

داربست نانولیفی پلی هیدروکسی بوتیرات کوهیدروکسی والرات حاوی نانوذرات هیدروکسی آپاتیت / بریدیجیت: مشخصه یابی و ارزیابی بیولوژیکی

منیره کوهی^{۱*}، مرتضی شمعیان^۱، محمد حسین فتحی^۱، ملاما پرابهاکران^۲ و سیرام راماکریشنا^۲

۱. گروه بیومواد، دانشکده مهندسی مواد، دانشگاه صنعتی اصفهان

۲. مرکز نانوالیاف و نانو تکنولوژی، دانشکده مهندسی مکانیک، دانشگاه ملی سنگاپور، سنگاپور

(دریافت مقاله: ۱۳۹۵/۰۵/۱۲ - دریافت نسخه نهایی: ۱۳۹۵/۰۷/۱۰)

چکیده - در این تحقیق، داربست نانولیفی کامپوزیتی پلی هیدروکسی بوتیرات کوهیدروکسی والرات (PHBV) حاوی نانوذرات کامپوزیتی هیدروکسی آپاتیت/بریدیجیت (HABR) به روش الکترورسی تولید شد. مورفولوژی نانوالیاف تولید شده و نحوه توزیع نانوذرات در نانوالیاف به ترتیب توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی و عبوری بررسی شدند. ارزیابی خواص مکانیکی نشان داد که یک حد آستانه‌ای برای غلظت نانوذرات وجود دارد که در آن، حضور نانوذرات باعث بهبود خواص مکانیکی داربست نانولیفی شد. داربست کامپوزیتی PHBV خاصیت ترشوندگی بهتری در مقایسه با PHBV خالص از خود نشان داد. در آزمون کشت سلول برون تنی، سلول‌های استئوبلاست (hFob) بر داربست‌های نانولیفی کشت داده شدند. ارزیابی تکثیر سلولی به روش MTS نشان داد که بعد از ۱۰ و ۱۵ روز، سلول‌ها بر داربست کامپوزیتی PHBV/HABR به‌طور معنی‌داری بیشتر از داربست خالص PHBV رشد داشته‌اند. به‌علاوه نتایج آنالیز ارزیابی میکروسکوپی الکترونی روبشی - طیف‌سنجی تفریق انرژی و رنگ آمیزی سلولی نشان دادند که سلول‌های کشت داده شده بر روی داربست کامپوزیتی PHBV بیشتر از داربست PHBV خالص و نمونه کنترل، رسوبات مینراله تشکیل دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که نانوالیاف کامپوزیتی PHBV/HABR با خواص مکانیکی، ترشوندگی و رفتار سلولی بهبود یافته، پتانسیل خوبی در کاربردهای بازسازی بافت استخوان دارند.

واژه‌های کلیدی: داربست نانولیفی، پلی هیدروکسی بوتیرات کووالرات، هیدروکسی آپاتیت، بریدیجیت، بازسازی استخوان.

Poly (hydroxybutyrate co hydroxyvalerate) Nanofibrous Scaffold Containing Hydroxyapatite\Bredigite Nanoparticles: Characterization and Biological Evaluation

M. Kouhi^{1*}, M. Shamanian¹, M. Fathi¹, M. P. Prabhakaran²
and S. Ramakrishna²

1. Biomaterials Research Group, Department of Materials Engineering, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.
2. Center for Nanofibers and Nanotechnology, Department of Mechanical Engineering, National University of Singapore, Singapore.

Abstract: In this work, poly (hydroxybutyrate co hydroxyvalerate) (PHBV) composite nanofibrous scaffold containing hydroxyapatite/bredigite (HABR) nanoparticles was fabricated through electrospinning method. The morphology of prepared

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: monireh.kouhi@gmail.com

nanofibers and the state of the nanoparticles dispersion in nanofiber matrix were investigated using scanning and transmission electron microscopy, respectively. Evaluation of the mechanical properties of the nanofibrous scaffolds revealed that there is a limit to the nanoparticle concentration at which nanoparticles can improve the mechanical properties of the nanofibrous scaffolds. According to the results, PHBV/HABR nanofibers showed higher wettability compared to PHBV nanofibers. In vitro cell culture assay was done using human fetal osteoblast cells on nanofibrous scaffold. MTS assay revealed that cell proliferation on the composite nanofibrous scaffold was significantly higher than those on the pure scaffold after 10 and 15 days. Scanning electron microscopy- Energy dispersive X-ray spectroscopy and CMFDA colorimeter assay analysis showed that the cells on the PHBV/HABR scaffolds acquired higher mineral deposition than the cells on the pure PHBV and control sample scaffold. Based on the results we concluded that PHBV/HABR nanofibers scaffold with higher wettability, improved mechanical properties and cell behavior hold great potential in bone regeneration applications.

Keywords: Nanofibrous scaffold, Poly (hydroxybutyrate co hydroxyvalerate), Hydroxyapatite, Bredigite, Bone regeneration.

۱- مقدمه

برای کاربردهای بازسازی استخوان، نانوکامپوزیت‌های حاوی فاز غیرآلی به دلیل دارا بودن خواص مکانیکی و بیولوژیکی مطلوب، به‌عنوان داربست بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. کارایی بهتر نانوکامپوزیت‌ها نسبت به کامپوزیت‌های یکپارچه و رایج را می‌توان به شباهت آنها به استخوان طبیعی که خودش یک نانوکامپوزیت حاوی عمدتاً نانوکریستال‌های هیدروکسی آپاتیت و نانوالیاف کلاژن است، نسبت داد [۴ و ۸]. استفاده از نانوذرات ذرات سرامیکی در درمان یا بازسازی استخوان مزایایی نسبت به سرامیک‌ها یا شیشه‌های زیستی با ابعاد ماکرو یا میکرو دارند، زیرا نشان داده شده است که کاهش ابعاد ذرات، اجازه چسبندگی سلولی منظم، افزایش تکثیر و تمایز استئوبلاست را می‌دهد و پروسه معدنی شدن زیستی^۴ را نیز افزایش می‌دهد [۹]. تحقیقات نشان داده است که قرار دادن سرامیک‌های زیست فعال از جمله کلسیم فسفات و شیشه‌های زیست فعال در کامپوزیت‌ها کارایی بهتری در رشد و تمایز سلول‌های استخوانی دارد. سرامیک‌های کلسیم فسفات مانند هیدروکسی آپاتیت، به دلیل دارا بودن ساختار شیمیایی مشابه با بخش معدنی استخوان بدن، سازگاری زیستی با بافت‌های نرم و سخت و قابلیت اتصال با استخوان، کاندیدای مناسبی برای کاربردهای بازسازی استخوان می‌باشند [۱۰ و ۱۱]. با وجود اینکه هیدروکسی آپاتیت زیست فعال است اما به دلیل نرخ تخریب‌پذیری پایین، فعالیت آن در محیط برون‌تنی^۵ بسیار محدود است و همچنین نرخ تجمع بافت استخوان در تماس با آن نسبتاً پایین است و مطالعات درون‌تنی^۶ نیز تشکیل کم بافت

در سال‌های اخیر تلاش‌های قابل توجهی در زمینه تولید داربست‌های تقلیدکننده ساختار ماتریکس خارج سلولی^۱ استخوان جهت کاربرد در مهندسی و بازسازی بافت صورت گرفته است. این بیومواد باید به‌گونه‌ای طراحی شوند که زیست سازگار، زیست تخریب‌پذیر و استخوان‌ساز باشند [۱]. نانوالیاف انتخاب مناسبی برای ایفای نقش ماتریکس خارج سلولی طبیعی در شرایط آزمایشگاهی هستند. مطالعات نشان می‌دهد که اگر سلول‌هایی از بافت‌های انسانی روی لایه متشکل از نانوالیاف تخریب‌پذیر کشت داده شوند، می‌توانند به لیف متصل شده و در آنجا تکثیر یابند و بافت مربوطه را به‌وجود آورند. به‌علاوه، خواص فیزیکی عالی از قبیل سطح مخصوص بالا، تخلخل بالا، حفرات به‌هم پیوسته و خواص مکانیکی مناسب، ساختارهای نانولیفی را گزینه مناسبی برای کاربرد به‌عنوان داربست در مهندسی بافت کرده است و مطالعات بر روی این داربست‌ها بسیار گسترش یافته است [۲-۴]. تاکنون پلیمرهای زیست تخریب‌پذیر مختلفی به‌روش الکتروریسی برای کاربردهای مهندسی بافت به داربست‌های نانولیفی تبدیل شده‌اند. در این میان پلی هیدروکسی آلکانوات‌ها^۲ به دلیل دارا بودن خواص مطلوبی چون زیست تخریب‌پذیری، قابلیت شکل‌پذیری بالا، دارا بودن ضریب پیژوالکتریک مشابه استخوان، سازگاری با سلول‌های استئوبلاست^۳ و از همه مهم‌تر محصولات تخریب غیرسمی، اخیراً توجه بسیاری از محققین را برای تهیه داربست جهت مهندسی بافت استخوان، به‌خود جلب کرده است [۵-۷].

استخوانی را نشان داده‌اند [۱۲]. به همین دلیل در سال‌های اخیر تلاش‌های بسیاری برای مخلوط کردن هیدروکسی آپاتیت با بیوسرامیک‌های فعال‌تر و شیشه‌های زیستی صورت گرفته است تا بیومواد کامپوزیتی نسل جدید با خواص بیولوژیکی مناسب به دست آید [۱۳ و ۱۴]. نشان داده شده است که بیوسرامیک‌هایی بر پایه سیلیکات رفتار زیست فعالی بالاتری نسبت به مواد کلسیم فسفات از خود نشان می‌دهند. یک مشخصه قابل توجه مواد سیلیکاتی توانایی آنها در رهائش یون‌های سیلیکون با غلظتی می‌باشد که رشد و تمایز سلول‌های استئوبلاست را بهبود می‌بخشد [۱۵ و ۱۶]. سیستم‌های سه‌تایی بر پایه $\text{CaO-SiO}_2\text{-MgO}$ به دلیل دارا بودن یون منیزیم، پایداری و خواص مکانیکی مطلوب‌تری نسبت به سرامیک‌های کلسیم سیلیکات دارند. بریدجیت^۷ یکی از بیوسرامیک‌های متعلق به سیستم سه‌تایی مذکور می‌باشد که تأیید شده است سلول سازگار و زیست فعال بوده و محصولات رهائش آن می‌تواند رشد استخوان را افزایش دهد [۱۷ و ۱۸]. در تحقیق پیشین ما نشان داده شد که در اثر ترکیب کردن بیوسرامیک زیست فعال بریدجیت با هیدروکسی آپاتیت، نانوذرات کامپوزیتی با خواص زیست فعالی و زیست سازگاری بهبود یافته نسبت به هیدروکسی آپاتیت خالص تولید می‌شود [۱۹].

تاکنون نانوالیاف PHBV به صورت خالص یا مخلوط با پلیمرهایی نظیر کیتوسان، آسپارتیک اسید و فیبروئین ابریشم به عنوان داربست در مهندسی بافت استخوان مورد مطالعه قرار گرفته است [۲۰ - ۲۳]. همچنین ترکیباتی مانند فاکتورهای رشد و نانوذرات بیوسرامیکی از جمله هیدروکسی آپاتیت و استراتیم کربنات به صورت مخلوط با نانوالیاف PHBV به عنوان داربست مهندسی بافت بررسی شده اند [۲۴ و ۲۵]. اما مطالعه خواص و رفتار سلولی نانوالیاف PHBV حاوی نانوذرات کامپوزیتی هیدروکسی آپاتیت/ بریدجیت تاکنون گزارش نشده است. با توجه به مطالب گفته شده، در این تحقیق تصمیم بر این است تا از خواص منحصر به فرد نانوالیاف در طراحی داربست جهت کاربرد در مهندسی بافت استخوان استفاده شود.

از پلیمر طبیعی پلی هیدروکسی بوتیرات کو هیدروکسی والرات (PHBV) به عنوان ماتریکس داربست، و از نانوذرات کامپوزیتی هیدروکسی آپاتیت/ بریدجیت (HABR) به عنوان فاز تقویت کننده و زیست فعال استفاده شد. پس از ساخت داربست، خواص ساختاری و مکانیکی آن با درصدهای مختلف نانوذره مورد ارزیابی قرار گرفت و تکثیر و چسبندگی سلول‌های استئوبلاست جنین انسانی^۸ (hFob) بر روی داربست‌های مذکور مطالعه شد.

۲- مواد و روش تحقیق

۲-۱- تولید نانوالیاف کامپوزیتی PHBV به روش الکترورسی

به منظور تولید داربست نانولیفی، محلول‌های ۸ درصد وزنی / حجمی PHBV (China company, PHBV, TianAn Enmat chemical) در حلال هگزا فلئوئورو ایزوپروپانول (۲-hexafluoro-۱,۱,۱,۳,۳,۳) (HFIP, propanol, Sigma) حاوی مقادیر مختلف نانوذرات هیدروکسی آپاتیت/ بریدجیت (HABR) (ستز شده مطابق تحقیق پیشین [۱۹]) الکترورسی شدند. بدین منظور، ابتدا مقدار مورد نظر از نانوذرات مربوطه (۵، ۱۰، ۱۵ درصد وزنی نسبت به وزن کل) در HFIP توسط آلتراسونیک دیسپرس شدند، سپس پلیمر به آن اضافه شد و محلول به مدت ۱۸ ساعت در همزن مغناطیسی در دمای محیط هم‌زده شد. هر یک از محلول‌های تهیه شده جهت الکترورسی به یک سرنگ ۳ میلی‌لیتری با سوزنی به قطر داخلی ۰/۵ میلی‌متر منتقل شدند. نانوالیاف با نرخ تغذیه یک میلی‌لیتر بر ساعت، ولتاژ ۱۴ کیلوولت و فاصله ریسندگی ۱۸ سانتی‌متر بر صفحه جمع کننده ثابت از جنس آلومینیوم تولید و جمع شدند.

۲-۲- مشخصه‌یابی داربست نانولیفی PHBV و نانوالیاف

کامپوزیتی PHBV/HABR

در این تحقیق جهت مشاهده مورفولوژی نانوالیاف و بررسی رفتار سلولی بر روی نمونه‌ها، میکروسکوپ روبشی نشر میدانی^۹ (Hitachi, Japan; S-۷۴۰۰) به کار گرفته شد. داربست نانولیفی

(ریسیده و جمع شده بر روی فویل آلومینیومی) توسط دستگاه لایه نشانی طلا با جریان ۱۰ میلی‌آمپر به مدت ۸۰ ثانیه روکش داده شدند و عکس‌هایی با بزرگ‌نمایی مناسب از نمونه‌ها گرفته شد. جهت اندازه‌گیری قطر نانوالیاف، پس از تهیه تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی از نمونه‌های مورد نظر، از هر نمونه، قطر ۱۰۰ لیف به‌طور اتفاقی توسط نرم‌افزار Image J تعیین گردید و میانگین قطری و ضریب تغییرات آن محاسبه شد. جهت مطالعه نحوه توزیع نانوذرات در نانوالیاف از میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM, Philips CM-۱۲۰) استفاده شد. نانوالیاف کامپوزیتی بر روی صفحه توری مس قرار گرفتند و تحت ولتاژ ۳۰۰ کیلوولت تصاویر مناسبی از آنها گرفته شد. آب‌دوستی داربست‌های نانولیفی تهیه شده با اندازه‌گیری زاویه تماس آنها با آب مقطر تعیین شد. داربست‌های نانولیفی الکترورسی شده بر روی لامل‌هایی با قطر ۱۵ میلی‌متر و سپس بر روی پایه نگه‌دارنده دستگاه آنالیز سطح VCA Optima (AST product, Billirica, MA) گذاشته شدند. اندازه قطره مورد استفاده برای گزارش زاویه آب‌دوستی در حدود ۱ میکرولیتر بود. برای همه نمونه‌ها از قطره شکل گرفته بر روی نانوالیاف بعد از مدت زمان یکسانی عکس گرفته شد.

۲-۳- اندازه‌گیری استحکام مکانیکی داربست نانولیفی

از آنجایی که لازم است داربست نانولیفی تهیه شده پایداری مکانیکی مناسب را برای ترمیم بافت آسیب دیده تا ترمیم کامل بافت داشته باشند، لذا، اندازه‌گیری خصوصیات مکانیکی آنها ضروری به‌نظر می‌رسید. خصوصیات مکانیکی داربست‌های نانولیفی خالص و کامپوزیتی با استفاده از دستگاه آزمایش خواص مکانیکی (Instron ۵۴۹۳, USA) با نیرویی برابر ۵۰ نیوتن و نرخ ازدیاد طولی در حدود ۱۰ میلی‌متر بر دقیقه ارزیابی شدند. داربست‌های الکترورسی شده به شکل مستطیل و با ابعادی در حدود ۱۰×۳۰ میلی‌متر مربع تهیه شدند و ضخامت آنها با استفاده از میکرومتر دیجیتالی (Mitutoyo) تعیین شد. سپس دو انتهای این داربست‌های مستطیل شکل در

فک‌های دستگاه قرار گرفت و با حرکت فک بالایی، منحنی استحکام- ازدیاد طول و اطلاعات مربوط به خواص مکانیکی هر نمونه به‌دست آمد. برای هر نمونه پنج بار آزمون تکرار شد و متوسط نتایج آزمون به‌عنوان مقدار استحکام کششی و ازدیاد طول گزارش شد. ضریب کشسانی^۱ از شیب بخش خطی اولیه منحنی استحکام- ازدیاد طول حاصل شد و متوسط پنج بار آزمون به‌عنوان نتیجه نهایی گزارش شد.

۲-۴- کشت سلول‌های (hFob)

سلول‌های hFob در محیط کشت Dulbecco's) DMEM/F-۱۲ (Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-۱۲) حاوی ۱۰ درصد سرم حاوی FBS (fetal bovine serum) و یک درصد آنتی‌بیوتیک (هر سه ماده ساخت شرکت Sigma) در یک فلاسک کشت سلول ۷۵ سانتی‌متر مربع کشت داده و در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و پنج درصد CO₂ نگه‌داشته شدند. زمانی که بیشتر از ۸۰ درصد سطح کف فلاسک با سلول‌ها پوشیده شد، با استفاده از محلول EDTA-تریپسین (ساخت شرکت Gibco Invitrogen- USA)، سلول‌ها از کف فلاسک جدا شدند و توسط هموسایتومتر مورد شمارش قرار گرفتند. به‌منظور شمارش تعداد سلول‌ها در واحد حجم سوسپانسیون سلولی، مقدار حدود ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی داخل چاهک موجود بر روی لام هموسایتومتر ریخته شد و پس از مشاهده لام در زیر میکروسکوپ، تعداد کل سلول‌های زنده موجود بر روی نواحی مشخص شده بر روی لام، شمرده شد (W). تعداد سلول‌های زنده در واحد حجم سوسپانسیون سلولی از رابطه (۱) قابل محاسبه می‌باشد:

$$(1) \times 10^4 \times \text{ضریب رقیق‌سازی} \times \frac{W}{4} = (\text{در میلی‌لیتر}) / \text{تعداد سلول‌ها}$$

برای مطالعه برهم‌کنش سلول- داربست، نانوالیاف بر روی لامل‌هایی با قطر ۱۵ میلی‌متر جمع‌آوری و تحت اشعه ماورای بنفش استریل شدند. سپس هر لامل به درون هر چاهک از پلیت ۲۴ تایی منتقل شده و توسط یک حلقه فولادی ضدزنگ ثابت نگه‌داشته شد تا لامل‌ها به‌طور کامل در تماس با سطح کف هر

چاهک باشند. سپس داربست‌ها سه مرتبه با محلول بافر فسفات^{۱۱} در زیر هود آزمایشگاهی شستشو داده شدند و به مدت یک شب در محیط کشت سلول فرو برده شدند. در ادامه به هر چاهک حدود ۱۰۰۰۰ سلول اضافه شد و برای مدت زمان‌های معینی در انکوباتور قرار داده شدند تا مورد آنالیزهای بعدی قرار گیرند. محیط کشت هر چاهک هر سه روز یکبار تعویض می‌شد.

۲-۵- تکثیر سلولی

تکثیر سلول‌های hFob بر روی داربست‌های مورد بررسی، توسط آنالیز کالریمتری MTS مطالعه شد. در آزمایش MTS نمک تترازیلیوم (۲H-tetrazolium)-(۴-sulfophenyl)-۲-۵-(۳-carboxymethoxyphenyl)-(۴,۵-dimethylthiazol-۲-yl) با سلول‌های فعال واکنش می‌دهد تا رنگ فرمازان محلول در آب بنفش رنگ را تشکیل دهد که با اندازه‌گیری جذب در طول موج ۴۹۰ نانومتر قابل تشخیص می‌باشد. برای این منظور بعد از مدت زمان ۵، ۱۰ و ۱۵ روز، داربست‌ها با PBS شسته شدند و به درون هر چاهک مقدار ۸۰۰ میکرولیتر محیط کشت بدون سرم و آنتی‌بیوتیک و ۲۰۰ میکرولیتر محلول MTS اضافه شد و پلیت‌ها به مدت سه ساعت در انکوباتور نگهداری شدند. سپس محتویات هر چاهک به شش چاهک از پلیت ۹۶ تایی منتقل شد و جذب هر چاهک توسط میکروپلیت ریدر^{۱۲} خوانده شد.

۲-۶- بررسی مورفولوژی سلولی و آنالیز طیف‌سنجی تفریق

انرژی

مورفولوژی سلول‌های hFob کشت داده شده بر روی داربست‌های مختلف بعد از ۱۵ روز از کشت سلول، توسط آنالیز میکروسکوپی الکترونی روبشی گسیل میدانی مشاهده شد. بدین منظور، ابتدا داربست‌های حامل سلول‌ها با PBS شسته شدند و سپس توسط ۳۰۰ میکرولیتر محلول سه درصد گلو تار آلدهید به مدت سه ساعت در دمای محیط تثبیت شدند. سپس هر داربست به ترتیب با ۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۵۰، ۷۵، ۹۰ و ۱۰۰ درصد حجمی/حجمی شستشو داده شد تا آب‌زدایی شود، در هر مرحله، اتانول به مدت ۱۵ دقیقه در تماس با داربست‌ها قرار گرفت. سرانجام داربست

حامل سلول‌ها با ۱۲۰ میکرولیتر هگزامتیل دیسیلازان^{۱۳} (HMDS) ساخت شرکت Sigma) عمل شده و در طول شب در هوا خشک شده و در نهایت سطح داربست توسط میکروسکوپی الکترونی روبشی مشاهده شد. آنالیز طیف‌سنجی تفریق انرژی نیز بر سطح داربست- سلول انجام شد.

۲-۷- بیان رنگ CMFDA

بیان رنگ فلورسنت در سلول‌های hFob کشت داده شده با استفاده از ترکیب CMFDA (5-chloromethylfluorescein diacetate) مشاهده شد که در اثر شکستن گروه‌های استات موجود در آن توسط استراز سیتوزولی، یکی از مشتقات فلورسنت CMFDA را تولید می‌کند. بعد از ۱۵ روز کشت سلول محیط کشت از هر چاهک خارج شد و به جای آن ۱۸۰ میکرولیتر محیط DMEM و ۲۰ میکرومتر CMFDA (۲۰ میکرومول) اضافه شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت در انکوباتور قرار گرفت. سپس محیط CMFDA با محیط کشت کامل جایگزین شد و سلول‌ها در انکوباتور CO₂ به مدت یک شب قرار گرفتند. در ادامه محیط کشت خارج شد و سلول‌ها دو مرتبه با PBS شسته شدند و بعد از افزودن محیط کشت بدون سرم، در زیر میکروسکوپ روبشی لیزری (Leica DC۳۰۰ F) در طول موج ۴۸۸ نانومتر مشاهده شدند.

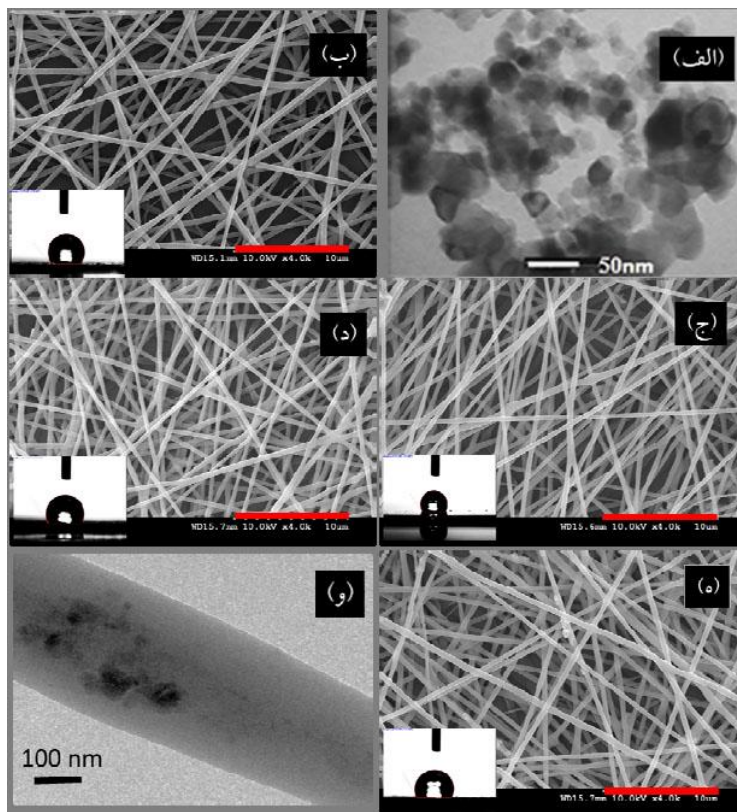
۲-۸- تجزیه و تحلیل آماری

جهت بررسی معنی‌دار بودن میانگین گروه‌ها از آنالیز واریانس میانگین‌های یک طرفه ANOVA به همراه آنالیز واریانس Tukey استفاده شد. مقدار $p \leq 0.05$ برای معنی‌دار بودن آماری لحاظ شد.

۳- تجزیه و تحلیل داده‌ها

۳-۱- مطالعه مورفولوژی نانوالیاف

تصویر میکروسکوپی الکترونی عبوری نانوذرات هیدروکسی آپاتیت/ بریدجیت در شکل (۱-الف) نشان داده شده است. به دلیل سطح ویژه بسیار زیاد نانوذرات، احتمال آگلومره شدن



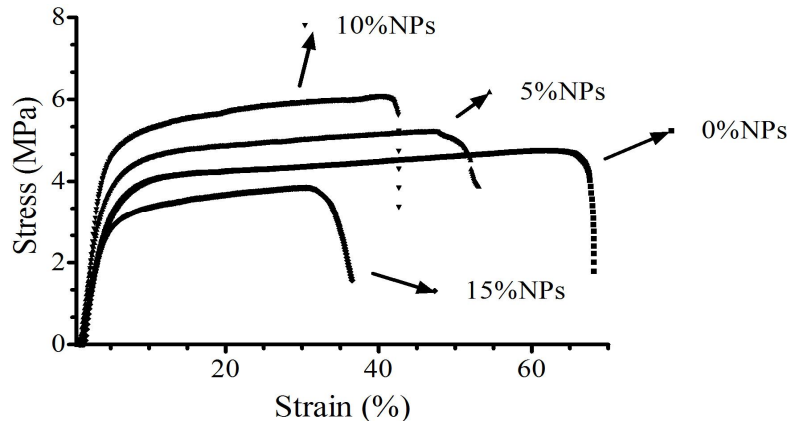
شکل ۱- الف) تصویر میکروسکوپی الکترونی عبوری نانوذرات هیدروکسی آپاتیت/ بریدجیت، ب) تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی داربست نانولیفی PHBV حاوی مقادیر مختلف نانوذره HBR همراه با تصاویر قرارگیری قطره آب بر سطح نمونه‌ها صفر درصد، ج) پنج درصد، د) ۱۰ درصد، و) ۱۵ درصد (مقیاس خطی نشان‌دهنده ۱۰ میکرومتر است) و ه) توزیع نانوذرات در نانولیف PHBV حاوی ۱۰ درصد نانوذره HBR

جدول ۱- مشخصه‌یابی داربست نانولیفی الکترونی شده: قطر الیاف، خواص مکانیکی، زاویه تماس آب داربست

زاویه تماس آب (درجه)	ازدیاد طول در پارگی (درصد)	ضریب کشسانی (مگاپاسگال)	استحکام نهایی (مگاپاسگال)	میانگین قطر الیاف (نانومتر)	
۱۲۹	۶۴/۶۱	۱۰۶/۷	۴/۴۱۷	۳۵۹±۵۰	PHBV
۱۲۱/۶	۴۶/۹۸	۱۴۷/۳	۵/۳۴۲	۳۹۳±۱۴	PHBV-5NPs
۱۱۹/۱	۳۹/۸۳	۱۵۸/۶	۶/۳۰۷	۳۸۷±۴۱	PHBV-10NPs
۱۱۵/۶	۳۴/۴۷	۹۵/۱۸	۳/۸۷۹	۴۱۲±۴۲	PHBV-15NPs

نانوالیاف در جدول (۱) آورده شده است. همان‌طور که تصاویر نشان می‌دهد، در همه فرمولاسیون‌ها، نانوالیاف بدون عیوب ساختاری و با قطر یکنواخت تولید شده است اما در درصدهای بالاتر نشانه‌هایی از آگلومره شدن و تجمع نانوذرات در طول الیاف دیده می‌شود. نتایج اندازه‌گیری قطر نشان می‌دهد که

ذرات نانو بسیار زیاد است. همان‌طور که در شکل دیده می‌شود، ذرات تا حدی آگلومره شده ولی با این وجود، اندازه ذرات کمتر از ۵۰ نانومتر می‌باشد. شکل (۱-ب تا ۱-و) تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی داربست نانولیفی PHBV حاوی درصدهای مختلف نانوذره را نشان می‌دهد. میانگین قطری



شکل ۲- نمودار تنش - کرنش نمونه داربست‌های نانولیفی حاوی مقادیر مختلف نانوذره HBR (NPs)

قبلی [۲۰]، زاویه تماس آب بالایی را نشان می‌دهد اما حضور نانوذرات هیدروکسی آپاتیت/ بریدیجیت به دلیل دارا بودن خاصیت آبدوستی باعث کاهش زاویه تماس آب می‌شوند. از آنجایی که بیوسرامیک‌های سیلیکاتی در محیط‌های فیزیولوژیک هیدرولیز می‌گردند، حضور آنها باعث افزایش جذب آب می‌شود. همچنین در تحقیقی که توسط اریکسون و همکاران بر روی داربست پلی کاپرولاکتون حاوی تری کلسیم فسفات انجام گرفت، آنها دلیل کاهش زاویه تماس آب را تغییر زبری سطح نانوالیاف در حضور نانوذرات عنوان کردند [۲۸]. آنها گزارش کردند پلیمرهای زیست تخریب‌پذیری که آب‌دوستی کمتری دارند نرخ تکثیر و چسبندگی سلولی کمتری نشان می‌دهند. با بهبود قابلیت ترشوندگی، زیست سازگاری داربست نیز بهبود می‌یابد [۲۸].

۳-۲- بررسی خواص مکانیکی داربست‌های نانولیفی حاوی مقادیر مختلف نانو ذره

میزان موفقیت یک داربست مهندسی بافت مخصوصاً بافت استخوانی در ترکیب خواص مکانیکی و ساختاری آن می‌باشد. یک داربست مناسب باید استحکام مکانیکی و ساختاری را حفظ کند و یک محیط رشد بهینه برای تشکیل استخوان در طی مراحل ابتدایی پروسه ترمیم فراهم آورد [۱]. شکل (۲) نمودار تنش - کرنش داربست نانولیفی PHBV حاوی درصد‌های

میانگین قطر نانوالیاف با افزایش درصد نانوذره تا ۱۵ درصد روند افزایشی داشته است این افزایش قطر را می‌توان به افزایش ویسکوزیته برشی محلول پلیمری در نتیجه افزودن ذرات سخت‌سرامیکی نسبت داد [۲۶]. حضور نانوذرات هیدروکسی آپاتیت/ بریدیجیت در بستر نانوالیاف PHBV توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری تأیید شد. چنانچه از شکل (۱-ه) مشخص است، نانوذرات در بستر نانوالیاف کامپوزیتی به‌خوبی توزیع شده‌اند.

آب‌دوستی تارهای نانولیفی در چسبندگی سلول‌ها به سطح آن بسیار مؤثر و در ترمیم بافت آسیب دیده بسیار حائز اهمیت است. قابلیت تر شدن و میزان آبدوستی تارهای نانولیفی در مهندسی بافت، در ایجاد یک کشت سلولی مناسب و یکنواخت در سه بعد مؤثر است. در این تحقیق، قابلیت ترشوندگی داربست نانولیفی تحت عنوان زاویه تماس آب اندازه‌گیری شد. تصاویر قطره آب قرار گرفته بر روی داربست‌های نانولیفی در آزمایش تعیین زاویه تماس آب، در شکل (۱) نشان داده شده و مقادیر زاویه تماس اندازه‌گیری شده در جدول (۱) گزارش شده است. طبق نتایج به‌دست آمده، زاویه تماس آب بر روی داربست نانولیفی با افزودن و افزایش مقدار نانوذرات به نانوالیاف PHBV کاهش یافت که نشان‌دهنده افزایش قابلیت ترشوندگی داربست نانولیفی می‌باشد. پلیمر PHBV ذاتاً آبگریز می‌باشد و طبق نتایج ما و گزارشات

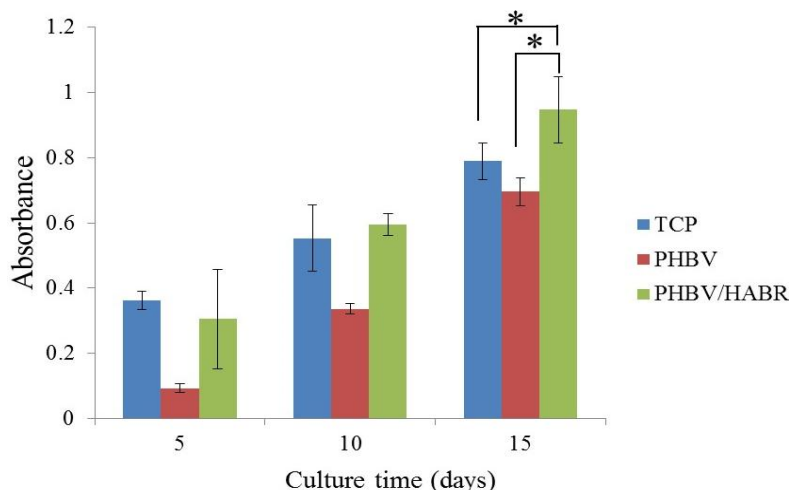
مختلف نانوذره را نشان می‌دهد. خواص مکانیکی این داربست‌ها در جدول (۱) خلاصه شده است. نمودار تنش- کرنش داربست خالص و کامپوزیتی PHBV روند یکسانی را نشان می‌دهد به گونه‌ای که در ابتدا از قانون هوک پیروی می‌کند و در ادامه با انتقال از منطقه الاستیک به منطقه پلاستیک همراه است. با افزایش غلظت نانوذره، نمودارها مقادیر استحکام و ازدیاد طول متفاوتی را نشان می‌دهند. همان‌طور که مشخص است حضور نانوذرات HABR تا ۱۰ درصد وزنی، استحکام نهایی و ضریب یانگ داربست را به ترتیب به میزان ۴۵ درصد و ۵۰ درصد افزایش داد. این بهبود استحکام مکانیکی توسط محققان دیگر نیز گزارش شده است و به برهم‌کنش مطلوب زمینه پلیمری و نانوذرات بیوسرامیکی که به‌عنوان پرکننده و به‌صورت همگن توزیع شده‌اند نسبت داده می‌شود و باعث انتقال نیروی مؤثر می‌گردد [۲۹ و ۳۰]. نتایج همچنین نشان داد که داربست نانولیفی PHBV حاوی نانوذره، ازدیاد طول تا حد پارگی کاهش یافته‌ای (۳۴ درصد) نسبت به داربست نانولیفی خالص PHBV (۶۴ درصد) دارند. در نتیجه حضور نانوذرات باعث شکننده‌تر شدن ساختار و افزایش مقاومت به تغییر شکل داربست نانولیفی می‌شود. کاهش استحکام داربست نانولیفی با افزایش درصد نانوذره از ۱۰ تا ۱۵ درصد می‌تواند به دلایل زیر باشد: با افزایش درصد نانوذره، نیروهای جاذبه بین مولکولی بین ذرات نانو افزایش یافته و ذرات تمایل به آگلومره شدن و تجمع دارند، تجمع نانوذرات نیز باعث کاهش استحکام داربست نانولیفی کامپوزیتی می‌گردد. کازا و همکاران نتایج مشابهی به دست آوردند [۳۱]، آنها مشاهده کردند که با افزودن نانوذرات هیدروکسی آپاتیت (HA) به ماتریس پلیمری پلی کاپرولاکتون (PCL)، استحکام مکانیکی داربست به میزان معنی داری (تا سه برابر) افزایش یافت. از دید ساختاری، مکانیسم استحکام‌دهی HA در نمونه‌های PCL به دلیل خاصیت مکانیکی نسبتاً سخت HA می‌باشد (زیرا HA ضریب الاستیک و تنش نهایی بالایی دارد) و این افزایش استحکام تا افزایش ۲۰ درصد حجمی HA ادامه داشت و بعد از آن خواص مکانیکی

کامپوزیت به دلیل توزیع ناهمگن نانوذرات HA کاهش یافت. خوزه و همکاران نیز در تحقیقی نشان دادند که یک حد آستانه‌ای برای درصد نانوذره در پلیمر وجود دارد تا خواص مکانیکی آن بهینه گردد و مقدار بیشتر از حد آستانه نه تنها پلیمر را تقویت نمی‌کند بلکه به‌عنوان عیب عمل کرده است و خواص مکانیکی را کاهش می‌دهد. آنها دلیل آن را آگلومره شدن ذرات نانو در درصد‌های بالا دانستند که مانع از برهم‌کنش مناسب پلیمر- ذره می‌شود و در نتیجه انتقال نیرو در نانوالیاف کامپوزیتی به خوبی صورت نمی‌گیرد [۳۲].

در ادامه، به دلیل خواص مکانیکی برتر داربست نانولیفی PHBV حاوی ۱۰ درصد نانوذره، این داربست برای آزمایش‌های کشت سلولی انتخاب شد.

۳-۳- برهم‌کنش سلول با داربست

اتصال، چسبندگی و گسترش سلولی که در مراحل اولیه برهم‌کنش ماده و سلول اتفاق می‌افتد، بر توانایی تکثیر سلول‌ها تأثیر می‌گذارد که در درجه اول به خواص فیزیکی و شیمیایی ترکیب داربست بستگی دارد [۳۲]. قابلیت تکثیر سلول‌های استئوبلاست بر روی داربست‌های PHBV و PHBV/HABR با آنالیز MTS تعیین شد. نتایج آنالیز MTS نشان داده شده در شکل (۳) مشخص کرد که با گذشت زمان کشت، سلول‌ها بر همه زیرلایه رشد داشته‌اند اما سرعت رشد آنها متفاوت بود. بعد از پنج روز کشت سلول، تعداد سلول‌های تکثیر شده بر روی نمونه کنترل بیشتر از تعداد سلول‌ها بر روی داربست PHBV می‌باشد. این اختلاف به دلیل طبیعت آبگریز نانوالیاف PHBV می‌باشد. نتایج مشابهی توسط رامیر و همکاران در ارزیابی نانوالیاف پلی هیدروکسی بوتیرات حاوی هیدروکسی آپاتیت به دست آمد. آنها عنوان کردند که ترکیب مناسبی از خاصیت آبدوستی- آبگریزی به همراه خواص سطحی بیوماده، فاکتورهای اساسی در چسبندگی و تکثیر سلولی می‌باشند [۳۳]. همان‌طور که در شکل (۳) نشان داده شده است بعد از ۱۰ و ۱۵ روز کشت سلول، سلول‌ها بر روی داربست PHBV حاوی



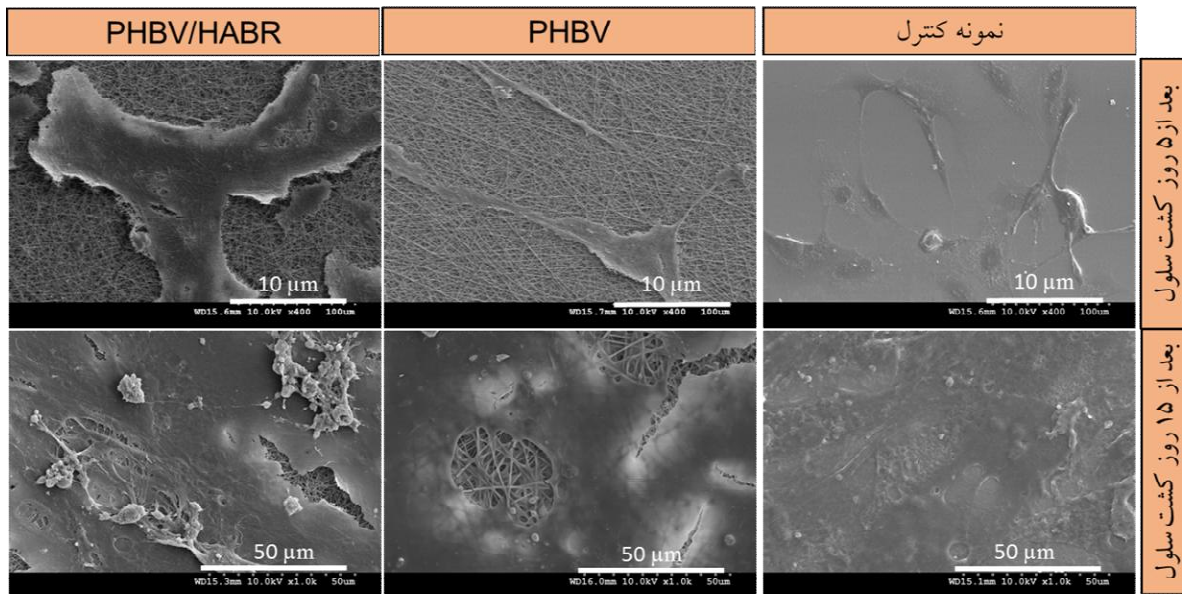
شکل ۳- مقایسه تکثیر سلول‌های استئوبلاست بر روی داربست نانولیفی PHBV و داربست نانولیفی PHBV حاوی ۱۰ درصد نانوذره (*: اختلاف از نظر آماری معنی‌دار)

ساختار فیبریلی ECM (ساختارهای متشکل از تارهای بسیار نازک به ابعاد نانومتری گفته می‌شود و این اصطلاح برای توصیف ساختار سلول‌ها به کار می‌رود) سلولی پوشانده شده است که نشان‌دهنده کانفلوئسنی رشد سلول‌های hFob می‌باشد.

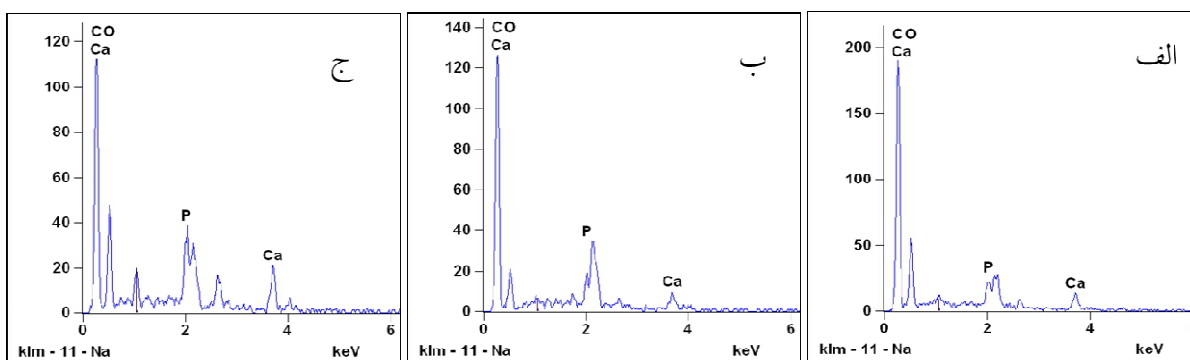
نتایج میکروسکوپی الکترونی روبشی همچنین نشان داد که مینراله شدن بر روی داربست حاوی نانوذره بیشتر از داربست PHBV خالص و نمونه کنترل است. رسوبات مینراله مورفولوژی متخلخل آپاتیت مانند واضحی را که حاوی تجمعات کروی شکل است نشان دادند (شکل ۴)، که این تجمعات همراه با ساختارهای فیبریلی کلاژن می‌باشد. سلول‌های استئوبلاست با تولید استئوید (اساساً از کلاژن نوع یک تشکیل شده است) و در ادامه آن تشکیل رسوبات مینراله توسط استئویدهای تولید شده، مسئول اصلی تشکیل بافت استخوان هستند [۳۵]. رسوبات مینراله تشکیل شده بر روی داربست‌ها، به وسیله آزمون طیف‌سنجی تفریق انرژی نیز تأیید شد. میزان عناصر P و Ca بر روی سطح سلول‌های رشد داده شده روی داربست‌های الکترونیسی شده، اندازه گرفته شد. شکل (۵) نتایج آزمون طیف‌سنجی تفریق انرژی را بعد از ۱۵ روز کشت سلول بر روی داربست‌های مختلف نشان می‌دهد. پیک‌های Ca و P در مناطقی که مینرال‌ها بر روی سلول‌ها رشد

نانوذرات HABR به‌طور معنی‌داری بیشتر از نمونه کنترل و داربست خالص PHBV رشد داشته‌اند. گزارش شده است که نانوذرات HA چسبندگی اولیه سلول‌ها را بهبود می‌بخشند، همچنین نتایج تحقیقات وو و همکاران نشان داد که محصولات یونی حاصل از انحلال بریدجیت می‌تواند تکثیر سلولی را افزایش دهند. ره‌ایش سیلیکون نقش بسیار مهمی در استخوان‌سازی ایفا می‌کند بعلاوه سالیسیلیک اسید (حاصل از انحلال بریدجیت) قادر به افزایش تولید کلاژن نوع یک می‌باشد و در اثر ره‌ایش سالیسیلیک اسید در محیط، توانایی زنده ماندن و تکثیر استئوبلاست افزایش می‌یابد [۳۴].

قابل ذکر است که تکنیک‌های برون‌تنی برای ارزیابی جنبه‌های مختلفی از برهم‌کنش سلول-بیوماده مناسب می‌باشند. چسبندگی، مورفولوژی سلولی و قابلیت تشکیل مینرال بر روی سلول‌های hFob توسط آنالیز میکروسکوپی الکترونی روبشی بررسی شد. شکل (۴) تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی مربوط به برهم‌کنش سلول-بیوماده را بعد از پنج و ۱۵ روز کشت سلول نشان می‌دهد. سلول‌ها بر روی داربست نانولیفی حاوی نانوذره به‌خوبی با یکدیگر و به ساختار نانولیفی اتصال برقرار کرده‌اند و به‌نظر می‌رسد که سطح داربست نانولیفی کامپوزیتی بعد از ۱۵ روز کشت سلول، به‌طور کامل با چندین لایه از سلول و همچنین



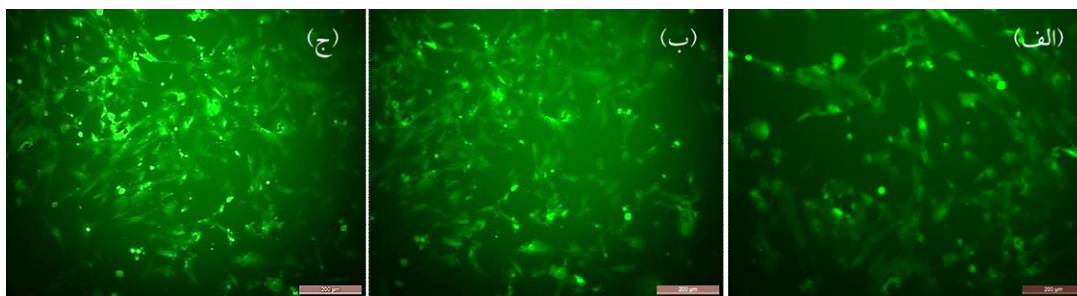
شکل ۴- تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی مربوط به برهم کنش داربست- سلول بر روی داربست نانولیفی PHBV خالص و PHBV حاوی نانوذره HABR و نمونه کنترل بعد از پنج و ۱۵ روز کشت



شکل ۵- الف) نتایج طیفسنجی تفریق انرژی مربوط به مینراله شدن سلول‌های hFob بعد از ۱۵ روز کشت بر روی نمونه‌های کنترل، ب) PHBV و ج) PHBV/HABR

پوشی مشاهده شدند. ترکیب CMFDA متعلق به دسته‌ای از مشتقات کلرومتیل می‌باشد که برای رنگ‌آمیزی سلول‌های زنده در محیط آزمایشگاه ساخته شده است [۳۷]. افزودن CMFDA به محیط کشت سلول باعث می‌شود که ترکیب به راحتی در غشای سلول نفوذ کند و در اثر فعالیت استراز سیتوزولی به یک ترکیب فلورسنت تبدیل شود. شکل (۶) نشان می‌دهد که مورفولوژی سلول بر روی داربست‌های نانولیفی تقریباً مشابه می‌باشد در صورتی که سلول‌ها بر روی داربست نانولیفی

کرده‌اند مشاهده می‌شود. همان‌طور که میدانیم Ca و فسفات به‌عنوان عامل جوانه زدن تشکیل HA می‌باشد و همان‌طور که از نتایج مشخص است ارتفاع پیک‌های این دو عنصر بر روی داربست کامپوزیتی PHBV بیشتر از نمونه کنترل و PHBV خالص می‌باشد که نشان‌دهنده میزان بیشتر مینرال‌های تشکیل شده در اثر حضور نانوذرات HABR می‌باشد [۳۶]. مینرال‌های تشکیل شده و مورفولوژی سلول‌های زنده hFob با به‌کارگیری رنگ فلورسنت CMFDA و میکروسکوپ لیزر



شکل ۶- الف) تصاویر میکروسکوپی فلورسنت سلول‌های زنده بر روی نمونه‌ها- نمونه کنترل، (ب) داربست نانولیفی بدون نانوذره و (ج) حاوی نانوذره (مقیاس خطی نشان‌دهنده ۲۰۰ میکرومتر است)

مقدار نانوذره بر قطر نانوالیاف، قابلیت ترشوندگی و خواص مکانیکی داربست مورد مطالعه قرار گرفت. تکثیر، زیستایی و قابلیت مینراله شدن سلول‌های استئوبلاست با کشت سلول‌های رده hFob بر روی داربست نانولیفی PHBV و داربست نانولیفی کامپوزیتی PHBV/HABR حاوی ۱۰ درصد نانوذره مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد که حضور نانوذرات هیدروکسی آپاتیت/ بریدیجیت نه تنها خواص مکانیکی داربست نانولیفی PHBV را بهبود می‌بخشد بلکه با افزایش آبدوستی و خاصیت زیست سازگاری، باعث افزایش نرخ تکثیر و قابلیت مینراله شدن سلول‌های استئوبلاست بر روی نانوالیاف PHBV می‌گردد. در نتیجه داربست نانولیفی پلی هیدروکسی بوتیرات کووالرات حاوی نانو ذرات هیدروکسی آپاتیت/ بریدیجیت پتانسیل بالقوه برای کاربردهای بازسازی استخوان دارد.

کامپوزیتی کلونی‌های بیشتر و در نتیجه میزان مینرال‌های بیشتری نسبت به نمونه کنترل تشکیل داده‌اند. به‌علاوه تعداد سلول‌های زنده بر روی داربست کامپوزیتی بیشتر از تعداد سلول‌ها بر روی داربست بدون نانوذره و نمونه کنترل می‌باشد. دلیل آن، ترکیب سه‌تایی CaO-SiO₂-Mg مربوط به سرامیک بریدیجیت می‌باشد. یک مشخصه قابل توجه بیومواد سیلیکاتی، توانایی آنها در رهائش یون‌های سیلیکون با غلظتی می‌باشد که رشد و تمایز استئوبلاست را بهبود ببخشد. به‌علاوه نشان داده شده است که منیزیم نقش کلیدی در معدنی شدن بافت کلسینه شده دارد [۱۷، ۳۷ و ۳۸].

۴- نتیجه‌گیری

در این تحقیق، نانوالیاف PHBV حاوی نانوذرات هیدروکسی آپاتیت/ بریدیجیت HABR به روش الکتروریسی و به‌منظور مطالعه جهت کاربرد مهندسی بافت استخوان تولید شدند. تأثیر

واژه‌نامه

1. extracellular matrix (ECM)
2. polyhydroxyalkanoates
3. osteoblast
4. biomineralization
5. In vitro
6. In vivo
7. bredigite
8. human fetal osteoblast
9. field emission scanning electron microscopy (FESEM)
10. Young's modulus
11. phosphate buffered saline (PBS)
12. microplate reader
13. hexamethyldisilazane

مراجع

1. Puppi, D., Chiellini, F., Piras, A. M., and Chiellini, E., "Polymeric Materials for Bone and Cartilage Repair", *Progress in Polymer Science*, Vol. 35, pp. 403-440, 2010.
2. Zhang, Z., Hu, J., and Ma, P. X., "Nanofiber-Based Delivery of Bioactive Agents and Stem Cells to Bone Sites", *Advanced Drug Delivery Review*, Vol. 65, pp. 1129-1141, 2012.
3. Abdal-hay, A., Tijing, L. D., and Lim, J. K., "Characterization of the Surface Biocompatibility of an Electrospun Nylon 6/CaP Nanofiber Scaffold using Osteoblasts", *Chemical Engineering Journal*, Vol. 215-216, pp. 57-64, 2013.
4. Holzwarth, J. M., and Ma, P. X., "Biomimetic Nanofibrous Scaffolds for Bone Tissue Engineering", *Biomaterials*, Vol. 32, No. 36, pp. 9622-9629, 2011.
5. Tian, H., Tang, Z., Zhuang, X., Chen, X., and Jing, X., "Biodegradable Synthetic Polymers: Preparation, Functionalization and Biomedical Application", *Progress in Polymer Science*, Vol. 37, No. 2, pp. 237-280, 2012.
6. Rezwani, K., Chen, Q. Z., Blaker, J. J., and Boccaccini, A. R., "Biodegradable and Bioactive Porous Polymer/Inorganic Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering", *Biomaterials*, Vol. 24, pp. 3413-3431, 2006.
7. Chena, G. Q., and Wu, Q., "The Application of Polyhydroxyalkanoates as Tissue Engineering Materials", *Biomaterials*, Vol. 26, pp. 6565-6657, 2005.
8. Kouhi, M., Morshed, M., Varshosaz, J., and Fathi, M. H., "Poly (ε-caprolactone) Incorporated Bioactive Glass Nanoparticles and Simvastatin Nanocomposite Nanofibers: Preparation, Characterization and In Vitro Drug Release for Bone Regeneration Applications", *Chemical Engineering Journal*, Vol. 228, pp. 1057-1065, 2013.
9. Webster, T. J., Siegel, R. W., and Bizios, R., "Osteoblast Adhesion on Nanophase Ceramics", *Biomaterials*, Vol. 20, No. 13, pp. 1221-1227, 1999.
10. Hench, L. L., and Polak, J. M. "Third-Generation Biomedical Materials", *Science*, Vol. 295, pp. 1014-1017, 2012.
11. Hench, L. L., "Bioceramics: from Concept to Clinic", *Journal of American Ceramic Society*, Vol. 74, pp. 1485-1510, 1991.
12. Suchanek, W., and Yoshimura, M., "Processing and Properties of Hydroxyapatite-Based Biomaterials for Use as Hard Tissue Replacement Implants", *Journal of Materials Research*, Vol. 13, pp. 94-117, 1998.
13. Taherian, M., Rojaee, R., Fathi, M., and Tamizifar, M., "Effect of Different Sol-Gel Synthesis Processes on Microstructural and Morphological Characteristics of Hydroxyapatite-Bioactive Glass Composite Nanopowders", *Journal of Advanced Ceramic*, Vol. 3, No. 3, pp. 207-214, 2014.
14. Lin, K., Chang, J., Liu, X., and Ning, C. "Synthesis and Characterization of Nanocomposite Powders Composed of Hydroxyapatite Nanoparticles and Wollastonite Nanowires", *International Journal of Applied Ceramic Technology*, Vol. 7, pp. 178-183, 2010.
15. Ohtsuki, C., Kokubo, T., and Yamamuro, T., "Mechanism of Apatite Formation on CaO-SiO₂-P₂O₅ Glasses in a Simulated Body Fluid", *Journal of Non-Crystal Solids*, Vol. 143, pp. 84-92, 1992.
16. Valerio, P., Pereira, M. M., Goes, A. M., and Leite, M. F., "The Effect of Ionic Products from Bioactive Glass Dissolution on Osteoblast Proliferation and Collagen Production", *Biomaterials*, Vol. 25, pp. 2941-2948, 2004.
17. Wu, C., Chang, J., Zhai, W., and Ni, S., "A Novel Bioactive Porous Bredigite (Ca₇MgSi₄O₁₆) Scaffold with Biomimetic Apatite Layer for Bone Tissue Engineering", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Vol. 18, No. 5, pp. 857-864, 2007.
18. Wu, C., and Chang, J. "Degradation, Bioactivity, and Cytocompatibility of Diopside, Akermanite, and Bredigite Ceramics", *Journal of Biomedical Materials Research B*, Vol. 83B, No.1, pp. 153-160, 2007.
19. Kouhi, M., Shamanian, M., Fathi, M., Samadikuchaksaraei, A., and Mehdipour, A., "Synthesis, Characterization, In Vitro Bioactivity and Biocompatibility Evaluation of Hydroxyapatite/Bredigite (Ca₇ MgSi₄ O₁₆) Composite Nanoparticles", *JOM*, Vol. 68, 1061-1070, 2016
20. Zhang, S., Prabhakaran, M. P., Qin, X., and Ramakrishna, S., "Poly 3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate Containing Scaffolds and Their Integration with Osteoblast as a Model for Bone Tissue Engineering", *Journal of Biomaterials Applications*, Vol. 10, pp. 1394-1406, 2015.
21. Zhang, S., Prabhakaran, M. P., Qin, X., and Ramakrishna, S., "Biocomposite Scaffold for Bone Regeneration: Role of Chitosan and Hydroxyapatite within Poly 3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate on Mechanical Properties and In Vitro Evaluation", *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, Vol. 51, pp. 88-98, 2015.
22. Pascu, E., Stokes, J., and McGuinness, G. B., "Electrospun Composites of PHBV, Silk Fibroin and Nano-Hydroxyapatite for Bone Tissue Engineering", *Materials Science and Engineering C*, Vol. 33, pp. 4905-4916, 2013.
23. LU, L. X., Wang, Y. Y., Mao, X., Xiao, Z. D., and Huang, N. P., "The Effects of PHBV Electrospun Fibers with Different Diameters and Orientations on Growth Behavior of Bone Marrowderived Mesenchymal Stem Cells", *Journal of Biomedical Materials*, Vol. 7, pp. 1-10, 2012.
24. Zhang, N., Xiao, Q. R., Man, X. Y., Liu, H. X., LU,

- L. X., and Huang, N. P., "Spontaneous Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells on Electrospun Nanofibrous Scaffolds", *ARC Advances*, Vol. 6, pp. 22144-22152, 2016.
25. Sajesh, K. M., Kiran, K., Nair, S. V., and Jayakumar, R., "Sequential Layer-by-Layer Electrospinning of Nano SrCO₃/PRP loaded PHBV Fibrous Scaffold For Bone Tissue Engineering", *Composites Part B*, Vol. 99, pp. 445-452, 2016.
 26. Wutticharoenmongkol, P., Sanchavanakit, N., Pavasant, P., and Supaphol, P., "Preparation and Characterization of Novel Bone Scaffolds Based on Electrospun Polycaprolactone Fibers Filled with Nanoparticles", *Macromolecular Bioscience*, Vol. 6, pp. 70-77, 2006.
 27. Erisken, C., Kalyon, D. M., and Wang, H., "Functionally Graded Electrospun Polycaprolactone and B-Tricalcium Phosphate Nanocomposites for Tissue Engineering Applications", *Biomaterials*, Vol. 29, pp. 4065-4073, 2008.
 28. Sultana, N., and Wang, M., "PHBV/PLLA-Based Composite Scaffolds Fabricated using an Emulsion Freezing/Freeze-Drying Technique for Bone Tissue Engineering: Surface Modification and In Vitro Biological Evaluation", *Biofabrication*, Vol. 4, pp. 1317-1324, 2012.
 29. Lee, E. J., Teng, S. H., Jang, T. S., Wang, P., Yook, S. W., and Kim, H. E., "Nanostructured Poly(ϵ -caprolactone)-Silica Xerogel Fibrous Membrane for Guided Bone Regeneration", *Acta Biomaterialia*, Vol. 6, pp. 3557-3565, 2010.
 30. Han, L., Han, C., Cao, W., Wang, X., Bian, J., and Dong, L., "Preparation and Characterization of Biodegradable Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate)/ Silica Nanocomposites", *Polymer Engineering Science*, Vol. 52, No. 2, pp. 250-258, 2012.
 31. Causa, F., Netti, P. A., Ambrosio, L., Ciapetti, G., Baldini, N., Pagani, S., Martini, D., and Giunti, A., "Poly- ϵ -caprolactone/Hydroxyapatite Composites for Bone Regeneration: In Vitro Characterization and Human Osteoblast Response", *Journal of Biomedical Materials Research*, Vol. 76A, pp. 151-162, 2006.
 32. Jose, M. V., Thomas, V., Johnson, K. T., Dean, D. R., and Nyairo, E., "Aligned PLGA/HA Nanofibrous Nanocomposite Scaffolds for Bone Tissue Engineering", *Acta Biomaterialia*, Vol. 5, pp. 305-315, 2009.
 33. Ramier, J., Boudierlique, T., Ne, O., Renard, E., Albanese, P., and Grande, D., "Biocomposite Scaffolds Based on Electrospun Poly(3-hydroxybutyrate) Nanofibers and Electrospayed Hydroxyapatite Nanoparticles for Bone Tissue Engineering Applications", *Materials Science and Engineering*, Vol. 1, No. 38, pp. 161-169, 2014.
 34. Porter, A. E., Buckland, T., Hing, K., Best, S. M., and Bonfield, W., "The Structure of the Bond Between Bone and Porous Silicon-Substituted Hydroxyapatite Bioceramic Implants", *Journal of Biomedical Materials Research*, Vol. 78A, pp. 25-33, 2006.
 35. Zhang, Y., Venugopal, J. R., El-Turki, A., Ramakrishna, S., Su, B., and Lim, C. T., "Electrospun Biomimetic Nanocomposite Nanofibers of Hydroxyapatite/Chitosan for Bone Tissue Engineering", *Biomaterials*, Vol. 29, No. 32, pp. 4314-4322, 2008.
 36. Prabhakaran, M. P., Venugopal, J., and Ramakrishna, S., "Electrospun Nanostructured Scaffolds for Bone Tissue Engineering", *Acta Biomaterialia*, Vol. 5, No. 8, pp. 2884-2893, 2009.
 37. Wu, C., Wang, J., Ni, S., and Zhai, W., "Preparation and Characteristics of a Calcium Magnesium Silicate (Bredigite) Bioactive Ceramic", *Biomaterials*, Vol. 26, No. 16, pp. 2925-2931, 2006.
 38. Soulie, J., Nedelec, J. M., and Jallot, E., "Influence of Mg Doping on the Early Steps of Physico-Chemical Reactivity of Sol-Gel derived Bioactive Glasses in Biological Medium", *Physical Chemistry Chemical Physics*, Vol. 11, No. 44, pp. 1043-1048, 2009.