

ساخت داربست‌های لایه‌به‌لایه نانولیفی تهیه شده از پلی‌کاپرولاکتون و پلیمرهای آب‌دوست و بتا تری کلسیم فسفات برای مهندسی بافت

مجید سهرابی^۱، مرجان عباسی^{۱*} و ملک مسعود انصار^۲

۱. دانشکده فنی، گروه مهندسی نساجی، دانشگاه گیلان

۲. گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

(دریافت مقاله: ۱۳۹۷/۴/۱۲ - دریافت نسخه نهایی: ۱۳۹۷/۹/۲۵)

چکیده- در این پژوهش با استفاده از پلیمرهای زیست تخریب پذیر، داربست‌های نانولیفی از الکترورسی دو نازل شامل پلی‌کاپرولاکتون، پلی‌وینیل پیرولیدون و پلی‌کاپرولاکتون، پلی‌وینیل‌الکل و بتا تری کلسیم فسفات به‌طور متناوب و لایه‌به‌لایه تولید شد. بعد از تهیه داربست، از آزمون‌های میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، تورم، تخلخل، خواص مکانیکی و ارزیابی رفتار زیست تخریب‌پذیری در محلول نمک فسفات با خاصیت بافری، استفاده شد که نتایج آزمون‌ها زیست‌فعالی و خواص مکانیکی مناسب داربست لایه‌به‌لایه را تأیید می‌کند. مقادیر جذب آب با افزودن پلیمرهای آب‌دوست افزایش پیدا می‌کند و در داربست لایه‌به‌لایه به 811 ± 214 درصد می‌رسد که اختلاف معناداری نسبت به پلی‌کاپرولاکتون خالص دارد. آزمون سنجش سمیت سلولی (MTT) روی داربست لایه‌به‌لایه بعد از گذشت ۳، ۵ و ۷ روز کشت سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش صحرایی (rMSC) درصد بقای سلولی بالای ۸۰ درصد را نشان می‌دهد و ریخت‌شناسی سلول‌ها روی داربست نشان‌دهنده قابلیت زیست‌سازگاری مطلوب سلول‌ها روی داربست است.

واژه‌های کلیدی: داربست، الکترورسی لایه‌به‌لایه، پلی‌کاپرولاکتون، بتا تری کلسیم فسفات، مهندسی بافت.

Fabrication of Poly(ϵ -Caprolactone), Hydrophilic and β -Tricalcium Phosphate Layer-by-Layer Nanofibrous Scaffolds for Tissue Engineering

M. Sohrabi¹, M. Abbasi^{1*} and M. M. Ansar²

1. Faculty of Engineering, Department of Textile Engineering, University of Guilan, Gilan, Iran.

2. Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran.

Abstract: In this study, using biodegradable polymers, nanofibrous scaffolds were fabricated from the layer-by-layer electrospinning method, including two layer that poly (ϵ -caprolactone), polyvinylpyrrolidone deposited at first layer and poly (ϵ -caprolactone), polyvinyl alcohol, β -tricalcium phosphate at latter. After preparation of scaffolds, scanning electron microscopy (SEM), swelling, porosity, mechanical properties and biodegradability behavior in buffered saline phosphate solution were

*: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: m.abbasi@guilan.ac.ir

studied. The results confirmed the bioactivity and suitable mechanical properties of the layer-by-layer scaffold. The swelling increase with the addition of hydrophilic polymers and reached $811 \pm 214\%$ in the layer-by-layer scaffold, which revealed a significant difference compared to pure PCL. The MTT test on the layer-by-layer scaffold, after 3, 5 and 7 days of rats bone marrow stem cells (rMSC) culture, showed the cell viability of above 80% moreover, cells morphology on the scaffold indicated the optimal compatibility of cells on the scaffold.

Keywords: Scaffold, Layer-by-layer electrospinning, Poly(ϵ -caprolactone), β -Tricalcium phosphate, Tissue engineering.

۱- مقدمه

درمان نقایص استخوانی ناشی از تروما، عفونت، تومورها یا بیماری‌های مادرزادی یک چالش بزرگ است. مهندسی بافت استخوان با هدف ترمیم، جایگزینی و یا بازسازی این نقایص استخوانی به وسیله داربست تخریب‌پذیر که به‌عنوان یک قالب موقت به‌منظور فراهم کردن محیط اختصاصی مناسب که اجازه رشد، تکثیر و تمایز سلول‌ها به زمینه خارج سلولی خود را می‌دهد و به محض تجدید تولید زمینه خارج سلولی طبیعی تخریب می‌شود پدید آمده است [۷-۱]. استخوان طبیعی یک کامپوزیت حاصل از یک زمینه آلی (کلاژن، پروتئین‌های غیرکلاژنی و لیپیدها) و یک فاز بلوری معدنی شامل نانوهیدروکسی آپاتیت^۱ (HA) است که به‌شکل سلسله مرتبه‌ای تنظیم شده‌اند [۸ و ۹].

در بین روش‌های موجود برای تولید داربست، روش الکتروریسی به‌عنوان یک روش ساده، مقرون به‌صرفه و متنوع در فناوری برای تهیه الیاف بی‌بافت با قطر در محدوده میکرون تا نانومتر مطرح می‌شود. با استفاده از الکتروریسی، امکان ایجاد داربست‌هایی با تقلید از معماری اختصاصی زمینه خارج سلولی استخوان با وجود مزایایی مانند تخلخل بالا، نسبت طول به قطر زیاد و سطح مخصوص بالا وجود دارد. سطح مخصوص بالا در داربست‌های الکتروریسی شده سطح بیشتری را برای اتصال سلولی مناسب آماده می‌کند و تخلخل بالا و اتصال داخلی زیاد حفرات، فضای کافی را برای تشکیل عروق خونی جدید که برای تغذیه استخوان جدید نیاز است را فراهم می‌کند و توانایی تعویض مواد مغذی و ضایعات متابولیکی بین داربست و محیط را دارا است [۱۰].

زیست مواد پلیمری و سرامیکی چه به‌صورت طبیعی و یا مصنوعی و یا کامپوزیت حاصل از آنها برای ساخت داربست‌هایی که توانایی رشد بافت استخوان را دارند، استفاده

شده است [۱۱ و ۱۲].

یانگ و همکاران داربست زیست تقلیدی پلی‌کاپرولاکتون^۲ (PCL) پوشش داده شده با کلسیم فسفات را به‌منظور مهندسی بافت استخوان تولید کردند که در نتیجه این تحقیق: ۱) ساختار داربست از ماتریس خارج سلولی^۳ (ECM) طبیعی استخوان پیروی می‌کند، ۲) داربست روزنه‌هایی برای مهاجرت سلولی و تبادل مواد مغذی را دارا است، ۳) داربست پوشش داده شده با کلسیم فسفات آب‌دوستی بیشتری نسبت به داربست بدون پوشش دارد. این مطالعه موفقیت پوشش داربست پلی‌کاپرولاکتون همراه با کلسیم فسفات را نشان می‌دهد [۱۳]. گیونگ‌من و همکاران، ترکیب پلی‌کاپرولاکتون و پلی‌وینیل پیرولیدون^۴ (PCL/PVP) را برای تولید داربست مهندسی بافت الکتروریسی کردند که برای افزایش نرخ تخریب‌پذیری پلی‌کاپرولاکتون از پلیمر قابل حل در آب پلی‌وینیل پیرولیدون استفاده شده است. نتایج نشان داد که استفاده از روش الکتروریسی و تشکیل ساختار نانومتخلخل، نه تنها نرخ تخریب‌پذیری الیاف را تسهیل می‌کند، بلکه چسبندگی و پخش سلول را بهبود می‌بخشد [۱۴].

چی‌هون و همکاران، با ترکیب پلی‌کاپرولاکتون و پلی‌وینیل الکل^۵ (PCL/PVA) و استفاده از الکتروریسی دوناژله (هیبریدی) داربستی را برای بهبود آب‌دوستی و در نتیجه افزایش اتصال و تکثیر سلولی تولید کردند که بررسی آزمایش‌های مربوطه نشان داد برای کشت سلول‌های اپیتلیال، افزودن پلیمر آب‌دوست پلی‌وینیل الکل به‌صورت هیبریدی با پلیمر پلی‌کاپرولاکتون، موجب بهبود نرخ اتصال و تکثیر سلولی شده است [۱۵].

کومار و همکاران، داربست کامپوزیتی (PVA/HAp/PCL) را به‌صورت دو لایه به‌روش الکتروریسی و به‌منظور ترمیم بافت استخوان تهیه و ارزیابی کردند. نتایج آزمایش‌های مربوطه نشان

زیست فعال استفاده شده است. تری کلسیم فسفات بیوسرامیکی است که بازجذب سریعتری نسبت به هیدروکسی آپاتیت و شیشه زیست فعال دارد اما فاقد استحکام کافی است و در فرم های α و β وجود دارد. بتا تری کلسیم فسفات (β -TCP) نسبت به دیگر فرم تری کلسیم فسفات (آلفا تری کلسیم فسفات) به دلیل پایداری شیمیایی عالی و نرخ زیست جذب قابل قبول ترجیح داده می شود. بتا تری کلسیم فسفات در دمای زیر ۱۱۲۵ درجه سانتی گراد پایدار است در حالی که حالت α آن تنها در محدوده دمایی ۱۴۰۰-۱۱۲۵ درجه سانتی گراد پایدار است. آلفا کلسیم فسفات به شدت واکنش پذیر است و در شرایط برون تنی (*in vitro*) خیلی سریع تخریب می شود، بنابراین به عنوان ماده پیوند استخوان استفاده نمی شود. گرچه بتا تری کلسیم فسفات به شکل طبیعی وجود ندارد، اما تحقیقات نشان داده شده است که این ماده پاسخ بیولوژیکی شبیه به استخوان دارد. بتا تری کلسیم فسفات به علت خواص مکانیکی ضعیف به عنوان یک کاشتنی به ندرت مورد استفاده قرار گرفته است و اغلب با دیگر پلیمرهای مصنوعی زیست تخریب پذیر ترکیب می شود [۲۱-۱۹].

در این پژوهش به بررسی تولید داربست نانولیفی پلی کاپرولاکتون (PCL)، با استفاده از پلیمرهای فوق جاذب نظیر پلی وینیل الکل و پلی وینیل پیرولیدون و نانوذره بتا تری کلسیم فسفات به روش الکتروریسی لایه به لایه پرداخته شد. پس از ساخت داربست، برای ارزیابی خواص مکانیکی و بیولوژیکی، آزمون های مربوطه روی آن انجام شد. از پلیمرهای آب دوست برای کاهش خاصیت آبریزی و همچنین کاهش زمان زیست تخریب پذیری پلی کاپرولاکتون و از نانوذره بتا تری کلسیم فسفات برای بهبود خواص زیستی و شبیه سازی بخش معدنی استخوان (نانوهیدروکسی آپاتیت طبیعی) استفاده شد.

۲- مواد و روش تحقیق

۲-۱- مواد

پلی کاپرولاکتون با وزن مولکولی ۷۰ تا ۹۰ کیلو دالتون از

می دهد قطر الیاف بین ۲۰۰ تا ۵۰۰ نانومتر است. همچنین، این کامپوزیت پس از بهینه سازی دارای ۶۴ درصد تخلخل و همچنین ۱۴۱ درصد تورم است. نتایج آزمون MTT^۶ نشان داد که این کامپوزیت زیست سازگار بوده و چسبندگی و تکثیر سلول استئوبلاست در آن بهبود یافته است. بر این اساس این کامپوزیت پتانسیل کاربرد در مهندسی بافت استخوان را دارا است [۱۶].

پلی کاپرولاکتون پلیمری نیمه بلوری با نقطه ذوب پایین (۶۴-۵۹ درجه سانتی گراد) است و دارای حلالیت خوب و ترکیب پذیری عالی است. علاوه بر آن، هنگامی که تنش اعمال می شود به شکل خطی با زمان در برابر جریان برشی مقاومت می کند و وقتی تنش برداشته می شود خیلی سریع به حالت اولیه خود برمی گردد. این ویژگی های پلیمر پلی کاپرولاکتون، کاربرد آن را برای محدوده گسترده ای از داربست ها فراهم می کند. تعداد زیادی از مواد کامپوزیتی بر پایه پلی کاپرولاکتون، در طی سالیان گذشته با استفاده از پرکننده هایی مانند بیوسرامیک ها، نانو ساختارهای کربنی و نانوذرات خاک رس به منظور کاربردهای پزشکی به کار رفته اند [۱۷].

سازمان جهانی غذا و دارو^۷ (FDA) این پلیمر را به عنوان یک پلیمر زیست تجزیه پذیر و محتوی تخریب پذیر غیرسمی تأیید کرده است. گرچه آب گریزی، فعالیت بیولوژیکی محدود و زمان تخریب پذیری نزدیک به دو سال استفاده از آن را به عنوان یک بیوماده مناسب در مهندسی بافت محدود کرده است [۱۸]. لذا چون نرخ تخریب پذیری و پاسخ سلولی به عنوان متغیرهای تأثیرگذار بستگی به ترکیب پلیمرها دارد، اصلاح سطحی و داخلی نانوالیاف الکتروریسی شده کامپوزیت های بر پایه پلی کاپرولاکتون به طور گسترده ای مورد مطالعه قرار گرفته اند. برای بهبود خواص آب دوستی و زیست سازگاری پلیمرهای مصنوعی، استفاده از پلیمرهای آب دوست مانند پلی وینیل الکل (PVA)، پلی اتیلن اکساید^۸ (PEO) و پلی وینیل پیرولیدون (PVP) از طریق ترکیب با پلیمر مورد استفاده قرار گرفته است [۱۸].

به منظور شبیه سازی بخش معدنی استخوان از نانوذرات هیدروکسی آپاتیت، تری کلسیم فسفات^۹ (TCP) و شیشه

شرکت Sigma - Aldrich آلمان، پلی‌وینیل پیرولیدن با وزن مولکولی ۴۰ کیلو دالتون و پلی‌وینیل الکل با وزن مولکولی ۷۲ کیلو دالتون از شرکت مرک آلمان و پودربتا تری‌کلسیم فسفات با اندازه ذرات ۱۵۰ نانومتر از شرکت نیک‌سرام رازی اصفهان خریداری شد. استیک اسید، دی‌کلرومتان و سایر مواد شیمیایی نیز از شرکت مرک آلمان خریداری شدند.

۲-۲-۲- دستگاه‌ها و روش‌ها

۲-۲-۲-۱- تهیه محلول‌ها

محلول ۱۵ درصد وزنی حجمی پلی‌کاپرولاکتون و پلی‌وینیل الکل با نسبت وزنی (۶۰/۴۰) از حل کردن پلیمرها در حلال مشترک استیک اسید تهیه شد. پس از تهیه محلول، به مقدار پنج درصد وزنی نانوذره بتا تری‌کلسیم فسفات (TCP-β) به محلول اضافه شد و محلول به مدت ۱۰ دقیقه توسط دستگاه آلتراسونیک همگن شد. همچنین محلول ۱۵ درصد وزنی حجمی پلی‌کاپرولاکتون و پلی‌وینیل پیرولیدون با نسبت وزنی با نسبت وزنی (۶۰/۴۰) از حل کردن پلیمرها در حلال مشترک دی‌کلرومتان آماده شد. این محلول‌ها و ترکیب درصد تهیه شده بعد از آزمون و خطا و انتخاب شرایط بهینه برای الکتروریسی انتخاب شدند. پس از تهیه محلول‌ها، هر کدام از آنها برای الکتروریسی داخل سرنگ مجزا قرار گرفتند.

۲-۲-۲-۲- الکتروریسی

دستگاه الکتروریسی شامل منبع ولتاژ قوی ۳۰-۰ کیلوولت و دو الکتروود مثبت و منفی است که الکتروود مثبت به نازل و منفی به صفحه جمع‌کننده متصل می‌شود. در این پژوهش، صفحه جمع‌کننده ساکن (ورق آلومینیومی با اندازه ۱۵×۱۵ سانتی‌متر)، پمپ سرنگی (Terumo Terfusion syringe pump) مدل STC-۵۲۳ ساخت ژاپن با حداقل سرعت ۰/۱ میلی‌لیتر بر ساعت، سرنگ پنج میلی‌لیتر پلاستیکی و نازل (سر سرنگ Spinal با اندازه Gauge ۲۴) استفاده شد. محلول پلی‌کاپرولاکتون - پلی‌وینیل الکل - بتا تری‌کلسیم فسفات

۲-۳-۲- بررسی ریخت‌شناسی نانوالیاف

در این آزمون از میکروسکوپ الکترونی روبشی^{۱۰} (SEM) مدل XL30 ساخت شرکت Philips هلند برای شناسایی و مشاهده ساختار نانولیفی نمونه‌ها و همچنین چگونگی ریخت‌شناسی و قرار گرفتن سلول‌ها روی شبکه‌های نانولیفی مورد بررسی قرار گرفت.

۲-۴-۲- طیف‌سنجی فروسرخ با تبدیل فوریه^{۱۱}

به منظور تأیید گروه‌های عامل شیمیایی در نمونه تهیه شده، از طیف‌سنج فروسرخ با تبدیل فوریه (FTIR) مدل Nikolet Magan-IR 560 ساخت کشور آمریکا در محدوده ۴۰۰-۴۰۰۰ بر سانتی‌متر استفاده شد.

۲-۵-۲- بررسی خواص آب‌دوستی داربست‌ها

در این آزمون، ابتدا نمونه‌های برش داده شده وزن شد و به مدت ۲۴ ساعت در آب دیونیزه شده قرار داده شدند. پس از

در این رابطه، ε درصد ازدیاد طول تا حد پارگی، L_1 طول نمونه در نقطه پارگی و L_0 طول اولیه نمونه است.

۲-۸- بررسی رفتار زیست تخریب پذیری داربست

به منظور بررسی رفتار تخریبی داربست‌های تهیه شده، ابتدا نمونه‌ها با ابعاد 1×1 سانتی‌متر وزن شدند (W_i)، سپس در 30° میلی‌لیتر از محلول نمک فسفات با خاصیت بافری در دمای 37° درجه سانتی‌گراد و به مدت زمان‌های مختلف ($3, 7, 14$ و 28 روز) غوطه‌ور شدند. بعد از خروج نمونه‌ها از محلول نمک فسفات با خاصیت بافری، با آب مقطر شستشو داده شدند و در دمای 37° درجه سانتی‌گراد به مدت 48 ساعت خشک شدند تا وزن آنها ثابت شود (W_f). درصد کاهش وزن داربست‌های نانولیفی تولید شده از رابطه (۵) محاسبه شده است:

$$\text{Weight loss (\%)} = \frac{W_i - W_f}{W_f} \times 100 \quad (5)$$

۲-۹- بررسی زیست‌سازگاری و داربست‌ها با روش MTT

برای انجام این روش از سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش صحرایی (rMSC) مطابق با استاندارد ASTM F813 استفاده شد. آزمون سمیت‌سنجی^{۱۲} بر اساس استاندارد ISO10993-5 انجام گرفت. ابتدا در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه محلولی حاوی 5000 سلول در محیط کشت DMEM^{۱۳} همراه با 10% درصد سرم جنینی گوساله^{۱۴} (FBS) و آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین به همراه داربست‌های سترون شده در فواصل زمانی $3, 5$ و 7 روز در محیط 37° درجه سانتی‌گراد و 5% درصد CO_2 و رطوبت نسبی انکوبه شدند. پس از اتمام زمان انکوباسیون محیط کشت رویی دور ریخته شد و به هر چاهک 200 میکرولیتر محیط کشت حاوی $0/5$ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر محلول MTT اضافه شد و به مدت 2 تا 4 ساعت انکوبه شد. سپس این محلول تخلیه و در هر چاهک 100 میکرولیتر حلال ایزوپروپانول ریخته شد و در نهایت جذب نوری محلول به دست آمده در طول موج 578 نانومتر با استفاده از دستگاه الیزاریدر مدل Tecan Spectra قرائت شد.

خشک شدن وزن خیس آن اندازه‌گیری و آب‌دوستی شبکه‌های نانولیفی با استفاده از رابطه (۱) محاسبه شد:

$$\text{Swelling Ratio (\%)} = \frac{W_s - W_d}{W_d} \times 100 \quad (1)$$

که در این رابطه W_d وزن خشک نمونه و W_s وزن مرطوب نمونه است.

۲-۶- اندازه‌گیری تخلخل داربست‌ها

در این آزمون، شبکه‌های نانولیفی برش داده شده وزن شده و ضخامت آنها اندازه‌گیری شد تا حجم داربست محاسبه شود. درصد تخلخل با استفاده از روش ارشمیدس از طریق رابطه (۲) اندازه‌گیری شد که در این رابطه ρ_m چگالی مواد پلیمری تشکیل‌دهنده داربست و ρ_{ap} چگالی ظاهری داربست است:

$$\text{porosity (\%)} = \left(1 - \frac{\rho_{ap}}{\rho_m} \right) \times 100 \quad (2)$$

۲-۷- بررسی خواص مکانیکی داربست‌ها

در این آزمون، دستگاه کشش (استحکام‌سنج) مدل میکرو 50 ساخت شرکت شرلی انگلستان به کار گرفته شد. ابتدا داربست‌ها به شکل مستطیلی به ابعاد 3×20 میلی‌متر برش داده و با سرعت دو میلی‌لیتر بر دقیقه کشیده می‌شود تا پارگی در نمونه‌ها اتفاق بیفتد. محاسبه استحکام کششی با استفاده از رابطه (۳) انجام گرفت [۲۲]:

$$S = \frac{d \times B}{A \times W} \times 100 \quad (3)$$

که در این رابطه، S: استحکام کششی یا تنش‌پارگی یا نیروی وارده بر سطح برحسب مگاپاسکال (MPa)، d: چگالی برحسب گرم بر سانتی‌متر مکعب (g/cm^3)، B: نیروی گسیختگی برحسب نیوتون (N)، A: چگالی سطحی برحسب گرم بر مترمربع (g/m^2)، W: عرض نمونه برحسب متر (m) است.

بعد از محاسبه استحکام، ازدیاد طول تا حد پارگی نیز با استفاده از رابطه (۴) برای نمونه داربست‌ها انجام گرفت:

$$\varepsilon (\%) = \frac{L_1}{L_0} \times 100 \quad (4)$$

افزایش مقاومت در برابر ازدیاد طول در هنگام الکترورسی می‌شود و از این رو قطر نانوالیاف افزایش می‌یابد.

قطر متوسط نانوالیاف داربست لایه‌به‌لایه [PCL/PVP, PCL/PVA / β -TCP]، 541 ± 232 نانومتر اندازه‌گیری شد که به‌طور تقریبی معادل میانگین قطر متوسط لایه‌های جداگانه تشکیل‌دهنده نانوالیاف داربست لایه‌به‌لایه است.

۲-۳- نتایج طیف‌سنجی فروسرخ

با توجه به مشخصات پیک‌های طیف‌سنجی مادون قرمز مربوط به پلیمرهای موجود در داربست، به تحلیل طیف‌سنجی مادون قرمز نمونه PCL/PVP که در شکل (۲-الف) نشان داده شده است می‌پردازیم. پیک مشخصه در 2945 و 2867 بر سانتی‌متر به ترتیب به ارتعاش کششی نامتقارن و متقارن C-H مرتبط هستند. پیک مشخصه در 1725 بر سانتی‌متر مربوط به ارتعاش کششی C=O استری در پلی‌کاپرولاکتون و پیک مشخصه 1660 بر سانتی‌متر مربوط به ارتعاش کششی C=O آمیدی در پلی‌وینیل پیرولیدن است. همچنین پیک مشخصه در 1287 بر سانتی‌متر مربوط به ارتعاش کششی C-N در پلی‌وینیل پیرولیدن و پیک مشخصه در $1057-1164$ بر سانتی‌متر مربوط به ارتعاش کششی متقارن C-O-C در پلی‌کاپرولاکتون و پلی‌وینیل پیرولیدن است. به‌طور کلی پیک‌های شناسایی شده در طیف به‌دست آمده در این مطالعه، وجود پلیمرهای پلی‌کاپرولاکتون و پلی‌وینیل پیرولیدن در داربست را تأیید می‌کند.

شکل (۲-ب) طیف فروسرخ با تبدیل فوریه داربست نانولیفی PCL/PVA/ β -TCP را نشان می‌دهد. در طیف فروسرخ، پیک مشخصه در 962 بر سانتی‌متر مربوط به ارتعاش کششی غیرمتقارن P-O از گروه عاملی PO_4^{3-} است که مربوط به نانوذره بتا تری‌کلسیم فسفات است. پیک مشخصه در 1722 بر سانتی‌متر مربوط به ارتعاش کششی C=O، پیک مشخصه در $1294-1292$ بر سانتی‌متر مربوط به ارتعاش کششی C-O و پیک مشخصه در $1369-1367$ بر سانتی‌متر مربوط به ارتعاش خمشی C-H است که تأیید حضور پلیمر پلی‌کاپرولاکتون در داربست است. همچنین پیک مشخصه

۱-۲- بررسی ریخت‌شناسی سلولی روی داربست

برای بررسی ریخت‌شناسی سلول‌های کشت داده شده روی داربست‌ها، تصاویر با استفاده از دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی مدل XL 30 ساخت شرکت Philips، از کشور هلند تهیه شدند. به‌منظور تثبیت سلول‌های چسبیده روی داربست‌ها، ابتدا نمونه‌ها به مدت یک ساعت داخل محلول فرمالین چهار درصد قرار گرفتند. در ادامه عمل آبیگری نمونه‌ها با استفاده از اتانول 50 ، 70 ، 80 ، 90 و 100 درصد به مدت 30 دقیقه برای هر درصد انجام شد. در نهایت داربست‌ها در دمای 34 - درجه سانتی‌گراد، فشار خلا $0/25$ میلی‌بار و به مدت سه ساعت در دستگاه خشک‌کن انجمادی قرار گرفتند، تا ریخت‌شناسی سلول‌ها حفظ شود.

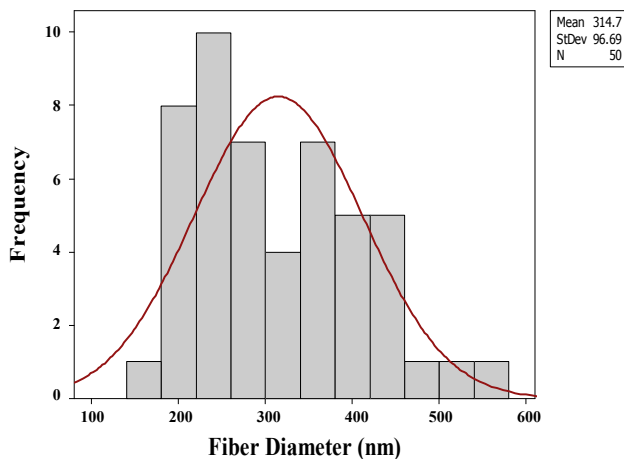
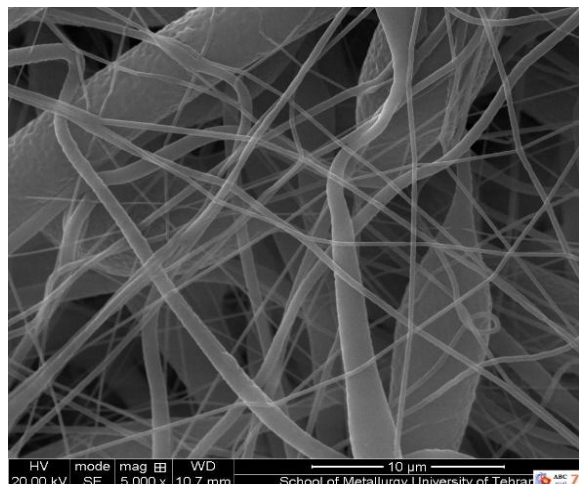
۱۱-۲- تحلیل آماری

اختلاف میانگین نتایج حاصل از آزمون‌ها در سطح معنی‌داری پنج درصد ($p < 0/05$) بعد از محاسبه میانگین و انحراف معیار داده‌ها مورد بررسی آماری قرار گرفت.

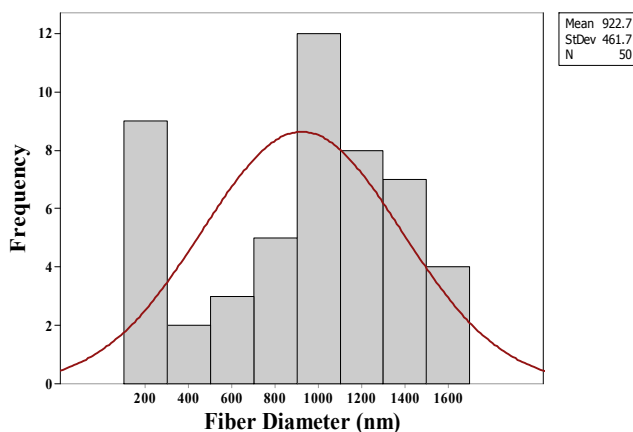
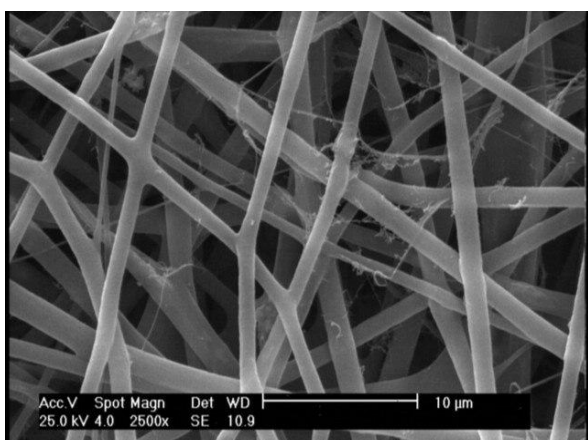
۳- نتایج و بحث

۱-۳- نتایج ریخت‌شناسی داربست‌های نانولیفی

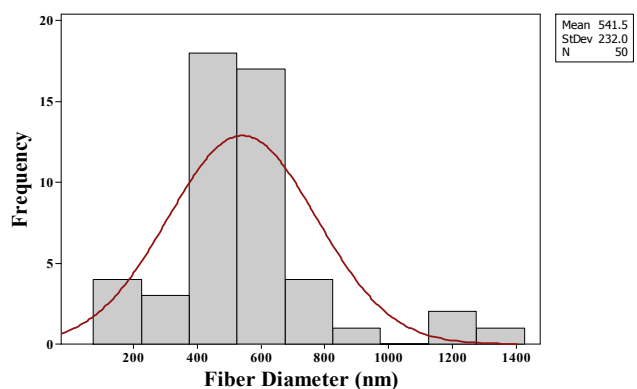
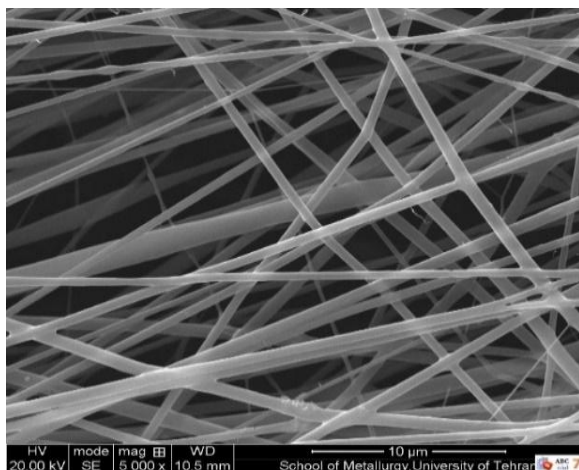
بررسی ریخت‌شناسی داربست‌ها همراه با توزیع قطر الیاف آنها در شکل (۱) نشان داده شده است. همان‌طور که در این شکل مشاهده می‌شود، نانوالیاف داربست‌های حاصل به شکل شبکه‌ای به هم پیوسته و با ریخت‌شناسی یکنواخت و بدون دانه تسبیحی حاصل شده‌اند. همچنین بررسی قطر نانوالیاف نشان می‌دهد که قطر متوسط نانوالیاف PCL/PVP، 314 ± 96 نانومتر و قطر متوسط نانوالیاف PCL/PVA/ β -TCP، 922 ± 461 نانومتر است. این افزایش قطر در نانوالیاف به دلیل وجود پلیمر پلی‌وینیل الکل با وزن مولکولی به مراتب بیشتر نسبت به پلیمر پلی‌وینیل پیرولیدن و همچنین وجود نانوذره بتا تری‌کلسیم فسفات در ترکیب است. وجود ذرات سرامیکی مانند بتا تری‌کلسیم فسفات موجب افزایش گرانیوی محلول پلیمری و



(الف)



(ب)

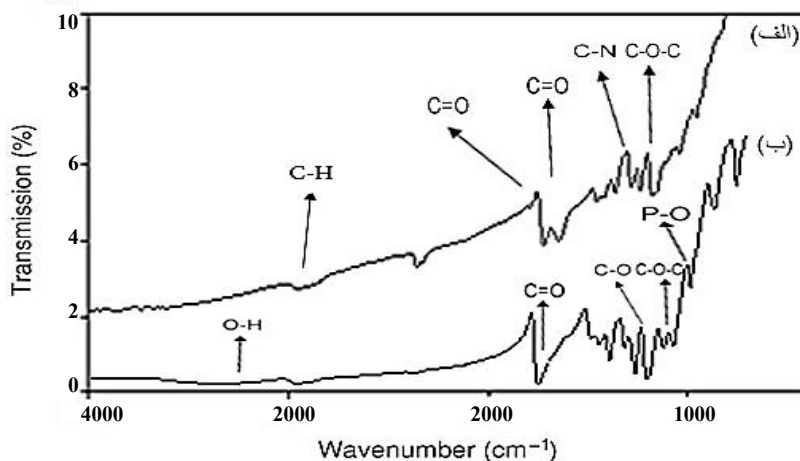


(ج)

شکل ۱- تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی با مقیاس ۱۰ میکرومتر از نانوالیاف همراه با توزیع قطر نانوالیاف در داربست‌های

الکترونی شده: الف) PCL/PVP (60/40)، ب) PCL/PVA (60/40) و

ج) [PCL/PVA (60/40)/β-TCP، PCL/PVP (60/40)]



شکل ۲- طیف فرسوخ با تبدیل فوریه داربست های نانولیفی: الف) PCL/PVP و ب) PCL/PVA / β -TCP

جدول ۱- توانایی جذب آب و میزان تخلخل داربست های الکترورسی

نمونه داربستی	جذب آب (%)	تخلخل (%)
پلی کاپرولاکتون	-	۶۹±۵
پلی کاپرولاکتون/پلی وینیل پیرولیدون پلی کاپرولاکتون/ پلی وینیل الکل /	۷۳۸±۱۶۲	۷۳±۴
بتا تری کلسیم فسفات	۵۴۲±۲۲۳	۶۹±۴

داربست ها در جدول (۱) نشان داده شده است، با توجه به اینکه میزان جذب آب در پلی کاپرولاکتون خالص ناچیز است به منظور ارتقای قابلیت جذب آب از پلیمرهای آب دوست استفاده شده است که میزان جذب آب داربست PCL/PVP، 162 ± 738 درصد است. مشاهده می شود اختلاف جذب آب داربست در سطح پنج درصد (p<0/05) نسبت به پلی کاپرولاکتون خالص معنی دار است. از طرفی میزان جذب آب داربست شامل PCL/PVA / β -TCP محاسبه و مقدار آن 541 ± 223 درصد اندازه گیری شد که نسبت به نمونه های شامل پلی وینیل الکل کمتر است، اما میزان جذب آب آن نسبت به پلی کاپرولاکتون خالص در سطح پنج درصد (p<0/05) معنی دار است. البته میزان جذب آب پلیمر پلی وینیل الکل به مراتب بیشتر از پلی وینیل پیرولیدون است که این کاهش احتمالاً به دلیل وجود نانوذرات بتا تری کلسیم فسفات در نمونه داربستی است؛ همچنین بررسی رفتار جذب آب داربست لایه به لایه؛

در ۱۳۳۰ و ۱۴۳۲ بر سانتی متر مربوط به ارتعاش های پیوندی CH_2 و پیک مشخصه در ۳۳۵۲ بر سانتی متر مربوط به ارتعاش کششی O-H است که نشان دهنده حضور پلیمر پلی وینیل الکل در داربست است.

۳-۳- ارزیابی قابلیت جذب آب داربست های نانولیفی

توانایی جذب آب یک فاکتور مهم در بسترهای مورد کاربرد در مهندسی بافت است. در واقع جذب آب، نشان دهنده توانایی داربست ها برای جذب ترشحات اضافی و مرطوب نگه داشتن بستر زخم است. در ضمن وجود داربست های آب دوست باعث تقویت اتصالات سلولی می شود و همچنین زیست سازگاری و تکثیر سلول ها را افزایش می دهد. به این منظور میزان جذب آب داربست های نانولیفی با غوطه ور کردن آنها در محلول نمک فسفات با خاصیت بافری اندازه گیری شد. تغییرات میزان جذب آب

جدول ۲- خواص مکانیکی داربست‌های الکترورسی شده

مدول کششی (MPa)	ازدیاد طول تا حد پارگی (%)	استحکام کششی (MPa)	نمونه داربست
۷۷/۰۳±۲۹/۶۶	۲۷/۲۴±۳/۵۰	۱۰/۰۲±۳/۲۹	پلی کاپرولاکتون
۷۳/۸۰±۳/۶۲	۵۹/۶۸±۲۰/۴۰	۲/۱۱±۰/۸۷	پلی کاپرولاکتون/پلی وینیل پیرولیدون پلی کاپرولاکتون/ پلی وینیل الکل/
۲۸۰/۲۹±۲۰/۵۰	۱۴/۶۷±۰/۴۷	۹/۱۴±۰/۷۴	بتا تری کلسیم فسفات

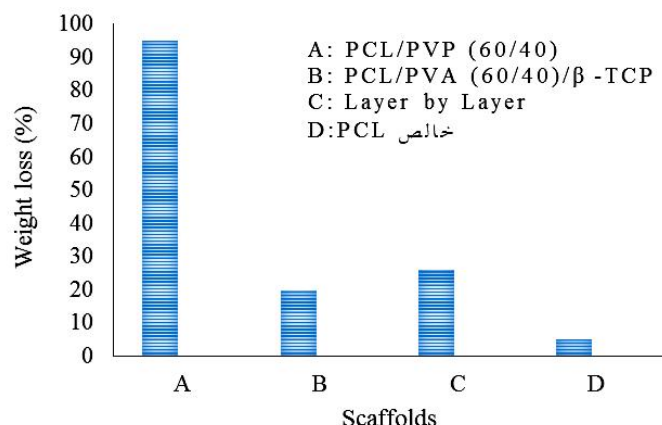
۳-۵- ارزیابی خواص مکانیکی داربست‌های نانولیفی

ویژگی‌های مکانیکی داربست باید با بافتی که در تماس با آن است سازگار باشد. در بافت استخوان داربست مورد نظر باید خواص مکانیکی مطلوبی دارا باشد. نتایج بررسی خواص مکانیکی که در جدول (۲) آورده شده است نشان می‌دهد با افزودن پلی وینیل پیرولیدون به پلی کاپرولاکتون خالص، استحکام کاهش چشمگیری پیدا می‌کند به طوری که استحکام پلی کاپرولاکتون خالص در حدود $10/02 \pm 3/29$ مگاپاسکال و استحکام نمونه PCL/PVP در حدود $2/11 \pm 0/87$ مگاپاسکال اندازه‌گیری شد. این اختلاف میانگین استحکام در سطح پنج درصد معنی‌دار است. اما افزودن بتا تری کلسیم فسفات در کنار پلی وینیل الکل در داربست PCL/PVA / β -TCP این نقصان را جبران می‌کند و استحکام آن $9/14 \pm 0/74$ مگاپاسکال اندازه‌گیری شد که نشان می‌دهد وجود نانوذرات سرامیکی مانند بتا تری کلسیم فسفات با توجه به اثر تقویت‌کننده‌ای که این مواد در زمینه پلیمری کامپوزیت دارند و این مواد نسبت به پلیمرها سخت‌تر هستند، باعث افزایش استحکام کششی می‌شوند. در نمونه لایه‌به‌لایه استحکام داربست به‌طور تقریبی میانگین استحکام لایه‌های مجزا است و استحکام داربست [PCL/PVP, PCL/PVA/ β -TCP]، $4/69 \pm 1/17$ مگاپاسکال است و اختلاف استحکام آن با نمونه PCL خالص در سطح پنج درصد معنی‌دار است. روند تقریباً مشابهی را در مورد اندازه‌گیری مدول الاستیک مشاهده شد و البته مشاهده می‌شود نمونه PCL/PVA / β -TCP بیشترین مقدار مدول را دارا

دارد. [PCL/PVA/ β -TCP, PCL/PVP] مورد بررسی قرار گرفت که در نتیجه آن میزان جذب آب 811 ± 214 درصد است و اختلاف آن نسبت به PCL خالص در سطح پنج درصد ($p < 0/05$) معنی‌دار است که این نتیجه نشان می‌دهد میزان جذب آب در داربست لایه‌به‌لایه نسبت به نمونه‌های مجزا بیشتر است.

۳-۴- نتایج اندازه‌گیری تخلخل

یکی از مزایای داربست الکترورسی شده برای کاربرد در مهندسی بافت، ساختار متخلخل آنها است. تعیین میزان تخلخل می‌تواند سینتیک مهاجرت سلولی به داخل داربست را تعیین کند، لذا ضروری است این ویژگی برای داربست حفظ شود. در این پژوهش همان‌طور که در جدول (۱) نشان داده شده است میزان تخلخل برای پلی کاپرولاکتون خالص 69 ± 5 درصد اندازه‌گیری شد. با اضافه کردن پلی وینیل پیرولیدون، مشاهده می‌شود که میزان تخلخل به 73 ± 4 درصد می‌رسد. همچنین، در داربست پلی کاپرولاکتون/ پلی وینیل الکل/ بتا تری کلسیم فسفات، میزان تخلخل 69 ± 4 درصد محاسبه شد این کاهش در میزان تخلخل به دلیل حضور β -TCP است که ممکن است به دلیل این واقعیت باشد که افزودن β -TCP باعث ایجاد دیواره ضخیم‌تر در منافذ با تخلخل پایین‌تر می‌شود. در داربست لایه‌به‌لایه [PCL/PVP, PCL/PVA / β -TCP]، میزان تخلخل، تقریباً میانگین تخلخل دو لایه تشکیل‌دهنده آن و برابر با 70 ± 2 درصد است و به‌طور کلی اختلاف میانگین تخلخل داربست‌ها نسبت به هم در سطح پنج درصد ($p < 0/05$) معنی‌دار نیست.



شکل ۳- زیست تخریب پذیری داربست‌های الکترونیسی شده بعد از گذشت ۲۸ روز در محلول بافر فسفات

می‌شود، با افزودن پلی‌وینیل پیرولیدون میزان زیست تخریب پذیری در داربست نسبت به پلی‌کاپرولاکتون خالص افزایش پیدا می‌کند اما این افزایش غیرقابل کنترل است و بعد از ۲۸ روز داربست به‌طور کلی تخریب می‌شود و این به دلیل خواص زیست تخریب‌پذیری ویژه پلی‌وینیل پیرولیدون است. اما با افزودن پلی‌وینیل الکل و نانوذره β -TCP در داربست PCL/PVA / β -TCP، بعد از ۲۸ روز میزان تخریب‌پذیری این داربست به 20 ± 5 درصد می‌رسد و روند تخریب زیستی منسجم‌تری اتفاق می‌افتد، همچنین مشاهده می‌شود میزان تخریب‌پذیری در داربست لایه‌به‌لایه [PCL/PVP, PCL/PVA / β -TCP] نیز بعد از گذشت ۲۸ روز 26 ± 2 درصد است و اختلاف میانگین سایر نمونه‌ها نسبت به PCL خالص در سطح پنج درصد معنی‌دار است.

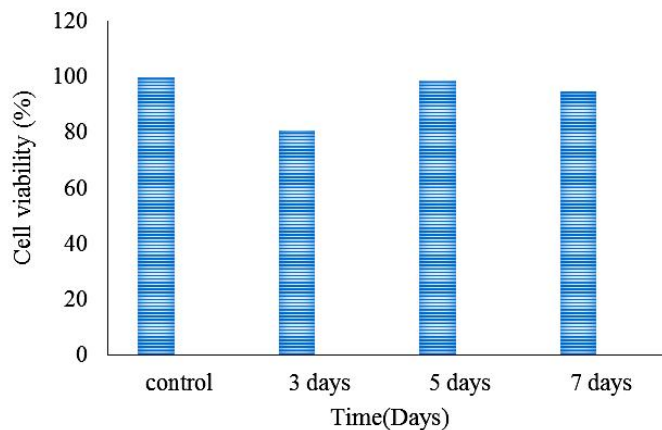
۳-۷- ارزیابی سمیت سلولی داربست‌ها با روش MTT

بررسی زیست‌سازگاری و سمیت سلولی داربست‌ها یکی از تعیین‌کننده‌ترین آزمون‌ها برای بررسی خواص مطلوب داربست است. بررسی نتایج این آزمون در داربست لایه‌به‌لایه مورد نظر در شکل (۴) نشان می‌دهد سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش صحرایی (rMSC) توانسته‌اند روی داربست زنده باقی بمانند و سمیت سلولی در آن مشاهده نمی‌شود. میزان درصد بقای سلولی بعد از گذشت ۳، ۵ و ۷ روز در داربست

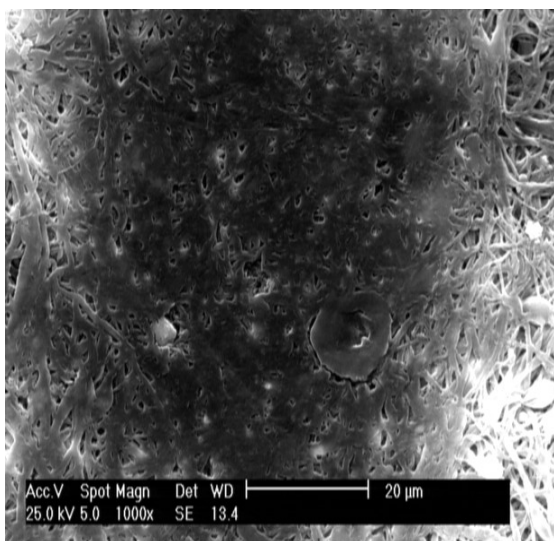
است و اختلاف میانگین مدول الاستیک آن با سایر نمونه‌ها در در سطح پنج درصد معنی‌دار است، و این افزایش به دلیل وجود نانوذره بتا تری کلسیم فسفات و خواص مکانیکی منحصر به فرد آن در داربست است. از طرفی مشاهده می‌شود با افزایش استحکام و مدول الاستیک، درصد ازدیاد طول تا حد پارگی کاهش می‌یابد و بیشترین میزان ازدیاد طول تا حد پارگی مربوط به نمونه PCL/PVP است که کمترین میزان استحکام و مدول را دارا است و اختلاف ازدیاد طول تا حد پارگی این نمونه نسبت به PCL خالص در سطح پنج درصد معنی‌دار است.

۳-۶- ارزیابی زیست تخریب‌پذیری داربست‌های نانولیفی

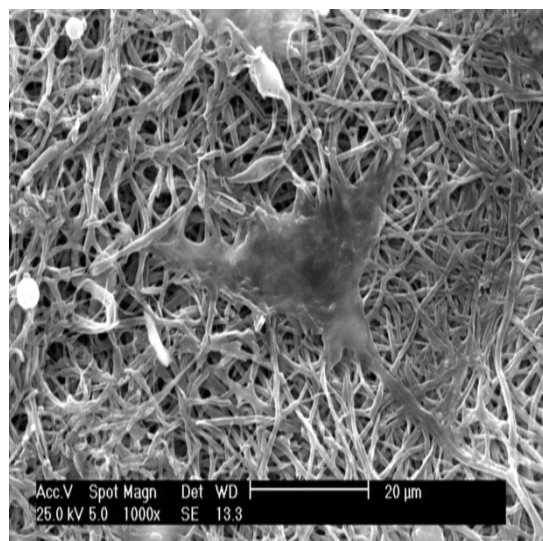
یکی از ویژگی‌های مهم برای داربست، میزان تخریب‌پذیری آنها است و باید با نرخ نوزایی و تولید مجدد زمینه خارج سلولی تطابق داشته باشد. نرخ بسیار بالای تخریب در داربست‌هایی که در بدن کاشته شده‌اند، ممکن است به فرایند تکثیر سلولی آسیب برساند و همچنین نرخ بسیار پایین تخریب نیز ممکن است موجب به تأخیر افتادن فرایند یکپارچه شدن این داربست‌ها با بافت اطرافش شود. در این پژوهش که نتایج زیست تخریب‌پذیری آن در شکل (۳) نشان داده شده است مشاهده می‌شود میزان تخریب‌پذیری پلی‌کاپرولاکتون بعد از گذشت ۲۸ روز ناچیز است و این پلیمر به آهستگی و در طی یک دوره زمانی تقریباً دوساله در بدن دچار تخریب زیستی



شکل ۴- درصد بقایای سلولی داربست لایه‌به‌لایه در بازه‌های زمانی مختلف بعد از کشت سلولی



(ب)



(الف)

شکل ۵- تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی داربست لایه‌به‌لایه بعد از گذشت: (الف) ۳ روز و (ب) ۷ روز کشت سلولی

موش صحرایی (rMSC) در محیط کشت روی داربست کشت شده‌اند. شکل (۵) تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی حاصل از ریخت‌شناسی سلول‌های ذکر شده را بعد از گذشت سه و هفت روز از کشت سلولی روی داربست نشان می‌دهد. در شکل (۵) برهم‌کنش بین سلول‌ها و داربست نانولیفی به‌خوبی مشاهده می‌شود. سلول‌ها به‌خوبی روی داربست لایه‌به‌لایه [PCL/PVA / β -TCP, PCL/PVP] اتصال برقرار کرده و گسترش یافته‌اند و مشاهده می‌شود رشد و گسترش سلولی در هفت روز بیشتر از سه روز است و سلول‌ها به‌طور کامل

لایه‌به‌لایه نسبت به نمونه کنترل به ترتیب 81 ± 14 ، 99 ± 20 و 95 ± 7 درصد اندازه‌گیری شد که نشان از توانایی داربست در زنده نگه داشتن و بقای سلول دارد و اختلاف میانگین میزان بقایای سلولی نمونه‌ها نسبت به هم در سطح پنج درصد معنی‌دار نیست.

۳-۸- نتایج ریخت‌شناسی سلولی روی داربست

برای بررسی زیست‌پذیری و بقای سلول‌ها روی داربست لایه‌به‌لایه تولید شده، سلول‌های بنیادی مغز استخوان

پلی‌وینیل‌پیرولیدون و پلی‌وینیل‌الکل در لایه‌ها، نسبت به PCL خالص تغییر کرده و بهبود می‌یابد و در داربست لایه‌به‌لایه جذب آب نسبت به لایه‌های جداگانه بیشتر هم می‌شود و همچنین تخریب‌پذیری روند متعادلی پیدا می‌کند. بررسی نتایج تخلخل‌سنجی و سنجش خواص مکانیکی نیز وضعیت مطلوبی را برای داربست نشان داده و آزمون MTT نشان‌دهنده عدم سمیت سلولی و بقای سلول‌ها روی داربست لایه‌به‌لایه است. ریخت‌شناسی سلولی نیز مؤید زیست‌سازگاری و بقای سلول‌ها روی داربست بوده و برهمکنش، بین سلول‌ها و داربست ایجاد شده است؛ به‌طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که داربست لایه‌به‌لایه [PCL/PVA (60/40)/ β -TCP], [PCL/PVP (60/40)]، دارای زیست‌سازگاری مناسبی برای مهندسی بافت است.

۴- نتیجه‌گیری

در این پژوهش، داربست نانولیفی لایه‌به‌لایه [PCL/PVA (60/40)/ β -TCP], [PCL/PVP (60/40)] از ترکیب لایه‌های جداگانه PCL/PVA / β -TCP و PCL/PVP (60/40) با موفقیت الکترورسی شدند. نتایج ریخت‌شناسی نشان می‌دهد نانو الیاف داربست لایه‌به‌لایه حاصل به‌شکل شبکه‌ای به هم پیوسته و با ریخت‌شناسی یکنواخت و بدون دانه تسیجی حاصل شده است و قطر آن تقریباً میانگین قطر لایه‌های جداگانه تشکیل‌دهنده داربست است. طیف‌سنجی فروسرخ در لایه‌ها، وجود اتصالات شیمیایی در داربست را تأیید می‌کند. رفتار جذب آب و تخریب‌پذیری داربست با افزودن پلیمرهایی آب‌دوست مانند

واژه‌نامه

1. Hydroxyapatite (HA)
2. Polycaprolactone (PCL)
3. extra cellular matrix (ECM)
4. Polyvinylpyrrolidone (PVP)
5. Poly(vinyl alcohol) (PVA)
6. MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]
7. food and drug administration
8. Poly(ethylene oxide)
9. Tricalcium Phosphate (TCP)
10. scanning electron microscope (SEM)
11. fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)
12. cytotoxicity
13. Dulbecco's Modified Eagle Medium
14. fetal bovine serum (FBS)

مراجع

1. Wu, C., Zhou, Y., Xu, M., Han, P., Chen, L., Chang, J., and Xiao, Y., "Copper-containing Mesoporous Bioactive Glass Scaffolds with Multifunctional Properties of Angiogenesis Capacity, Osteostimulation and Antibacterial Activity", *Biomaterials*, Vol. 34, pp. 422-433, 2013.
2. Bi, L., Rahaman, M. N., Day, D. E., Brown, Z., Samujh, C., Liu, X., Mohammadkhan, A., Dusevich, V., Eick, J. D., and Bonewald, L. F., "Effect of Bioactive Borate Glass Microstructure on Bone Regeneration, Angiogenesis, and Hydroxyapatite Conversion in a Rat Calvarial Defect Model", *Acta Biomaterialia*, Vol. 9, No. 8, pp. 8015-8026, 2013.
3. Zhao, S., Zhang, J., Zhu, M., Zhang, Y., Liu, Z., Tao, C., Zhu, Y., and Zhang, C., "Three-dimensional Printed Strontium-containing Mesoporous Bioactive Glass Scaffolds for Repairing Rat Critical-sized Calvarial Defects", *Acta Biomaterialia*, Vol. 12, pp. 270-280, 2015.
4. Erol, M., Özyüğüran, A., Özarpat, Ö., and Küçükbaşrak, S., "3D Composite Scaffolds using Strontium Containing Bioactive Glasses", *Journal of the European Ceramic Society*, Vol. 32, No. 11, pp. 2747-2755, 2012.
5. Yunos, D. M., Ahmad, Z., and Boccaccini, A. R., "Fabrication and Characterization of Electrospun Poly-DL-lactide (PDLLA) Fibrous Coatings on 45S5 Bioglass® Substrates for Bone Tissue Engineering Applications", *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, Vol. 85, No. 6, pp. 768-774, 2010.
6. Lin, H. M., Lin, Y. H., and Hsu, F. Y., "Preparation and Characterization of Mesoporous Bioactive Glass/Polycaprolactone Nanofibrous Matrix for Bone Tissues Engineering", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Vol. 23, No. 11, pp. 2619-2630, 2012.
7. Gao, C., Gao, Q., Li, Y., Rahaman, M. N., Teramoto, A., and Abe, K., "In Vitro Evaluation of Electrospun

- Gelatin-bioactive Glass Hybrid Scaffolds for Bone Regeneration”, *Journal of Applied Polymer Science*, Vol. 127, No. 4, pp. 2588-2599, 2013.
8. Liu, X., Smith, L. A., Hu, J., and Ma, P. X., “Biomimetic Nanofibrous Gelatin/Apatite Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering”, *Biomaterials*, Vol. 30, No. 12, pp. 2252-2258, 2009.
 9. Rajzer, I., Grzybowska-Pietras, J., and Janicki, J., “Fabrication of Bioactive Carbon Nonwovens for Bone Tissue Regeneration”, *Fibres & Textiles in Eastern Europe*, Vol. 1, No. 84, pp. 66-72, 2011.
 10. Xie, J., Blough, E. R., and Wang, C. H., “Submicron Bioactive Glass Tubes for Bone Tissue Engineering”, *Acta Biomaterialia*, Vol. 8, No. 2, pp. 811-819, 2012.
 11. Gómez-Lizárraga, K. K., Flores-Morales, C., Del Prado-Audelo, M. L., Álvarez-Pérez, M. A., Piña-Barba, M. C., and Escobedo, C., “Polycaprolactone and Polycaprolactone/Ceramic-based 3D-bioplotting Porous Scaffolds for Bone Regeneration: A Comparative Study”, *Materials Science and Engineering: C*, Vol. 79, pp. 326-335, 2017.
 12. Ghorbani, F. M., Kaffashi, B., Shokrollahi, P., Akhlaghi, S., and Hedenqvist, M. S., “Effect of Hydroxyapatite Nano-particles on Morphology, Rheology and Thermal Behavior of Poly (Caprolactone)/Chitosan Blends”, *Materials Science and Engineering: C*, Vol. 59, pp. 980-989, 2016.
 13. Yang, F., Wolke, J. G. C., and Jansen, J. A., “Biomimetic Calcium Phosphate Coating on Electrospun poly (ϵ -Caprolactone) Scaffolds for Bone Tissue Engineering”, *Chemical Engineering Journal*, Vol. 137, No. 1, pp. 154-161, 2008.
 14. Kim, G-M., Kim, H. T., Le, S. M., Giannitelli, Y. J. L., Alberto, R., and Marcella T., “Electrospinning of PCL/PVP Blends for Tissue Engineering Scaffolds”, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Vol. 24, No. 6, pp. 1425-1442, 2013.
 15. Kim G-M., Le, K. H., Giannitelli, S. M., Lee, Y. J., Rainer, A., and Trombetta, M., “An Improved Hydrophilicity via Electrospinning for Enhanced Cell Attachment and Proliferation”, *Journal of Biomedical Materials Research Biomaterials*, Vol. 78, No. 2, pp. 283-290, 2006.
 16. Maheshwari, S. U., Samuel, V. K., and Nagiah, N., “Fabrication and Evaluation of (PVA/HAp/PCL) Bilayer Composites as Potential Scaffolds for Bone Tissue Regeneration Application”, *Ceramics International*, Vol. 40, No. 6, pp. 8469-8477, 2014.
 17. Mkhabela, V., and Ray, S. S., “Biodegradation and Bioresorption of Poly (ϵ -Caprolactone) Nanocomposite Scaffolds”, *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 79, pp. 186-192, 2015.
 18. Mohan, N., and Nair, P. D., “Polyvinyl Alcohol-poly (Caprolactone) Semi IPN Scaffold with Implication for Cartilage Tissue Engineering”, *Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, Vol. 84, No. 2, pp. 584-594, 2008.
 19. Zegzula, H. D., Buck, D. C., Brekke, J., Wozney, J. M., and Hollinger, J. O., “Bone Formation with Use of RHBMP-2 (Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2)”, *Journal of Bone & Joint Surgery*, Vol. 79, No. 12, pp. 1778-1790, 1997.
 20. 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. 27, No. 18, pp. 3413-3431, 2006.
 21. Befort, C. A., Nazir, N., and Perri, M. G., “Prevalence of Obesity Among Adults from Rural and Urban Areas of the United States: findings from NHANES (2005-2008)”, *The Journal of Rural Health*, Vol. 28, No. 4, pp. 392-397, 2012.
 22. Amiraliyan, N., Nouri, M., and Kish, M. H., “Structural Characterization and Mechanical Properties of Electrospun Silk Fibroin Nanofiber Mats”, *Polymer Science Series A*, Vol. 52, No. 4, pp. 407-412, 2010.