

بررسی تأثیر نانوذرات هیدروکسی آپاتیت بر خواص نانوالیاف کراتین جهت کاربرد در مهندسی بافت

مرجان میرحاج^۱، محبوبه محمودی^{۱*} و علی شیبانی^۲

۱. گروه مهندسی پزشکی، واحد یزد، دانشگاه آزاد اسلامی، یزد، ایران

۲. گروه شیمی، واحد یزد، دانشگاه آزاد اسلامی، یزد، ایران

(دریافت مقاله: ۱۳۹۵/۱۰/۲۲ - دریافت نسخه نهایی: ۱۳۹۶/۰۵/۲۴)

چکیده - در این تحقیق، داربست کراتین/ پلی کاپرولاکتون/ هیدروکسی آپاتیت (HA) با روش الکتروریسی ساخته شد. سپس تأثیر نانوذرات HA بر خواص داربست B (کراتین ۳۳ درصد، پلی کاپرولاکتون ۵۰ درصد و هیدروکسی آپاتیت ۱۷ درصد) و داربست A (کراتین ۴۰ درصد و پلی کاپرولاکتون ۶۰ درصد) مورد بررسی قرار گرفت. مورفولوژی سطح، گروه‌های عاملی موجود بر سطح نمونه، درصد تخلخل و سطح ویژه داربست‌ها به ترتیب با میکروسکوپی الکترونی روبشی، طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوری، روش جابه‌جایی مایع و آزمون BET ارزیابی شد. متوسط قطر الیاف در نمونه A و B به ترتیب ۱۸۴ و ۱۰۸ نانومتر محاسبه شد. همچنین، نتایج آزمون‌ها حاکی از افزایش سطح ویژه داربست حاوی نانوذرات HA نسبت به داربست بدون نانوذرات HA تا تقریباً به میزان دو برابر بودند. با بررسی رفتار زیست تخریب پذیری داربست‌ها در محلول بافر فسفات، افزایش میزان کاهش وزن در داربست B مشاهده شد. درصد زنده‌مانی و چسبندگی سلول‌های استخوانی رده سلولی Saos-2 بر سطح داربست‌ها با روش MTT بررسی شد و افزایش رشد سلول‌ها بر سطح داربست PCI/Kr حاوی نانوذرات هیدروکسی آپاتیت مشاهده شد. بنابراین، داربست حاوی نانوذرات هیدروکسی آپاتیت می‌تواند گزینه مناسبی برای کاربرد در مهندسی بافت باشد.

واژه‌های کلیدی: کراتین، هیدروکسی آپاتیت، الکتروریسی، نانوالیاف، مهندسی بافت.

Effect of Hydroxyapatite Nanoparticles on Properties of Keratin/Poly Caprolactone Nanofibers for Tissue Engineering

M. Mirhaji¹, M. Mahmoodi^{1*} and Ali shybani²

1. Department of Biomedical Engineering, Yazd Branch, Islamic Azad University, Yazd, Iran.

2. Department of Chemistry, Yazd Branch, Islamic Azad University, Yazd, Iran.

Abstract: In this research, keratin (Kr)/ poly caprolactone (PCL)/ hydroxyapatite (HA) scaffold was made by electrospinning method. Then, the effect of HA nanoparticles on properties of scaffold B (Kr 33%, PCL 50% and HA 17%) and scaffold A (Kr 40% and PCL 60%) were studied. The surface morphology, functional groups on the surface of samples, porosity, and specific surface area were evaluated by Scanning Electron Microscopy (SEM), Fourier Transform Infrared Spectrophotometer (FTIR), liquid displacement method, and BET test, respectively. The mean diameter of fibers in samples A and B was measured 184 nm and 108 nm, respectively. Results showed that the specific surface area in scaffolds with HA nanoparticles was almost 2 times higher than that of the scaffold without HA. The biodegradability of scaffolds was examined in

* : مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: m.mahmoodi@iauyazd.ac.ir

phosphate buffer solution (PBS) and the results showed an increase in the weight loss percentage of the scaffold B. The cell viability and adherence of osteosarcoma cell line (Saos-2) on the scaffold surface was observed via MTT assay and the results showed an increase in cell growth on PCL/Kr scaffolds with HA nanoparticles. Thus, scaffolds containing HA nanoparticles can be a good choice for tissue engineering applications.

Keywords: Keratin, Hydroxyapatite, Electrospinning, Nanofibers, Tissue engineering.

۱- مقدمه

فیبرین، کلاژن، ژلاتین، آلژینات، کیتوسان، اسید هیالورونیک و کراتین (Kr) به طور گسترده برای ساخت داربست‌های مهندسی بافت به کار می‌روند [۱ و ۶].

کراتین دسته‌ای از پروتئین‌های فیبری شکل حاوی آمینو اسیدهای گوگرددار است. کراتین با توجه به مزایای زیست سازگاری ذاتی، زیست تخریب‌پذیری، خواص فیزیکی و مکانیکی، فراوانی طبیعی و خصوصیات ضد میکروبی، سازگاری سلولی بهینه‌ای را در داربست‌های مهندسی بافت به وجود می‌آورد [۱]. محصولات کراتینی، تحولی بزرگ در زمینه بیومواد در جهان ایجاد کرده‌اند. اما در بین مواد زیستی مشتق شده از طبیعت، آنهایی که مبتنی بر کراتین هستند دارای استحکام مکانیکی ضعیفی هستند [۷ و ۸]. بنابراین برای کنترل خواص فیزیکی و بیولوژیکی این بیوماده آن را با پلیمرهای مصنوعی به صورت کامپوزیت در پزشکی به کار می‌برند [۹ و ۱۰]. تحقیقات اخیر در مورد داربست‌های مبتنی بر کراتین به بهینه‌سازی استحکام مکانیکی و انعطاف‌پذیری داربست‌ها معطوف شده است، در حالی که فعالیت بیولوژیکی عالی آنها حفظ شود [۱۱].

پلی‌کاپرولاکتون یک پلی‌استر ترموپلاستیک زیست سازگار و دارای خواص مکانیکی عالی و پر کاربرد در زمینه زیست مواد و مهندسی بافت به شمار می‌رود. این پلیمر به آهستگی تخریب می‌شود و اجزای آزاد شده در نهایت توسط ماکروفاژها و سلول‌های بیگانه‌خوار غول‌آسا^۳ (FBGC) حذف می‌شود. PCL دارای خواص الاستومری، ازدیاد طول بالا، انحلال‌پذیری زیاد در حلال‌های آلی، ولی استحکام کششی نسبتاً پایین است [۱۲]. همچنین یاف پلی‌کاپرولاکتون به دلیل داشتن سطح به حجم بالا، می‌تواند سبب بهبود برهم‌کنش‌های سلول-داربست شود که در مهندسی بافت مورد اهمیت است [۱۳].

یکی از ضروریات جامعه نیاز شدید به تأمین اعضا، و بافت‌های آسیب دیده و از کار افتاده بیماران است. از آنجایی که روش‌های سنتی شامل پیوند اتوگرافت^۱ و الوگرافت^۲ دارای معایبی است، تکنیک‌های مهندسی بافت مطرح شده است [۱]. در زمینه بافت استخوان نیز چنین نیازی شدیداً حس می‌شود. شکستگی استخوان در نهایت به شکستگی‌های جوش نخورده منجر می‌شود که استفاده از تکیه‌گاه‌های موقت یا همان داربست‌ها به عنوان پلی برای جوش خوردن طبیعی استخوان و ترمیم توسط مهندسی بافت استخوان ارائه می‌شود. یکی از مسائل مهمی که در دو دهه اخیر در مهندسی بافت مطرح شده است، ساخت داربست زیست تخریب‌پذیر که بعد از ترمیم نقص عضو، خود به خود تخریب می‌شوند، است. برای این منظور بسیاری از محققان در تحقیقات خود از پلیمرهای مصنوعی و طبیعی با توجه به قابلیت ذاتی بیوشیمیایی، مکانیکی و ساختاری بسیار خاص آنها در تولید نانوالیاف برای کاربردهای گسترده‌ای در مهندسی پزشکی استفاده کرده‌اند [۲]. پلیمرهای مصنوعی شامل پلی‌لاکتیک اسید (PLA)، پلی‌گلیکولیک اسید (PGA) و پلی‌کاپرولاکتون (PCL) به طور گسترده در مهندسی بافت به کار می‌روند [۳]. پلیمرهای مصنوعی معمولاً خواص مکانیکی بهتری را نسبت به پلیمرهای طبیعی ارائه می‌دهند. اما آنها دارای سازگاری سلولی محدودی هستند که در درجه اول به خاصیت آبگریزی آنها مرتبط است [۴]. پلیمرهای طبیعی وقتی که به تنهایی استفاده می‌شوند، نمی‌توانند نانوالیافی با استحکام کافی تولید کنند. بنابراین، پلیمرهای طبیعی با پلیمرهای مصنوعی کامپوزیت می‌شوند تا به کمک پلیمرهای طبیعی علاوه بر استحکام مکانیکی بالا، عملکرد بیولوژیکی مطلوبی را ایجاد کنند [۵]. پلیمرهای طبیعی مانند

جدول ۱- مشخصات کامپوزیت های ساخته شده

نمونه	ترکیب داربست	نسبت اجزای داربست	درصد اجزای داربست
A	PCL-Kr	۳:۲	۶۰:۴۰
B	PCL-Kr-HA	۳:۲:۱	۵۰:۳۳:۱۷

مورفولوژی یکنواخت با خواص مکانیکی مناسب بودند [۲۳]. همچنین با تحقیق بر خواص کامپوزیت پلی ال لاکتیک اسید/ پلی لاکتید- گلیگولید اسید/ هیدروکسی آپاتیت نتایج نشان دادند که وجود ذرات هیدروکسی آپاتیت باعث افزایش سطح ویژه، کاهش قطر الیاف و افزایش تخلخل می‌شوند [۱۵]. با توجه به اینکه تحقیقات کمی بر کامپوزیت کراتین- هیدروکسی آپاتیت انجام گرفته است، در این تحقیق داربست کراتین/ پلی کاپرولاکتون/ هیدروکسی آپاتیت با روش الکترورسی ساخته شد و نقش ذرات هیدروکسی آپاتیت بر خواص داربست مورد ارزیابی قرار گرفت.

۲- مواد و روش تحقیق

در این تحقیق کراتین (۸۴۱۲۷۰، Merck) با درجه خلوص ۹۸ درصد و اندازه ذرات ۳۰ نانومتر، پلی کاپرولاکتون (MV= ۷۰-۹۰KD) و هیدروکسی آپاتیت با اندازه ذرات ۲۰۰ نانومتر از شرکت Aldrich (کد ۶۷۷۴۱۸) خریداری شد.

۲-۱- ساخت کامپوزیت HA/ PCL /Kr

جهت ساخت کامپوزیت، درصد وزنی/ حجمی متفاوت از کراتین، پلی کاپرولاکتون، هیدروکسی آپاتیت برای دو نوع کامپوزیت که در جدول (۱) مشاهده می‌شود، آماده‌سازی شد [۲۳]. جهت ساخت کامپوزیت A، ابتدا کراتین (۱۰ درصد) توسط اسید استیک: اسید فرمیک به نسبت حجمی (۳:۱) به مدت یک ساعت توسط همزن مغناطیسی حل شد. پلی کاپرولاکتون (۱۳/۵ درصد) در حلال اسید استیک: اسید فرمیک به نسبت حجمی (۳:۱) به مدت ۲۴ ساعت توسط همزن مغناطیسی مخلوط شد. در نهایت برای ساخت داربست دو فازی A، دو محلول آماده شده با نسبت حجمی (۳:۲) توسط همزن

استخوان طبیعی با ساختار کامپوزیتی از دو بخش معدنی و آلی تشکیل شده است. هیدروکسی آپاتیت (HA) مهم‌ترین جز بخش معدنی استخوان است که به‌عنوان یک فاز تقویت کننده در فاز آلی استخوان (کلاژن) قرار دارد. تحقیقات نشان داده است که حضور نانو ذرات سرامیکی HA در کامپوزیت‌ها سبب تحریک استخوان‌زایی در اطراف بافت و ایمپلنت می‌شود [۱۴]. همچنین کاربرد هیدروکسی آپاتیت در داربست‌های مهندسی بافت استخوان باعث افزایش استحکام داربست و کاهش اندازه قطر الیاف می‌شود [۱۵]. تاکنون روش‌های متعددی از جمله ریخته‌گری حلال^۴ [۱۶]، جدایش فازی^۵ [۱۷]، فوم‌گازی^۶ [۱۸] و روش الکترورسی [۱۹ و ۲۰] جهت تولید داربست‌های متخلخل برای کاربردهای مختلف مهندسی بافت استخوان مورد بررسی قرار گرفته است. در بین روش‌های ساخت داربست‌های متخلخل، روش الکترورسی به‌دلیل قابلیت تغییر در پارامترهای دستگاهی و عدم محدودیت در انتخاب پلیمر مورد توجه قرار گرفته است. این روش دارای توانایی تنظیم قطر منافذ از طریق تنظیم بار الکتریکی و ارتباط داخلی داربست برای کاربردهای مهندسی بافت، امکان نفوذ سلولی مناسب و تحویل مواد مغذی را فراهم می‌کند [۲۱]. در سال‌های اخیر نانوالیاف الکترورسی شده به‌دلیل نزدیک بودن ساختار آنها با بافت‌های بدن سطح مؤثر بالا برای چسبندگی و رشد سلول‌ها در مهندسی بافت مورد توجه قرار گرفته است [۲۲]. توسط گروهی از محققین، نانوالیاف کامپوزیتی کراتین/ پلی کاپرولاکتون توسط روش الکترورسی ساخته شد و نتایج نشان داد که الیاف دارای یکنواختی مورفولوژی و خواص مکانیکی مناسب است [۱۱]. در تحقیق دیگر کامپوزیت کراتین- پلی کاپرولاکتون- اکسید منیزیم توسط روش الکترورسی ساخته شد و برای کاربردهای پزشکی مورد بررسی قرار گرفت. الیاف به‌وجود آمده دارای

۴۰۰۰ بر سانتی‌متر مشاهده و نوع پیوندها با بررسی عدد موج قله‌ها مشخص شد.

۲-۵- بررسی تخلخل داربست‌ها

تخلخل داربست‌ها با روش جابه‌جایی مایع محاسبه شد. مطابق این روش ابتدا داربست‌های با وزن ابتدایی (W_i) به مدت ۲۴ ساعت در داخل یک استوانه مدرج حاوی اتانول (گرم بر سانتی‌متر مکعب $\rho=0.789$) با حجم V_1 به حالت غوطه‌ور نگه‌داشته شد. در ادامه حجم کل، یعنی حجم داربست و حجم اتانول به‌عنوان V_2 گزارش شد. با خارج کردن داربست از درون استوانه مدرج، حجم اتانول باقی‌مانده در استوانه مدرج به‌صورت V_3 گزارش شد. بنابراین حجم کل داربست برابر با $V_2 - V_3$ شد. با اندازه‌گیری W_i و وزن انتهایی داربست (W_f)، حجم منافذ از رابطه $W_f - W_i / \rho_{\text{Ethanol}}$ به‌دست می‌آید و مقدار متوسط درصد تخلخل داربست (ε) توسط رابطه (۱) محاسبه می‌شود [۲۴]:

$$\varepsilon = (W_f - W_i / \rho) / (V_2 - V_3) \times 100 \quad (1)$$

۲-۶- اندازه‌گیری سطح ویژه نمونه‌ها

جهت اندازه‌گیری سطح ویژه نانوالیاف از دستگاه BET (۹۱۰۵-TPD-TPR-BET-ایران) استفاده شد. برای آماده‌سازی نمونه‌ها از عبور گاز هلیوم به مدت ۲۰ دقیقه ناخالصی‌هایی از جمله آب، دی‌اکسیدکربن و یا سایر مولکول‌هایی که ممکن است حجم حفره‌ها را اشغال کرده باشد، خالص‌سازی شد. سپس نمونه‌ها در معرض مقدار مشخصی از گاز نیتروژن قرار گرفت که با توجه به افزایش تدریجی گاز در این مرحله صد درصد ماده به اشباع رسیده و پر می‌شود. با متراکم شدن گاز درون حفره‌های سطح می‌توان ساختار حفره‌ها را ارزیابی کرد و توسط رابطه گازها (PVT) مقدار گاز جذب شده محاسبه می‌شود. در مرحله آخر، به جای مخزن نیتروژن از آب با دمای محیط استفاده می‌شود تا با کاهش تدریجی فشار گاز، تبخیر از سطح صورت گیرد و واجذب رخ دهد. سپس منحنی واجذب

مغناطیسی برای مدت زمان ۲۰ دقیقه مخلوط شدند. برای ساخت کامپوزیت سه فاز B، هیدروکسی آپاتیت در حلال اسید استیک: اسید فرمیک با نسبت حجمی (۳:۱) توسط همزن مغناطیسی به مدت یک ساعت توزیع شد. سپس، محلول HA به محلول کامپوزیت A اضافه شد و در نهایت برای مدت زمان ۱۵ دقیقه با دستگاه التراسونیک پروبی (Top Sonics- ایران) همگن شد.

۲-۲- ساخت داربست توسط روش الکترورسی

جهت ساخت داربست از دستگاه الکترورسی (KYKY-SBC-12) استفاده شد. محلول کامپوزیت A و B جداگانه هر کدام در سرنگ با قطر سوزن ۰/۶ میلی‌متر طول ۴ سانتی‌متر قرار داده شدند. سپس الکترورسی هر نمونه جداگانه با تنظیم پارامترهای دستگاه با نرخ تغذیه ۰/۱۲۵ میلی‌لیتر بر ساعت، ولتاژ ۱۹ کیلوولت و فاصله کلکتور تا نوک سوزن ۱۴ سانتی‌متر انجام شد [۸].

۲-۳- بررسی اندازه قطر الیاف و مورفولوژی سطح

داربست‌ها

به‌منظور ارزیابی داربست‌ها و بررسی ساختار و قطر الیاف ریسیده شده از میکروسکوپی الکترونی روبشی (SEM) (KYKY-EM۳۲۰۰-چین) استفاده شد. ابتدا نمونه‌ها با طلا پوشش داده شدند و سپس تصویربرداری انجام گرفت و توسط نرم‌افزار Image J، به‌طور تصادفی ۲۰ لیف انتخاب و میانگین قطر متوسط الیاف اندازه‌گیری شد.

۲-۴- طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه

شناسایی گروه‌های عاملی و پیوندهای تشکیل شده در نمونه‌ها توسط طیف سنجی مادون قرمز با تبدیل فوریه (FTIR) (BRUKER-TENSOR۲۷-آلمان) مورد ارزیابی قرار گرفت. برای انجام این آزمون نمونه‌ها با KBr خالص مخلوط و به‌صورت قرص نازک شکل‌دهی شد. سپس توسط دستگاه FTIR، قله‌های جذب پرتو IR در عدد موج در محدوده ۴۰۰-

سانتی گراد، رطوبت ۹۵ درصد و دی‌اکسیدکربن ۵ درصد برای مدت زمان سه روز قرار داده شد. پس از پایان یافتن زمان کشت، محیط کشت رویی خالی شد و نمونه‌ها دو بار به مدت ۲۰ دقیقه توسط PBS شسته شدند. سپس محیط کشت قبلی با محیط کشت حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاو (FBS) جایگزین شد. در این آزمون، محیط کشت حاوی سلول بدون نمونه به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد.

۲-۸-۲- بررسی زنده‌مانی سلول‌ها

میزان تکثیر و زنده‌مانی سلول‌های Saos-۲ روی سطح نمونه‌ها توسط آزمون MTT^{۱۱} (Methyl Thiazol Tetrazolium) مورد ارزیابی قرار گرفت. ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر محلول ۰/۰۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نمک تترازیولیم بروماید (محلول MTT^۱) به محیط کشت حاوی نمونه‌ها و نمونه کنترل اضافه شد و به مدت چهار ساعت داخل انکوباتور (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد گاز CO₂) قرار گرفت. در اثر افزودن محلول MTT، کریستال‌های نامحلول فرمازون بر سلول‌ها زنده ایجاد شد. سپس جهت حل کردن این کریستال‌ها و تغییر رنگ محیط کشت، ۵۰۰ میکرومتر محلول حاوی Hcl ۰/۱ (Merck) و ایزوپروپانال (Merck) به محیط کشت اضافه شد و به مدت یک روز داخل انکوباتور قرار گرفت. در نهایت محیط کشت رنگی به داخل ظرف کشت منتقل شد و ظرف کشت به مدت ۲۰ دقیقه داخل شیکر دستگاه الایزایدر (پیش‌تاز طب مدل Avicina) قرار داده شد و میزان جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد.

۲-۸-۳- بررسی مورفولوژی سلول‌ها بر سطح داربست

مورفولوژی سلول‌ها بر سطح نمونه‌ها با میکروسکوپی الکترونی روبشی مورد ارزیابی قرار گرفت. برای آماده‌سازی نمونه‌ها جهت تصویربرداری، نمونه‌ها تحت شرایط استریل از درون ظرف کشت سلول خارج و به ظرف دیگری برای انجام فرایند تثبیت سلول‌ها منتقل شد. ابتدا، سلول‌ها با محلول PBS دو

و جذب رسم و توسط نرم‌افزار مساحت سطح منحنی محاسبه شد. این آزمایش در دمای محیط ۲۹۸ کلوین و دمای دستگاه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد و در فشار ۰/۸۸ اتمسفر انجام گرفت.

۲-۷- بررسی تخریب‌پذیری داربست‌ها

به‌منظور بررسی آزمون تخریب‌پذیری نمونه‌ها، طبق استاندارد ASTM F۱۶۳۵، نمونه‌ها بر کاور شیشه‌ای به قطر ۱۵ میلی‌متر الکترورسی شد. سپس از روی کاور جدا شده و توسط ترازوی دیجیتالی با دقت چهار رقم اعشار توزین شد. در مرحله بعد، نمونه‌ها درون انکوباتور (MEMMERT-IPP55Plus - آلمان) با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد درون محلول بافر فسفات (PBS) قرار داده شد. نمونه‌ها پس از گذشت مدت زمان ۷، ۳، ۱ و ۱۴ روز از درون ظرف بیرون آورده شد و با آب دو بار تقطیر شسته و پس از خشک شدن درون آون خلأ وزن شدند. سپس درصد کاهش وزن نمونه‌ها (WL) با رابطه (۲) محاسبه شد [۲۵].

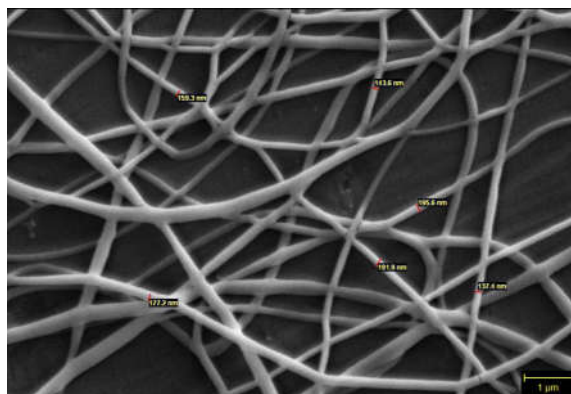
$$WL(\%) = (W_0 - W_t) / W_0 \times 100 \quad (2)$$

که در آن W_0 وزن اولیه و W_t وزن نمونه پس از بازه‌های زمانی مشخص است.

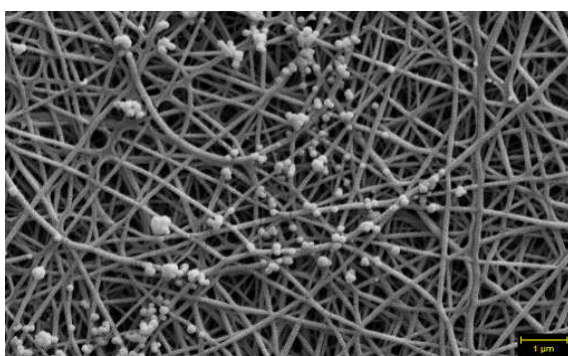
۲-۸-۲- آزمون کشت سلولی^۹ (In Vitro)

۲-۸-۱- کشت سلول‌های Saos-۲ بر سطح داربست‌ها

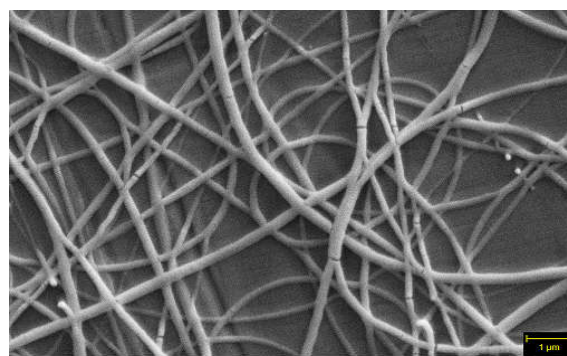
در این تحقیق از سلول‌های استئوبلاست جدا شده از استئوژنیک سارکومای انسانی (Saos-۲) تهیه شده از بانک سلولی پژوهشکده رویان جهت زیست‌سازگاری و بررسی میزان رشد و تکثیر سلول‌ها بر داربست‌ها استفاده شد. بعد از آماده‌سازی و استریل کردن نمونه‌های A و B، 5×10^4 سلول Saos-۲ بر نمونه‌ها در محیط کشت DMEM با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی^{۱۰} (FBS) موجود در ظرف کشت پلی‌استایرنی قرار داده شد. سپس ظرف کشت داخل انکوباتور با دمای ۳۷ درجه



شکل ۱- تصویر میکروسکوپی الکترونی روبشی از داربست پلی کاپرولاکتون



(ب)



(الف)

شکل ۲- تصویر میکروسکوپی الکترونی روبشی از داربست پلی کاپرولاکتون: الف) داربست A و ب) داربست B

۳- نتایج و بحث

۳-۱- بررسی ساختار و مورفولوژی سطح نمونه‌ها

شکل (۱) مورفولوژی سطح PCL را نشان می‌دهد. ساختار آن از الیافی با اندازه نسبتاً غیریکنواخت با متوسط قطر الیاف ۱۹۱ نانومتر تشکیل شده است. در الکتروریسی هنگامی که از یک پلیمر غیرسازمانده مانند PCL استفاده می‌شود، پلیمر نمی‌تواند بارها را تا جمع کننده با خود حمل کند، بنابراین پلیمر به خوبی در میدان کشیده نمی‌شود. اما زمانی که همراه با PCL، پلیمر طبیعی کراتین به ترکیب افزوده شود، محلول به خوبی، بارها را بر خود نگه می‌دارد و تا جمع کننده به خوبی در میدان کشیده می‌شود [۲۶].

شکل (۲- الف) مورفولوژی نمونه A را نشان می‌دهد که این ساختار دارای الیافی با اندازه نسبتاً یکنواخت و بدون گره

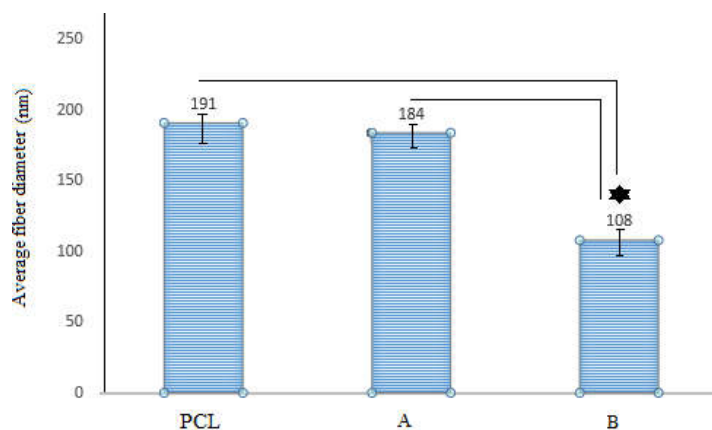
مرتبه شستشو داده شد و برای مدت زمان ۹۰ دقیقه درون محلول گلو تار آلدهید ۲/۵ درصد قرار داده شد. نمونه‌ها پس از خروج از درون گلو تار آلدهید با PBS شسته و عملیات آبیگری با اتانول با غلظت‌های ۶۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰ و ۱۰۰ درصد به ترتیب به مدت ۱۵ دقیقه انجام گرفت. بعد از خروج نمونه‌ها از الکل و خشک شدن نهایی، نمونه‌ها با طلا پوشش داده شد و توسط میکروسکوپی الکترونی روبشی، مورفولوژی سلول‌ها مشاهده شد.

۲-۹- ارزیابی آماری

مقایسه آماری داده‌های به دست آمده توسط روش t-student انجام شد. تعداد تکرار برای آزمون‌ها، سه در نظر گرفته شده و نتایج به صورت میانگین \pm انحراف از معیار گزارش شده است.

جدول ۲- متوسط قطر الیاف در داربست ها و متوسط اندازه ذرات هیدروکسی آپاتیت

نمونه	قطر الیاف (نانومتر)	قطر ذرات هیدروکسی آپاتیت (نانومتر)
PCL	191 ± 31/52	-
A	184 ± 10/86	-
B	108 ± 8/38	200 ± 2/23

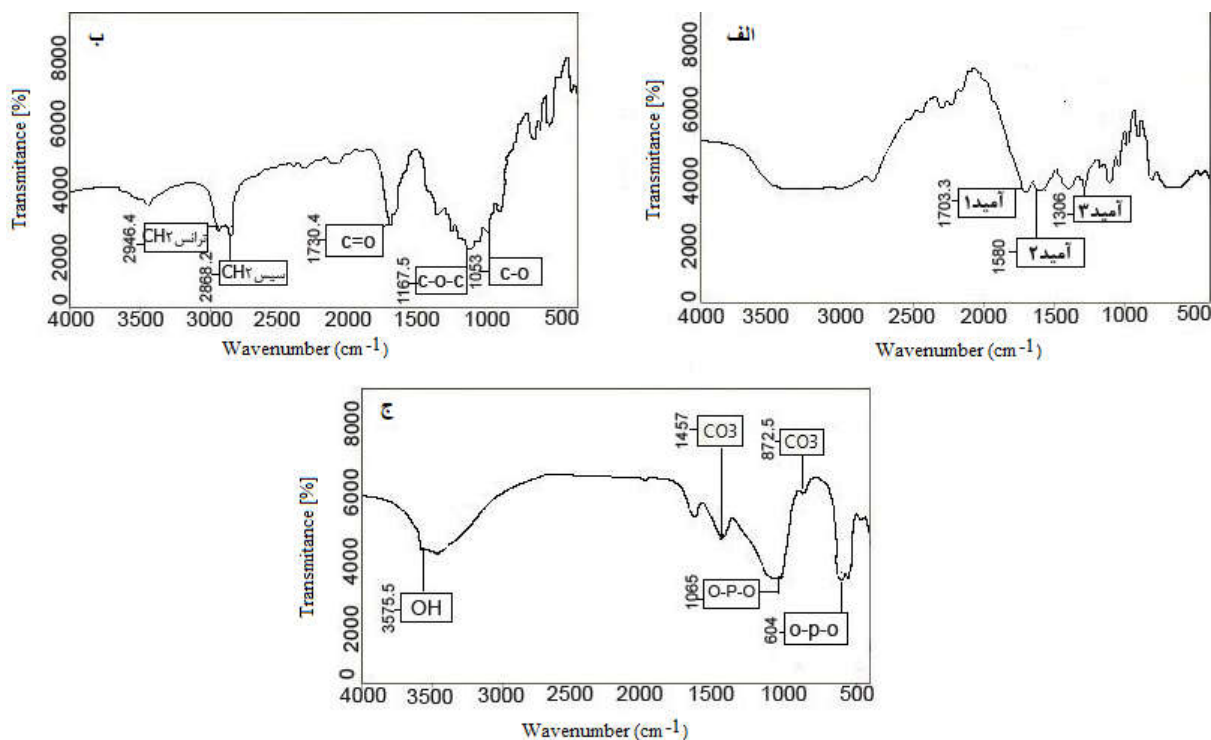


شکل ۳- متوسط قطر الیاف در نانوداربست ها

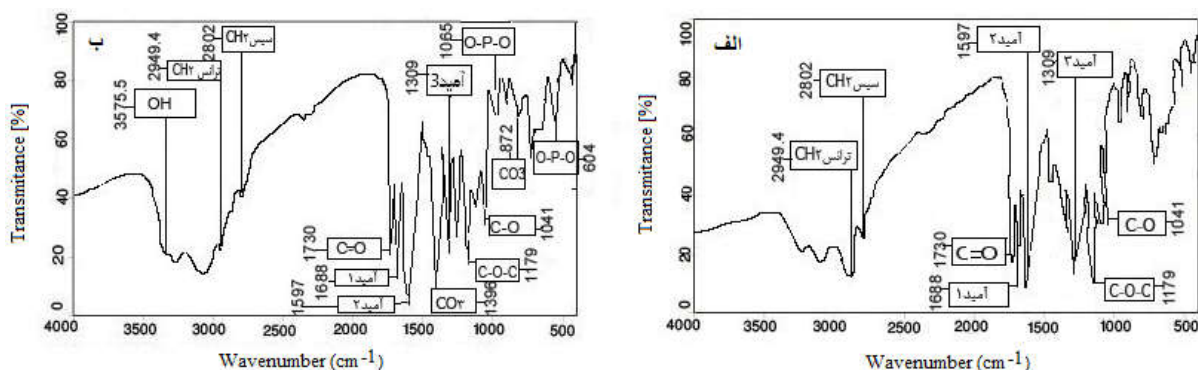
(* متوسط قطر الیاف در داربست B نسبت به داربست A و PCL، معنی دار ($p < 0/05$) است)

آپاتیت روی سطح الیاف و قطر الیاف به ترتیب حدود ۲۰۰ نانومتر و ۱۰۸ نانومتر محاسبه شد (شکل ۳). با افزودن HA به محلول A، گرانیوی، غلظت محلول و میزان رسانایی محلول الکتریکی افزایش می یابد که عاملی بر کاهش قطر الیاف در داربست B است [۲۷]. در روش الکتروریسی، ویسکوزیته محلول باید در حدی باشد که وقتی جریان باریک و پر شتاب محلول پلیمری، نوک سوزن را در حین الکتروریسی ترک می کند، همزمان که محلول پلیمر به طرف صفحه جمع کننده حرکت می کند، کشیده شود. با افزایش ویسکوزیته اثر متقابل بیشتری بین حلال و مولکول های پلیمر ایجاد می شود. محلول وقتی تحت تأثیر بارهای الکتریکی کشیده می شود مولکول های حلال تمایل دارند تا در سرتاسر مولکول های پلیمر در هم رفته منتشر شوند. بنابراین مولکول های حلال برای اینکه تحت تأثیر کشش سطحی تجمع یابند، کاهش می یابند و هدایت الکتریکی را افزایش داده و باعث کاهش قطر الیاف می شوند [۲۸].

است. با مقایسه میانگین قطر الیاف پلی کاپرولاکتون و داربست A، مشاهده می شود که با افزایش درصد کراتین در ترکیب، قطر الیاف الکتروریسی شده $184 \pm 10/86$ نانومتر کاهش می یابد (جدول ۲). کاهش قطر الیاف در داربست A به هدایت الکتریکی (رسانایی) مناسب محلول الکتروریسی که در اثر اضافه کردن کراتین ایجاد شده است، مرتبط است. گروه های آمینی موجود در کراتین که دارای بار منفی هستند، باعث افزایش هدایت الکتریکی محلول می شوند [۸]. شکل (۲-ب) داربست B را نشان می دهد. در این مرحله برای یافتن داربستی با خواص بهینه، علاوه بر کراتین، هیدروکسی آپاتیت با PCL الکتروریسی شد. واضح است که این ساختار دارای یک مورفولوژی کشیده و صاف از الیافی با سایز نسبتاً یکنواخت و ذرات به صورت همگن در سطح الیاف، توزیع و با حداقل گره تشکیل شده است. در تصاویر میکروسکوپی متوسط اندازه ذرات هیدروکسی



شکل ۴- طیف سنجی مادون قرمز فوریه: الف) کراتین، ب) پلی کاپرولاکتون و ج) هیدروکسی آپاتیت



شکل ۵- طیف سنجی مادون با تبدیل قرمز فوریه: الف) داربست A و ب) داربست B

۱۰۵۳، ۱۱۶۷، ۲۹۴۶ و ۲۸۶۸ بر سانتی متر به ترتیب مرتبط به گروه‌های (C=O)، (C-O)، (C-O-C) و CH₂ ترانس و سیس در پلی کاپرولاکتون هستند [۱۱]. عدد موجی‌های ۱۰۶۵ و ۶۰۴ بر سانتی متر معرف گروه (O-P-O)، پیک‌های ۸۷۲ و ۱۴۵۷ بر سانتی متر مربوط به پیوند کربنات و عدد موجی ۳۵۷۵ بر سانتی متر منسوب به گروه OH در HA هستند (شکل ۴-ج) [۲۹]. بنابراین، در شکل (۵)، حضور تمام پیک‌های معرف کراتین،

در شکل (۴) طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه کراتین، پلی کاپرولاکتون و هیدروکسی آپاتیت در محدوده ۴۰۰ - ۴۰۰۰ بر سانتی متر مشاهده می‌شود. پیک‌های موجود در عدد موج‌های ۱۷۰۳ بر سانتی متر، ۱۵۸۰ و ۱۳۰۶ بر سانتی متر معرف گروه‌های آمید نوع ۱ و ۲ و ۳ در کراتین است (شکل ۴-الف) [۲۳]. شکل (۴-ب) طیف سنجی مادون قرمز فوریه پلی کاپرولاکتون را نشان می‌دهد. پیک‌های ارتعاشی ظاهر شده در عدد موجی‌های ۱۷۳۰،

جدول ۳- تخلخل و اندازه تخلخل داربست‌ها

نوع داربست	درصد تخلخل (درصد)	اندازه تخلخل (میکرومتر)
PCL	۷۲±۴	۲/۵۴ ± ۰/۲۴
A	۸۱±۵	۲/۱۱ ± ۰/۱۷
B	۹۰±۳	۲/۶۶ ± ۰/۳

جدول ۴- پارامترهای مربوط به نمونه‌ها در آزمون BET

نمونه	سطح ویژه (مترمربع بر گرم)	جذب سطحی	واجذب سطحی	محدوده کالیبراسیون
A	۵/۹۸۹ ± ۰/۵۱	۰/۳۷	۰/۳۶	۶/۴۴
B	۱۰/۶۶۵ ± ۰/۲۴	۰/۷۵	۰/۷۳	۶/۴۵

پلی‌کاپرولاکتون و هیدروکسی آپاتیت بدون حضور ترکیب و پیوند ناخواسته‌ای در هر دو داربست A و B مشاهده می‌شود.

۳-۲- آنالیز درصد تخلخل و سطح ویژه داربست‌ها

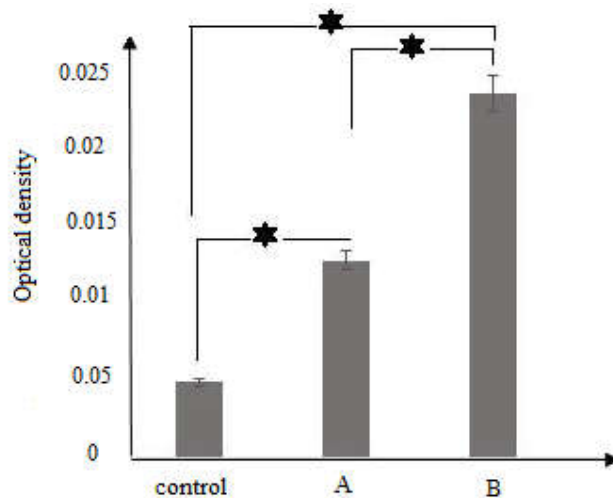
در جدول (۳) میزان درصد تخلخل داربست‌های A، B و پلی‌کاپرولاکتون که با روش جابه‌جایی مایع و اندازه تخلخل که توسط تصاویر میکروسکوپی الکترونی و نرم‌افزار Image J محاسبه شده است را نشان می‌دهد. داربست‌های تهیه شده با روش الکترورسی دارای تخلخل بالاتر از ۸۰ درصد هستند که دستیابی به این اندازه تخلخل‌ها در مهندسی بافت استخوان امری ضروری برای انتشار یکنواخت سلول‌ها در سرتاسر فضای داربست است [۳۰]. در این تحقیق، ۷۲ درصد تخلخل برای داربست پلی‌کاپرولاکتون مشاهده شد که با افزودن کراتین به محلول پلی‌کاپرولاکتون، مقدار درصد تخلخل تا ۸۱ درصد افزایش یافت. این نتایج نشان می‌دهد که داربست کراتین نمی‌تواند به تنهایی به‌عنوان داربست مهندسی بافت استخوان به کار برده شود. همچنین، با افزودن هیدروکسی آپاتیت به محلول A، درصد تخلخل از ۸۱ درصد به ۹۰ درصد در نمونه B افزایش یافت. بنابراین، داربست B با درصد تخلخل زیاد می‌تواند گزینه‌ای مناسبی برای مهندسی بافت استخوان باشد.

در هر دو داربست با وجود کراتین، تورم زنجیره‌های کراتین در محیط‌های آبی رخ می‌دهد. در نتیجه حجم داربست با توجه به آب‌دوستی آنها به شدت افزایش می‌یابد. بنابراین، اندازه تخلخل‌های ایجاد شده در داربست‌ها به مراتب بزرگ و در حدود دو میکرون حاصل می‌شود (جدول ۳). با توجه به اینکه اندازه متوسط تخلخل در داربست برای نفوذ سلول‌های استخوانی به درون داربست‌های مهندسی بافت استخوان در حدود میکرون است [۳۱]. بنابراین داربست‌های ساخته شده دارای اندازه تخلخل مناسب به‌عنوان داربست مهندسی بافت استخوان هستند.

در اثر جذب و واجذب گاز توسط نمونه‌ها میزان سطح ویژه نمونه‌ها در آزمون BET محاسبه شد. با کاهش قطر الیاف در داربست B، سطح ویژه داربست B در مقایسه با داربست A ۵/۹۸۹ به ۱۰/۶۶۵ مترمربع بر گرم افزایش یافت (جدول ۴). حضور نانوذرات هیدروکسی آپاتیت در سطح داربست سبب افزایش سطح ویژه در داربست B می‌شود. در حین انجام آزمون مشاهده شد که داربست B به همان میزان جذب گاز، واجذب داشته است و مقدار میزان جذب گاز در داربست B به نسبت داربست A دو برابر است که نشان‌دهنده دو برابر بودن حجم کل حفرات در داربست B نسبت به داربست A است.

جدول ۵- درصد کاهش وزن نمونه‌ها در زمان‌های متفاوت

نمونه	کاهش وزن (روز ۱) (%)	کاهش وزن (روز ۳) (%)	کاهش وزن (روز ۷) (%)	کاهش وزن (روز ۱۴) (%)
A	۵± ۰/۲	۱۴± ۰/۲۴	۱۷± ۱/۲۴	۲۴± ۲/۵۶
B	۱۴± ۰/۱۵	۲۶± ۰/۳۰	۳۱± ۰/۳۷	۴۶± ۰/۵۸



شکل ۶- میزان جذب نوری سلول‌های Saos-۲ بر سطح داربست‌های A و B پس از سه روز کشت (* میزان رشد سلول‌ها بر سطح داربست B نسبت به داربست A و کنترل، معنی‌دار (p<۰/۰۵) است)

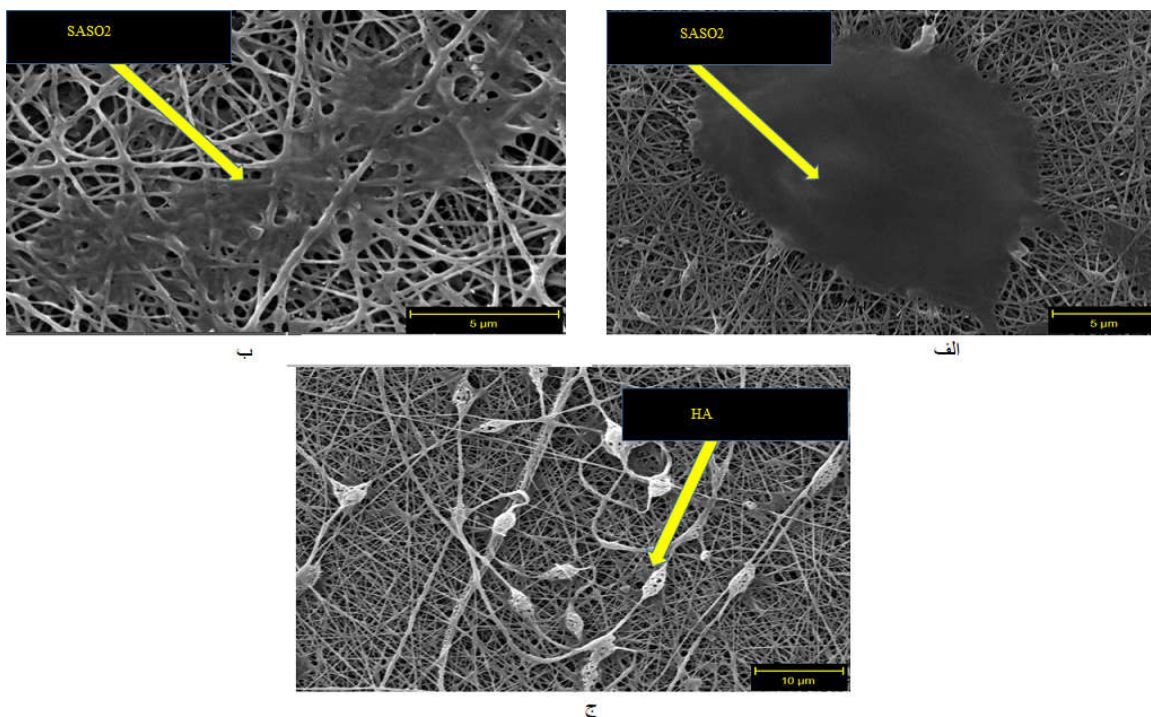
۳-۳- آنالیز رفتار زیست تخریب‌پذیری داربست‌ها

میزان کاهش وزن داربست A و B در جدول (۵) مشاهده می‌شود. نتایج نشان می‌دهد که با وجود کراتین و پلی‌کاپرولاکتون تخریب در هر دو داربست رخ می‌دهد. میزان کاهش وزن داربست B با گذشت زمان تقریباً دو برابر میزان کاهش وزن داربست A است. با افزودن نانوذرات هیدروکسی آپاتیت در داربست، قطر الیاف کاهش، سطح ویژه و درصد تخلخل افزایش می‌یابد. محققین [۲۷] با تحقیقی که بر کامپوزیت پلی لاکتیک اسید/ پلی کاپرولاکتون/ هیدروکسی آپاتیت انجام دادند، مشاهده کردند که با افزودن نانوذرات هیدروکسی آپاتیت به کامپوزیت پلیمری، آب‌دوستی کامپوزیت افزایش می‌یابد. بنابراین، حضور هیدروکسی آپاتیت باعث افزایش آب‌دوستی داربست و در نتیجه افزایش نفوذ محلول بافر فسفات به درون داربست می‌شود و تخریب بیشتری در

داربست ایجاد می‌شود [۲۵]. همان‌طور که مظفری و همکاران [۳۲] در مطالعه‌ای، تأثیر ذرات هیدروکسی آپاتیت را بر زیست تخریب‌پذیری کامپوزیت پلی‌کاپرولاکتون / هیدروکسی آپاتیت مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند که در اثر تخریب داربست کامپوزیتی و حضور ذرات هیدروکسی آپاتیت، محیط قلیایی می‌شود و pH محلول افزایش می‌یابد و در نتیجه مقدار کاهش وزن داربست حاوی ذرات HA، افزایش می‌یابد.

۳-۴- بررسی میزان رشد و سمیت سلولی (MTT)

شکل (۶) و (۷) به ترتیب میزان جذب نوری توسط سلول‌های Saos-۲ بر داربست‌های A و B و تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی آنها را پس از سه روز کشت نشان می‌دهد. تکثیر و رشد سلول‌های بیشتری بر داربست B در مقایسه با داربست A مشاهده شد. به دلیل حضور ذرات نانوهیدروکسی



شکل ۷- تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی پس از سه روز کشت سلول ۲-Saos (الف) داربست A، (ب) داربست B و (ج) داربست B با حضور ذرات کلسیم فسفات بر نانوالیاف

سلول‌ها در نقاطی از سطح داربست که این ذرات وجود دارد زیادتر است.

۴- نتیجه‌گیری

در این پژوهش نانوالیاف کراتین/ پلی‌کاپرولاکتون/ هیدروکسی آپاتیت به‌روش الکتروریسی ساخته شد و با داربست کراتین/ پلی‌کاپرولاکتون مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج آزمون‌ها، کاهش قطر نانوالیاف و افزایش میزان تخلخل، زیست تخریب‌پذیری و سطح ویژه در داربست دارای نانوذرات هیدروکسی آپاتیت را نسبت به داربست بدون هیدروکسی آپاتیت نشان داد. همچنین افزایش رشد و تکثیر سلول‌های استخوانی بر سطح داربست‌های A و B نسبت به کنترل مشاهده شد. بنابراین با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق، می‌توان داربست کراتین/ پلی‌کاپرولاکتون/ هیدروکسی آپاتیت را گزینه مناسبی برای مهندسی بافت استخوان به‌کار برد.

آپاتیت در داربست B و کاهش قطر الیاف که منجر به افزایش تخلخل در داربست می‌شود رشد و تکثیر ۴۸۰ درصد سلول بر سطح داربست B در مقایسه با داربست A با ۲۶۰ درصد رشد سلول مشاهده شد. بنابراین نتایج به‌دست آمده بیانگر زیست سازگاری عالی هر دو نمونه نسبت به تکثیر ۱۰۰ درصدی نمونه کنترل منفی است. ادوارد و همکاران [۱۱] مطالعه‌ای بر کامپوزیت پلی‌کاپرولاکتون/ کراتین انجام دادند و وجود کراتین را عاملی برای رشد و تکثیر عالی سلول‌های استخوانی بر سطح داربست گزارش کردند. در این تحقیق، نانوذرات هیدروکسی آپاتیت به‌عنوان عاملی مؤثر بر رشد بیش از صد درصد سلول‌های استخوانی بر سطح داربست B است. در شکل (۷-ب) تصویر رشد سلول‌های استخوانی را بر سطح داربست B مشاهده می‌شود. با توجه به حضور ذرات نانو هیدروکسی آپاتیت در داربست B، کلسیم فسفات بر نانوالیاف ایجاد می‌شود. همان‌طور که در شکل (۷-ج) مشاهده می‌شود، رشد

واژه‌نامه

- | | |
|---|--|
| <ol style="list-style-type: none"> 1. autograft 2. allograft 3. foreign body giant cells (FBGC) 4. casting solvent 5. Phase Separation 6. Gas Foaming | <ol style="list-style-type: none"> 7. Scanning Electron Microscopy (SEM) 8. Fourier Transform Infrared Spectrophotometer (FTIR) 9. in vitro 10. fetal bovine serum (FBS) 11. methyl thiazol tetrazolium (MTT) |
|---|--|

مراجع

1. Rouse, J. G., and Van Dyke, M. E., "A Review of Keratin-Based Biomaterials for Biomedical Applications", *Materials*, Vol. 3, No. 2, pp. 999-1014, 2010.
2. Kharkar, P. M., Kiick, K. L., and Kloxin, A. M., "Designing Degradable Hydrogels for Orthogonal Control of Cell Microenvironments", *Chemical Society Reviews*, Vol. 42, No. 17, pp. 7335-7372, 2013.
3. Vroman, I., and Tighzert, L., "Biodegradable Polymers", *Materials*, Vol. 2, No. 2, pp. 307-344, 2009.
4. Subramanian, A., Krishnan, U. M., and Sethuraman, S., "Development of Biomaterial Scaffold for Nerve Tissue Engineering: Biomaterial Mediated Neural Regeneration", *Journal of Biomedical Science*, Vol. 16, No. 1, pp. 1, 2009.
5. Zhu, J., and Marchant, R. E., "Design Properties of Hydrogel Tissue-Engineering Scaffolds", *Expert Review of Medical Devices*, Vol. 8, No. 5, pp. 607-626, 2011.
6. Nicodemus, G. D., and Bryant, S. J., "Cell Encapsulation in Biodegradable Hydrogels for Tissue Engineering Applications", *Tissue Engineering Part B: Reviews*, Vol. 14, No. 2, pp. 149-165, 2008.
7. Hill, P., Brantley, H., and Van Dyke, M., "Some Properties of Keratin Biomaterials: Keratines", *Biomaterials*, Vol. 31, No. 4, pp. 585-593, 2010.
8. Zhao, X., Lui, Y. S., Choo, C. K. C., Sow, W. T., Huang, C. L., Ng, K. W., Tan, L. P., and Loo, J. S. C., "Calcium Phosphate Coated Keratin-PCL Scaffolds for Potential Bone Tissue Regeneration", *Materials Science and Engineering: C*, Vol. 49, pp. 746-753, 2015.
9. Ahmed, E. M., "Hydrogel: Preparation, Characterization, and Applications: A Review", *Journal of Advanced Research*, Vol. 6, No. 2, pp. 105-121, 2015.
10. Mohan, T., Mohan, T., Hribernik, S., Kargl, R., and Stana-Kleinschek, K., "Nanocellulosic Materials in Tissue Engineering Applications", *Cellulose-Fundamental Aspects and Current Trends InTech*, Vol. 10, No. 5772, p. 59889, 2015.
11. Edwards, A., Jarvis, D., Hopkins, T., Pixley, S., and Bhattarai, N., "Poly (ϵ -Caprolactone)/Keratin-Based Composite Nanofibers for Biomedical Applications", *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, Vol. 103, No. 1, pp. 21-30, 2015.
۱۲. برادران، م.، شفیع‌ی س. س.، مضطرزاده، ف.، و مرتضوی، س. ز.، "ساخت و مشخصه‌یابی نانوکامپوزیت پلی‌کاپرولاکتان/ هیدروکسید دوگانه لایه‌ای به منظور کاربرد در مهندسی بافت سخت"، *مواد پیشرفته در مهندسی*، سال ۳۵، شماره ۳، ص ۲۸-۱۳، پاییز ۱۳۹۵.
13. Hong, S., and Kim, G. H., "Electrospun Polycaprolactone/Silk Fibroin/Small Intestine Submucosa Composites for Biomedical Applications", *Macromolecular Materials and Engineering*, Vol. 295, No. 6, pp. 529-534, 2010.
۱۴. فتحی، م. ح.، فیضی، ق.، موسوی، س. ب.، جهانبخشی، غ. ر.، صالحی، م.، ساعتچی، ا. و مرتضوی، و. س. "نقش نوع زیرلایه فلزی پوشش هیدروکسی آپاتیت ایمپلنت دندان‌ی در موفقیت کلینیکی و پاتولوژی"، *مواد پیشرفته در مهندسی*، سال ۲۰، شماره ۱، ص ۲۰۵-۱۸۹، شهریور ۱۳۸۰.
15. Qiao, T., Jiang, S., Song, P., Song, X., Liu, Q., Wang, L., and Chen, X., "Effect of Blending HA-g-PLLA on Xanthohumol-Loaded PLGA Fiber Membrane", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Vol. 146, pp. 221-227, 2016.
16. Shin, C., Chen, X. C., Prausnitz, J. M., and Balsara, N. P., "Effect of Block Copolymer Morphology Controlled by Casting-Solvent Quality on Pervaporation of Butanol/Water Mixtures", *Journal of Membrane Science*, Vol. 523, pp. 588-595, 2017.
17. Arjmand, M., Ke, J. H., and Szlufarska, I., "Control of Surface Induced Phase Separation in Immiscible Semiconductor Alloy Core-Shell Nanowires",

- Computational Materials Science*, Vol. 130, pp. 50-55, 2017.
18. Joshi, M. K., Pant, H. R., Tiwari, A. P., Park, C. H., and Kim, C. S., "Multi-layered Macroporous Three-Dimensional Nanofibrous Scaffold via a Novel Gas Foaming Technique", *Chemical Engineering Journal*, Vol. 275, pp. 79-88, 2015.
 19. Shrestha, B. K., Mousa, H. M., Tiwari, A. P., Ko, S. W., Park, C. H., and Kim, C. S., "Development of Polyamide-6, 6/Chitosan Electrospun Hybrid Nanofibrous Scaffolds for Tissue Engineering Application", *Carbohydrate Polymers*, Vol. 148, pp. 107-114, 2016.
 20. Yu, H., Jia, Y., Chen, G., and Zhang, Y., "Fabrication of Core/Sheath PCL/PEG-PNIPAAm Fibers as Thermosensitive Release Carriers by a New Technique Combining Blend Electrospinning and Ultraviolet-Induced Graft Polymerization", *Materials Letters*, Vol. 164, pp. 505-508, 2016.
 21. Sisson, K., Zhang, C., Farach-Carson, M. C., Chase, D. B., and Rabolt, J. F., "Fiber Diameters Control Osteoblastic Cell Migration and Differentiation in Electrospun Gelatin", *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, Vol. 94, No. 4, pp. 1312-1320, 2010.
 22. Pham, Q. P., Sharma, U., and Mikos, A. G., "Electrospun Poly (ϵ -Caprolactone) Microfiber and Multilayer Nanofiber/Microfiber Scaffolds Characterization of Scaffolds and Measurement of Cellular Infiltration", *Biomacromolecules*, Vol. 7, No. 10, pp. 2796-2805, 2006.
 23. Boakye, M. A., Rijal, N. P., Adhikari, U., and Bhattarai, N., "Fabrication and Characterization of Electrospun PCL-MgO-Keratin-Based Composite Nanofibers for Biomedical Applications", *Materials*, Vol. 8, No. 7, pp. 4080-4095, 2015.
 24. Gryshkov, O., Klyui, N. I., Temchenko, V. P., Kyselov, V. S., Chatterjee, A., Belyaev, A. E., Lauterboeck, L., Iarmolenko, D., and Glasmacher, B., "Porous Biomimetic Silicon Carbide Ceramics Coated with Hydroxyapatite as Prospective Materials for Bone Implants", *Materials Science and Engineering: C*, Vol. 68, pp. 143-152, 2016.
 25. Ghorbani, F. M., Kaffashi, B., Shokrollahi, P., Seyedjafari, E., and Ardeshirylajimi, A., "PCL/Chitosan/Zn-Doped nHA Electrospun Nanocomposite Scaffold Promotes Adipose Derived Stem Cells Adhesion and Proliferation", *Carbohydrate Polymers*, Vol. 118, pp. 133-142, 2015.
 26. Fridrikh, S. V., Jian, H. Y., Brenner, M. P., and Rutledge, G. C., "Controlling the Fiber Diameter During Electrospinning", *Physical Review Letters*, Vol. 90, No. 14, p. 144502, 2003.
 27. Liao, G., Jiang, Sh., XU, X., and Ke, Y., "Electrospun Aligned PLLA/PCL/HA Composite Fibrous Membranes and Their in Vitro Degradation Behaviors", *Materials Letters*, Vol. 82, pp. 159-162, 2012.
 28. Baratéla, F. J. C., Higa, O. Z., dos Passos, E. D., and de Queiroz, A. A. A., "Fabrication of Electrospun HPGL Scaffolds via Glycidyl Methacrylate Cross-linker: Morphology, Mechanical and Biological Properties", *Materials Science and Engineering: C*, Vol. 73, pp. 72-79, 2017.
 29. Chen, J., Peng, C., Nie, J., Kennedy, J. F., and Ma, G., "Lyophilization as a Novel Approach for Preparation of Water Resistant HA Fiber Membranes by Crosslinked with EDC", *Carbohydrate Polymers*, Vol. 102, pp. 8-11, 2014.
 30. Kang, D. H., and Kang, H. W., "Surface Energy Characteristics of Zeolite Embedded PVDF Nanofiber Films with Electrospinning Process", *Applied Surface Science*, Vol. 387, pp. 82-88, 2016.
 31. Mohammadi, Y., Mirzadeh, H., Moztarzadeh, F. E., Soleymani, M., and Jabari, E., "Design and Fabrication of Biodegradable Porous Chitosan/Gelatin/Tricalcium Phosphate Hybrid Scaffolds for Tissue Engineering", *Polymer Science and Technology*, Vol. 20, No. 3, pp. 297-308, 2007.
۳۲. مظفری، م.، جوهری، ن.، و فتحی، م. ح.، "داریست کامپوزیتی پلی کاپرولاکتون- هیدروکسی آپاتیت: بررسی تأثیر درصد ذرات هیدروکسی آپاتیت و مقایسه ذرات با سایز نانومتری و میکرومتری و اثر آنها بر خواص مکانیکی و زیست تخریب پذیری داریست"، *مجله مواد نوین*، سال ۵، شماره ۴، ص ۱۴۱-۱۳۱، تابستان ۱۳۹۴.