



Milad.a.taghavi133@gmail.com

مهندس میلاد انگورج تقوی،
نویسنده‌ی اول مقاله، دانشگاه
صنعتی نوشیروانی بابل،
دانشکده مواد و صنایع

مروری بر نانوالیاف کامپوزیتی پلیمر/سرامیک زیستی الکترورسی شده جهت ترمیم بافت استخوان

میلاد انگورج تقوی^۱، سید محمود ربیعی^۲، محسن جهانشاهی^۳، فاطمه نصیری^۴

^۱ کارشناسی ارشد مواد و متالورژی، دانشکده مواد و صنایع، دانشگاه صنعتی نوشیروانی بابل

^۲ دانشیار دانشکده مواد و صنایع، دانشگاه صنعتی نوشیروانی بابل

^۳ استاد دانشکده شیمی، دانشگاه صنعتی نوشیروانی بابل

^۴ دکترای مهندسی نساجی، دانشگاه صنعتی اصفهان

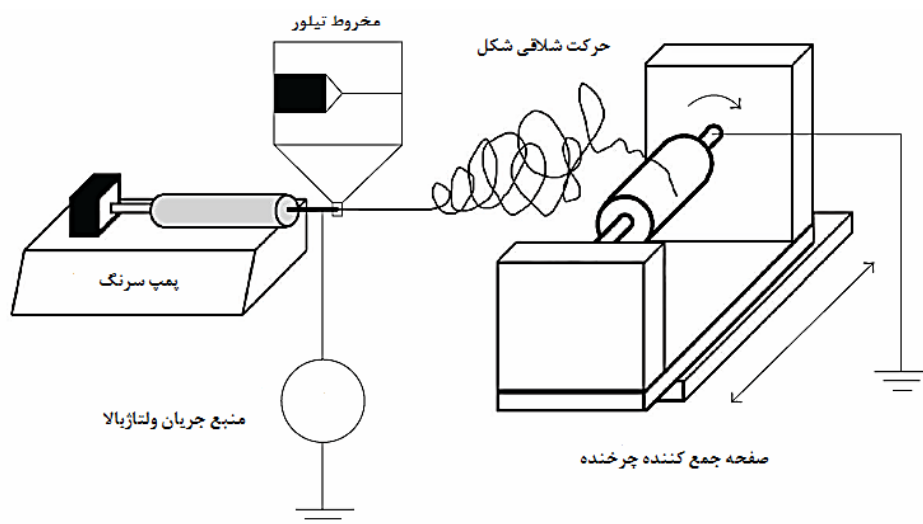
چکیده: در سال‌های اخیر تولید نانوالیاف با بهره‌گیری از روش الکترورسی توجه بسیاری از مجامع علمی را برای ترمیم و بازسازی دائمی بافت استخوان بدون حضور ایمپلنت به خود جلب کرده است. با توجه به ساختار استخوان طبیعی که تلفیقی از خاصیت انعطاف پذیری و استحکام است استفاده از بایومواد کامپوزیتی پلیمر-سرامیک داریستی مناسب برای بهبود و بازسازی بافت استخوان است. طیف وسیعی از مواد زیستی از جمله پلیمرهای طبیعی- سنتزی، سرامیک‌های معدنی، شیشه‌های زیستی و شیشه سرامیک‌ها برای ترمیم بافت استخوان وجود دارد که ادغام آنها به صورت کامپوزیتی نتایج مطلوبی را به همراه دارد. **کلمات کلیدی:** نانو الیاف، الکترورسی، بایومواد، مهندسی بافت استخوان.

۱- مقدمه

در سال‌های اخیر نانوالیاف در صنعت پزشکی پتانسیل بالایی را به خود اختصاص داده است به گونه‌ای که حدود ۲/۳ کاربرد نانوالیاف در صنعت پزشکی برای ترمیم و بهبود بافت‌های آسیب دیده و یا از دست رفته می‌باشد [۱]. درمهندسی بافت نیاز به طراحی یک داربست سه بعدی متخلخل و بهم پیوسته، زیست سازگار، زیست تخریب پذیر و غیرسمی است که بتواند شرایط افزایش چسبندگی سلول‌ها، مهاجرت سلولی، تکثیر، تمایز و در نهایت رشد و جایگزینی بافت جدید را فراهم بکند [۲،۳]. ساختمان طبیعی استخوان تلفیقی از پلیمر و سرامیک می‌باشد لذا کامپوزیت سرامیک- پلیمر داربست ایده ال برای مهندسی بافت استخوان است. استفاده از روش الکترورسی برای ساخت داربست با اهداف مهندسی بافت به دلیل ساده و ارزان بودن فرایند، انعطاف پذیری بالا (اندازه حفرات و قطر الیاف برای تکثیر سلول قابل تغییر) و قابلیت صنعتی سازی توجه بیشتری را برای تحقیقات به خود اختصاص داده است [۴،۵]. به همین منظور در این مقاله به ارائه مروری بر مطالعات انجام شده بر نانوالیاف کامپوزیتی پلیمر-سرامیک زیستی الکترورسی شده در جهت ترمیم بافت استخوان پرداخته شده است.

۲- دستگاه الکترورسی

دستگاه الکترورسی به طور ساده شامل سرنگ متصل به پمپ، سوزن، صفحه جمع کننده و منبع جریان ولتاژ بالا است [۶]. هنگامی که به پیستون سرنگ نیرو وارد می‌شود سیال داخل سرنگ از درون سوزن حرکت کرده و میدان الکتریکی حاصل از منبع ولتاژ بالا بین نوک سوزن و صفحه جمع کننده ایجاد می‌شود. هنگام افزایش ولتاژ نیروی دافعه بر کشش سطحی غلبه کرده سپس قطره‌ای کشیده به نام مخروط تیلور در نوک سوزن شکل گرفته و هم زمان تبخیر حلال صورت گرفته و جریانی پایدار به صورت چرخشی و شلاقی شکل به سمت صفحه جمع کننده حرکت می‌کند. در نهایت نانوالیاف بروی صفحه جمع کننده بر جای می‌گذارد [۶-۹].



شکل ۱- نمایی ساده از دستگاه الکتروریسی [۶]

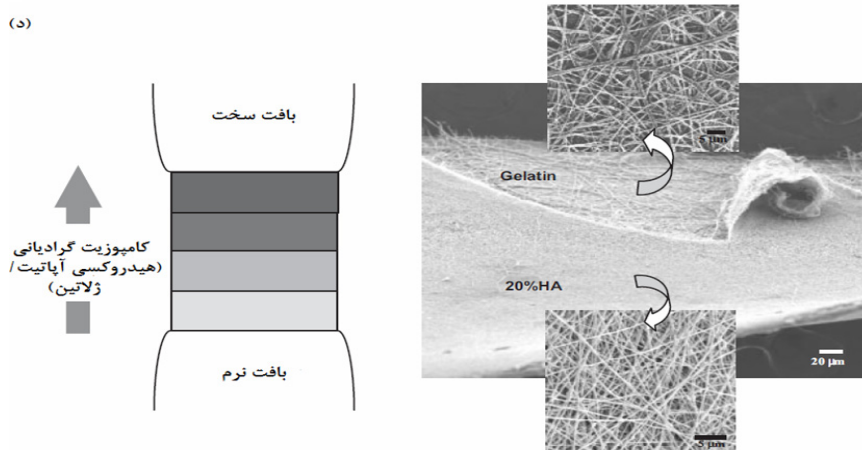
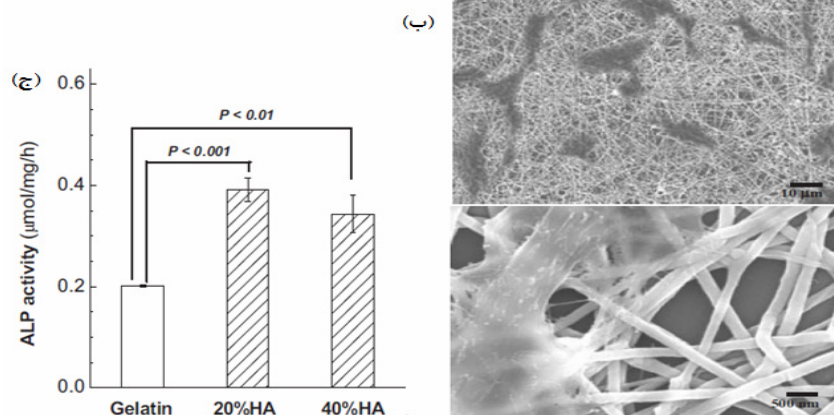
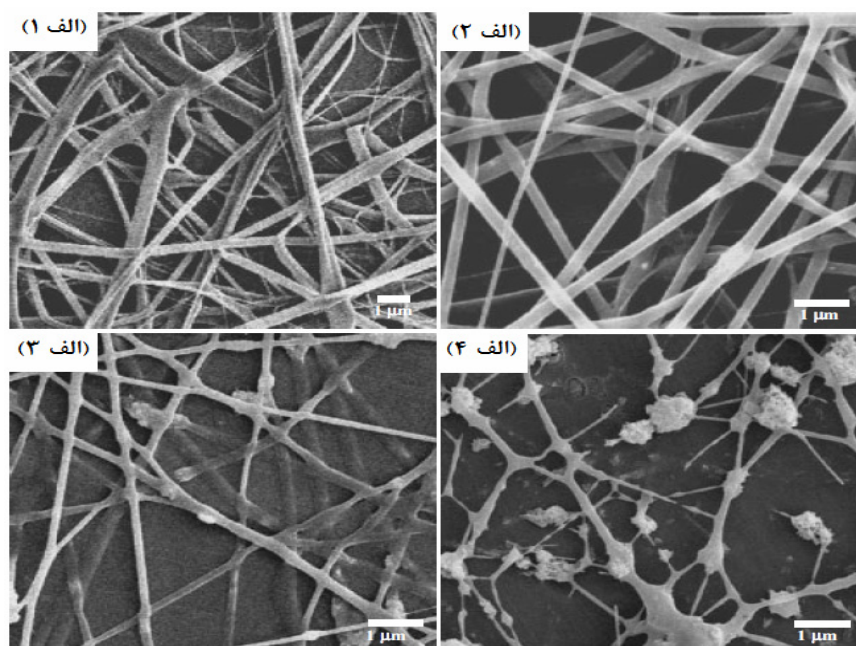
۳- مروری بر پژوهش‌های انجام شده با روش الکتروریسی برای ترمیم بافت استخوان

نانو الیاف کامپوزیتی به دلیل خواص زیست سازگاری، زیست تخریب پذیری بالا و خواص مکانیکی مطلوب مشابه ماتریس خارج سلولی (ECM) عمل کرده و شرایط مناسب برای مهاجرت سلولی، چسبندگی، تکثیر و در نهایت رشد و جایگزینی بافت جدید را فراهم می‌کند. در این تحقیق به مطالعه مروری و پژوهش‌های صورت گرفته بر تعدادی از کامپوزیت‌های پلیمر-سرامیک پرداخته می‌شود.

۳-۱- ژلاتین / هیدروکسی آپاتیت

ژلاتین به دلیل زیست‌سازگاری بالا، زیست تخریب‌پذیری، افزایش چسبندگی، مهاجرت، تکثیر و تمایز سلولی به عنوان یک داربست مهندسی بافت استفاده می‌شود ولی خواص مکانیکی پایین ژلاتین کاربرد آن‌ها را در مهندسی بافت استخوان محدود می‌کند [۱۰-۱۲]. بایوسرامیک هیدروکسی آپاتیت بسیار شبیه به ساختار معدنی استخوان است و پیوند مستقیم با استخوان برقرار می‌سازد [۱۳، ۱۴]. کیم و همکاران در سال ۲۰۰۵ به مطالعه کامپوزیت ژلاتین/هیدروکسی آپاتیت پرداختند. داربست‌های نانولیفی مطلوبی را از طریق کامپوزیت ژلاتین/هیدروکسی آپاتیت در حلال مناسب ۱، ۱، ۳، ۳، ۳، ۳-هگزا فلوئور-۲-پروپانول^۱ تهیه کردند. الکتروریسی موفق و نانوالیاف یکنواخت در کامپوزیت با غلظت ۲۰٪ هیدروکسی آپاتیت مشاهده کردند (شکل ۲-الف ۲). همچنین در کامپوزیت با غلظت ۴۰٪ هیدروکسی آپاتیت، نانوالیاف یکنواخت ولی همراه با گره ظاهر شده است (شکل ۲-الف ۳). با افزایش غلظت هیدروکسی آپاتیت عدم یکنواختی و گره در ساختار نانوالیاف مشاهده شده است (شکل ۲-الف ۴). رشد مطلوب و گسترش سلول استخوانی به وضوح در شکل ۲-ب نشان داده شده است و فعالیت آکالین فسفاتاز (ALP) در الیاف کامپوزیتی ژلاتین/هیدروکسی آپاتیت در مقایسه با ژلاتین به مراتب بیش‌تر است و این افزایش در نانو کامپوزیت ۲۰٪ هیدروکسی آپاتیت بیش‌تر ظاهر شده است (شکل ۲-ج). پیشنهاد شد که از این کامپوزیت بتوان بعنوان کامپوزیت گراדיانی برای ترمیم بافت نرم/سخت به طور مثال در دندان استفاده کرد (شکل ۲-د) [۱۵].

^۱ 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFP)

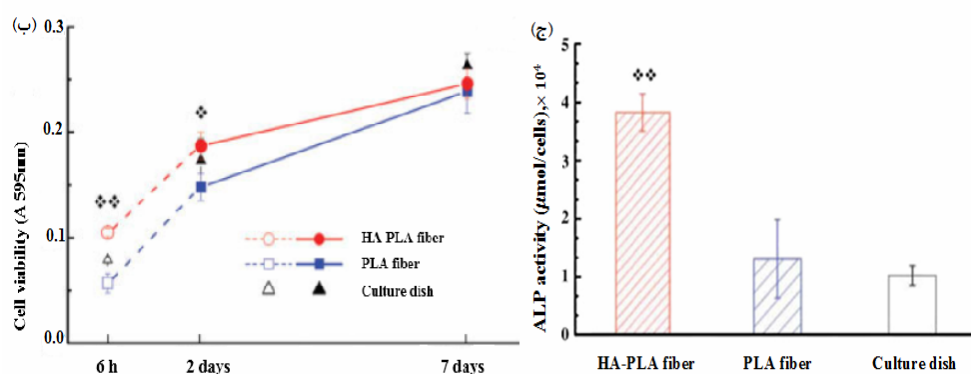
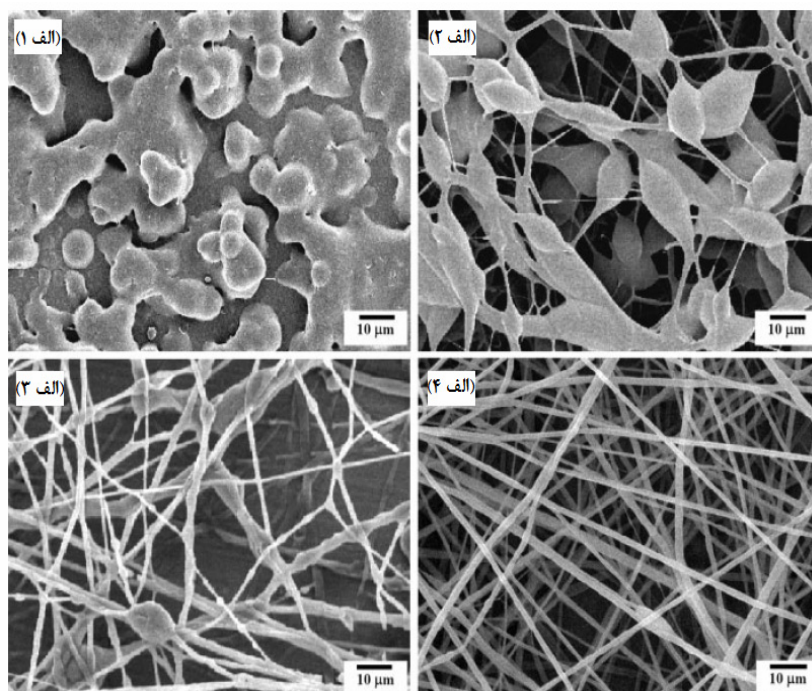


شکل ۲- (الف ۱-۴) میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی (FESEM)^۱ مورفولوژی الیاف کامپوزیتی هیدروکسی آپاتیت-ژلاتین الکترورسی شده: (الف ۱) ژلاتین تنها، (الف ۲) ۲۰٪ هیدروکسی آپاتیت (الف ۳) ۴۰٪ هیدروکسی آپاتیت (الف ۴) ۶۰٪ هیدروکسی آپاتیت-ژلاتین. میکروگراف الکترونی رشد سلولی در نانوالیاف ۲۰٪ هیدروکسی آپاتیت بعد از ۳ روز کشت با دو مقیاس ۱۰ و ۵۰ میکرومتر (ب). فعالیت آلکالین فسفاتاز بعد از ۷ روز کشت (ج) تصویر و شماتیکی از کامپوزیت گرادیانی بین ژلاتین و هیدروکسی آپاتیت برای ترمیم بافت سخت/نرم (د) [۱۵].

¹ Field-emission SEM

۳-۲- پلی‌ال‌لاکتیک اسید^۱ / هیدروکسی آپاتیت

پلی‌ال‌لاکتیک اسید به دلیل زیست تخریب‌پذیری، زیست‌سازگاری و هدایت بازسازی استخوان توجه بسیار زیادی در حوزه پزشکی را به خود جلب کرده است [۱۶، ۱۷]. سال ۲۰۰۸ داربست کامپوزیتی پلی‌ال‌لاکتیک اسید/ هیدروکسی آپاتیت توسط کیم و همکاران تهیه شد. تصویر FESEM کامپوزیت PLLA-HA الکتروریزی شده با استفاده از حلال مناسب (اتانول/آب/کلروفرم) مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج بیانگر این می‌باشد که هیدروکسی آپاتیت تجاری بدون HSA^۲ نانوالیاف تشکیل نمی‌دهد و صرفاً تعدادی مهره چند میکرون تشکیل شده است (شکل ۳-الف ۱). پودر هیدروکسی آپاتیت کلوخه شده^۳ مانع از یکنواخت شدن شروع جت و ازدیاد طول نانوالیاف شده است. در کامپوزیت با پودر سل‌ژل^۴ هیدروکسی آپاتیت بدون HSA شرایط بهتر شده ولی پودر به طور کامل همگن نیست (شکل ۳-الف ۲). از سوی دیگر، با واسطه ۱٪ HSA در پودر سل‌ژل، تغییر چشمگیر در مورفولوژی محصول الکتروریزی حاصل گردید به نحوی که الیاف همگن مشاهده می‌شود (شکل ۳-الف ۳). با افزایش غلظت، الیاف مستمر با متوسط قطر یکنواخت ۱۰۰۰-۲۰۰۰ نانومتر مشاهده شد (شکل ۳-الف ۴).



شکل ۳- (الف ۱-۳) تصویر SEM الیاف کامپوزیتی PLLA-HA الکتروریزی شده تحت شرایط مختلف: (الف ۱) پودر تجاری HA بدون HSA، (الف ۲) پودر سل-ژل HA بدون HSA، (الف ۳) پودر سل-ژل HA با ۱٪ HSA، (ب) ارزیابی چسبندگی و رشد سلولی به روش MTT (ج) فعالیت آلکالین فسفاتاز بعد از ۷ روز کشت سلول [۱۸].

¹ Poly (lactic acid) (PLLA)

² hydroxyacetic acid (HSA)

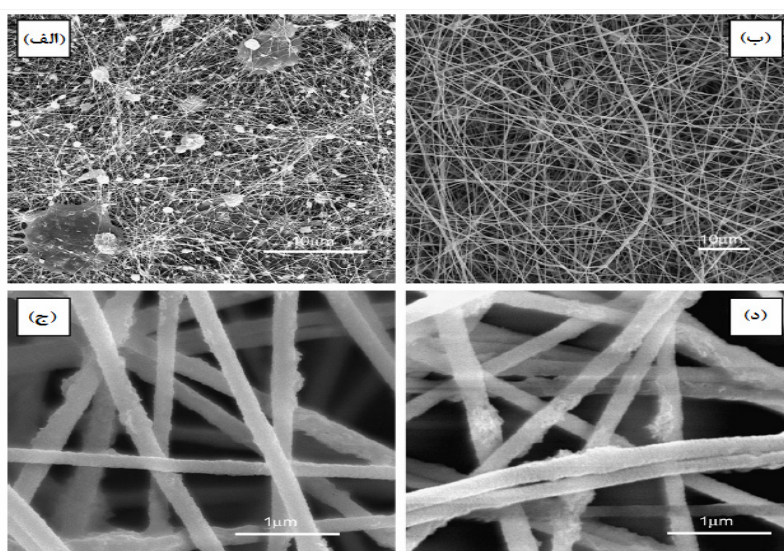
³ agglomerated

⁴ Sol-gel

حیات سلول^۱ در روز ۷ برای نانوکامپوزیت PLLA-HA در مقایسه با PLLA بالاتر است (شکل ۳-ب). فعالیت ALP^۲ نانوالیاف کامپوزیت PLLA-HA نسبت به PLLA به طور چشمگیری بالاتر بوده ($p < 0.001$) و این به سبب حضور بایوسرامیک هیدروکسی آپاتیت است. در نتیجه این کامپوزیت نقش بسزایی در تحریک پاسخ سلولی استخوان^۳ و دوباره سازی استخوان دارد (شکل ۳-ج) [۱۸].

۳-۳- کیتوسان / هیدروکسی آپاتیت

کیتوسان پلیمری آبدوست و دارای خصوصیتی از جمله زیست سازگاری بالا، سمیت پایین، زیست تخریب پذیری، هدایت الکتریکی بالا و خواص ضد میکروبی قابل قبول است [۱۹-۲۲]. در سال ۲۰۰۸ زانگ و همکاران به تهیه ی داربست نانولیفی کیتوسان / هیدروکسی آپاتیت پرداختند. نانوالیاف کامپوزیت کیتوسان / هیدروکسی آپاتیت در حلال استیک اسید / دی متیل سولفو کسید با افزودن پلی اتیلن اکسید به منظور بهبود فرآیند الکتروریسی تهیه کردند. با مشاهده مورفولوژی FESEM نانوکامپوزیت کیتوسان / هیدروکسی آپاتیت به این نتیجه رسیدند که ریسندگی موفق در شکل (۴-ب) رخ داده است و این به دلیل وزن مولکولی فوق العاده بالا پلی اتیلن اکسید با وجود غلظت کم تر می باشد. نانوالیاف کامپوزیتی کیتوسان / هیدروکسی آپاتیت ممکن است به عنوان یک داربست مناسب برای بازسازی استخوان مفید باشد [۲۳].



شکل ۴- (الف) تصویر FESEM نانوالیاف کامپوزیتی الکتروریسی شده هیدروکسی آپاتیت-کیتوسان با ۲۰٪ وزنی پلی اتیلن اکسید با وزن مولکولی متوسط (ب). ۱۰٪ وزنی با پلی اتیلن با درصد وزنی بالا در مقیاس کم (ج) در مقیاس بالاتر (د) بعد از قلیایی کردن [۲۳].

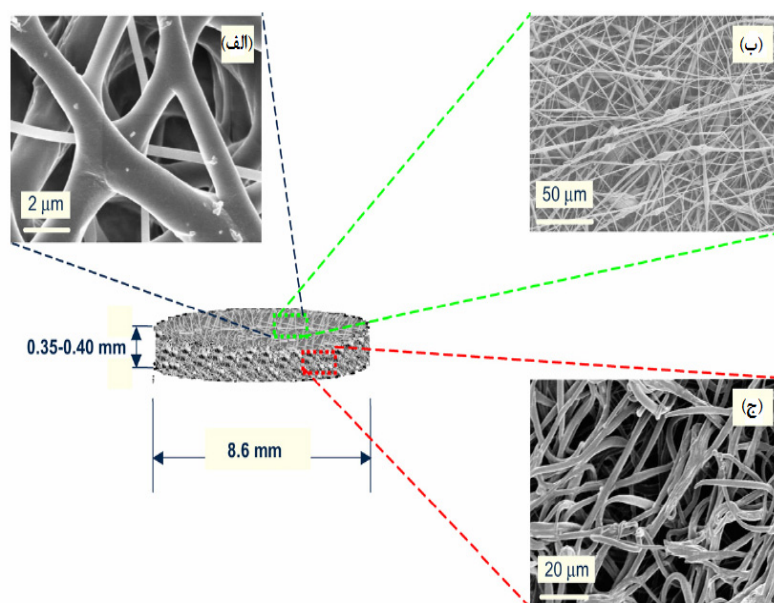
۳-۴- پلی کاپرولاکتون / بتا تری کلسیم فسفات

پلی کاپرولاکتون پلی استر آب گریز است که دارای انعطاف پذیری بالا، زیست سازگاری خوب، فرآیندپذیری ساده و آسان، نرخ زیست تخریب پذیری پایین و محصول حاصل از تخریب آن غیرسمی است [۲۴-۲۷]. بتا تری کلسیم فسفات همانند هیدروکسی آپاتیت دارای زیست سازگاری و قابلیت القاء استخوانی است [۲۸-۳۰]. اریسکن و همکاران کامپوزیت پلی کاپرولاکتون / بتا تری کلسیم فسفات بعنوان داربست با روش الکتروریسی مورد بررسی قرار دادند. نانوالیاف کامپوزیتی پلی کاپرولاکتون / بتا تری کلسیم فسفات با پارامتر نرخ جریان در حلال دی کلرومتان بدست آوردند. داربست کامپوزیتی سه بعدی متخلخل و بهم پیوسته با غلظت های متفاوت از بتا تری کلسیم فسفات و با جهت گیری تصادفی بدست آمده است (شکل ۵). این داربست خصوصا در فصل مشترک استخوان-غضروف کاربرد دارد (شکل ۵) [۳۱]. در نانوالیاف نانوکامپوزیت پلی کاپرولاکتون / بتا تری کلسیم فسفات انتظار می رود اندازه تخلخل، میزان تخلخل و جذب آب داربست افزایش پیدا کند [۳۲، ۳۳].

¹ Cell viability

² Alkaline phosphatase (ALP) activity

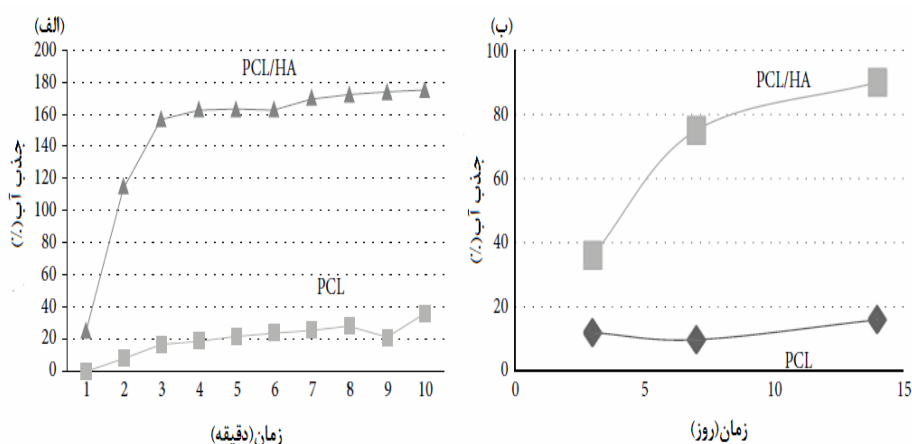
³ Bone cell response



شکل ۵- تصویر SEM الیاف الکتروریسی شده کامپوزیت پلی کاپرولاکتون/بتاتری کلسیم فسفات [۳۱].

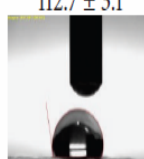
۳-۵- پلی کاپرولاکتون/هیدروکسی آپاتیت

حسن و همکاران در سال ۲۰۱۴، در طی فرآیند الکتروریسی اختلاط هیدروکسی آپاتیت به پلی کاپرولاکتون مورد مطالعه قرار دادند. در غلظت کمتر پلی کاپرولاکتون، متوسط قطر الیاف به صورت نانومتر و همراه با گره بوده ولی در غلظت بالا پلی کاپرولاکتون، متوسط قطر الیاف به صورت میکرومتر، صاف و هموار بوده است. نانوالیاف الکتروریسی شده کامپوزیت پلی کاپرولاکتون/هیدروکسی آپاتیت در حلال مناسب کلروفورم/ متانول بدست آمد. در شکل (۶) جذب آب در لیف PCL و الیاف PCL-HA در فواصل زمانی مختلف پس از غوطه‌ور کردن در (الف) آب مقطر و (ب) SBF نشان داده شده است. در هر دو شکل جذب آب لیف پلی کاپرولاکتون، در فاصله زمانی مشخص با کاهش روبرو شده و این به سبب خاصیت آب‌گریزی پلی کاپرولاکتون می‌باشد. ولی آنچه در هر دو شکل مشخص است میزان آبدوستی کامپوزیت نانولیفی PCL-HA از PCL به وضوح بالاتر است و این به دلیل خاصیت آبدوستی بالا فاز کلسیم‌فسفاتی است که با PCL اختلاط شده است. ترشوندگی نانوالیاف با استفاده از زاویه تماس تعیین شد. اختلاط HA با PCL با توجه به خاصیت آبدوستی HA آن موجب کاهش زاویه تماس در نانوالیاف کامپوزیت شده است و این کاهش زاویه تماس در غلظت‌های بالای PCL و HA بیش‌تر نمایان شده است (جدول ۲-۴) [۳۴]. کاهش در زاویه تماس و افزایش آبدوستی می‌تواند محیط مساعد برای زیست‌تخریب‌پذیری و افزایش توانایی جذب آب نانوالیاف کامپوزیتی PCL-HA را برای رشد سلول‌های استخوانی فراهم کند.



شکل ۶- جذب آب الیاف PCL و PCL-HA در بازه زمانی مختلف پس از غوطه‌ور کردن (الف) آب مقطر (ب) مایع شبیه‌سازی شده بدن [۳۴].

جدول ۱- اندازه گیری زاویه تماس از الیاف PCL و PCL-HA با غلظت مختلف [۳۴].

Composition	0%HA/7.5% PCL	10%HA/7.5% PCL	20%HA/7.5% PCL	0%HA/12.5% PCL	10%HA/12.5% PCL	20%HA/12.5% PCL
Contact angle	127.3 ± 2.4 	112.7 ± 3.1 	106.3 ± 4.5 	120.5 ± 2.2 	115.1 ± 4.1 	93.7 ± 3.6 

۴- نتیجه گیری

در این تحقیق به ارائه مروری بر تولید نانو الیاف نانو کامپوزیتی پلیمر-سرامیک به روش الکتروریسی پرداخته شد. با توجه به خواص زیست سازگاری بالا، زیست تخریب پذیری، سطح تخلخل بالا و خواص مکانیکی مطلوب داربست های نانو کامپوزیتی آزمایشاتی به منظور بررسی مورفولوژی داربست ها، میزان جذب آب، فعالیت ALP صورت گرفت. نتایج بدست آمده نشان داد که کامپوزیت های پلیمر-سرامیک با توجه به مورفولوژی و خواص بیولوژیک مناسب می توانند داربست های مناسبی برای اهداف مهندسی بافت استخوان باشند.

مراجع

- [1] Lanza R., Langer R., Vacanti J. "Principles of Tissue Engineering, 3rd ed. Academic Press". San Diego. Bailey, AE, 1979.
- [2] Hollister, S. J. "Porous scaffold design for tissue engineering, Nature materials". Vol. 4, PP. 518-524, 2005.
- [3] Chen SS, Fitzgerald W, Zimmerberg J, Kleinman HK. "Cell-cell and cell-extracellular matrix interaction regulate embryonic". Stem cell. Vol. 25, PP. 553-661, 2007.
- [4] Gunatilake AP, Adhikari R. "Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering". European Cells and Material. Vol. 5, PP. 1-16, 2003.
- [5] Z.M. Huang, Y.Z. Zhang, M. Kotaksi, S. Ramakrishna. "A review on polymer Nanofibers by electrospinning & their application in Nano composites." Composites Science and Technology. Vol. 63, PP. 2223-2253, 2003.
- [6] Liu H, Ding X, Zhou G, Li P, Wei X, Fan Y. "Electrospinning of Nanofibers for Tissue Engineering Applications". Journal of Nanomaterials. Vol. 2013, PP. 1-11, 2013.
- [7] Beachley V, Wen X. "Polymer nanofibrous structures: Fabrication, biofunctionalization, and cell interactions". Progress in Polymer Science. Vol. 35, PP. 868-892, 2010.
- [8] Bhardwaj N, Kundu SC. "Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique Biotechnology". Advances. Vol. 28, PP. 325-347, 2012.
- [9] Xie J, Li X, Xia Y. "Putting electrospun nanofibers to work for biomedical research". Macromol, Rapid Commun. Vol. 29, PP. 1775-1792, 2008.
- [10] Babaei Z, Jahanshahi M, Rabiee SM. "The fabrication of nanocomposites via calcium phosphate formation on gelatin-chitosan network and the gelatin influence on the properties of biphasic composites". Materials Science and Engineering C. Vol. 33, PP. 370-375, 2013.
- [11] Thein-Han WW, Saikhun J, Pholpramoo C, Misra RD, Kitiyanant Y, Chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering: physicochemical properties and biological response of buffalo embryonic stem cells and transfectant of GFP-buffalo embryonic stem cells. Acta biomaterialia. Vol. 5, PP. 3453-3466, 2009.
- [12] Lien S, Li W, Huang T. "Genipin cross linked gelatin scaffolds for articular cartilage tissue engineering with a novel crosslinking method". Mater. Sci. Eng. C. Vol. 28, PP. 36-43, 2008.
- [13] Rabiee SM, Moztarzadeh F, Salimi-Kenari H, Solati-Hashjin M. "Preparation and properties of a porous calcium phosphate bone graft Substitute". Materials Science-Poland. Vol. 25, PP. 1019-1027, 2007.
- [14] Swetha M, Sahithi K, Moorthi A, Srinivasan N, Ramasamy K, Selvamurugan N. "Biocomposites containing natural polymers and hydroxyapatite for bone tissue engineering". Int. Journal. Biological Macromolecules. Vol. 47, PP. 1-4, 2010.
- [15] Kim HW, Song JH, Kim HE. "Nanofiber generation of gelatin-hydroxyapatite biomimetics for guided tissue regeneration. Advance". Function. Materials. Vol. 15, PP. 1988-1994, 2005.
- [16] Badami AS, Kreke MR, Thompson MS, Riffle JS, Goldstein AS. "Effect of fiber diameter on spreading, proliferation, and differentiation of osteoblastic cells on electrospun poly (lactic acid) substrates". Biomaterials. Vol. 27, PP. 596-606, 2006.
- [17] Chen J, Chu B, Hsiao BS. "Mineralization of hydroxyapatite in electrospun nanofibrous poly (L-lactic acid) scaffolds". Journal of Biomedical Materials Research, Part A. Vol. 79, PP. 307-317, 2006.

- [18] Kim HW, Lee HH, Knowles JC. "Electrospinning biomedical nanocomposite fibers of hydroxyapatite/ poly (lactic acid) for bone regeneration". *Journal of Biomedical Materials Research, Part A*. Vol. 79, PP. 643–649, 2006.
- [19] Nikpour MR, Rabiee SM, Jahanshahi M. "Synthesis and characterization of hydroxyapatite/chitosan nanocomposite materials for medical engineering application". *Composites: Part B*. Vol. 43, PP. 1881–1886, 2012.
- [20] Peter M, Ganesh N, Selvamurugan N, Nair SV, Furuike T, Tamura H, Jayakumar R. "Preparation and characterization of chitosan-gelatin/ nanohydroxyapatite composite scaffolds for tissue engineering applications". *Carbohydrate Polymers*. Vol. 80, PP. 687-694, 2009.
- [21] Peter M, Binulal NS, Nair SV, Selvamurugan N, Tamura H, Jayakumar R. "Novel biodegradable chitosan - gelatin/nano-bioactive glass ceramic composite scaffolds for alveolar bone tissue engineering". *Chemical Engineering Journal*. Vol. 158, PP. 353-361, 2012.
- [22] Zhang YZ, Su B, Ramakrishna S, Lim CT. "Chitosan nanofibers from an easily electrospinnable UHMWPEO-doped chitosan solution system". *Biomacromolecules*. Vol. 9, PP. 136–41, 2008.
- [23] Zhang Y, Venugopal JR, El-Turki A, Ramakrishna S, Su B, Lim CT. "Electrospun biomimetic nanocomposite nanofibers of hydroxyapatite/chitosan for bone tissue engineering". *Biomaterials*. Vol. 29, PP. 4314–4322, 2008.
- [24] Huang L, Nagapudi K, Apkarian RP, Chaikof EL. "Engineered collagen-PEO nanofibers and fabrics". *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. Vol. 12, PP. 979-93, 2001.
- [25] Zhang C, Yuan X, Wu L, Han Y, Sheng J. "Study on morphology of electrospun poly (vinyl alcohol) mats. *European Polymer Journal*". Vol. 41, PP. 423–32, 2005.
- [26] Zhao ZZ, Li JQ, Yuan XY, Li X, Zhang YY, Sheng J. "Preparation and properties of electrospun poly (vinylidene fluoride) membranes". *Journal Applied Polymer Science*. Vol. 97, PP. 466-74, 2005.
- [27] Koski A, Yim K, Shivkumar S. "Effect of molecular weight on fibrous PVA produced by Electrospinning". *Material Letter*. Vol. 58, PP. 493–7, 2004.
- [28] Marcho M. "Calcium phosphate ceramics as hard Tissue prosthetics". *Clinic Orthopaedic*. Vol. 157, PP. 259-278, 1981.
- [29] Yeo MG, Kim GH. "Preparation and Characterization of 3D Composite Scaffolds Based on Rapid-Prototyped PCL/ β -TCP Struts and Electrospun PCL Coated with Collagen and HA for Bone Regeneration". *Material*. Vol. 24 PP. 903–913, 2012.
- [30] Kim YB, Kim GH. "Rapid-prototyped collagen scaffolds reinforced with PCL/ β -TCP nanofibres to obtain high cell seeding efficiency and enhanced mechanical properties for bone tissue regeneration". *Journal of Materials Chemistry*. Vol. 22, PP. 16880–16889, 2012.
- [31] Erisken C, Kalyon DM, Wang H. Function-ally graded electrospun polycaprolactone and β -tricalcium phosphate nanocomposites for tissue engineering applications. *Biomaterials*. Vol. 29, PP. 4065–4073, 2008.
- [32] Zhou Y, Hutmacher DW, Varawan S, Lim TM. "In vitro bone engineering based on polycaprolactone and polycaprolactone–tricalcium phosphate composites". *Polymer International*. Vol. 56 PP. 333–342, 2007.
- [33] Maroof N, Karim Aghaloo F, Vahid Dastjerdi E, Nazarian H, Noje Dehiyan H. "Physicochemical evaluation of Chitosan-gelatin-Hydroxyapatite composite scaffold prepared by freeze drying". *Journal Dental School*. Vol. 29, PP. 385-393, 2012.
- [34] Hassan MI, Sultana N, Hamdan S. "Bioactivity Assessment of Poly (ϵ -caprolactone)/Hydroxyapatite Electrospun Fibers for Bone Tissue Engineering Application". *Journal of Nanomaterials*, Vol. 2014, pp. 1-6, 2014.