

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

منیره کوهی '*، مرتضی شمعانیان'، محمد حسین فتحی'، ملاما پرابهاکران' و سیرام راماکریشنا' ۱. گروه بیومواد، دانشکده مهندسی مواد، دانشگاه صنعتی اصفهان ۲. مرکز نانوالیاف و نانوتکنوژی، دانشکده مهندسی مکانیک، دانشگاه ملی سنگایور، سنگایور

(دريافت مقاله: ١٣٩٥/٥٥/١٢ - دريافت نسخه نهايي: ١٣٩٥/٥٧/١٠)

چكیده- در این تحقیق، داربست نانولیفی كامپوزیتی پلی هیدروكسی بوتیرات كوهیدروكسی والـرات (PHBV) حـاوی نـانوذرات كـامپوزیتی هیدروكسی آپاتیت/بریدیجیت (HABR) به روش الكتروریسی تولید شد. مورفولوژی نانوالیاف تولید شده و نحـوه توزیـع نـانوذرات در نانوالیـاف به ترتیب توسط میكروسكوپ الكترونی روبشی و عبوری بررسی شدند. ارزیابی خواص مكانیكی نشان داد كه یـك حـد آسـتانهای بـرای غلظـت نانوذرات وجود دارد كه در آن، حضور نانوذرات باعث بهبود خواص مكانیكی داربست نانولیفی شد. داربست كامپوزیتی HBV خاصیت ترشوندگی بهتری در مقایسه با PHBV خالص از خود نشان داد. در آزمون كشت سلول برون تنی، سلولهای استؤبلاست كامپوزیتی HBV خاصیت ترشوندگی كشت داده شدند.ارزیابی تكثیر سلولی بهروش MTS نشان داد كه بعد از ۱۰ و ۱۵ روز، سلولهای استؤبلاست کـامپوزیتی PHBV/HABR بـمطـور معنیداری بیشتر از داربست خالص PHBV/HABR رشد داشتهاند. بهعلاوه نتایج آنالیز ارزیابی میكروسكوپی الكترونی روبشی – طیفسنجی تفریق انرژی و رنگ آمیزی سلولی نشان دادند كه سلولهی کشت داده میده بعد از ۱۰ و ۱۵ روز، سلولها بـر داربسـت كـمپوزیتی PHBV/HABR بـمطـور و رنگ آمیزی سلولی نشان دادند كه سلولهی كشت داده میده بعد از ۱۰ و ۱۵ روز، سلولها بـر داربسـت كـمپوزیتی PHBV رون و رنگ آمیزی سلولی نشان دادند كه سلولهای کشت داده شده برروی داربست كـمپوزیتی و و مونی و نرژی كلیزی سلولی نشان دادند كه سلولهای كشت داده شده برروی داربست كـمپوزیتی و ایکترونی روبشی- طیفسنجی تفریق انرژی كنترل، رسوبات مینراله تشكیل دادند. نتایج این مطالعه نشان داد كه نانوالیاف كامپوزیتی PHBV/HABR با خواص مكانیكی، ترشـوندگی و رفتار

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

 Biomaterials Research Group, Department of Materials Engineering, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.
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 electrospining method. The morphology of prepared

* : مسئول مكاتبات، پست الكترونيكي: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 (hydroxybutirate co hydroxyvalerate), Hydroxyapatite, Bredigite, Bone regeneration.

فاز غیرآلی بهدلیل دارا بـودن خـواص مکـانیکی و بیولـوژیکی مطلوب، بهعنوان داربست بسیار مورد توجه قرار گرفتهاند. کارایی بهتر نانوکامیوزیتها نسبت به کامیوزیتهای یکیارچه و رایج را می توان به شباهت آنها به استخوان طبیعی کـه خـودش یک نانوکامپوزیت حاوی عمدتاً نانوکریستال های هیدروکسی آیاتیت و نانوالیاف کلاژن است، نسبت داد [۴ و ۸]. استفاده از نانوذرات ذرات سرامیکی در درمان یا بازسازی استخوان مزايايي نسبت به سراميکها يا شيشههاي زيستي 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 شـدن زیسـتی ٔ را نیـز افزایش میدهد [۹]. تحقیقات نشان داده است که قرار دادن سرامیکهای زیست فعال از جمله کلسیم فسفات و شیشههای زیست فعال در کامپوزیتها کارآیی بهتـری در رشـد و تمـایز سلولهای استخوانی دارد. سرامیکهای کلسیم فسفات مانند هيدروكسي آپاتيت، بەدلىل دارا بودن ساختار شيميايي مشابه با بخش معدنی استخوان بدن، سازگاری زیستی با بافت های نرم وسخت و قابلیت اتصال با استخوان، کاندیدای مناسبی برای کاربردهای بازسازی استخوان می باشند [۱۰ و ۱۱]. با وجود اينكه هيدروكسي أپاتيت زيست فعال است اما بـهدليـل نـرخ تخريب پذيري پايين، فعاليت آن در محيط برون تني⁶ بسيار محدود است و همچنین نرخ تجمع بافت استخوان در تماس با آن نسبتاً پایین است و مطالعات درون تنی^ع نیز تشکیل کم بافت

برای کاربردهای بازسازی استخوان، نانوکامپوزیت، ای حاوی

در سالهای اخیر تلاش های قابل توجهی در زمینه تولید داربستهای تقلید کننـده سـاختار مـاتریکس خـارج سـلولی ا استخوان جهت کاربرد در مهندسی و بازسازی بافت صورت گرفته است. این بیومواد باید به گونهای طراحی شوند که زیست سازگار، زیست تخریب پذیر و استخوان ساز باشند [۱]. نانوالیاف انتخاب مناسبي براي ايفاي نقش ماتريكس خارج سلولي طبيعي در شرایط آزمایشگاهی هستند. مطالعات نشان میدهد کـه اگـر سلول هایی از بافت های انسانی روی لایه متشکل از نانوالیاف تخريب يذير كشت داده شوند، مي توانند به ليف متصل شده و در آنجا تكثير يابند و بافت مربوطه را بهوجود آورند. بهعـلاوه، خواص فيزيكي عالى از قبيل سطح مخصوص بالا، تخلخل بالا، حفرات به هم پیوسته و خواص مکانیکی مناسب، ساختارهای نانولیفی را گزینه مناسبی برای کاربرد بهعنوان داربست در مهندسی بافت کرده است و مطالعات برروی ایـن داربسـتهـا بسیار گسترش یافته است [۲-۴]. تاکنون پلیمرهای زیست تخريب پذير مختلفي بهروش الكتروريسي براي كاربردهاي مهندسی بافت به داربستهای نانولیفی تبدیل شدهاند. در این ميان يلي هيدروكسي ألكانواتها بعدليل دارا بودن خواص مطلوبي چون زيست تخريب پذيري، قابليت شكل پـذيري بـالا، دارا بودن ضریب پیزوالکتریک مشابه استخوان، سازگاری با سلولهای استئوبلاست" و از همه مهم تـر محصـولات تخريـب غیرسمی، اخیراً توجه بسیاری از محققین را برای تهیه داربست جهت مهندسی بافت استخوان، بهخود جلب کرده است [۵-۷].

۱- مقدمه

از پلیمر طبیعی پلی هیدروکسی بوتیرات کو هیدروکسی والرات (PHBV) بهعنوان ماتریکس داربست، و از نانوذرات کامپوزیتی هیدروکسی آپاتیت/ بریدیجیت (HABR) بهعنوان 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^(hFob) برروی داربستهای مذکور مطالعه شد.

۲ – مواد و روش تحقیق
۲ – ۱ – تولیـــد نانوالیــاف کــامپوزیتی PHBV بـــهروش
الکتروریسی

بهمنظور تولید داربست نانولیفی، محلولهای ۸ درصد وزنی / حجمی (China company, PHBV, TianAn Enmat chemical) PHBV در حلال هگزا فلوئورو ایزوپروپانول (-۲-۱٫۱٫۳٫۳٫۳ hexafluoro) هدروکسی آپاتیت/ بریدیجیت (HFIP, propanol, Sigma هیدروکسی آپاتیت/ بریدیجیت (HABR) (سنتز شده مطابق تحقیق پیشین [۱۹]) الکتروریسی شدند. بدین منظور، ابتدا مقدار مورد نظر از نانوذرات مربوطه (۵ ۱۰ ۱۵ درصد وزنی نسبت به وزن که) در نانوذرات مربوطه (۵ ۱۰ ۵۰ درصد وزنی نسبت به وزن که) در شد و محلول به مدت ۱۸ ساعت در همزن مغناطیسی در دمای محیط همزده شد. هر یک از محلولهای تهیه شده جهت الکتروریسی به یک سرنگ ۳ میلیلیتری با سوزنی به قطر داخلی ماکتروریسی به یک سرنگ ۳ میلیلیتری با سوزنی به قطر داخلی ماکتروریسی به یک سرنگ ۳ میلیلیتری با سوزنی به قطر داخلی ماکتروریسی به یک سرنگ ۳ میلیلیتری ما سوزنی ما سانتی متر بر ماره میلی متر متقل شدند. نانوالیاف با نرخ تغذیه یک میلیلیتر بر ساعت، ولتاژ ۱۴ کیلوولت و فاصله ریسندگی ۱۸ سانتی متر بر

۲-۲ مشخصه یابی داربست نانولیفی PHBV و نانوالیاف ۲-۲ مشخصه یابی داربست PHBV/HABR

در این تحقیق جهت مشاهده مورفولـوژی نانوالیـاف و بررسـی رفتار سلولی برروی نمونهها، میکروسکوپ روبشی نشر میدانی^۹ (Hitachi, Japan) بهکار گرفته شد. داربست نـانولیفی

استخوانی را نشان دادهاند [۱۲]. به همین دلیل در سال های اخیر تلاش های بسیاری برای مخلوط کردن هیدروکسی آپاتیت با بیوسرامیکهای فعالتر و شیشههای زیستی صورت گرفته است تا بيومواد كامپوزيتي نسل جديد با خواص بيولـوژيكي مناسـب بهدست آید [۱۳ و ۱۴]. نشان داده شده است که بيوسراميكهايي بر پايه سيليكات رفتار زيست فعالى بالاترى نسبت به مواد کلسیم فسفات از خود نشان میدهند. یک مشخصه قابل توجه مواد سيليكاتي توانايي أنها در رهايش یونهای سیلیکون با غلظتی میباشد که رشد و تمایز سلولهای استئوبلاست را بهبود میبخشد [۱۵ و ۱۶]. سیستمهای سهتایی بر پایه CaO-SiO_r-MgO بهدلیل دارا بودن یون منیزیم، پایداری و خواص مکانیکی مطلوبتری نسبت به سرامیک های کلسیم سیلیکات دارند. بریدیجیت^۷ یکی از بیوسرامیکهای متعلق به سیستم سهتایی مذکور میباشد که تأیید شده است سلول سازگار و زیست فعال بوده و محصولات رهایش آن می تواند رشد استخوان را افزایش دهد [۱۷ و ۱۸]. در تحقیق پیشین ما نشان داده شد که در اثر ترکیب کردن بیوسرامیک زیست فعال بريديجيت با هيدروكسي آپاتيت، نانوذرات كامپوزيتي با خواص زیست فعالی و زیست سازگاری بهبود یافته نسبت به هيدروكسي آپاتيت خالص توليد مي شود [١٩].

تاکنون نانوالیاف PHBV بهصورت خالص یا مخلوط با پلیمرهایی نظیر کیتوسان، آسپارتیک اسید و فیبروئین ابریشم بهعنوان 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 استرانتیم کربنات بهصورت مخلوط با نانوالیاف PHBV بهعنوان داربست مهندسی بافت بررسی شده اند [۲۴ و ۲۵]. اما مطالعه خواص و رفتار سلولی نانوالیاف PHBV حاوی نانوذرات کامپوزیتی هیدروکسی آپاتیت/ بریدیجیت تاکنون گزارش نشده است. با توجه به مطالب گفته شده، در این تحقیق تصمیم بر این است تا از خواص منحصر بهفرد نانوالیاف در طراحی داربست جهت کاربرد در مهندسی بافت استخوان استفاده شود.

مواد پیشرفته در مهندسی، سال ۳۶، شمارهٔ ۳، پاییز ۱۳۹۶

٨٩

(ریسیده و جمع شده برروی فویل آلومینیومی) توسط دستگاه لایه نشانی طلا با جریان ۱۰ میلی آمپر به مدت ۸۰ ثانیه روکش داده شدند و عکسهایی با بزرگنمایی مناسب از نمونهها گرفته شد. جهت اندازه گیری قطر نانوالیاف، پس از تهیه تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی از نمونه های مورد نظر، از هر نمونه، قطر ۱۰۰ لیف به طور 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 (۲۲۰-TEM, Philips CM) استفاده شد. نانوالیاف کامپوزیتی برروی صفحه توری مس قـرار گرفتنـد 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 الکتروریسی شده برروی لاملهایی با قطر ۱۵ میلیمتر و سپس AST) VCA Optima بروی پایه نگهدارنده دستگاه آنالیز سطح AST) VCA Optima استفاده برای گزارش زاویه آبدوستی در حدود ۱ میکرولیتر بود. برای همه نمونهها از قطره شکل گرفته برروی نانوالیاف بعد از مدت زمان یکسانی عکس گرفته شد.

۲-۳- اندازه گیری 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، اندازه گیری خصوصیات مکانیکی آنها ضروری بهنظر می رسید. خصوصیات مکانیکی داربست های نانولیفی خالص و کامپوزیتی با استفاده از دستگاه آزمایش نیوتن و نرخ ازدیاد طولی در حدود ۱۰ میلی متر بر دقیقه ارزیابی شدند. داربست های الکتروریسی شده به شکل مستطیل و با ابعادی در حدود ۱۰×۳۰ میلی متر مربع تهیه شدند و ضخامت آنها با استفاده از میکرومتر دیجیتالی (Mitutoyo) تعیین شد. سپس دو انتهای این داربست های 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.

(hFob) کشت سلول های (hFob)

Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-۱۲) حاوى ۱۰ درصد سرم حاوی fetal bovine serum) FBS) و یک درصد آنتی بیوتیک (هر سه ماده ساخت شرکت Sigma) در یک فلاسک کشت سلول ۷۵ سانتیمتر مربع کشت داده و در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و پنج درصد CO₂ نگهداشته شدند. زمانی که بیشتر از ۸۰ درصد سطح کف فلاسک با سلول ها پوشیده شد، با استفاده از محلول EDTA-تريپسين (ساخت شركت Gibco Invitrogen- USA)، سلول ها از کف فلاسک جدا شدند و توسط هموسایتومتر مورد شمارش قرار گرفتند. بهمنظور شمارش تعداد سلول ها در واحد حجم سوسپانسيون سلولي، مقدار حدود ١٠ ميكروليتر از سوسپانسيون سلولي داخل چاهک موجود برروي لام هموسايتومتر ريخته شد و پس از مشاهده لام در زیر میکروسکوپ، تعداد کل سلولهای زنده موجود برروی نواحی مشخص شده برروی لام، شمرده شد (W). تعداد سلولهای زنده در واحد حجم سوسپانسیون سلولى از رابطه (١) قابل محاسبه مي باشد:

(۱) ^۲ ۱۰۰ ضریب رقیق سازی $\times \frac{W}{Y} = (cr order or$

چاهک باشند. سپس داربستها سه مرتبه با محلول بافر فسفاتی ^{۱۱} در زیر هود آزمایشگاهی شستشو داده شدند و بهمدت 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 سلول های hFob برروی داربست های مورد بررسی، توسط آنالیز کالریمتری MTS مطالعه شد. در آزمایش MTS نمیک تترازیلیوم (MTS مطالعه شد. در آزمایش MTS) نمیک تترازیلیوم (۲۰ ماره - ۲۰ - ۲۰ - ۲۰) - ۴) - ۴) (۳- carboxymethoxyphenyl) با سلول های فعال واکنش می دهد تا رنگ فرمازان محلول در آب بنفش رنگ را تشکیل دهد که با اندازه گیری جذب در طول موج ۴۹۰ نانومتر قابل تشخیص می باشد. برای این منظور بعد از مدت زمان ۵، ۱۰ و ۱۵ روز، داربست ها با BS شسته شدند و به درون هر چاهک مقدار ۴۰۰ میکرولیتر محیط کشت بدون پلیت ها به مدت سه ساعت در انکوبانور 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 برروی 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 ۰۳۰ میکرولیتر محلول سه درصد گلوتارآلدهید به مدت سه ساعت در دمای محیط تثبیت شدند. سپس هر داربست به ترتیب با ۰۰۰ میکرولیت ر اتانول ۵۰ ۷۵ ۹۰ و ۱۰۰درصد حجمی/ حجمی شستشو داده شد تا آبزدایی شود، در هر مرحله، اتانول به مدت ۱۵ دقیقه در تماس با داربستها قرار گرفت. سرانجام داربست

مواد پیشرفته در مهندسی، سال ۳۶، شمارهٔ ۳، پاییز ۱۳۹۶

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 ترکیــــب CMFDA (S-chloromethylfluorescein diacetate) CMFDA ا مشاهده شد که در اثر شکستن گروههای استات موجود در آن توسط استراز سیتوزولی، یکی از مشتقات فلورسنت CMFDA را تولید می کند. بعد از ۱۵ روز کشت سلول محیط کشت از هر چاهک خارج شد و به جای آن ۱۸۰ میکرولیتر محیط MEM و ۲۰ خارج شد و به جای آن ۱۸۰ میکرولیتر محیط کشت از مر درجه سانتی گراد به مدت ۲ ساعت در انکوباتور قرار گرفت. سپس محیط AGD با محیط کشت کامل جایگزین شد و سلولها در انکوباتور ۲OT به مدت یک شب قرار گرفتند. در ادامه محیط کشت محیط کشت بدون سرم، در زیر میکروسکوپ روبشی لیزری محیط کشت بدون سرم، در زیر میکروسکوپ روبشی لیزری محیط کشت در طول موج ۲۸۸ نانومتر مشاهده شدند.

۲–۸– تجزیه و تحلیل آماری

جهت بررسی معنیدار بودن میانگین گروهها از آنالیز واریانس میانگینهای یک طرف ANOVA بـه همـراه آنـالیز واریـانس Tukey استفاده شـد. مقـدار ۵۵/۰≥ p بـرای معنـیدار بـودن آماری لحاظ شد.

۳- تجزیه و تحلیل دادهها ۳-۱- مطالعه مورفولوژی نانوالیاف

تصویر میکروسکوپی الکترونـی عبـوری نـانوذرات هیدروکسـی آپاتیت/ بریدیجیت در شکل (۱–الـف) نشـان داده شـده اسـت. بهدلیل سطح ویژه بسیار زیاد نانوذرات، احتمـال آگلـومره شـدن



شکل ۱- الف) تصویر میکروسکوپی الکترونی عبوری نانوذرات هیدروکسی آپاتیت/ بریدیجیت، ب) تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی داربست نانولیفی PHBV حاوی مقادیر مختلف نانوذره HABR 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 هـ) توزیع نانوذرات در نانوالیاف PHBV حاوی ۱۰ درصد نانوذره HABR

زاویه تماس آب (درجه)	ازدیاد طول در پارگی (درصد)	ضریب کشسانی (مگاپاسگال)	استحکام نهایی (مگاپاسگال)	ميانگين قطر الياف (نانومتر)	
129	84/81	$\circ \mathcal{P}/V$	4/411	۳۵۹±۵°	PHBV
171/8	۴ ۶/۹۸	140/4	0/347	どくだ まりを	PHBV-5NPs
114/1	۳٩/٨٣	101/8	۶/٣°٧	۳۸V±۴۱	PHBV-10NPs
110/8	344/4V	90/11	٣/٨٧٩	そりて主をて	PHBV-15NPs

جدول ۱– مشخصه یابی داربست نانولیفی الکتروریسی شده: قطر الیاف، خواص مکانیکی، زاویه تماس آب داربست

نانوالیاف در جدول (۱) آورده شده است. همان طور 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 می شود. نتایج اندازه گیری قطر نشان میدهد که ذرات نانو بسیار زیاد است. همانطور که در شکل دیده می شود، ذرات تا حدی آگلومره شده ولی با این وجود، اندازه ذرات کمتر از ۵۰ نـانومتر مـیباشـد. شـکل (۱– ب تـا ۱– و) تصـاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی داربست نانولیفی PHBV حـاوی درصدهای مختلف نـانوذره را نشـان مـیدهـد. میانگین قطـری



شکل ۲ – نمودار تنش – کرنش نمونه داربستهای نانولیفی حاوی مقادیر مختلف نانوذره NPs) HABR (NPs)

میانگین قطر نانوالیاف با افزایش درصد نانوذره تا ۱۵ درصد روند افزایشی داشته است این افزایش قطر را می توان به افزایش ویسکوزیته برشی محلول پلیمری در نتیجه افزودن ذرات سخت سرامیکی نسبت داد [۲۶]. حضور نانوذرات هیدروکسی آپاتیت/ بریدیجیت در بستر نانوالیاف PHBV توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری تأیید شد. چنانچه از شکل (۱- هه) مشخص است، نانوذرات در بستر نانوالیاف کامپوزیتی به خوبی 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 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 برروی داربستهای نانولیفی در آزمایش تعیین زاویه تماس آب، در شکل (۱) نشان داده شده و مقادیر زاویه تماس اندازه گیری شده در جدول (۱) گزارش شده است. طبق نتایج به دست آمده، زاویه تماس آب نانوذرات به نانوالیاف PHBV کاهش یافت که نشان دهنده افزایش قابلیت ترشوندگی داربست نانولیفی می باشد. پلیمر افزایش قابلیت ترشوندگی داربست نانولیفی می باشد. پلیمر

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 محیط های فیزیولوژیک هیدرولیز می گردند، حضور آنها باعث افزایش جذب آب میشود. همچنین در تحقیقی که توسط اریکسون و همکاران برروی 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 تخریب پذیری که آب دوستی کمتری دارند نرخ تکثیر و چسبندگی سلولی کمتری نشان میدهند. با بهبود قابلیت ترشوندگی، زیست سازگاری داربست نیز بهبود می ابد [۸].

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

مواد پیشرفته در مهندسی، سال ۳۶، شمارهٔ ۳، پاییز ۱۳۹۶

کامپوزیت بهدلیل 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 می شود و در نتیجه انتقال نیرو در نانوالیاف کامپوزیتی به خوبی صورت نمی گیرد [۳۲].

در ادامه، بهدلیل خواص مکانیکی برتـر داربسـت نـانولیفی PHBV حـاوی ۱۰ درصـد نـانوذره، ایـن داربسـت بـرای 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 می گذارد که در درجه اول به خواص فیزیکی و شیمیایی تركیب داربست بستگی دارد [۳۲]. قابلیت تكثیر سلول های استئوبلاست برروی 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 برروی نمونه کنترل بیشتر از تعداد سلول ها برروی داربست PHBV مىباشد. اين اختلاف بەدلىل طبيعت أبگريـز نانواليـاف PHBV میباشد. نتایج مشابهی توسط رامیـر و همکـاران در ارزيابي نانوالياف پلى هيدروكسي بوتيرات حاوى هيدروكسي آیاتیت بهدست 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]. همان طور که در شکل (۳) نشان داده شده است بعد از ۱۰ و ۱۵ روز کشت سلول، سلولها برروی داربست PHBV حاوی

مختلف نانوذره را نشان میدهد. خواص مکانیکی این داربست ها در جدول (۱) خلاصه شده است. نمودار تنش-کرنش داربست خالص و کامپوزیتی PHBV رونـد یکسـانی را نشان میدهد به گونهای که در ابتدا از قانون هوک پیروی میکند و در ادامه با انتقال از منطقه الاستیک به منطقه پلاستیک همـراه 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 وزنبی، استحکام نهایی و ضریب یانگ داربست را بهترتیب به میزان ۴۵ درصد و ۵۰ درصد افزایش داد. ایـن بهبـود اسـتحکام مکـانیکی توسط محققان دیگر نیز گزارش شده است و به بـرهمکـنش مطلـوب زمینه پلیمری و نانوذرات بیوسرامیکی که بـمعنـوان پرکننـده و بهصورت همگن توزیع شدهاند نسبت داده می شود و باعث انتقال نیروی مؤثر می گردد [۲۹ و ۳۰]. نتایج همچنین نشان داد که داربست نانولیفی PHBV حاوی نانوذره، ازدیاد طول تا حدپارگی کاهش یافتهای (۳۴ درصد) نسبت به داربست نانولیفی خالص PHBV (۶۴ درصد) دارند. در نتیجه حضور نانوذرات باعث شکننده تر شدن ساختار و افزایش مقاومت به تغيير شكل داربست نانوليفي مي شود.كاهش استحكام داربست نانولیفی با افزایش درصد نانوذره از ۱۰ تا ۱۵ درصد می تواند 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 بهدست آوردند [۳۱]، آنها مشاهده کردند که با افزودن نانوذرات هیدروکسی آپاتیت (HA) بـ مـاتریس پلیمـری پلـی کاپرولاکتون (PCL)، استحکام مکانیکی داربست به میزان معنی داری (تا سه برابر) افزایش یافت. از دید ساختاری، مکانیسم استحکامدهی HA در نمونههای PCL بهدلیل خاصیت مكانيكي نسبتاً سخت HA ميباشد (زيرا HA ضريب الاستيك و تنش نهایی بالایی دارد) و این افزایش استحکام تا افزایش ۲۰ درصد حجمی HA ادامه داشت و بعد از آن خـواص مکـانیکی



شکل ۳– مقایسه تکثیر سلولهای استئوبلاست برروی داربست نانولیفی PHBV و داربست نانولیفی PHBV حاوی ۱۰ درصد نانوذره (*: اختلاف از نظر آماری معنی دار)

نانوذرات HABR بهطور معنی داری بیشتر از نمونه کنترل و داربست خالص PHBV رشد داشتهاند. گزارش شده است که نانوذرات HA چسبندگی اولیه سلول ها را بهبود می بخشند، همچنین نتایج تحقیقات وو و همکاران نشان داد که محصولات یونی حاصل از انحلال بریدیجیت می تواند تکثیر سلولی را افزایش دهند. رهایش سیلیکون نقش بسیار مهمی در استخوان سازی ایفا می کند بعلاوه سالیسیلیک اسید (حاصل از انحلال بریدیجیت) قادر به افزایش تولید کلاژن نوع یک می باشد و در اثر رهایش سالیسیلیک اسید در محیط، توانایی زنده ماندن و تکثیر استوبلاست افزایش می یابد [۳۴].

قابل ذکر است که تکنیکهای برون تنی برای ارزیابی جنبههای مختلفی از برهم کنش سلول – بیوماده مناسب می باشند. چسبندگی، مورفولوژی سلولی و قابلیت تشکیل مینرال برروی سلولهای hobd توسط آنالیز میکروسکوپی الکترونی روبشی مربوط به شکل (۴) تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی مربوط به برهم کنش سلول – بیوماده را بعد از پنج و ۱۵ روز کشت سلول نشان می دهد. سلولها برروی داربست نانولیفی حاوی نانوذره به خوبی با یکدیگر و به ساختار نانولیفی اتصال برقرار کرده اند و بهنظر می رسد که سطح داربست نانولیفی کامپوزیتی بعد از ۱۵ روز کشت سلول، به طور کامل با چندین لایه از سلول و همچنین

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 کانفلوئنسی رشد سلولهای hFob میباشد.

نتايج ميكروسكويي الكتروني روبشي همچنين نشان داد كه مینراله شدن برروی داربست حاوی نانوذره بیشتر از داربست PHBV خـالص و نمونـه كنتـرل اسـت. رسـوبات مينرالـه مورفولوژی متخلخل آپاتیت مانند واضحی را که حاوی تجمعات کروی شکل است نشان دادند (شکل ۴)، که این تجمعات همراه با ساختارهای فیبریلی کارژن می باشد. سلولهای استئوبلاست با تولید استئوید (اساساً از کـلاژن نـوع یک تشکیل شده است) و در ادامه آن تشکیل رسوبات مینراله توسط استئویدهای تولید شده، مسئول اصلی تشکیل بافت استخوان هستند [۳۵]. رسوبات مينراك تشكيل شده برروى داربستها، بهوسیله آزمون طیفسنجی تفریق انرژی نیز تأیید شد. میزان عناصر P و Ca برروی سطح سلول های رشد داده شده روی داربستهای الکتروریسی شده، اندازه گرفته شد. شکل (۵) نتایج آزمون طیفسنجی تفریق انـرژی را بعـد از ۱۵ روز کشت سلول برروی داربستهای مختلف نشان میدهد. پیکهای Ca و P در مناطقی که مینرالها برروی سلولها رشد

مواد پیشرفته در مهندسی، سال ۳۶، شمارهٔ ۳، پاییز ۱۳۹۶



PHBV شکل ۴– تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی مربوط به برهمکنش داربست– سلول برروی داربست نانولیفی PHBV خالص و 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 برروی نمونههای کنترل، ب) PHBV/HABR و ج) PHBV/HABR

پویشی مشاهده شدند. ترکیب CMFDA متعلق به دستهای از مشتقات کلرومتیل می باشد که برای رنگ آمیزی سلول های زنده در محیط آزمایشگاه ساخته شده است [۳۷]. افزودن CMFDA به محیط کشت سلول باعث می شود که ترکیب به راحتی در غشای سلول نفوذ کند و در اثر فعالیت استراز سیتوزولی به یک غشای سلول نفوذ کند و در اثر فعالیت استراز میتوزولی به یک مرکیب فلورسنت تبدیل شود. شکل (۶) نشان می دهـد که می باشد در صورتی که سلول ها برروی داربست نانولیفی

کردهاند مشاهده می شود. همان طور که میدانیم Ca و فسفات به عنوان عامل جوانه زدن تشکیل HA می باشد و همان طور که از نتایج مشخص است ارتفاع پیکهای این دو عنصر برروی داربست کامپوزیتی PHBV بیشتر از نمونه کنترل و PHBV خالص می باشد که نشان دهنده میزان بیشتر مینرال های تشکیل شده در اثر حضور نانو ذرات HABR می باشد [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 برروی نمونهها– نمونه کنترل، ب) داربست نانولیفی بدون نانوذره و ج) حاوی نانوذره (مقیاس خطی نشاندهنده ۲۰۰ میکرومتر است)

> کامپوزیتی کلونی های بیشتر و در نتیجه میزان مینرال های بیشتری نسبت به نمونه کنترل تشکیل دادهاند. به علاوه تعداد سلول های زنده برروی داربست کامپوزیتی بیشتر از تعداد سلول ها برروی داربست بدون نانوذره و نمونه کنترل می باشد. دلیل آن، ترکیب سهتایی CaO-SiOT-Mg مربوط به سرامیک بریدیجیت می باشد. یک مشخصه قابل توجه بیومواد سیلیکاتی، توانایی آنها در رهایش یون های سیلیکون با غلظتی می باشد که رشد و تمایز استئوبلاست را بهبود ببخشد. به علاوه نشان داده شده است که منیزیم نقش کلیدی در معدنی شدن بافت کلسینه شده دارد [۱۷] و ۲۷ و ۸۸].

۴- نتیجهگیری

در این تحقیق، نانوالیاف PHBV حاوی نـانوذرات هیدروکسـی آپاتیت/ بریدیجیت HABR به روش الکتروریسـی و بـهمنظـور مطالعه جهت کاربرد مهندسی بافت استخوان تولید شدند. تـأثیر

واژەنامە

- 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

مکانیکی داربست مورد مطالعه قرار گرفت. تکثیر، زیستایی و قابلیت مینراله شدن سلولهای استئوبلاست با کشت سلولهای رده hFob برروی داربست نانولیفی PHBV و داربست نانولیفی کامپوزیتی PHBV/HABR حاوی ۱۰ درصد نانوذره مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد که حضور مکانیکی داربست نانولیفی PHBV را بهبود می بخشد بلکه با افزایش آبدوستی و خاصیت زیست سازگاری، باعث افزایش نرخ تکثیر و قابلیت مینراله شدن سلولهای استئوبلاست برروی نانوالیاف PHBV می گردد. درنتیجه داربست نانولیفی پلی هیدروکسی بوتیرات کووالرات حاوی نانو ذرات هیدروکسی آپاتیت/ بریدیجیت پتانسیل بالقوه برای کاربردهای بازسازی استخوان دارد.

مقدار نانو ذره بر قطر نانو الياف، قابليت ترشو ندگی و خواص

- 1. extracellular matrix (ECM)
- 2. polyhydroxyalkanoates
- 3. osteoblast
- 4. biomineralization
- 5. In vitro
- 6. In vivo
- 7. bredigite

DOI: 10.29252/jame.36.3.87

- 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.
- 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.
- 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.
- Holzwarth, J. M., and Ma, P. X., "Biomimetic Nanofibrous Scaffolds for Bone Tissue Engineering", *Biomaterials*, Vol. 32, No. 36, pp. 9622-9629, 2011.
- 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.
- Rezwan, 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.
- Chena, G. Q., and Wu, Q., "The Application of Polyhydroxyalkanoates as Tissue Engineering Materials", *Biomaterials*, Vol. 26, pp. 6565-6657, 2005.
- Kouhi, M., Morshed, M., Varshosaz, J., and Fathi, M. H., "Poly (e-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.
- Webster, T. J, Siegel, R. W., and Bizios, R., "Osteoblast Adhesion on Nanophase Ceramics", *Biomaterials*, Vol. 20, No. 13, pp. 1221-1227, 1999.
- Hench, L. L., and Polak, J. M. "Third-Generation Biomedical Materials", *Science*, Vol. 295, pp. 1014-1017, 2012.
- Hench, L. L, "Bioceramics: from Concept to Clinic", Journal of American Ceramic Society, Vol. 74, pp. 1485-1510, 1991.
- 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.
- 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.

- 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.
- 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, М., Shamanian, М., Fathi, M., Samadikuchaksaraei, A., and Mehdipour, Α., "Synthesis, Characterization, In Vitro Bioactivity and Biocompatibility Evaluation of Hydroxyapatite/Bredigite $(Ca_7 MgSi_4 O_{16})$ Composite Nanoparticles", JOM, Vol. 68, 1061-1070, 2016
- 20. Zhang, S., Prabhakaran, M. P., Qin, X., and Ramakrishna, S., "Poly 3-hydroxybutyrate-co-3hydroxyvalerate 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.

- Sajesh, K. M., Kiran, K., Nair, S. V., and Jayakumar, R., "Sequential Layer-by-Layer Electrospinning of Nano SrCO /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.
- 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.
- 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(ecaprolactone)-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-4hydroxybutyrate)/ Silica Nanocomposites", *Polymer Engineering Science*, Vol. 52, No. 2, pp. 250-258, 2012.
- Causa, F., Netti, P. A., Ambrosio, L., Ciapetti, G., Baldini, N., Pagani, S., Martini, D., and Giunti, A., "Poly-e-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., Bouderlique, T., Ne, O., Renard, E., Albanese, P., and Grande, D., "Biocomposite Scaffolds Based on Electrospun Poly(3hydroxybutyrate) Nanofibers and Electrosprayed 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.
- Wu, C., Wang, J., Ni, S., and Zhai, W., "Preparation and Characteristics of a Calcuim 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.