

Development and characterization of electrospun Mg-doped fluorapatite nanoparticles – PCL nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering

Z. Fereshteh¹, M. H. Fathi^{1,2*}, R. Mozaffarinia³

¹PhD student, Biomaterials Research Group, Department of Materials Engineering, Isfahan University of Technology, Isfahan.

Z.Fereshteh@ma.iut.ac.ir

²Professor, Biomaterials Research Group, Department of Materials Engineering, Isfahan University of Technology, Isfahan.

Dental Materials Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan.

³Associate Professor, MalekAshtar University of Technology, Department of Materials Engineering, Isfahan, Shahin-Shah.

Mozaffarinia@yahoo.com

Abstract

The aim of this study was to prepare and characterize the novel poly (ϵ -caprolactone) / Mg-doped fluorapatite nanoparticles (PCL / nMg-FA) composite scaffolds by electrospinning method. The optimized composite was achieved by changing of electrospinning parameters such as solvent, polymer concentration, applied voltage, nozzle to collector distance and content of ceramic. It was shown that the diameter size of fibers decreased by adjusting the viscosity and conductivity solution. Optimal samples were studied with transmission electron microscopy (TEM), scanning electron microscope (SEM), X-ray diffraction (XRD), energy dispersive X-ray (EDX) and thermogravimetric analysis (TGA). According to TEM and the X-ray maps of the scaffolds, Mg-FA particles were homogeneously dispersed into the nanofibers without any agglomeration. It is noteworthy that was not any surfactant in this study. Also results of XRD show no chemical reactions between polymeric solution components. Mechanical properties of the scaffolds were also evaluated. Results showed that tensional strength of scaffolds and also thermal stability increased by increasing the weight ratio of nanoparticles up to 5 wt. %.

Key words: Electrospinning, Nanocomposite, Mg-doped fluorapatite nanoparticle.

*Corresponding author

Address: Materials Engineering Department, Isfahan University of Technology, Isfahan, 84156-83111, Iran, Postal Code: 8415683111, Isfahan, I.R. Iran.

Tel: +983113912750-1

Fax: +98311 3912752

E-mail: Fathi@cc.iut.ac.ir

بهینه‌سازی و مشخصه‌یابی داربست نانوکامپوزیتی E- پلی‌کاپرولاکتون / نانوذرات منیزیم فلئوئور هیدروکسی آپاتیت با هدف مهندسی بافت استخوان

زینب فرشته^۱، محمدحسین فتحی^{۲*}، رضا مظفری‌نیا^۳

^۱ دانشجوی دکتری مهندسی نانومواد، گروه پژوهشی بیومواد، دانشکده مهندسی مواد، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان

Z.Fereshteh@ma.iut.ac.ir

^۲ استاد، گروه پژوهشی بیومواد، دانشکده مهندسی مواد، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان

^۲ استاد، مرکز تحقیقات مواد دندان، دانشکده دندان‌پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان

^۳ دانشیار، دانشکده مهندسی مواد، دانشگاه مالک اشتر شاهین شهر، اصفهان Mozaffarinia@yahoo.com

چکیده

هدف از پژوهش حاضر ساخت و مشخصه‌یابی داربست کامپوزیت پلی E-کاپرولاکتون/ نانوذرات منیزیم فلئوئور آپاتیت (PCL/nMg-FA) با استفاده از روش الکتروریسندگی است. کامپوزیت مورد نظر با استفاده از بهینه‌سازی پارامترهای فرایند الکتروریسی مانند حلال، غلظت پلیمر و درصد بیوسرامیک موجود در کامپوزیت تهیه شد. نتایج نشان داد که اندازه قطر الیاف با تنظیم ویسکوزیته و هدایت الکتریکی محلول، تغییر می‌کند. نمونه‌های بهینه شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)، میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، پراش پرتو ایکس (XRD)، تحلیل توزیع انرژی پرتو ایکس (EDX) و تحلیل حرارتی وزن‌سنجی (TGA) بررسی شدند. نتایج بدست آمده از TEM و EDX نشان دادند نانوذرات nMg-FA به صورت کاملاً همگن درون الیاف پلیمری قرار گرفته‌اند. نکته قابل توجه این است که در طی فرایند ساخت از هیچ‌گونه ماده سورفکتانت به عنوان عامل اصلاح‌ساز سطحی استفاده نشد. همچنین نتایج XRD نشان داد که هیچ واکنش شیمیایی بین اجزای کامپوزیت رخ نداده است. از طرفی با افزایش مقدار نانوذرات درون کامپوزیت، استحکام مکانیکی و نیز مقاومت حرارتی داربست افزایش یافت.

کلیدواژگان: الکتروریسندگی، نانوکامپوزیت، نانوذرات منیزیم فلئوئور آپاتیت.

*عهده‌دار مکاتبات

نشانی: اصفهان، دانشگاه صنعتی اصفهان، دانشکده مهندسی مواد، گروه پژوهشی بیومواد، کدپستی: ۸۴۱۵۶۸۳۱۱۱

تلفن: ۰۳۱۱-۳۹۱۲۷۵۰، ۰۳۱۱-۳۹۱۲۷۵۲، دورنگار: ۰۳۱۱-۳۹۱۲۷۵۲، پیام‌نگار: Fathi@cc.iut.ac.ir

۱- مقدمه

داربست‌های زیست‌تخریب‌پذیر کاربرد فراوانی در مهندسی بافت استخوان دارند. این داربست‌ها باید ویژگی‌های خاصی داشته باشند. از جمله این ویژگی‌ها، زیست‌تخریب‌پذیری آن‌ها است که چسبندگی و فعالیت سلولی را افزایش می‌دهد. در این راستا پلیمرهای زیست‌تخریب‌پذیر از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند. پلیمرها بستر مناسبی را برای رشد و تکثیر سلولی فراهم می‌کنند. در ضمن نرخ تخریب پلیمر و سرعت رشد سلولی باید با هم مطابقت داشته باشند که بدین منظور از پلیمرهای مصنوعی و طبیعی استفاده می‌شود [۲].

داربست‌های پلیمری خالص با هدف مهندسی بافت با کاربری بافت استخوانی به دلایل متعددی محدود شده‌اند. از جمله این دلایل می‌توان به خواص مکانیکی ضعیف این داربست‌ها اشاره کرد. از طرف دیگر این مواد بر خلاف بیوسرامیک‌ها انعطاف‌پذیری مطلوبی دارند. با توجه به این که بیش از ۶۰ درصد بافت استخوانی از هیدروکسی‌کربنات‌آپاتیت در زمینه بافت آلی لیفی شکل قرار گرفته است، به نظر می‌رسد بهترین گزینه برای داربست‌های مهندسی بافت استخوانی، استفاده از داربست‌هایی با زمینه پلیمری با ذرات و یا نانوالیاف بیوسرامیکی مانند هیدروکسی‌آپاتیت^۵ باشد [۲].

به دلیل ویژگی‌هایی همچون زیست‌فعالی، زیست‌تخریب‌پذیری و توانایی استخوان‌سازی، هیدروکسی‌آپاتیت و ترکیبات اصلاح‌شده آپاتیت مانند فلئورآپاتیت، فلئور هیدروکسی‌آپاتیت، منیزیم‌هیدروکسی‌آپاتیت و غیره در مهندسی بافت استفاده شده‌اند. خواص زیست‌سازگاری و زیست‌فعالی منیزیم فلئور آپاتیت بسیار بهتر از هیدروکسی‌آپاتیت و یا فلئور آپاتیت خالص است. به عبارت دیگر یون‌های فلئور می‌توانند بر فرایند معدنی شدن و تشکیل استخوان تأثیرگذار باشند. همچنین استخوان‌سازی در مواد حاوی فلئور افزایش می‌یابد. از طرف دیگر مواد حاوی یون منیزیم فرایند استخوان‌سازی را بهبود بخشیده‌اند. انعطاف‌پذیری منیزیم

بافت استخوانی و غضروفی آسیب دیده مشکلی است که سالانه برای میلیون‌ها نفر در سراسر جهان پدید می‌آید. در نتیجه موضوع بازسازی و ترمیم بافت اسکلت استخوان با کمک مهندسی بافت، در بسیاری از جوامع علمی مورد مطالعه قرار گرفته است. همچنین نتایج مطلوبی از پژوهش‌های حیوانی و بالینی در این زمینه بدست آمده است. رایج‌ترین رویکرد در زمینه مهندسی بافت استفاده از سلول‌ها و یا سلول‌های تمایز یافته^۱ بر روی داربست‌های زیست‌تخریب‌پذیر^۲ است [۱].

چالش بزرگ مهندسی مواد در زمینه مهندسی بافت، کنترل دقت و تکرارپذیری ساخت داربست‌هایی است که به منظور استاندارد سازی روند ساخت آن‌ها در مقیاس صنعتی در آینده، ساخته می‌شوند. تکنیک‌های متنوعی برای ساخت داربست با اهداف مهندسی بافت وجود دارد. همچنین مواد کامپوزیتی و یا پلیمرهای مختلفی می‌تواند در ساخت داربست استفاده شود. امروزه ریزساختارهای مختلفی با جنس‌ها و تکنیک‌های مختلف در حال ساخت و بهینه‌سازی است؛ با وجود این، هر یک از آن‌ها معایبی نیز دارند. فقدان کنترل درصد تخلخل داربست، محدوده وسیع اندازه ذرات، توزیع غیریکنواخت حفرات و حضور بقایای حلال سمی در داربست از جمله این معایب هستند [۲].

از میان روش‌های موجود برای ساخت داربست‌های مهندسی بافت، فرایند الکترورسی^۳ روش ساده‌ای است که داربست‌هایی با تخلخل بیش از ۹۰ درصد ایجاد می‌کند. داربست‌های ایجاد شده با این روش، دارای ریزساختار لیفی شکل با قطر نانومتر هستند [۳]. داربست‌های الکترورسی شده مشابه ماتریکس خارج سلولی^۴ هستند. همچنین ویژگی‌های ساختاری این داربست‌ها پاسخ‌های مثبت داربست را در برابر سلول‌های کاشته شده در سطح (مانند افزایش چسبندگی^۵، توزیع و تکثیر سلولی^۶) در شرایط آزمایشگاهی بهبود می‌بخشد [۴، ۵].

^۱Cell differentiation
^۵Cell adhesion

^۲Biodegradable
^۶Cell proliferation

^۳Electrospinning
^۷Hydroxyapatite (HA)

^۴Extracellular matrix (ECM)

در این پژوهش سعی می‌شود از خواص مطلوب پلی‌E-کاپرولاکتون و نیز خواص بسیار ویژه منیزیم فلئور آپاتیت استفاده شود. بعلاوه از آنجایی که بافت استخوانی در محدوده نانومتر است، استفاده از نانو بیوسرامیک‌ها و فناوری‌نانو برای ساخت داربست، احتمال حصول موفقیت در ترمیم بافت استخوانی را بیشتر می‌کند.

۲- مواد و روش‌ها

نانوذرات فلئور آپاتیت ($nMg-FA$) مطابق با مرجع [۱۴] به روش سل-ژل تهیه شدند. همچنین برای ساخت محلول الکتروریسی نانوذرات به مدت ۱۵ دقیقه در اتانول و یا متانول (*Merck Co.* - 99.8 v%) به عنوان حلال پراکنده‌ساز با استفاده از امواج فراصوت پراکنده شدند. سپس کلروفورم و پلی E-کاپرولاکتون (*Sigma* - $PCL, Mw = 80,000, m.p. 60^{\circ}C$) به محلول اضافه شدند. در نهایت محلول به مدت ۲۴ ساعت با سرعت ثابت و در دمای اتاق همزده شد. سیستم حلال با نسبت های مختلفی از کلروفورم و اتانول انتخاب شد که شامل ۱۰:۰، ۹۰:۱۰، ۲۰:۸۰، ۲۵:۷۵ و ۳۰:۷۰ بود. محلول های حاوی ۸، ۱۰، ۱۲ و ۱۴ درصد وزنی به حجمی از پلیمر مورد نظر تهیه شدند. همچنین غلظت نانوذرات بیوسرامیک با مقادیر ۱، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد انتخاب شد. مقادیر و نوع پارامترهای بهینه شده در جدول (۱) به صورت خلاصه بیان شده است. پارامترهای بهینه شده شامل حلال، مقدار نانوذرات بیوسرامیک و پلیمر هستند. ویژگی های دستگاه الکتروریسی مورد استفاده شامل سوزن $23G$ ، آهنگ تزریق ۱ میلی لیتر بر ساعت و فاصله بین جمع کننده و سوزن برابر با ۲۰ سانتی متر بود. مقدار رطوبت و دما نیز، ثابت و به ترتیب برابر با ۲۰٪ و ۲۵ درجه سانتی گراد بود.

به منظور بررسی اندازه و ساختار الیاف و نانوذرات از میکروسکوپ الکترونی روبشی (*SEM*) *Phillips XL 30*: *Eindhoven, The Netherlands* استفاده شد. همچنین توزیع

بیشتر از بیوموادسرامیکی مرسوم از قبیل هیدروکسی آپاتیت است، در حالی که ضریب کشسانی و استحکام تسلیم فشاری منیزیم در مقایسه با سایر کاشتنی های فلزی به استخوان طبیعی نزدیک تر است [۶]. همچنین این عنصر برای فعالیت های متابولیسم بدن ضروری است و در بافت استخوانی نیز یافت می شود. منیزیم چهارمین کاتیون موجود در بدن است. براساس نتایج آزمایش های انجام شده، در بدن فردی با جرم ۷۰ کیلوگرم یک مول منیزیم وجود دارد به طوری که حدود نیمی از این مقدار منیزیم در بافت استخوان ذخیره شده است [۷].

از طرف دیگر پلیمرهایی که در مقالات مختلف به صورت گسترده بررسی شده اند، پلی آلفاهیدروکسی اسیدها و نیز پلی E-کاپرولاکتون هستند. این پلیمرها با کاربری پزشکی در دستگاه های مختلف مورد تأیید اداره مواد غذایی و دارویی ایالات متحده آمریکا هستند [۸]. در زمینه ترمیم، پلی کاپرولاکتون تقویت شده با رشته های شیشه ای فسفات در بین تثبیت شکستگی^۸، ترمیم کرانیوفاسیال^۹، و به طور کلی برای بازسازی بسیاری از استخوان ها استفاده می شود [۹]. کامپوزیت های پلی کاپرولاکتون/ هیدروکسی آپاتیت ترویج استخوان سازی مناسبی را در محیط آزمایشگاهی نشان داده است که ناشی از مقادیر زیاد آپاتیت بر روی سطح و نیز درون سیستم است [۱۰]. علاوه بر این هیدروکسی آپاتیت اضافی استحکام، مدول یانگ، گرانروی و خواص الاستیک را بهبود می بخشد [۱۱]. پلیمرهایی با پایه پلی کاپرولاکتون برهم کنش های پلیمر - استئوبلاست های خوبی را نشان می دهد. این داربست ها تکثیر و رشد استخوان سازی را افزایش داده؛ همچنین فرایند معدنی شدن را بهبود می بخشد [۱۲]. داربست های رشته ای با پایه پلی E-کاپرولاکتون که به وسیله الکتروریسی تهیه شده اند، خواص بیولوژیک و فیزیکی بهتری از خود نشان می دهند. نگهداری ساختار داربست در بافر فیزیولوژیک از تکثیر و تمایز سلول های استخوان سازی پشتیبانی می کند و ممکن است برای مهندسی بافت هایی با عمر طولانی تر استفاده شود [۱۳].

⁸Fracture fixation pins

⁹Craniofacial

نانوذرات درون الیاف پلیمری با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM, EM 109, ZEISS, Germany) و تحلیل توزیع انرژی پرتو ایکس SERON TECHNOLOGY A15- 2100 بررسی شد. برای تعیین اندازه دقیق ذرات از نرم افزار *Imag J* استفاده شد. خواص کریستالوگرافی داربست‌های ساخته شده با استفاده از دستگاه پراش پرتو ایکس *Philips diffractometer, 40 kV* بررسی شد. تحلیل حرارتی نمونه‌ها با دستگاه *Rheometric scientific 1998, USA* در اتمسفر هوا با سرعت گرمایش $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ انجام شد. همچنین از دستگاه *INSTRON, Zwick, United Kingdom* به منظور بررسی خواص مکانیکی داربست تهیه شده، استفاده شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- انتخاب حلال

سیستم حلال مورد استفاده نقش بسزایی را در فرایند الکترورسی به عهده دارد؛ زیرا اولین مرحله از فرایند الکترورسی انحلال پلیمر در یک حلال مناسب است. حلال مورد نظر باید از نظر برخی خواص مانند دمای جوش، فشار بخار و فرار بودن بررسی شود [۱۵]. به عنوان مثال فرار بودن حلال نمی‌تواند بسیار زیاد یا بسیار کم باشد؛ به دلیل اینکه در مقادیر زیاد، حلال قبل از رسیدن الیاف به جمع‌کننده تبخیر می‌شود و در نتیجه باید فاصله بین سوزن و جمع‌کننده کاهش یابد که باعث می‌شود قطر الیاف افزایش یابد. از طرف دیگر در قدرت فرار کم، الیاف جمع‌آوری شده بر روی جمع‌کننده حاوی حلال هستند و کاملاً خشک نشده‌اند که باعث می‌شود نانوالیاف به یکدیگر بچسبند.

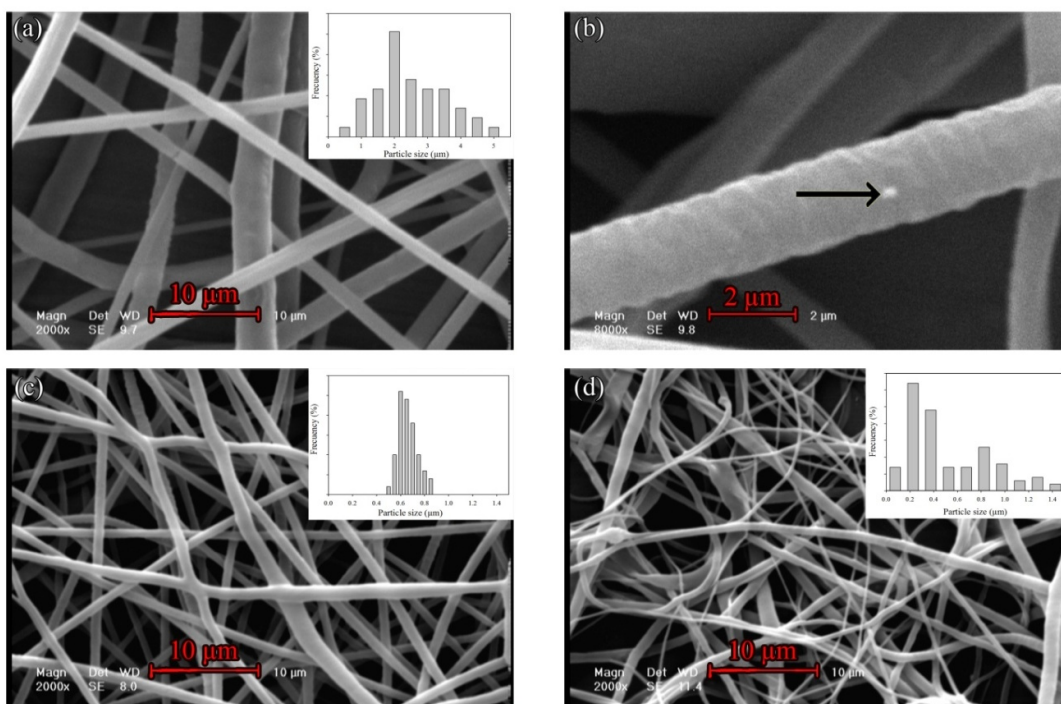
همچنین هدایت محلول [۱۶، ۱۷] و ویسکوزیته [۱۶] آن از دیگر پارامترهای مهم محلول هستند. محلول با هدایت الکتریکی زیاد، چگالی بار سطحی بیشتری دارد؛ در نتیجه در میدان الکتریکی ثابت نیروی کششی بر جت محلول افزایش یافته و به

دلیل حضور بارهای هم‌نام، دافعه ذاتی محلول بر روی سطح افزایش می‌یابد [۱۷]. بعلاوه باعث می‌شود جت بوجود آمده پایدارتر باشد و در نتیجه الیافی نازک‌تر و با توزیع اندازه باریک‌تری بوجود آیند [۱۸]. از طرف دیگر در ولتاژ ثابت اگر ویسکوزیته محلول زیاد باشد، قطر الیاف افزایش می‌یابد. بنابراین برای تهیه الیاف با قطر کم و نیز توزیع اندازه باریک، باید ویسکوزیته محلول به دقت تنظیم شود. غلظت پلیمر و نیز نوع حلال، ویسکوزیته محلول را تنظیم می‌کنند [۲۰-۲۳]. از طرف دیگر برهم‌کنش بین مولکول‌های حلال و پلیمر (دافعه و جاذبه) منحصراً به نوع حلال بستگی دارد؛ بنابراین انتخاب حلال از اهمیت زیادی برخوردار است.

برای بررسی نوع حلال غلظت پلیمر تا ۱۲٪ ثابت نگه داشته و حلال تغییر داده شد. همچنین به منظور در نظر گرفتن اثر نانوذرات بیوسرامیکی، مقدار تقویت‌کننده به میزان ۱ درصد (کمترین میزان) ثابت نگه داشته شد. برای انتخاب حلال ذکر این نکته ضروری به نظر می‌رسد که *PCL* پلیمری است که تنها در حلال‌های آلی انحلال پذیر است. همچنین در بسیاری از مقالات از حلال کلروفرم به منظور انحلال *PCL* استفاده شده است. از طرفی دیگر برای پراکنده‌سازی متناسب نانوذرات درون زمینه پلیمری سیستم نیازمند حلال قطبی است که برای این منظور از اتانول و نیز متانول استفاده می‌شود. این مواد از قوی‌ترین حلال‌ها برای پراکنده‌سازی نانوذرات آبدوست هستند. شکل (۱) تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از داربست نانوکامپوزیتی *PCL / nMg-FA* را با استفاده از سیستم‌های حلال مختلف نشان می‌دهد. از نمادهای *Ch*، *Ch/Et*، *Ch/Me* به ترتیب برای سیستم‌های کلروفرم خالص، کلروفرم/اتانول و کلروفرم/متانول استفاده شده است. جدول (۱) برخی خواص حلال‌های مورد استفاده در این مطالعه را نشان می‌دهد. داده‌های این جدول اتانول نسبت به متانول، مشابهت بیشتری به کلروفرم دارد. در محلول حاوی کلروفرم خالص، الیاف قطور و غیر یکنواخت‌اند

کمتر از سیستم اتانول/کلروفرم است؛ اما در این سیستم گره مشاهده می‌شود و از طرف دیگر توزیع قطر الیاف در این سیستم پهن‌تر است. همچنین با توجه به کاربرد مهندسی بافت داربست نانوکامپوزیتی بهتر است از اتانول- که حلال سبزی است- استفاده شود. براساس نتایج بدست آمده از بررسی سیستم حلال با استفاده از تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی سیستم حلال اتانول/کلروفرم برای بررسی بیشتر استفاده شد.

از طرفی دیگر نانوذرات در این سیستم لخته شده‌اند [قسمت (ب) شکل (۱)]. به نظر می‌رسد قسمت آلی (پلیمر و کلروفرم) و قسمت معدنی ($nMg-FA$) برهم‌کنش مناسبی با یکدیگر ندارند و در نتیجه نانوذرات به یکدیگر می‌چسبند [۲۱، ۲۴]. در سیستم‌های دوتایی قطر الیاف کاهش یافته (کمتر از ۶۰۰ نانومتر) که می‌تواند به دلیل افزایش هدایت الکتریکی محلول الکترولیتی باشد. قطر الیاف در سیستم حاوی متانول برابر 0.548 ± 0.342 و اتانول 0.692 ± 0.0783 است. قطر الیاف در سیستم متانول/کلروفرم



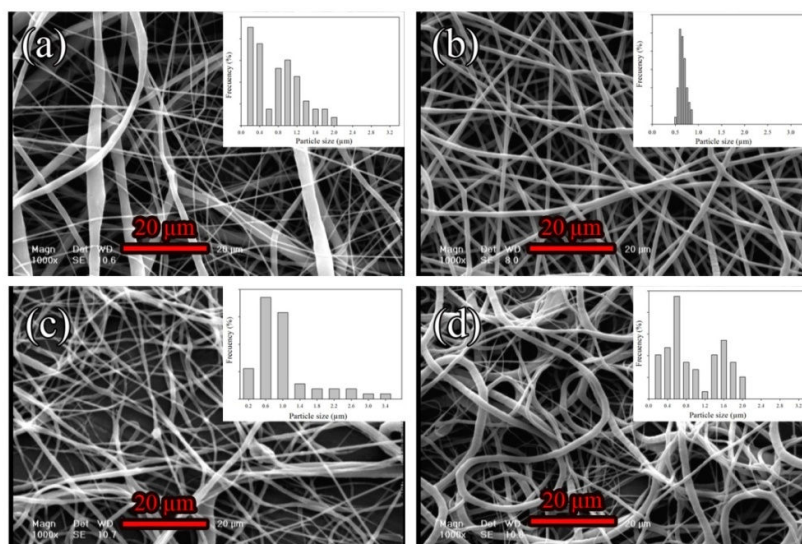
شکل (۱)- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی و توزیع قطر الیاف برای سیستم‌های حلال مختلف: (a) و (b) کلروفرم (Ch)، (c) اتانول/کلروفرم (Et/Ch) و (d) متانول/کلروفرم (Me/Ch).

جدول (۱) - برخی خواص حلال‌های مورد استفاده

حلال	پارامتر حلالیت ($MPa^{-1/2}$)	ثابت دی الکتریک	چگالی ویژه (g/cm^3)	ویسکوزیته (cP)	دمای جوش ($^{\circ}C$)	فشار بخار ($mmHg$)
کلروفرم	۱۸/۸۴	۴/۸۰	۱/۴۸	۰/۵۸	۶۱/۷	۱۶۰
متانول	۲۹/۲۰	۳۳/۰	۰/۷۹	۰/۶	۶۴/۷	۹۶
اتانول	۲۶/۲۰	۲۴/۳	۰/۷۹	۱/۱	۷۸/۴	۴۳/۷

با افزایش بیشتر اتانول در سیستم حلال، قطر الیاف افزایش می‌یابد. می‌توان بیان کرد در ابتدا افزایش درصد حلال هدایت الکتریکی را افزایش می‌دهد و در نتیجه قطر الیاف کاهش می‌یابد؛ اما با ادامه روند عامل ویسکوزیته حلال نیز مؤثر واقع شده؛ باعث می‌شود ویسکوزیته محلول افزایش یابد و در نتیجه قطر الیاف بیشتر می‌شود. ویسکوزیته اتانول تقریباً دو برابر کلروفرم است. با توجه به این نتایج سیستم حلال اتانول/کلروفرم با درصد ۸۰:۲۰ انتخاب شد. داده‌های مربوط به شکل‌های (۱) و (۲) در جدول (۲) ارائه شده است.

ویسکوزیته و هدایت الکتریکی حلال با افزایش درصد اتانول افزایش می‌یابد؛ لذا در این سیستم برای ایجاد الیاف نازک‌تر این دو پارامتر با یکدیگر در رقابت هستند. بدین منظور درصد اتانول موجود در سیستم حلال بررسی شد. شکل (۲) تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از سیستم حلال اتانول/کلروفرم را برای درصدهای مختلف اتانول نشان می‌دهد. مقدار اتانول ۱۰، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ انتخاب شدند. در ابتدا با افزایش مقدار اتانول قطر الیاف و نمودار توزیع اندازه کاهش می‌یابد؛ اما



شکل (۲) - تصاویر میکروسکوپ الکترونی و نمودار توزیع قطر الیاف در سیستم حلال اتانول/کلروفرم برای درصدهای مختلف اتانول؛ (a) Et 10،

(b) Et 20، (c) Et 25 و (d) Et 30.

جدول (۲) - اندازه قطر الیاف و انحراف استاندارد آن‌ها در سیستم‌های مختلف حلال.

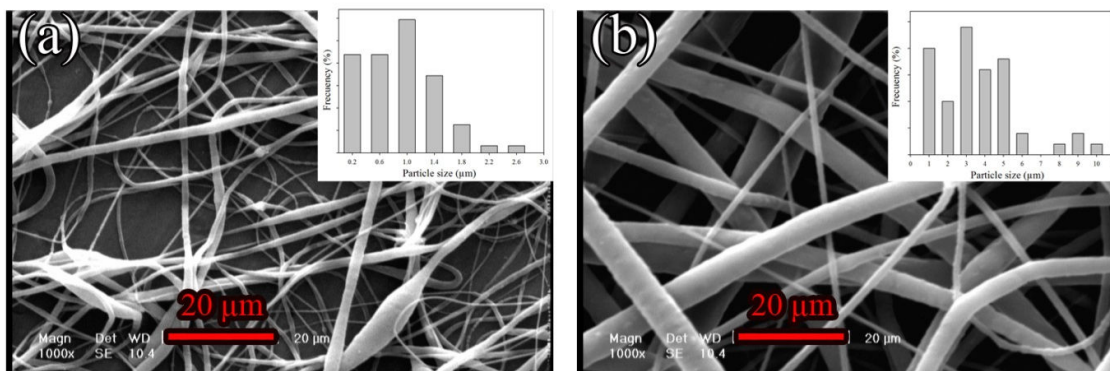
سیستم حلال	نماد	اندازه قطر الیاف (nm)	انحراف استاندارد
کلروفرم	<i>Ch</i>	۲۷۸۷	۱۲۰۳
متانول/کلروفرم	<i>Mt/Ch</i>	۵۴۸	۳۴۲
اتانول/کلروفرم	<i>Et/Ch</i>	۶۹۲	۷۸/۳

سیستم حلال دوتایی اتانول/کلروفرم				
انحراف استاندارد	اندازه قطر الیاف (nm)	نماد	کلروفرم	اتانول
۵۴۰	۸۷۲	<i>Et 10</i>	۹۰	۱۰
۷۸/۳	۶۹۲	<i>Et 20</i>	۸۰	۲۰
۸۲۴	۱۱۹۴	<i>Et 25</i>	۷۵	۲۵
۵۶۶	۱۰۶۷	<i>Et 30</i>	۷۰	۳۰

که الیاف تشکیل نمی‌شوند و فقط محلول بر روی صفحه آلومینیومی اسپری می‌شود. در غلظت‌های پایین پلیمر، زنجیره‌های پلیمری نمی‌توانند جت و مخروط تیلور پایدار و مناسبی را ایجاد کنند. همچنین در غلظت‌های زیاد، ویسکوزیته محلول بسیار زیاد است، به گونه‌ای که تبخیر حلال و جامد شدن محلول بسیار سریع رخ می‌دهد و باعث بسته شدن نازل خروجی می‌شود [۲۱]. با افزایش غلظت پلیمر و در نتیجه افزایش ویسکوزیته محلول، گره حذف شده و قطر الیاف افزایش می‌یابد. با توجه به آزمایش‌های انجام شده بهینه غلظت پلیمر بدست آمده ۱۲ درصد است. این نمونه بدون گره و از توزیع قطر الیاف مناسبی برخوردار است.

۳-۲- بررسی اثر غلظت پلیمر

از دیگر پارامترهای مهم فرایند الکتروریسی غلظت پلیمر مورد استفاده، است. غلظت پلیمر رابطه مستقیمی با ویسکوزیته محلول دارد به طوری که با افزایش غلظت پلیمر، ویسکوزیته محلول افزایش می‌یابد. در این پروژه غلظت پلیمر ۸، ۱۰، ۱۲ و ۱۴ درصد وزنی/حجمی حلال انتخاب شد. شکل (۳) مربوط به تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی محلول حاوی ۱۰ و ۱۴ درصد پلیمر است. محلول حاوی ۱۲ درصد پلیمر در قسمت (ب) شکل (۲) نشان داده شده است. در محلول‌های حاوی کمتر از ۸ درصد پلیمر، ویسکوزیته محلول بسیار کم است، به گونه‌ای

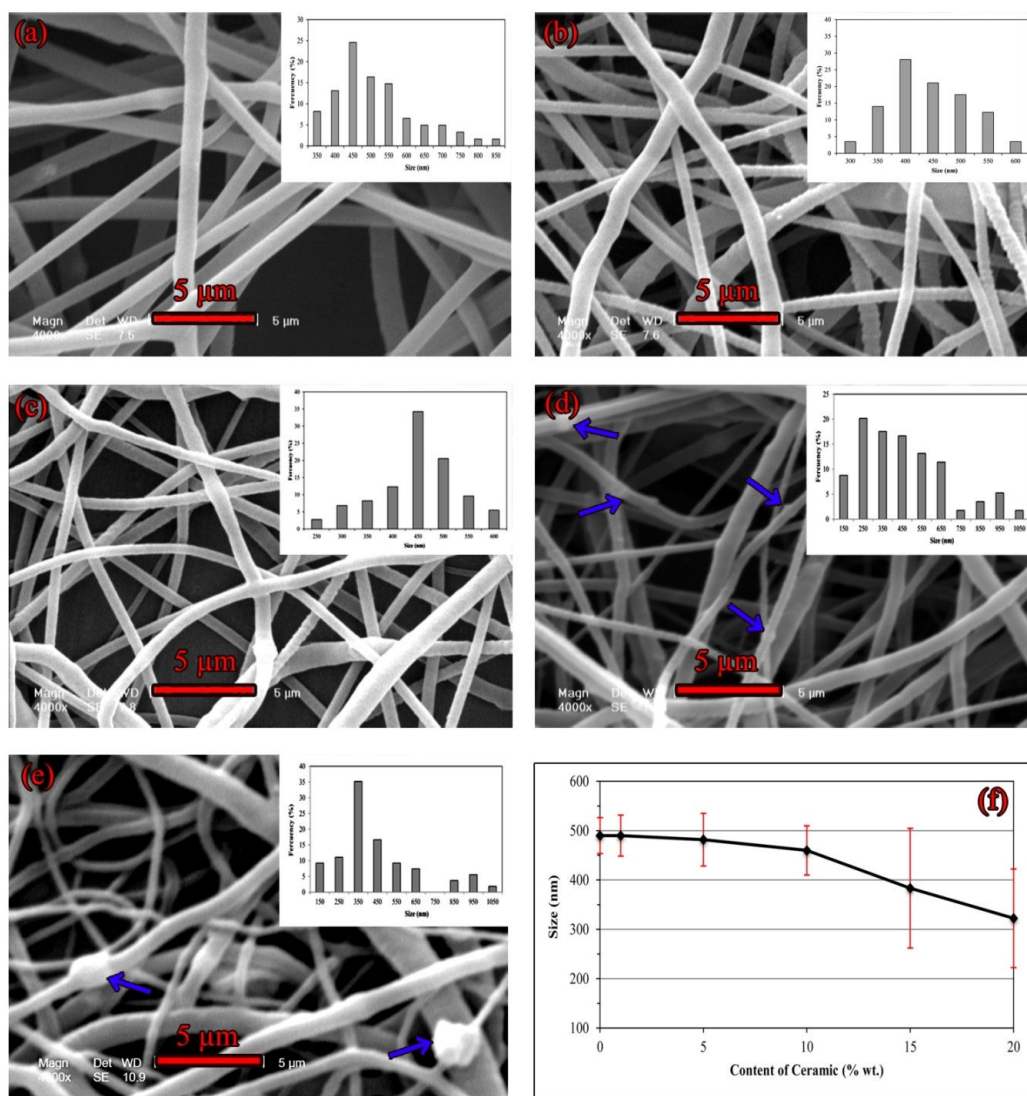


شکل (۳) - تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی و نمودار توزیع قطر الیاف نمونه‌های حاوی (a) ۱۰ و (b) ۱۴ درصد وزنی پلیمر در سیستم حلال اتانول:کلروفرم (۸۰:۲۰).

الکتریکی ثابت، نیروی کششی جت بیشتر است. افزایش نیروی کششی سطح باعث می‌شود دافعه درونی محلول بر سطح افزایش یافته و در نتیجه قطر الیاف کاهش یابد [۲۱]. بنابراین با افزایش غلظت نانوذرات، کاهش قطر الیاف و نیز افزایش لخته شدن ذرات درون زمینه پلیمری مشاهده شد. همچنین توزیع اندازه قطر الیاف نیز پهن‌تر می‌شود که می‌تواند به دلیل ناپایداری مخروط تیلور و یا تشکیل جت‌های چندگانه باشد. نحوه توزیع نانوذرات در زمینه پلیمری بر خواص زیستی مانند زیست‌سازگاری، زیست‌تخریب پذیری و کشت سلولی بسیار مؤثر است [۱۸]. همان‌طور که در شکل (۴) نشان داده شده است، در نمونه‌های حاوی ۱۵ و ۲۰ درصد، نانوذرات لخته شده‌اند (پیکان‌های آبی نشان دهنده نانوذرات لخته شده‌اند).

۳-۳- بررسی اثر غلظت نانو ذرات

غلظت نانوذرات بیوسرامیکی و نحوه توزیع آن‌ها در داربست با هدف مهندسی بافت بسیار اهمیت دارد، زیرا نحوه توزیع ذرات بر خواص زیستی نانوکامپوزیت مؤثر است. در این پژوهش مقدار بیوسرامیک ۱، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد انتخاب شد. با توجه به اینکه اتانول حلالی قطبی است، به راحتی نانوذرات در محلول اتانول پراکنده می‌شوند. تصاویر میکروسکوپ الکترونی نشان داده است که با افزایش غلظت نانوذرات بیوسرامیک قطر الیاف کاهش می‌یابد. با توجه به اینکه افزودن نانوذرات منیزیم فلئورآپاتیت باعث افزایش هدایت الکتریکی محلول می‌شود، می‌توان کاهش قطر الیاف نانوکامپوزیت را با افزایش غلظت نانوذرات بیوسرامیک پیش‌بینی کرد [۱۶]. محلول با هدایت الکتریکی زیاد، چگالی بار سطحی بیشتری دارد و در میدان



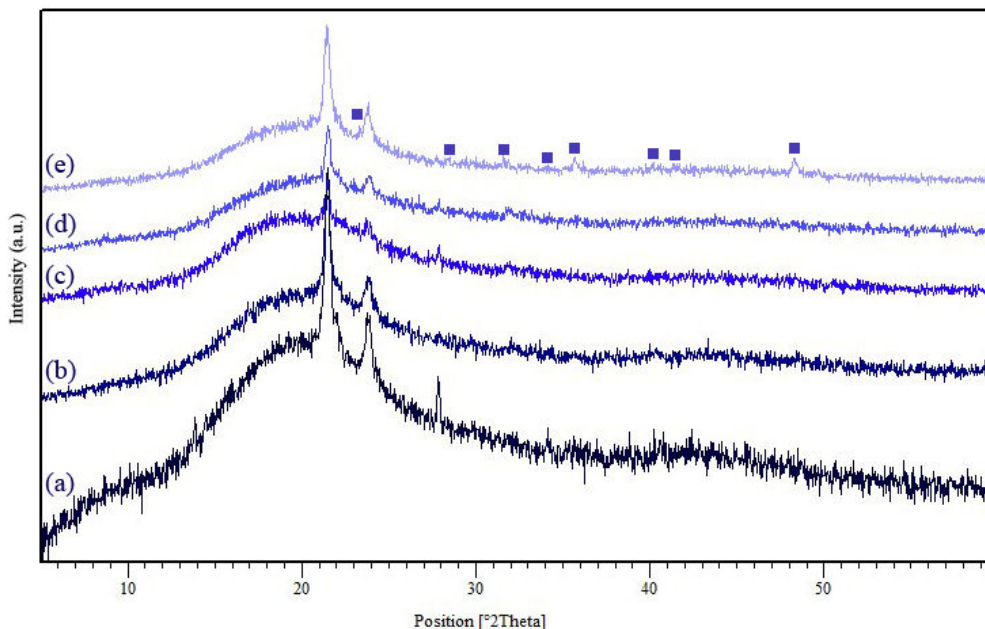
شکل (۴) - تصاویر میکروسکوپ الکترونی و توزیع اندازه قطر الیاف (a) ۱، (b) ۵، (c) ۱۰، (d) ۱۵ و (e) ۲۰ درصد وزنی حاوی نانوذرات منیزیم فلئورآپاتیت و (f) نمودار تغییرات قطر الیاف نسبت به غلظت نانوذرات.

دو پیک مشخصه در حدود زوایای $21/4882$ و $23/8277$ است [۲۷-۲۵]. با افزایش مقدار نانوذرات بیوسرامیکی درون زمینه پلیمری، شدت پیک‌های مربوط به آن نیز افزایش می‌یابد. همچنین الگوی پراش داربست نانوکامپوزیتی، پیک اضافی مبنی بر حضور ناخالصی درون داربست نانوکامپوزیتی را نشان نمی‌دهد.

۴-۳-۴- مشخصه‌یابی داربست نانوکامپوزیتی بهینه شده

۴-۳-۱- بررسی ساختار داربست نانوکامپوزیتی

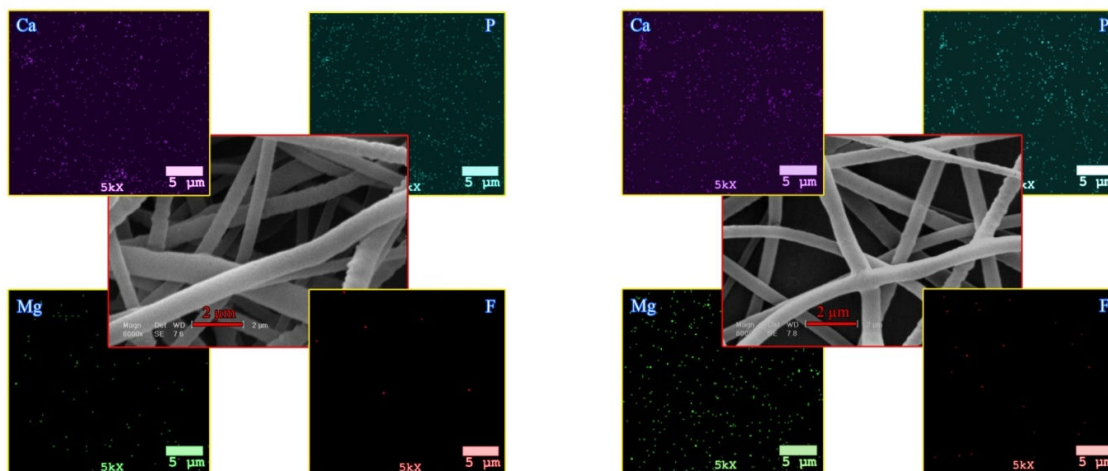
شکل (۵) الگوی پراش اشعه ایکس داربست نانوکامپوزیتی حاوی ۱، ۵، ۱۰ و ۱۵ درصد وزنی نانوذرات منیزیم فلئورآپاتیت است که با الگوی پراش داربست پلی ۴- کاپرولاکتون خالص مقایسه شده‌اند. پلی ۴-کاپرولاکتون دارای



شکل (۵) - الگوی پراش داربست PCL خالص و داربست نانوکامپوزیتی حاوی (b) ۱، (c) ۵، (d) ۱۰ و (e) ۱۵ درصد وزنی نانوذرات منیزیم فلئورآپاتیت.

می‌توان دریافت که نانوذرات به خوبی درون نانوالیاف پلیمری توزیع شده‌اند؛ اگر چه با افزایش مقدار نانوذرات، لخته شدن مشاهده می‌شود [شکل (۶) قسمت‌های (الف) و (ب)]. شدت نسبی عناصر با افزایش غلظت و نیز وزن اتمی رابطه‌ای مستقیم دارد. بنابراین در نمونه حاوی ۱۰ درصد نانوذرات شدت عناصر یکسان افزایش می‌یابد. از طرف دیگر با افزایش عدد اتمی شدت نسبی عناصر افزایش می‌یابد [۱۹].

۳-۲-۴- بررسی نحوه توزیع نانوذرات منیزیم فلئورآپاتیت درون داربست نانوکامپوزیتی
به منظور بررسی نحوه توزیع نانوذرات در زمینه پلیمری به طور هم‌زمان از نقشه‌برداری اشعه ایکس و میکروسکوپ الکترونی عبوری استفاده شد. شکل (۶) نقشه‌برداری اشعه ایکس داربست نانوکامپوزیتی حاوی ۵ و ۱۰ درصد وزنی نانوذرات منیزیم فلئورآپاتیت را نشان می‌دهد. این تصاویر مربوط به عناصر کلسیم، فسفر، منیزیم و فلئور هستند. با توجه به شکل (۶)



(الف)

(ب)

شکل (۶)- نقشه اشعه ایکس داربست نانوکامپوزیتی حاوی (الف) ۵ و (ب) ۱۰ درصد وزنی نانوذرات منیزیم فلوئورآپاتیت.

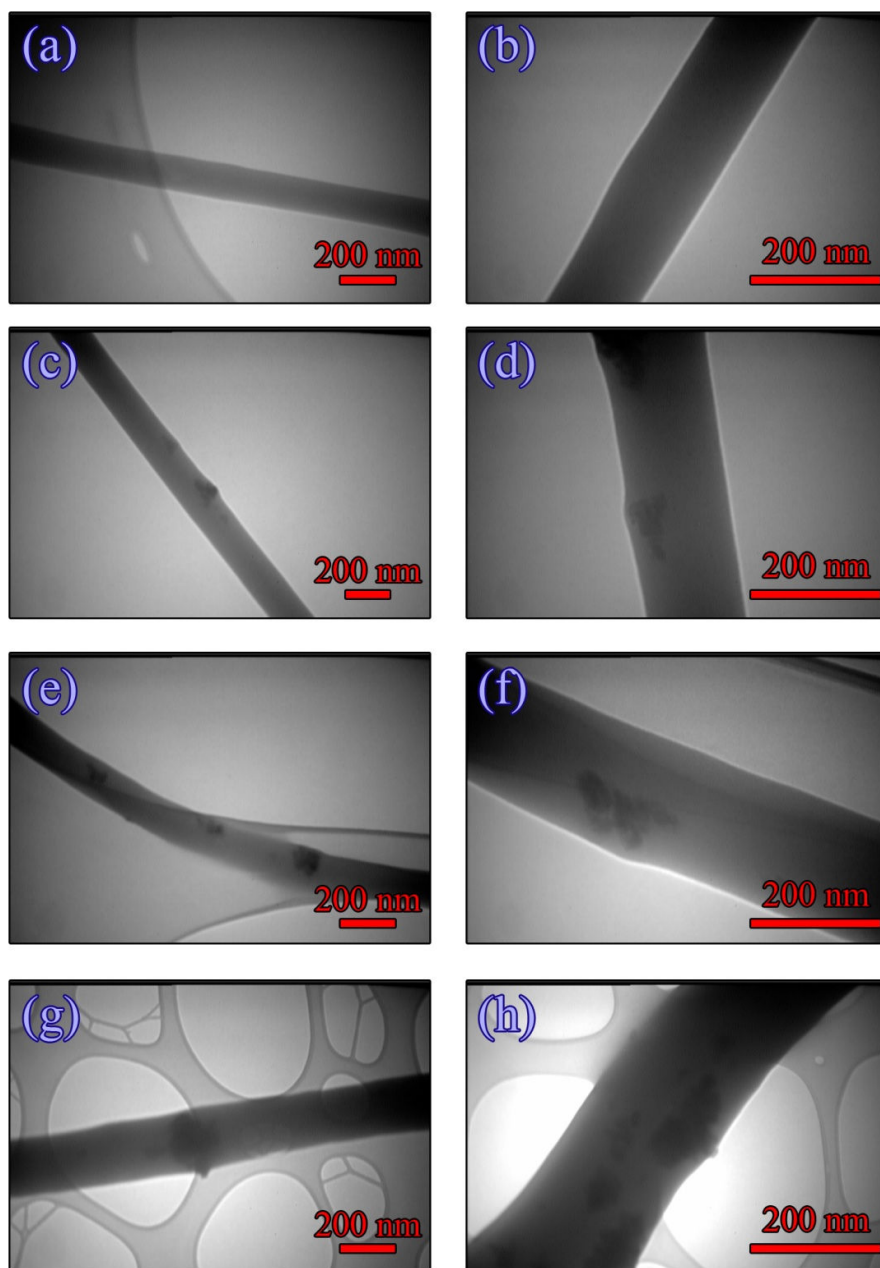
نانوکامپوزیتی حاوی ۵ درصد *nMg-FA* به صورت تک مرحله‌ای به ترتیب در محدوده دمایی 310°C - 470°C و 325°C - 600°C تخریب می‌شوند. کاهش وزن داربست پلیمری خالص و داربست نانوکامپوزیتی به ترتیب برابر $92/32$ و $88/26$ است. این کاهش وزن به دلیل تخریب نانوالیاف پلیمری است. همچنین با استفاده از این تحلیل می‌توان دریافت که حدود بیش از ۸۰٪ نانوذرات درون داربست نانوکامپوزیتی بارگذاری شده‌اند. همان‌طور که مشاهده می‌شود داربست نانوکامپوزیتی حاوی ۵٪ نانوذرات *nMg-FA* در دمای بیشتری تخریب می‌شوند که می‌تواند به دلیل حضور نانوذرات بیوسرامیکی و افزایش استحکام حرارتی نانوکامپوزیت باشد. این تغییر دما در حدود 5°C است. همچنین روند یکسان هر دو داربست (خالص و کامپوزیتی) نشان می‌دهد نانوذرات به صورت یکنواختی درون نانوالیاف قرار گرفته‌اند و تمام حلال مورد استفاده در فرایند الکترورسی در طی فرایند و بعد از آن تبخیر شده است. اهمیت این موضوع در این است که برای آزمایش‌های چسبندگی سلولی و میزان بقای سلول‌ها به مرحله پیش خشک کردن^{۱۰} نیازی نخواهد بود.

تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری از داربست نانوکامپوزیتی نحوه توزیع نانوذرات را درون زمینه پلیمری نشان می‌دهد (شکل (۷)). تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری نشان می‌دهد که نانوذرات *nMg-FA* درون نانوالیاف قرار گرفته‌اند؛ اگرچه به نظر می‌رسد مقدار کمی از نانوذرات بر سطح نانوالیاف قرار دارند. همچنین این تصاویر نشان می‌دهد که ابعاد نانوذرات درون پلیمر کمتر از ۱۰ نانومتر است [بخش‌های (ج) تا (و) شکل (۷)]; هر چند با افزایش مقدار نانوذرات، لخته شدن نیز افزایش می‌یابد.

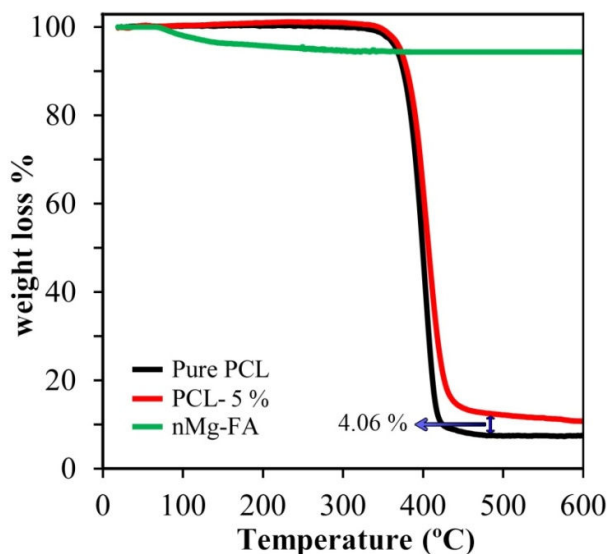
۳-۴-۳- بررسی ویژگی‌های گرمایی

ویژگی‌های گرمایی نانوذرات تهیه شده و داربست نانوکامپوزیتی ساخته شده با استفاده از تحلیل حرارتی وزن‌سنجی بررسی شدند (شکل (۸)). این بررسی‌ها نشان داد نانوذرات *nMg-FA* حدود $5/67$ درصد از وزن خود را در دمای 65 - 120 درجه سانتی‌گراد از دست می‌دهند. این کاهش وزن به دلیل از دست دادن مولکول‌های آب جذب سطحی شده بر روی نانوذرات است. همچنین داربست پلیمری خالص و داربست

¹⁰ Pre-drying step



شکل (۷) - تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری داربست الف، ب) پلیمر خالص؛ نانوکامپوزیت حاوی ج، د) ۱٪؛ ه، و) ۰.۵٪؛ ز، ح) ۱۰٪؛ نانوذرات nMg-FA



شکل (۸) - نمودار تحلیل حرارتی وزن‌سنجی نانوذرات nMg-FA داربست پلیمری خالص و داربست نانوکامپوزیتی حاوی ۵٪ nMg-FA.

۳-۴-۴- بررسی رفتار مکانیکی

با توجه به کاربرد داربست‌های ساخته شده به عنوان مهندسی بافت استخوان، ویژگی‌های مکانیکی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند. برای بررسی خواص مکانیکی از آزمون تست کششی استفاده شد. برای این منظور نمونه‌هایی به شکل مستطیل و با ابعاد 5×1 سانتی‌متر مربع بریده شدند و برای هر نمونه ۵ تکرار در نظر گرفته شد. نتایج آزمون در شکل (۹) و جدول (۳) نمایش داده شده است. همانطور که نمودار تنش-کرنش نمونه‌ها نشان می‌دهد در ابتدا (فشار کمتر از ۱۰٪) داربست‌ها از قانون هوک^{۱۱} تبعیت می‌کنند و نمودار به صورت خطی افزایش می‌یابد؛ اما با افزایش فشار نمودار از حالت خطی خارج می‌شود. تغییرات نمودار به مقدار نانوذرات درون الیاف بستگی دارد. در ابتدا با افزایش میزان نانوذرات بیوسرامیکی (۰.۵٪)، استحکام کششی نیز افزایش می‌یابد. با افزایش بیشتر نانوذرات درون کامپوزیت، خواص مکانیکی کاهش می‌یابد. به عنوان مثال کرنش شکست تا میزان $291/7 \pm 13/8$ کاهش می‌یابد. همچنین مدول کششی در غلظت ۲/۵٪ وزنی کاهش می‌یابد. این نتایج به دلیل حضور نانوذرات لخته شده و ساختار ناهمگن داربست

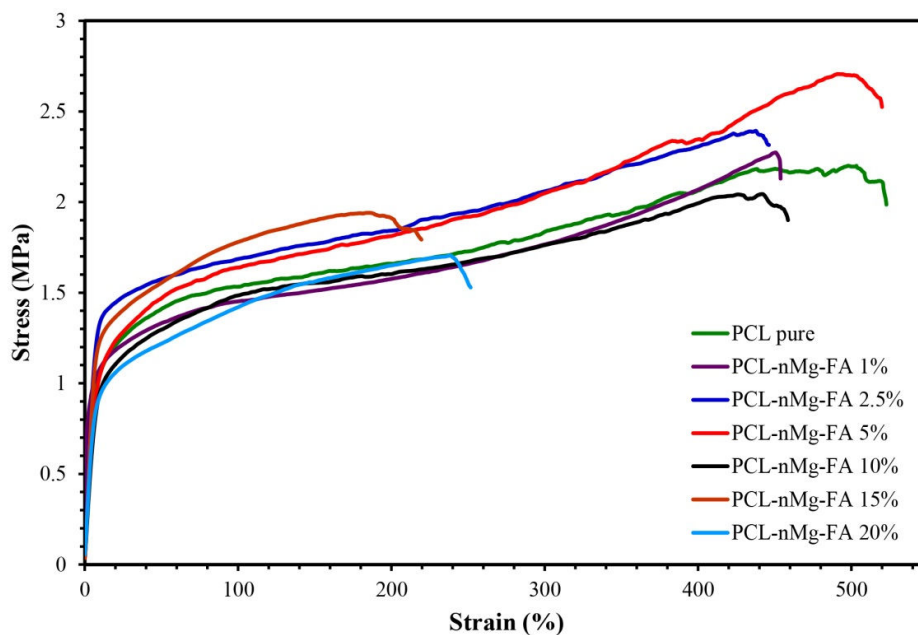
نانوکامپوزیتی حاصل شده‌اند (شکل‌های (۴) و (۷)). براساس نتایج پژوهش‌های انجام شده بر داربست‌های الکترورسی شده از جنس پلی ۴-کاپرولاکتون، با افزایش نانوذرات کرنش کاهش می‌یابد [۲۹، ۲۸]. یانگ و همکارانش گزارش کردند که با افزایش مقدار نانوذرات هیدروکسی آپاتیت درون داربست پلی ۴-کاپرولاکتون خواص مکانیکی افزایش می‌یابد. آن‌ها پیشنهاد کردند خواص مکانیکی تقویت‌کننده را می‌توان با استفاده از مکانیسم اتلاف انرژی اضافی^{۱۲} توضیح داد. این مکانیسم براساس حرکت نانوذرات است. در این فرایند نانوذرات تحت تأثیر نیروی کششی آرایش می‌یابند و پیوندهایی موقتی بین زنجیره‌های پلیمری ایجاد می‌کنند؛ به این ترتیب ناحیه پراثری ایجاد می‌شود و خواص مکانیکی افزایش می‌یابد [۲۸]. همچنین تحقیقات بیانکو و همکارانش نشان می‌دهد که با افزایش مقدار نانوذرات هیدروکسی آپاتیت به بیش از ۳/۶ درصد وزنی، خواص مکانیکی کاهش می‌یابد [۲۹]. با افزایش نانوذرات، به دلیل لخته شده آن‌ها خواص مکانیکی کاهش خواهد یافت؛ اگرچه خواص زیستی داربست افزایش می‌یابد.

¹¹ Hooke's law

¹² Additional energy-dissipating mechanism

از طرف دیگر مدول الاستیک و استحکام داربست با کاهش قطر الیاف، افزایش می‌یابد. در الیاف نازک‌تر از ۷۰۰ نانومتر، اندازه قطر الیاف بر سفتی و استحکام کششی بیشتر تأثیر گذار است. بعلاوه شکل‌پذیری داربست با کاهش قطر الیاف افزایش می‌یابد [۲۰]. مدول کششی نیز با افزایش غلظت نانوذرات در نمونه تا نمونه حاوی ۱۵ درصد وزنی *nMg-FA* افزایش می‌یابد. به نظر می‌رسد قطر الیاف و غلظت بیوسرامیک با هم در رقابت هستند؛ بنابراین با افزایش غلظت نانوذرات قطر الیاف کاهش می‌یابد، اما لخته شدن نانوذرات افزایش می‌یابد. در نمونه‌های حاوی ۱۰ و ۱۵ درصد وزنی *nMg-FA* قطر الیاف از ۶۶۰ به ۳۸۳ نانومتر کاهش می‌یابد. بنابراین استحکام کششی داربست افزایش می‌یابد.

افزایش نانوذرات به ۲۰ درصد وزنی، قطر الیاف به میزان تقریباً ۱۶ درصد کاهش می‌یابد در حالی که قطر الیاف در مرحله قبل (افزایش غلظت نانوذرات تا میزان ۱۵ درصد) به میزان ۲۰ درصد کاهش یافته است. از طرف دیگر با افزایش مقدار نانوذرات، میزان لخته شدن آن‌ها افزایش می‌یابد. در نهایت تقابل بین افزایش لخته شدن نانوذرات و کاهش قطر الیاف باعث می‌شود استحکام داربست در ۲۰ درصد وزنی *nMg-FA* کاهش یابد. بنابراین روند طبیعی تغییرات استحکام کششی با افزایش نانوذرات ادامه پیدا می‌کند.



شکل (۱۲) - منحنی تنش - کرنش مربوط به داربست نانوکامپوزیتی حاوی درصد‌های مختلف وزنی *nMg-FA*

جدول (۵) - خواص مکانیکی داربست نانوکامپوزیتی حاوی درصد‌های مختلف وزنی nMg-FA.

نمونه	تنش (MPa)	کرنش (%)	مدول یانگ (MPa)
PCL Pure	۲/۲۹±۰/۱۳	۴۴۴/۸±۴۶/۲	۱۴/۹±۲/۸
PCL-1%	۱/۸۷±۰/۳۵	۳۱۹/۰±۱۲/۱	۳۸/۵±۴/۳
PCL-2.5%	۲/۵۸±۰/۱۴	۴۷۱/۸±۱۱/۹	۱۷/۴۳±۳/۵
PCL-5%	۲/۳۴±۰/۴۵	۴۰۸/۶±۱۲/۸	۱۰/۲±۲/۶
PCL-10%	۱/۶۷±۰/۳۴	۲۹۱/۷±۱۳/۸	۹/۸±۱/۵
PCL-15%	۱/۸۳±۰/۱	۱۵۵/۶±۳/۹	۱۵/۴±۲/۷
PCL-20%	۱/۶۴±۰/۱۲	۲۳۶/۶±۱۰/۳۵	۱۱/۹±۱/۴

۴- بحث و نتیجه گیری

محصول جانبی در نانوکامپوزیت وجود ندارد. تحلیل TGA نشان می‌دهد پایداری حرارتی نانوکامپوزیت با افزودن نانوذرات بیوسرامیکی به سیستم افزایش می‌یابد. همچنین این تحلیل نشان می‌دهد که بیش از ۸۰ درصد نانوذرات درون داربست بارگذاری شده‌اند. بررسی خواص مکانیکی نشان داد که با افزودن ۵٪ نانوذرات به سیستم می‌توان خواص مکانیکی را افزایش داد؛ اما با افزایش بیش از این میزان خواص مکانیکی افت خواهد کرد. براساس داده‌های بدست آمده با کاهش قطر الیاف و مقدار نانوذرات درون الیاف، استحکام داربست افزایش می‌یابد. بیشترین استحکام کششی مربوط به نانوکامپوزیت حاوی ۵٪ nMg-FA است. براین اساس می‌توان نانوکامپوزیت بدست آمده با استفاده از روش الکتروریسی رابه عنوان داربست مناسبی برای بازسازی بافت استخوان در نظر گرفت.

همچنین می‌توان بیان کرد که این روش، آسان و از نظر اقتصادی با صرفه است و با تغییر پارامترهای آن نیز می‌توان نانوالیاف مورد نظر را بدست آورد. همچنین مطالعه خواص زیستی داربست نانوکامپوزیتی می‌تواند جالب توجه باشد. بعلاوه به نظر می‌رسد با افزودن نانوذرات nMg-FA به داربست پلیمری، خواص آبدوستی، زیست سازگاری و زیست تخریب پذیری افزایش می‌یابد.

در این پژوهش داربست‌های نانوکامپوزیتی پلی ۴-کاپرولاکتون حاوی درصد‌های مختلف وزنی nMg-FA با استفاده از روش الکتروریسندگی تهیه شدند. برای بدست آوردن بهترین نتیجه، اثر حلال و غلظت پلیمر و نانوذرات بیوسرامیکی بررسی شدند. براساس مطالعات انجام شده تغییرات حلال بیشترین اثر را بر قطر و سایر خواص الیاف دارد. به دلیل حضور نانوذرات nMg-FA استفاده از حلال قطبی اجتناب‌ناپذیر است، بنابراین دو سیستم اتانول/کلروفرم و متانول/کلروفرم بررسی شدند. بر طبق شکل (۴) و جدول (۳) بهترین سیستم حلال اتانول/کلروفرم با نسبت ۲۰:۸۰ انتخاب شد. در این سیستم نانوالیاف باریک و بسیار یکنواخت بودند. همچنین تغییرات غلظت پلیمر بر اندازه قطر الیاف مؤثر است، به طوری که با افزایش غلظت پلیمر، قطر الیاف افزایش می‌یابد. در این مطالعه الکتروریسی محلول ۱۲ درصد وزنی پلیمر PCL تحت پتانسیل ۲۵ کیلوولت و فاصله ۲۰ سانتی‌متر بهینه نانوالیاف را ایجاد کرد. توزیع نانوذرات درون داربست نانوکامپوزیتی نیز با استفاده از نقشه‌برداری اشعه ایکس و میکروسکوپ الکترونی عبوری بررسی شد. بعلاوه با افزایش غلظت نانوذرات، لخته شدن افزایش می‌یابد. در الگوی پراش پرتو ایکس هیچ پیک اضافی مبنی بر حضور ناخالصی و یا

۵- مراجع

- R.E.S., Influence of the microstructure and mechanical strength of nanofibers of biodegradable polymers with hydroxyapatite in stem cells growth. *Electrospinning, characterization and cell viability; Polymer Degradation and Stability*, 2012; 97:2037.
- [17] Hohman M.M., Shin Y.M., Rutledge G., Brenner M.P., Electrospinning and electrically forced jets.II. Applications; *Phys Fluids*, 2001; 13: 2221.
- [18] Moghe A.K., Hufenus R. Hudson S.M., Gupta B.S., Effect of the addition of a fugitive salt on electrospinnability of poly (3-caprolactone); *Polymer*, 2009; 50: 3311.
- [19] Yang F., Both S.K., Yang X., Walboomers X. F., Jansen J.A., Development of an electrospun nano-apatite/PCL composite membrane for GTR/GBR application; *ActaBiomaterialia*, 2009; 5: 3295.
- [20] Moghe A.K., Hufenus R. Hudson S.M., Gupta B.S., Effect of the addition of a fugitive salt on electrospinnability of poly (3-caprolactone); *Polymer*, 2009; 50: 3311.
- [21] Schueren L. V., Schoenmaker B. D., Kalaoglu O. I., Clerck, K. D., An alternative solvent system for the steady state electrospinning of polycaprolactone; *European Polymer Journal*, 2011; 47: 1256.
- [22] Lu C., Chen P., Li, J., Zhang Y., Computer simulation of electrospinning. Part I. Effect of solvent in electrospinning; *Polymer*, 2006; 47: 915.
- [23] Thompson C.J., Chase G.G., Yarin A.L., Reneker D.H., Effects of parameters on nanofiber diameter determined from electrospinning model; *Polymer*, 2007; 48: 6913.
- [24] Lowery J.L., Datta N., Rutledge G.C., Effect of fiber diameter, pore size and seeding method on growth of human dermal fibroblasts in electrospun poly (3-caprolactone) fibrous mats; *Biomaterials*, 2010; 31: 491.
- [25] Wang Y., Liu L., Guo S., Characterization of biodegradable and cytocompatible nano-hydroxyapatite/polycaprolactone porous scaffolds in degradation in vitro; *Polym. Degrad. Stab.*, 2010; 95: 207.
- [26] Johari N., Fathi M.H., Golozar M.A., Fabrication, characterization and evaluation of the mechanical properties of poly (ϵ -caprolactone) / nano-fluoridated hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering; *Composites: Part B*, 2012; 43: 1671.
- [27] Diba M., Fathi M.H., Kharaziha M., Novel forsterite/polycaprolactone nanocomposite scaffold for tissue engineering applications; *Materials Letters*, 2011; 65: 1931.
- [28] Yang F., Both S.K., Yang X., Walboomers X. F., Jansen J.A., Development of an electrospun nano-apatite/PCL composite membrane for GTR/GBR application; *ActaBiomaterialia*, 2009; 5: 3295.
- [29] Bianco A., Federico E.D., Moscatelli I., Camaioni A., Armentano I., Campagnolo L., Dottori M., Kenny J.M., Siracusa G., Gusmano G., Electrospun poly(ϵ -caprolactone)/Ca-deficient hydroxyapatite nanohybrids: Microstructure, mechanical properties and cell response by murine embryonic stem cells; [1] Lanza R., Langer R., Vacanti J., Principles of Tissue Engineering; 3rd ed. Academic Press, San Diego. Bailey, AE, 1979.
- [2] Wang M., Developing bioactive composite materials for tissue replacement; *Biomaterials*, 2003; 24: 2133-2151.
- [3] Li W.J., Laurencin C.T., Caterson E.J., Tuan R.S., Electrospun nanofibrous structure: a novel scaffold for tissue engineering; *J. Biomed Mater Res*, 2002; 60: 613-621.
- [4] Huang Z.M., Zhang Y.Z., Kotaki, M., Ramakrishna S., A review on nanocomposites; *Comp. Sci. Tech.*, 2003; 63: 2223.
- [5] Li W.J., Tuli R., Okafor C., Derfoul A., Danielson K.G., Hall D.G., Tuan R. S., A three-dimensional nanofibrous scaffold for cartilage tissue engineering using human mesenchymal stem cells; *Biomaterials*, 2005; 26: 599.
- [6] Witte F., Hort N., Vogt C., Cohen S., Kainer K.U., Willumeit R., Degradable biomaterials based on magnesium corrosion; *J. Curr.Opin.in Solid-State and Mater. Sci.*, 2008; 12: 63.
- [7] Yun Y., Dong Z., Yong D., Schulz M., Shanov V., Biodegradable Mg corrosion and osteoblast cell culture studies; *Mater.Sci. Eng. C*, 2009; 29: 1814.
- [8] Place E.S., George J., Williams C.K., Stevens M.M., Synthetic polymer scaffolds for tissue engineering; *Chem. Soc. Rev.*, 2009; 38:1139.
- [9] Lei Y., Rai B., Ho K., Teoh S., In vitro degradation of novel bioactive polycaprolactone-20% tricalcium phosphate composite scaffolds for bone engineering; *Mater SciEng C*, 2007; 27: 293.
- [10] Taddei P., Tinti A., Reggiani M., Fagnano C., In vitro mineralization of bioresorbablepoly (ϵ -caprolactone)/apatite composites for bone tissue engineering: a vibrational and thermal investigation; *J. MolStruct*, 2005; 744: 135.
- [11] Chen B., Sun K., Mechanical and dynamic viscoelastic properties of hydroxyapatite reinforced poly(ϵ -caprolactone); *Polym Test*, 2005; 24: 978.
- [12] Ciapetti G., Ambrosio L., Savarino L., Granchi D., Cenni E., Baldini N., Osteoblast growth and function in porous poly ϵ -caprolactone matrices for bone repair: a preliminary study; *Biomaterials*, 2003; 24: 3815.
- [13] Li W., Cooper J., Mauck R., Tuan R., Fabrication and characterization of six electrospun poly([alpha]-hydroxy ester)-based fibrous scaffolds for tissue engineering applications; *ActaBiomater*, 2006; 2: 377.
- [14] Kheradmandfard M., Fathi M.H., Preparation and characterization of Mg-doped fluorapatite nanopowders by sol-gel method; *Journal of Alloys and Compounds*, 2010; 504: 141.
- [15] Bhardwaj N., Kundu S.C., Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique; *Biotechnology Advances*, 2010; 28: 325.
- [16] Neto W.A.R., Pereira I.H.L., Ayres E., Paula A.C.C., Averous L., Góes A.M., Oréface R.L., Bretas

Materials Science and Engineering C, 2009; 29: 2063.

- [30] Wong S. C., Baji A., Leng S., Effect of fiber diameter on tensile properties of electrospun poly(ϵ -caprolactone); Polymer, 2008; 49, 4713.