leaching method of salt particle 400 μm at 30 wt%. The controlled release of proteins from HAp particles and the HAp-PCL scaffolds was influenced by ionic interaction between molecules of proteins and HAp and investigated by UV-Visible spectrophotometry. Profile release of CBP was the greatest from HAp particle and HAp-PCL scaffold. The potential for use of protein-loaded HAp-PCL as bone scaffolds was assessed by mouse-calvaria derived pre-osteoblastic cells, MC3T3-E1. Cell attachment, cell proliferation, and alkaline phosphatase (ALP) activity on protein-HAp PCL scaffolds were not significant difference due to no effect from proteins. For mineralization, the quantification of calcium deposition was observed the highest intensity on CBP/HAp-PCL scaffold. It can say that crude bone protein/HAp-PCL scaffold was suitable for bone tissue engineering.

บทคัดย่อ

สุจิตรา ชัยสุนทรานนท์ : การพัฒนาไฮดรอกซีอะพาไทต์สำหรับพาโปรตีนในโครงร่างเซลล์พอลิคาโพรแลคโตนสำหรับซ่อมสร้างเนื้อเยื่อกระดูก (Development of Hydroxyapatite Porous Particle as carrier of Proteins in Polycaprolactone Scaffold for Bone Tissue Engineering)

อ. ที่ปรึกษา : ศ. ดร. พิชญ์ ศุภผล รศ. ดร. ประสิทธิ์ ภาวสันต์ และ ดร.ณิรนุช ควรวะณิช 100 หน้า

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาไฮดรอกซีอะพาไทต์ให้มีคุณสมบัติเป็นตัวพาโปรตีนที่ดี และฝังตัวอยู่ในพอลิคาโพรแลคโตน เพื่อผลิตเป็นวัสดุโครงร่างเซลล์ที่ทำจากไฮดรอกซีอะพาไทต์-พอลิคาโพรแลคโตน โปรตีน โอวัลบูมิน เจลลาตินชนิดบี โบไวน์ซีรัมอัลบูมิน และโปรตีนสกัดจากกระดูกหมู จะถูกกักเก็บภายในไฮดรอกซีอะพาไทต์ โดยไฮดรอกซีอะพาไทต์ถูกสังเคราะห์ผ่านกระบวนการตกตะกอนร่วมระหว่างไดแคลเซียมฟอสเฟตไดไฮเดรต (DCPD) และแคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO_3) โดยโปรตีนจะถูกกักเก็บภายในไฮดรอกซีอะพาไทต์ในระหว่างการตกตะกอนร่วมของสารตั้งต้นทั้งสองตัว หลังจากนั้นทำการขึ้นรูปเป็นวัสดุโครงร่างเซลล์ไฮดรอกซีอะพาไทต์-พอลิคาโพรแลคโตน โดยใช้เทคนิคการหล่อเป็นตัวสร้างรู การปลดปล่อยโปรตีนจากไฮดรอกซีอะพาไทต์ และจากโครงร่างเซลล์ไฮดรอกซีอะพาไทต์-พอลิคาโพรแลคโตน มีผลร่วมกันระหว่างการเกิดปฏิกิริยาออสติโอการระหว่างโมเลกุลของโปรตีนกับไฮดรอกซีอะพาไทต์ โดยวิธี UV-Visible spectrophotometry พบว่าโปรตีนสกัดจากกระดูกหมูแสดงผลการปลดปล่อยจากไฮดรอกซีอะพาไทต์ และไฮดรอกซีอะพาไทต์-พอลิคาโพรแลคโตน ได้ดีที่สุด การศึกษาประสิทธิภาพของการใช้โครงร่างเซลล์ไฮดรอกซีอะพาไทต์-พอลิคาโพรแลคโตน ด้วยเซลล์จากกระดูกหมู (MC3T3-E1) พบว่า การยึดเกาะของเซลล์ การขยายจำนวนของเซลล์ และปริมาณเอนไซม์แอลพีได้ผลที่ไม่แตกต่างกันในแต่ละโครงร่างเซลล์เนื่องจากยังไม่เห็นผลของการปลดปล่อยโปรตีน สำหรับการหาปริมาณแร่ธาตุแคลเซียมที่เกิดขึ้นในแต่ละโครงร่างเซลล์พบว่าโปรตีนสกัดจากกระดูกหมูสามารถเร่งการทำงานของเซลล์กระดูกทำให้โปรตีนสกัดจากกระดูกหมูในไฮดรอกซีอะพาไทต์-พอลิคาโพรแลคโตน ได้ปริมาณแคลเซียมสูงสุดอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเทียบกับโครงร่างเซลล์ที่ไม่มีโปรตีนในไฮดรอกซีอะพาไทต์ จึงอาจกล่าวได้ว่าโปรตีนสกัดจากกระดูกหมูที่ฝังตัวในไฮดรอกซีอะพาไทต์-พอลิคาโพรแลคโตน เหมาะสำหรับเป็นวัสดุที่ใช้ซ่อมสร้างเนื้อเยื่อกระดูก

ACKNOWLEDGEMENTS

The author would like to thank Prof. Pitt Supaphol, Assoc. Prof. Prasit Pavasant, Assoc. Prof. Nuanchawee Wetprasit, Asst. Prof. Hathaikarn Manuspiya and Dr. Neeranut Kuanchertchoo for their sincere assistances. They have provided the very useful guidance and the great encouragement throughout this research.

The author also thanks to all of colleagues, staff and teachers in the Petroleum and Petrochemical college, Chulalongkorn University who helps greatly during studies.

The author is grateful for funding of the thesis work provided by Petroleum and Petrochemical college; and Center for petroleum, Petrochemicals, and Advanced Materials.

The author wishes to give thanks to all of friends in Pitt Supaphol group's student for helps and suggestions.

Finally, the author would like to express appreciation for supporting scholarship and caring a great love of family especially mother, father, brother, and grandmother.

TABLE OF CONTENTS

| | | PAGE |
|----------------|---|-------------|
| | Title Page | i |
| | Abstract (in English) | iii |
| | Abstract (in Thai) | iv |
| | Acknowledgements | v |
| | Table of Contents | vi |
| | List of Tables | viii |
| | List of Figures | ix |
| | | |
| CHAPTER | | |
| I | INTRODUCTION | 1 |
| II | LITERATURE REVIEW | 2 |
| III | EXPERIMENTAL | 20 |
| IV | DEVELOPMENT OF POROUS HYDROXYAPATITE PARTICLES AS CARRIERS OF PROTEINS FOR BONE TISSUE ENGINEERING | |
| | 4.1 Abstract | 28 |
| | 4.2 Introduction | 28 |
| | 4.3 Experiments | 29 |
| | 4.4 Results and Discussion | 33 |
| | 4.5 Conclusions | 47 |
| | 4.6 Acknowledgements | 47 |
| | 4.7 References | 48 |

| CHAPTER | PAGE |
|--|-------------|
| V | |
| DEVELOPMENT OF POROUS HYDROXYAPATITE PARTICLES AS CARRIERS OF PROTEINS IN A POLYCAPROLACTONE SCAFFOLD FOR BONE TISSUE ENGINEERING | |
| 5.1 Abstract | 50 |
| 5.2 Introduction | 50 |
| 5.3 Experiments | 51 |
| 5.4 Results and Discussion | 57 |
| 5.5 Conclusions | 71 |
| 5.6 Acknowledgements | 72 |
| 5.7 References | 72 |
| VI | |
| CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS | 74 |
| REFERENCES | 76 |
| APPENDICES | |
| Appendix A Electrical conductivity of proteins-loaded Hydroxyapatite powder | 83 |
| Appendix B Proteins release from HAp powder and HAp-PCL scaffold | 84 |
| Appendix C Particle size distribution of protein-loaded HAp | 87 |
| Appendix D Characterization of Polycaprolactone scaffold | 88 |
| Appendix E Experimental data of water absorption | 89 |
| Appendix F Experimental data of cell culture studies | 90 |
| CURRICULUM VITAE | 100 |

LIST OF TABLES

| TABLE | PAGE |
|--|-------------|
| 2.1 Abbreviations of CaP-compounds with corresponding chemical formula and Ca/P ratio | 14 |
| 2.2 Comparison of amino acid between albumin | 15 |
| 4.1 The different crystallite size of calcined and uncalcined HAp | 37 |
| 4.2 SEM of proteins-loaded HAp powder | 40 |
| 4.3 BET surface area and pore size of the sample calcined | 44 |
| 5.1 Density, porosity, pore volume and pore size of PCL scaffold | 58 |
| 5.2 Formazan crystal within TCPS, PCL, HAp-PCL scaffold were eluted with DMSO after cell seeding 6 hour | 63 |
| 5.3 Formazan crystals within scaffolds after using eluting dye (DMSO) after cell seeding 1 day | 65 |
| 5.4 Selected SEM images of MC3T3-E1 after seeding on TCPS, PCL, OVA/HAp-PCL, Gelatin type B/HAp-PCL, BSA/HAp-PCL, and CBP/HAp-PCL scaffolds at 2, 4, and 6 h | 66 |
| 5.5 Selected SEM images of MC3T3-E1 after seeding on TCPS, PCL, HAp-PCL, OVA/HAp-PCL, Gelatin type B/HAp-PCL, and BSA/HAp-PCL scaffolds at 1, 2, and 3 days | 67 |
| 5.6 Alizarin Red S staining for mineralization assessment of MC3T3-E1 on 21 days after being cultured on the surfaces of neat PCL, HAp-PCL, HAp/OVA-PCL, HAp/Gelatin-PCL, HAp/BSA-PCL, and HAp/CBP-PCL | 70 |

LIST OF FIGURES

| FIGURE | | PAGE |
|---------------|---|-------------|
| 2.1 | Release from physically entangled, degradable, and swelling | 8 |
| 2.2 | Production methods of polymer microsphere | 9 |
| 2.3 | Schematic illustration of the unit cell from a crystal of HAp | 11 |
| 2.4 | Process of gelatin production | 16 |
| 2.5 | Chemical structure of gelatin | 16 |
| 2.6 | The structure of polycaprolactone | 19 |
| 4.1 | TGA-DTG curves of proteins-loaded hydroxyapatite | 34 |
| 4.2 | XRD pattern of HAp powders | 36 |
| 4.3 | Schematic illustration of the protein-medicated crystallization of HAp crystals with positive charges | 37 |
| 4.4 | The FTIR spectra of HAp powders | 38 |
| 4.5 | TEM micrographs of proteins-loaded HAp powder | 41 |
| 4.6 | EDS spectrum of the biomimetic apatite layer deposited. | 43 |
| 4.7 | Average particle size distribution of Hydroxyapatite | 44 |
| 4.8 | Encapsulating efficiency of protein-loaded hydroxyapatite in phosphate buffer saline solution | 46 |
| 4.9 | Loading capacity of protein-loaded HAp (LC) in phosphate buffer saline solution | 46 |
| 5.2 | SEM images illustrate microstructure of the scaffolds on the surface. | 57 |
| 5.3 | Water absorption capability of the PCL scaffolds in 0.1 M PBS at room temperature within 3 days. | 59 |
| 5.4 | Release profile from protein-loaded HAp-PCL scaffold in 10 % MEM. | 60 |
| 5.5 | Direct cytotoxicity evaluation of proteins based on the | |

| FIGURE | PAGE |
|---|------|
| viability of MC3T3-E1. | 61 |
| 5.6 Indirect cytotoxicity evaluation of protein-loaded HAp based | 61 |
| 5.7 on the viability of MC3T3-E1. | |
| Indirect cytotoxic evaluation of HAp-PCL scaffold based | 62 |
| 5.8 on the viability of MC3T3-E1. | |
| Attachment of MC3T3-E1 on control TCPS, PCL, | 63 |
| 5.9 HAp/OVA-PCL, HAp/gelatin B-PCL, and HAp/BSA-PCL | |
| Proliferation of MC3T3-E1 on TCPS, PCL, HAp/OVA-PCL, HAp/gelatin B-PCL, and HAp/BSA-PCL. | 64 |
| 5.10 ALP activity of MC3T3-E1 cultured on TCP, PCL, HAp-PCL, OVA/HAp-PCL, Gelatin B/HAp-PCL, BSA/HAp-PCL, | 68 |
| 5.11 PCL and CBP/HAp-PCL porous scaffolds after 3 and 7days in culture. | 69 |
| ALP activity of MC3T3-E1 cultured with 2%MEM, OVA, Gelatin type B, BSA and CBP after 5 and 7 days in culture | |
| Different absorbance of alizalin red S from MC3T3-E1 on TCPS, PCL, HAp-PCL, proteins-loaded HAp-PCL at 21 days. | 71 |