Research article

Available in: http://jips.ippi.ac.ir

Iran. J. Polym. Sci. Technol. (Persian),
Vol. 37, No. 2, 127-139
June-July 2024
ISSN: 1016-3255
Online ISSN: 2008-0883
DOI: 10.22063/JIPST.2024.3553.2291

Characterization of Electrospun Scaffold Made of Polyhydroxybutyrate-Poly(ethylene glycol) Incorporated by Bioactive Glass for Bone Tissue Engineering

Elham Naghashzargar*, Amaneh Ebadi

Department of Textile Engineering, University of Bonab, Postal Code: 5551395133, Bonab, Iran

Received: 25 December 2023, accepted:30 September 2024

ABSTRACT

Hypothesis: Bone injuries are considered to be one of the challenges of medical science, which involves heavy finances for treatment in the world every year. The use of various types of electrospun nanofibrous structures consisting of biopolymers along with bioceramics is very important in the application of bone tissue engineering. Polyhydroxybutyrate is known as a biocompatible polymer with high mechanical strength. Needless to say, properties such as its low hydrophilicity have led to its combination with other hydrophilic polymers such as polyethylene glycol. In the applications of bone tissue engineering, bioceramics, such as bioactive glass, are usually used to increase the bioactive property, which is very important in the stages of bone growth and repair.

Methods: The purpose of this study is to design and evaluate a nanocomposite scaffold consisting of two polymers, polyhydroxybutyrate and polyethylene glycol, containing bioactive glass prepared by electrospinning for bone tissue engineering. For this purpose, different percentages of bioactive glass from 5 to 12.5% (by wt) were added to the electrospinning solution of polyhydroxy butyrate and polyethylene glycol. The produced samples were characterized and compared in terms of functional bioactivity test.

Findings: Scanning electron microscope images show successful electrospinning, without interruption or any damage to the nanofiber surface. The presence of bioactive glass nanoparticles can be proven by energy dispersive X-ray test. By adding the bioactive glass component to the polymer solution, the average diameter of the produced nanofibers is increased and the value of hydrophilicity is decreased. Based on the obtained results of nanofiber diameter and hydrophilicity, 5% (by wt) of bioactive glass was decided as the optimal percentage. In the bioactivity test, the increase in bioactivity with the formation of hydroxyapatite phase on the surface of nanocomposite samples can be proven.

Keywords:
polyhydroxybutyrate,
poly(ethylene glycol),
bioactive glass,
electrospinning,
bone tissue

(*)To whom correspondence should be addressed.
E-mail: e.naghashzargar@ubonab.ac.ir

Please cite this article using:
Naghashzargar E., Ebadi E., Characterization of Electrospun Scaffold Made of Polyhydroxybutyrate-Poly(ethylene glycol) Incorporated by Bioactive Glass for Bone Tissue Engineering, *Iran. J. Polym. Sci. Technol. (Persian)*, **37**, 127-139, 2024.

مقاله پژوهشی

مشخصه‌یابی داربست الکتروریسی‌شده پلی‌هیدروکسی بوتیرات-پلی(اتیلن گلیکول) دارای شیشه زیست‌فعال برای مهندسی بافت استخوان

الهام نقاش زرگر*، آمنه عبادی

بناب، دانشگاه بناب، گروه مهندسی نساجی، کد پستی ۵۵۵۱۳۹۵۱۳۳

دریافت: ۱۴۰۲/۱۰/۴، پذیرش: ۱۴۰۳/۷/۹

دسترس‌پذیر در نشانی: http://jips.ippi.ac.ir

مجله علوم و تکنولوژی پلیمر،
سال سی و هفتم، شماره ۲،
صفحه ۱۳۹-۱۲۷، ۱۴۰۳
ISSN: 1016-3255
Online ISSN: 2008-0883
DOI: 10.22063/JIPST.2024.3553.2291

چکیده

فرضیه: آسیب‌های استخوانی یکی از چالش‌های علم پزشکی به‌شمار می‌آید که هر ساله در دنیا هزینه زیادی را برای درمان به خود اختصاص داده است. استفاده از انواع ساختارهای نانولیفی الکتروریسی‌شده متشکل از پلیمرهای زیستی به‌همراه سرامیک‌های زیستی در کاربرد مهندسی بافت استخوان از اهمیت زیادی برخوردار است. پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات به‌عنوان پلیمر زیست‌سازگار با استحکام مکانیکی زیاد شناخته می‌شود. البته خواصی نظیر آب‌دوستی کم آن به ترکیب آن با سایر پلیمرهای آب‌دوست مانند پلی(اتیلن گلیکول) منجر شده است. در کاربردهای مهندسی بافت استخوان، برای افزایش خاصیت زیست‌فعالی که در مراحل رشد و ترمیم استخوان از اهمیت زیادی برخوردار است، به‌طور معمول از انواع زیست‌سرامیک‌ها مانند شیشه زیست‌فعال استفاده می‌شود.

روش‌ها: هدف از این مطالعه طراحی و ارزیابی داربست نانوکامپوزیتی متشکل از دو پلیمر پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات و پلی(اتیلن گلیکول) دارای شیشه زیست‌فعال تهیه‌شده با روش الکتروریسی برای مهندسی بافت استخوان است. بدین منظور درصدهای مختلف شیشه زیست‌فعال از ٪۵ تا ٪۱۲/۵ وزنی به محلول الکتروریسی پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات و پلی(اتیلن گلیکول) اضافه شد. نمونه‌های تولیدشده مشخصه‌یابی شده و از نظر آزمون عملکردی زیست‌فعالی بررسی و مقایسه شدند.

یافته‌ها: تصاویر میکروسکوپ الکترونی بیانگر الکتروریسی موفق، بدون گسستگی یا هر گونه آسیب در سطح الیاف بوده است. وجود نانوذرات شیشه زیست‌فعال با استفاده از آزمون پاشنده انرژی پرتو X قابل اثبات است. با افزودن جزء شیشه زیست‌فعال به محلول پلیمری، قطر متوسط نانوالیاف تولیدشده روند افزایشی داشته و مقدار آب‌دوستی کاهش یافته است. با توجه به نتایج، قطر نانوالیاف و آب‌دوستی، ٪۵ وزنی از شیشه زیست‌فعال به‌عنوان مقدار بهینه انتخاب شد. در آزمون عملکردی نیز افزایش خاصیت زیست‌فعالی با تشکیل فاز هیدروکسی‌آپاتیت روی سطح نمونه‌های نانوکامپوزیتی قابل اثبات است.

واژه‌های کلیدی

پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات،
پلی(اتیلن گلیکول)،
شیشه زیست‌فعال،
الکتروریسی،
بافت استخوان

* مسئول مکاتبات، پیام‌نگار:
e.naghashzargar@ubonab.ac.ir

مقدمه

با توجه به اهمیت بافت استخوان در بدن موجودات زنده، هر گونه آسیب و جراحت در ساختار آن به ایجاد مشکلات زیادی در زندگی فرد منجر خواهد شد. بافت استخوانی آسیب‌دیده دارای قابلیت ذاتی در ترمیم خودبه‌خودی آسیب‌های خفیف و جزئی بدون نیاز به دخالت دارویی است. قابلیت ترمیم خودبه‌خودی بافت استخوان محدودیت‌هایی نیز دارد، به‌نحوی که در شکستگی‌های بزرگ، درمان توسط بدن مؤثر نبوده و به درمان‌های دارویی، پیوندی یا پزشکی نیاز است. در مقایسه با روش‌های پیوندی رایج، مهندسی بافت که براساس پیوند یاخته یا بافت در بستری از داربست انجام می‌شود، مشکلات پیوندهای رایج را از بین برده و روش مؤثرتر و نویدبخش‌تری در درمان آسیب‌های بافت استخوان ارائه می‌کند [۱،۲].

از میان مواد زیستی ارائه‌شده در طراحی انواع داربست، گروه مربوط به شیشه زیست‌فعال از مهم‌ترین مواد مصرفی در مهندسی بافت استخوان است که زیر مجموعه سرامیک‌های زیستی هستند. شیشه زیست‌فعال قابلیت اتصال با بافت زنده را دارد و زمانی‌که در تماس با مایع زیستی قرار می‌گیرد، لایه‌ای با ساختار آپاتیت در سطح خود تشکیل می‌دهد که این لایه مسئول اتصال به بافت‌های نرم و سخت اطراف است [۳،۴]. پژوهش‌ها نشان داده است، با به‌کارگیری نانوذرات سرامیکی مانند شیشه زیست‌فعال در کنار مواد پلیمری و تولید نانوکامپوزیت‌های پلیمری، افزون بر امکان دستیابی به خواص مکانیکی بهتر، درجه زیست‌سازگاری و قابلیت استخوان‌سازی نیز به‌مقدار چشم‌گیری افزایش خواهد یافت و می‌توان ماده‌ای نزدیک‌تر به خواص استخوان طبیعی فراهم کرد. ساختار سه‌بعدی بسیار متخلخل به‌همراه حفره‌های به‌هم پیوسته با قابلیت انتقال مواد غذایی و مواد زاید و نیز نسبت سطح به حجم زیاد از مهم‌ترین برتری‌های داربست‌های نانوکامپوزیتی لیفی است [۵،۶].

از میان روش‌های مختلف تولید داربست‌های نانولیفی متشکل از مواد پلیمری و نانوذرات سرامیکی، الکتروریسی به‌دلیل آسانی و کنترل بیشتر بر عوامل مؤثر، به سایر روش‌ها ترجیح داده می‌شود. الکتروریسی روشی آسان و مقرون به‌صرفه برای تولید الیافی است که در تولید آن از میدان الکتریکی با ولتاژ زیاد استفاده می‌شود [۷،۸]. با توجه به اینکه استخوان ترکیبی دوفازی متشکل از یک فاز پلیمری و یک فاز معدنی است، برای طراحی داربست مهندسی بافت استخوان ضرورت دارد که شرایط لازم برای ایجاد هر دو فاز مهیا شود. معمولاً در فاز معدنی از زیست‌سرامیک‌ها و در فاز پلیمری از پلیمرهای طبیعی یا سنتزی یا ترکیبی استفاده می‌شود. در این مطالعه، از دو پلیمر پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات (polyhydroxybutyrate, PHB) و پلی(اتیلن گلیکول) (poly(ethylene glycol), PEG) به‌عنوان ماده پلیمری ماتریس و از شیشه زیست‌فعال (bioactive glass, BG) به‌عنوان فاز معدنی سرامیکی استفاده شده است.

PHB، یک پلی‌هیدروکسی‌آلکونات است که پلیمری متعلق به دسته پلی‌استرهاست و به‌دلیل داشتن خواص مناسب نظیر زیست‌سازگاری خوب، زیست‌تخریب‌پذیری مناسب و استحکام مکانیکی زیاد در مقایسه با سایر پلیمرها، در کاربردهای پزشکی مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. تهرانی و همکاران [۹] محلول پلیمری پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات را تهیه و الکتروریسی کردند. یاخته‌های فیبروبلاست موش روی سطح داربست کشت داده شد و رشد و تکثیر مناسب را ارائه کرد. البته، خواصی نظیر آب‌دوستی کم و تُردی آن باعث می‌شود تا به‌صورت خالص برای ساخت داربست مهندسی بافت استخوان مناسب نباشد. از جمله راهکارهای حل این مشکل، آمیخته‌سازی آن با سایر پلیمرهاست [۱۰].

PEG یکی از مهم‌ترین پلیمری است که قابلیت ترکیب با PHB را دارد. PEG، به دسته‌ای از پلیمرهای آب‌دوست متشکل از واحد مونومر اتیلن گلیکول گفته می‌شود. از ویژگی‌های این پلیمر سنتزی می‌توان به آب‌دوستی، خواص غیرپادگنی (antigen)، انحلال‌پذیری در آب، زیست‌سازگاری زیاد و دفع آسان از راه کلیه و خون اشاره کرد. از کاربردهای PEG می‌توان به اصلاح سطح به‌عنوان پوشش آب‌دوست روی نانوذرات، دارورسانی و مهندسی بافت اشاره کرد [۱۱]. Spasova و همکاران [۱۲] نانوالیاف الکتروریسی‌شده پلی(L-لاکتیک اسید)-پلی(اتیلن گلیکول) را معرفی کردند. در این مطالعه، نسبت‌های مختلف پلی(L-لاکتیک اسید) و پلی(اتیلن گلیکول) بررسی شد. ریزلایه‌های نانولیفی الکتروریسی‌شده در برابر یاخته‌های استئوبلاست و فیبروبلاست از زیست‌سازگاری مناسبی برخوردار بودند که دلیل آن ماهیت آب‌دوست PEG بود. همچنین، در پژوهش انجام‌شده درباره داربست‌های الکتروریسی‌شده PEG و پلی‌آکریلونیتریل برای کاربرد در داربست‌های مهندسی‌شده بافت استخوان بسیار موفق عمل کرده است [۱۳].

داربست‌های نانولیفی مزایای منحصربه‌فردی نسبت به سایر داربست‌ها دارند. از جمله برتری‌های آن‌ها تخلخل‌های مرتبط و مساحت سطح زیاد است که نقش مهمی در انتقال مواد غذایی و زائد، نفوذ چسبندگی و رشد یاخته‌ای دارد [۱۴]. برای افزایش خاصیت زیست‌فعالی PHB که در مراحل رشد و ترمیم استخوان الزامی است، به‌طور معمول پلیمر با انواع سرامیک‌های زیست‌فعال مانند شیشه زیست‌فعال یا هیدروکسی‌آپاتیت مخلوط می‌شود. در میان زیست‌سرامیک‌های سنتزی بهترین رفتار زیست‌فعالی، به شیشه‌های زیست‌فعال مربوط است. افزودن ترکیبات معدنی

مانند نانوذرات شیشه زیست‌فعال موجب بهبود خواص مکانیکی، زیست‌فعالی و برهم‌کنش بهتر داربست PHB با یاخته شده است [۱۵]. حسنی و همکاران [۱۶] بر خواص فیزیکی و مکانیکی هیدروژل نانوکامپوزیتی متشکل از دکستران و شیشه زیست‌فعال تمرکز کرده و آن را برای طراحی داربست مهندسی‌شده بافت استخوان پیشنهاد کردند. Iron و همکاران [۱۷] نیز ریزلایه‌های کامپوزیتی متشکل از PHB و شیشه زیست‌فعال را با روش الکتروریسی تهیه کرده و درصدهای مختلف شیشه زیست‌فعال از ٪۷/۵ تا ٪۱۵ وزنی–وزنی را بررسی کردند. تخلخل تمام نمونه‌ها بیش از ٪۸۰ گزارش شد. نتایج مربوط به آزمون خواص مکانیکی نشان داد، افزودن شیشه زیست‌فعال به ماده ماتریس PHB رفتار مکانیکی را بهبود بخشیده است. ٪۷/۵ وزنی–وزنی از شیشه زیست‌فعال به‌عنوان مقدار بهینه معرفی شد. داربست کامپوزیتی طراحی‌شده رفتار زیست‌فعالی خوبی نیز داشته است. همچنین فروغی و همکاران [۱۸] در طراحی داربست مهندسی‌شده بافت استخوان از سه ماده PHB، کیتوسان و شیشه زیست‌فعال با روش الکتروریسی استفاده کردند. براساس نتایج اضافه‌کردن دو ماده کیتوسان و شیشه زیست‌فعال به ماده پایه PHB به بهبود خواص مکانیکی و زیست‌فعالی داربست منجر شده است.

Karahaliloğlu و همکاران [۱۹] نیز پژوهشی درباره نانوالیاف الکتروریسی‌شده PHB در مقایسه با نانوالیاف الکتروریسی‌شده PHB اصلاح‌شده با PEG به روش پلاسما انجام دادند. در این مطالعه، زاویه تماس آب اندازه‌گیری شد و مقدار عددی آن برای PHB از ۱۱۰° به ۶۲° برای نمونه اصلاح سطح‌شده با PEG کاهش پیدا کرد. دلیل اصلی کاهش زاویه تماس آب پوشش‌دهی سطحی ماده PEG روی نانوالیاف الکتروریسی‌شده PHB عنوان شد. نمونه اصلاح‌شده از رشد و تکثیر یاخته‌ای بهتری نیز برخوردار بود. با توجه به مطالب گفته‌شده، هدف از این پژوهش طراحی بافت مهندسی‌شده استخوانی به‌کمک ریزلایه‌های نانوکامپوزیتی متشکل از PHB، PEG و شیشه زیست‌فعال برای اولین بار است. درصدهای مختلف شیشه زیست‌فعال در ماده زمینه PHB-PEG بررسی شده و سپس آزمون‌های مشخصه‌یابی و عملکردی برای دستیابی به نمونه بهینه انجام شد.

تجربی

مواد

پودر پلیمر پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات (PHB) با وزن مولکولی متوسط وزنی ۳۰۰۰۰۰ g/mol از شرکت Sigma-Aldrich خریداری شد. پودر نانوذرات شیشه زیست‌فعال (bioactive glass, BG) از نوع 45s با اندازه ذرات کمتر از ۱۵۰ nm تهیه شد. دانه‌های پلی(اتیلن گلیکول) (PEG) با وزن مولکولی متوسط عددی ۴۰۰۰ g/mol و دو حلال کلروفرم و دی‌متیل‌فرمامید نیز از شرکت Merck آلمان تهیه شدند.

دستگاه‌ها و روش‌ها

طراحی ریزلایه‌های نانولیفی کامپوزیتی

ابتدا، برای تهیه محلول پلیمری متشکل از دو ماده PHB و PEG، از دو حلال کلروفرم و دی‌متیل فرمامید به‌ترتیب با نسبت وزنی ۹ به ۱ استفاده شد. به‌منظور حل‌کردن PHB در کلروفرم به دمای ۶۰ °C و برای حل‌کردن دانه PEG به دمای محیط نیاز است. غلظت جزء PHB ٪۹ وزنی–وزنی و جزء PEG ٪۵ وزنی–وزنی درنظر گرفته شد. در این غلظت‌ها، نانوالیافی با ساختار سالم بدون دانه، شکستگی یا هر نوع آسیب دیگر با توزیع قطری یکنواخت به‌دست خواهد آمد. غلظت‌های بهینه در تولید نانوالیاف الکتروریسی‌شده PHB-PEG براساس شرایط نمونه بهینه در مطالعه پیشین انتخاب شد [۲۰]. دو پلیمر مدنظر در حلال‌های مصرفی به‌مدت ۳۰ min به‌کمک همزن مغناطیسی همزده شدند تا محلول یکنواختی به‌دست آید. برای تهیه محلول کامپوزیتی شامل نانوذرات شیشه زیست‌فعال، چهار مقدار وزنی ۵، ۷/۵، ۱۰ و ٪۱۲/۵ به محلول پلیمری قبلی اضافه شد و پس از مدت ۹۰ min استفاده از همزن مغناطیسی، از همزن فراصوت استفاده شد. برای توزیع یکنواخت و بهتر ذرات در محلول و جلوگیری از کلوخه‌شدن نانوذرات، محلول به‌مدت ۳۰ min به‌کمک همزن فراصوت کاونده‌ای با توان ۱۰۰ W همزده شد و بلافاصله الکتروریسی شد. پس از تهیه محلول پلیمری، برای الکتروریسی از جمع‌کننده ثابت ایستا استفاده شد. برای انجام فرایند الکتروریسی، فاصله بین افشانک و صفحه ایستا (فاصله ریسندگی) ۱۳ cm، ولتاژ ۱۸ kW و سرعت تغذیه ۱ mL/h مطابق با شرایط بهینه فرایند الکتروریسی در پژوهش‌های پیشین تنظیم شدند [۲۰]. مطابق با جدول ۱ طراحی آزمایش‌ها مربوط به تهیه ۶ نمونه ریزلایه نانولیفی سه‌جزئی متشکل از PHB، PEG و شیشه زیست‌فعال انجام شده و در شکل ۱ نمایی از مراحل تهیه و ارزیابی نمونه‌های نانوکامپوزیتی آمده است.

مشخصه‌یابی

برای مشخصه‌یابی و ارزیابی داربست‌های نانوکامپوزیتی و تهیه تصاویر میکروسکوپ الکترونی پویشی از ریزلایه‌های الکتروریسی‌شده از میکروسکوپ الکترونی پویشی (SEM) MIRA3-XMU شرکت TESCAN از جمهوری چک استفاده شد. با استفاده از نرم‌افزار تحلیل

جدول ۱- مشخصات داربست‌های نانولیفی الکتروریسی‌شده.

Table 1. Sample description of electrospun nanofiber scaffolds.

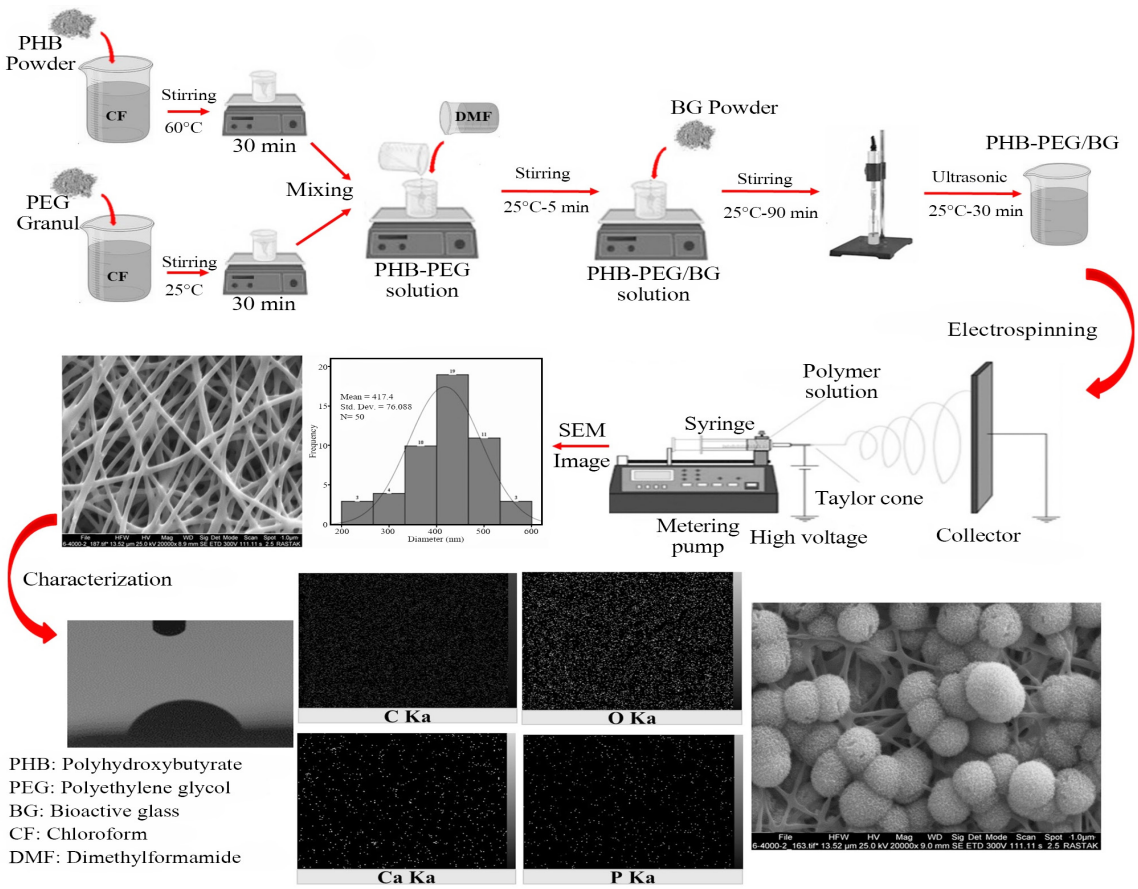
Sample no.	Sample code	Concentration (wt%)		
		BG	PEG	PHB
1	PHB	0	0	9
2	PHB-PEG	0	5	9
3	PHB-PEG/BG5	5	5	9
4	PHB-PEG/BG7.5	7.5	5	9
5	PHB-PEG/BG10	10	5	9
6	PHB-PEG/BG12.5	12.5	5	9

BG, Bioactive glass; PEG, poly(ethylene glycol); PHB, polyhydroxybutyrate.

تصاویر Image J، ۵۰ قطر از نانوالیاف تهیه‌شده با استفاده از تصاویر میکروسکوپ الکترونی اندازه‌گیری و تمام داده‌ها با نرم‌افزار آماری SPSS و Prism تجزیه و تحلیل شده و از نظر توزیع پراکندگی قطری، نمودار بافت‌نگاشت (histogram)، به‌همراه آماره‌های بهنجاربودن و تحلیل واریانس یک‌طرفه بررسی شدند.

آزمون ارزیابی پراکنش انرژی پرتو X (EDX-map) امکان شناسایی عناصر تشکیل‌دهنده نمونه به‌شکل نیمه‌کمی را به‌دست می‌دهد. این آزمون به‌کمک دستگاه MIRA 2 با آشکارساز SAMX ساخت فرانسه انجام شد. با توجه به وجود شیشه زیست‌فعال در بستر پلیمری PHB و PEG از عناصر کربن (C)، اکسیژن (O)، کلسیم (Ca) و فسفر (P) پرتوبرداری شد. وجود دو عنصر کلسیم و فسفات در آزمون EDX، وجود شیشه زیست‌فعال در ریزلایه الکتروریسی‌شده را تأیید می‌کند. در نمونه بهینه پس از قرارگرفتن در محلول SBF نیز وجود عنصر سیلسیم (Si) بررسی شد.

طیف‌سنجی زیرقرمز (FTIR) با امکان انجام تحلیل بازتابی (ATR)



شکل۱- نمایی از مراحل تهیه و ارزیابی داربست‌های الکتروریسی‌شده متشکل از پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات و پلی(اتیلن گلیکول) دارای شیشه زیست‌فعال.

Fig. 1. Schematic view of the fabrication and characterization of electrospun scaffolds made of polyhydroxybutyrate (PHB)-poly(ethylene glycol) (PEG) incorporated by bioactive glass.

یکی از پرکاربردترین روش‌های طیف‌سنجی در مواد شیمیایی به‌شمار می‌آید. در این مطالعه، از طیف‌سنج زیرقرمز مدل Thermo-AVATAR مجهز به ATR از نوع Diamond ساخت آمریکا استفاده شده است. نانوالیاف PHB، نانوالیاف متشکل از PHB و PEG و نیز نانوالیاف متشکل از سه جزء PHB، PEG و شیشه زیست‌فعال تولیدشده در محدوده عدد موجی $4000-400\ cm^{-1}$ با استفاده از نمک KBr با وضوح $4\ cm^{-1}$ مورد آزمایش قرار گرفتند و در نهایت تمام طیف‌ها با هم مقایسه شد.

برای بررسی مقدار آب‌دوستی یا آب‌گریزی سطح تمام ریزلایه‌ها، از دستگاه اندازه‌گیری زاویه تماس آب ایستا مدل GAC-10 ساخته‌شده در شرکت Jikan CA ایران استفاده شد. به‌منظور تشخیص مقدار آب‌دوستی یا آب‌گریزی لایه‌های لیفی از روش چکاندن قطره آب به‌مقدار $8\ \mu L$ بر سطح نانوالیاف و اندازه‌گیری زاویه تماس استفاده شده است. زاویه تماس با نرم‌افزار ImageJ طی سه تکرار و براساس استاندارد ASTM D5946 اندازه‌گیری شد.

آزمون عملکردی زیست‌فعالی

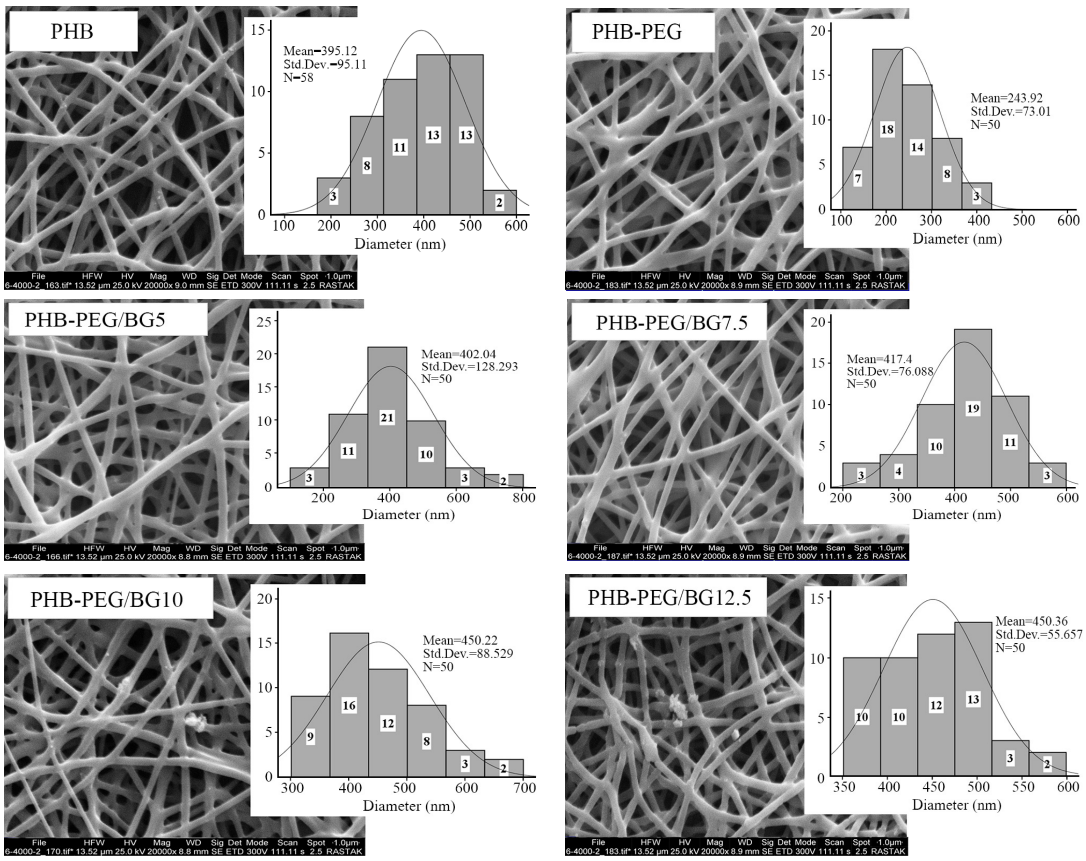
از سیال شبیه‌سازی‌شده بدن (simulated body fluid, SBF) برای ارزیابی زیست‌فعالی نمونه دارای شیشه زیست‌فعال استفاده شد. برای این آزمون نمونه‌هایی با ابعاد $1 \times 1\ cm$ از ریزلایه بهینه تهیه شده و سپس درون محلول SBF در دمای $37\ ^{\circ}C$ به‌مدت ۲۱ روز قرار داده شدند. در بازه‌های زمانی ۷، ۱۴ و ۲۱ روز نمونه‌ها از SBF خارج شده و ابتدا با آب مقطر شسته و سپس با محلول جدید جایگزین شدند. از نمونه‌ها آزمون SEM گرفته شد تا تشکیل فاز هیدروکسی‌آپاتیت روی سطح داربست و زیست‌فعالی آن تأیید شود.

نتایج و بحث

شکل‌شناسی ریزلایه‌های تهیه‌شده از نانوالیاف بر خواص فیزیکی، مکانیکی و زیستی داربست‌های تهیه‌شده اثرگذار است. افزون بر آن، قطر نانوالیاف تولیدشده و توزیع قطری آن بر شکل‌شناسی ریزلایه اثر خواهد گذاشت. پس از تهیه ریزلایه‌های الکتروریسی‌شده مطابق با جدول ۱، خواص شکل‌شناسی با استفاده از تصویرهای میکروسکوپ الکترونی بررسی شد. در شکل ۲، تصاویر مربوط به میکروسکوپ الکترونی پویشی به‌همراه نمودار فراوانی یا بافت‌نگاشت قطر نمونه‌های تهیه‌شده آمده است. تصاویر مربوط به میکروسکوپ الکترونی تمام نمونه‌ها، بیانگر الکتروریسی موفق هر شش نمونه بوده است. با اضافه‌کردن درصدهای مختلف از شیشه زیست‌فعال به محلول پلیمری PHB-PEG الکتروریسی با موفقیت انجام شده است. تمام ریزلایه‌های نانولیفی بدون گسستگی در فرایند الکتروریسی به تولید وب‌های ضخیم منجر شدند. تولید نانوالیاف سالم بدون هر گونه دانه یا چسبندگی نیز قابل اثبات است. کمترین قطر نانوالیاف تولیدشده به نمونه PHB-PEG با مقدار عددی $243 \pm 73\ nm$ مربوط است. علت آن کاهش گران‌روی محلول پلیمری در مقایسه با نمونه PHB بوده که به‌دلیل ماهیت ساختاری جزء PEG و عدم درگیری زنجیرهای پلیمری براساس مطالعات Spasova و همکاران است [۱۲]. براساس مطالعات پیشین، در تولید نانوالیاف الکتروریسی‌شده متشکل از PEG و پلی‌آکریلونیتریل به کاهش گران‌روی محلول پلیمری و ضریب رسانندگی محلول با افزایش جزء PEG اشاره شده است. کاهش گران‌روی و رسانندگی الکتریکی به کاهش قطر نانوالیاف منجر شده است. با کاهش گران‌روی، جت خروجی از ریسنده دستگاه الکتروریسی ناپایدار است و به آسیب در سطح لیف منجر می‌شود [۲۱]. با افزودن جزء شیشه زیست‌فعال با درصدهای مختلف ٪۵ تا ٪۱۲/۵ وزنی–وزنی به محلول پلیمری PHB-PEG، قطر متوسط نانوالیاف تولیدشده در تمام نمونه‌ها افزایش یافته به‌طوری که برای نمونه PHB-PEG/BG 5% مقدار $402 \pm 128\ nm$ محاسبه شده است. دلیل افزایش قطر نانوالیاف می‌تواند افزایش گران‌روی و مشکل‌ترشدن کشیدگی جت محلول پلیمری با افزودن نانوذره باشد. فروغی و همکاران [۱۸] نیز ادعا کردند، با افزایش شیشه زیست‌فعال به محلول پلیمری PHB و کیتوسان، قطر نانوالیاف تولیدی افزایش خواهد یافت.

با توجه به نتایج آزمون‌های بهنجاربودن Kolmogorov-smirnov و Shapiro-Wilk (P-value < ۰/۰۵) و نیز یکنواختی نمودار فراوانی، توزیع بهنجار داده‌ها و به‌عبارت دیگر یکنواختی آن اثبات می‌شود. در ادامه آزمون واریانس یک‌طرفه برای بررسی تفاوت معنادار متغیر قطر در بین شش گروه نمونه تهیه‌شده انجام شد و اختلاف معنادار بین قطر نمونه‌ها با توجه به‌مقدار آماره آزمون (P-value < ۰/۰۵) اثبات شد. براساس نتایج آزمون آماری توکی (شکل ۳)، اختلاف بین گروه‌های آماری قابل مشاهده است. با توجه به نتایج شکل ۳، درصدهای مختلف نانوذرات شیشه زیست‌فعال، اختلاف آماری معناداری روی قطر نانوالیاف ایجاد نمی‌کنند. بنابراین می‌توان گفت، تغییرات قطری نانوالیاف تولیدشده، با تغییر درصد نانوذرات شیشه زیست‌فعال از نظر آماری شایان توجه نیست و می‌توان با درصدهای کمتر از نانوذره به قطر کمتری از نانوالیاف رسید.

به‌منظور بررسی اثر اضافه‌کردن شیشه زیست‌فعال به ترکیب پلیمری PHB-PEG در فرایند الکتروریسی، تجزیه عنصری برای

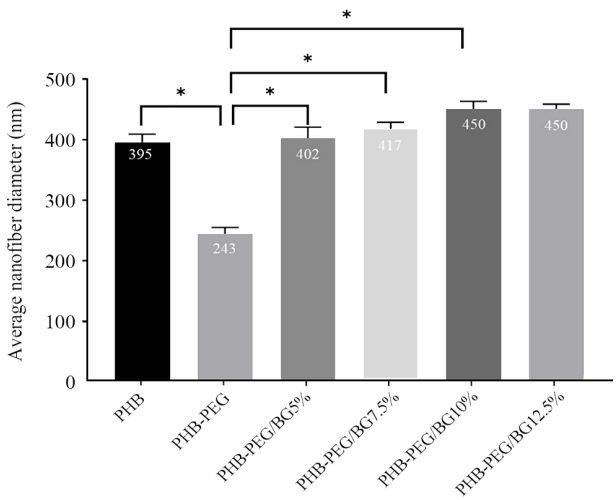


شکل ۲- تصویرهای SEM داربست‌های الکتروریسی‌شده به‌همراه نمودارهای بافت‌نگاشت.

Fig. 2. SEM images and related histograms of electrospun scaffolds.

تمام نمونه‌ها انجام شد. برای نمونه‌های PHB و PHB-PEG عناصر اکسیژن و کربن مدنظر بوده است، در حالی که برای نمونه‌های دارای شیشه زیست‌فعال چهار عنصر اکسیژن، کربن، کلسیم و فسفر درنظر گرفته شد. شکل ۴ به نقشه توزیع عناصر نام‌برده اشاره دارد.

همچنین، به مقدار عناصر موجود در نمونه‌ها براساس درصد وزنی نیز در جدول ۲ اشاره شده است. براساس داده‌های خلاصه‌شده در جدول ۲، با افزایش جزء PEG به ماتریس PHB مقدار وزنی اکسیژن در مقایسه با نمونه خالص PHB از ٪۱۹/۱۰ به ٪۱۹/۷۶ افزایش یافته که این افزایش با توجه به گروه‌های آب‌دوست OH انجام شده است. درصد عناصر کلسیم و فسفر در نمونه PHB-PEG/BG 5% به‌ترتیب برابر با ۰/۰۲ و ٪۰/۲۷ گزارش شده است. مقدار عناصر نام‌برده با افزایش شیشه زیست‌فعال تا ٪۱۰ وزنی-وزنی روند افزایشی داشته به‌طوری که در نمونه PHB-PEG/BG 10% به‌ترتیب ۰/۰۳ و ٪۰/۵۴ است. با افزایش بیشتر مقدار شیشه زیست‌فعال به ٪۱۲/۵ وزنی-وزنی روند کاهشی شده است و مقدار عناصر کاهش می‌یابد. احتمال تجمع نانوذرات با افزایش غلظت آن در محلول پلیمری می‌تواند دلیلی بر نتایج به‌دست‌آمده باشد. البته باید دقت کرد، روش پاشنده انرژی پرتو X روش نیمه‌کمی بوده و با توجه به نتایج آزمون‌های دیگر



شکل ۳- متوسط قطر نانوالیاف داربست‌های الکتروریسی‌شده (*P-value < ۰/۰۵).

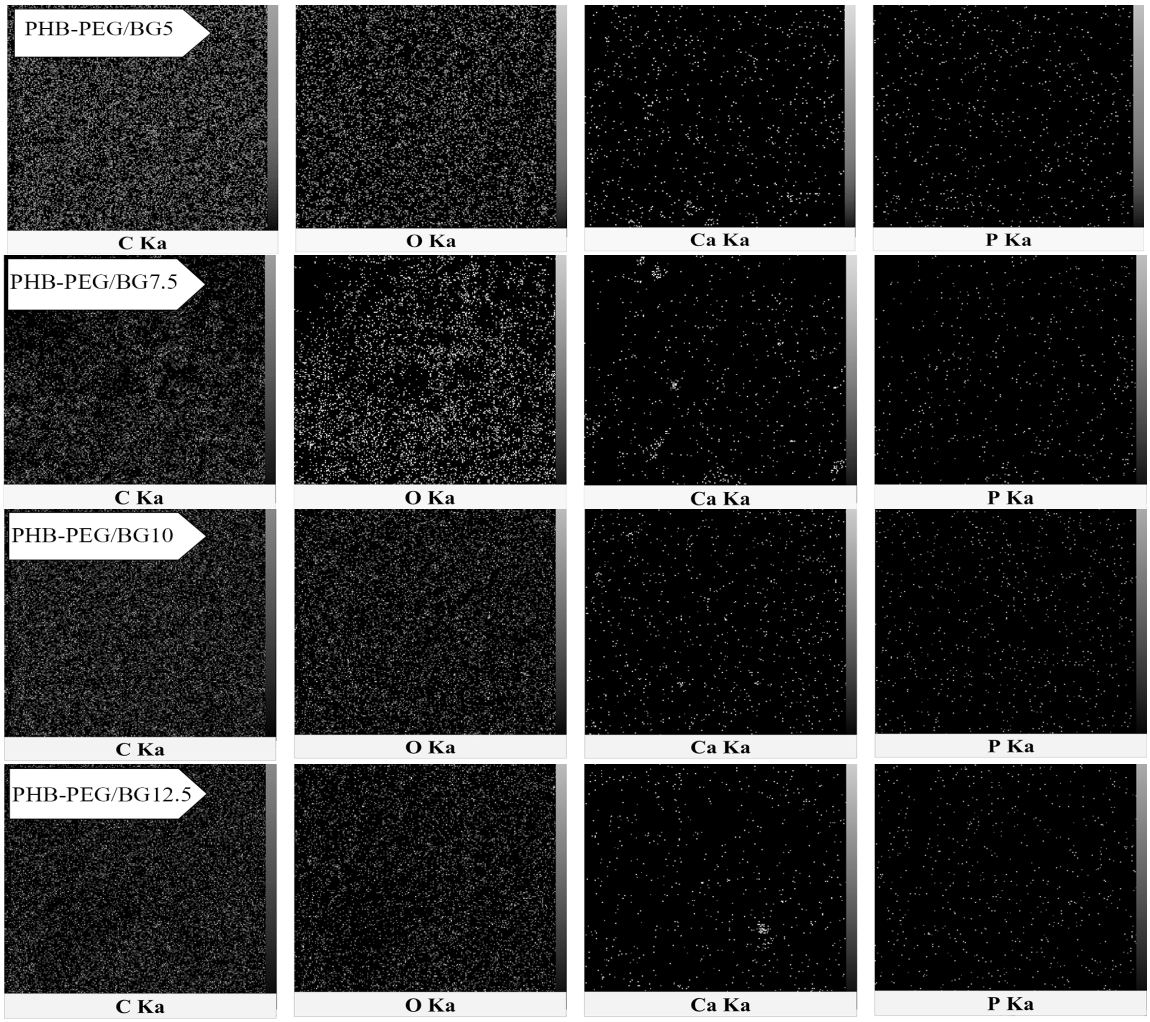
Fig. 3. Average nanofiber diameter of electrospun scaffolds (* P-value < 0.05).

جدول ۲- نتایج EDX، درصد وزنی عناصر موجود در داربست‌های الکتروریسی‌شده.

Table 2. EDX analysis, weight percentage of elements in electrospun scaffolds.

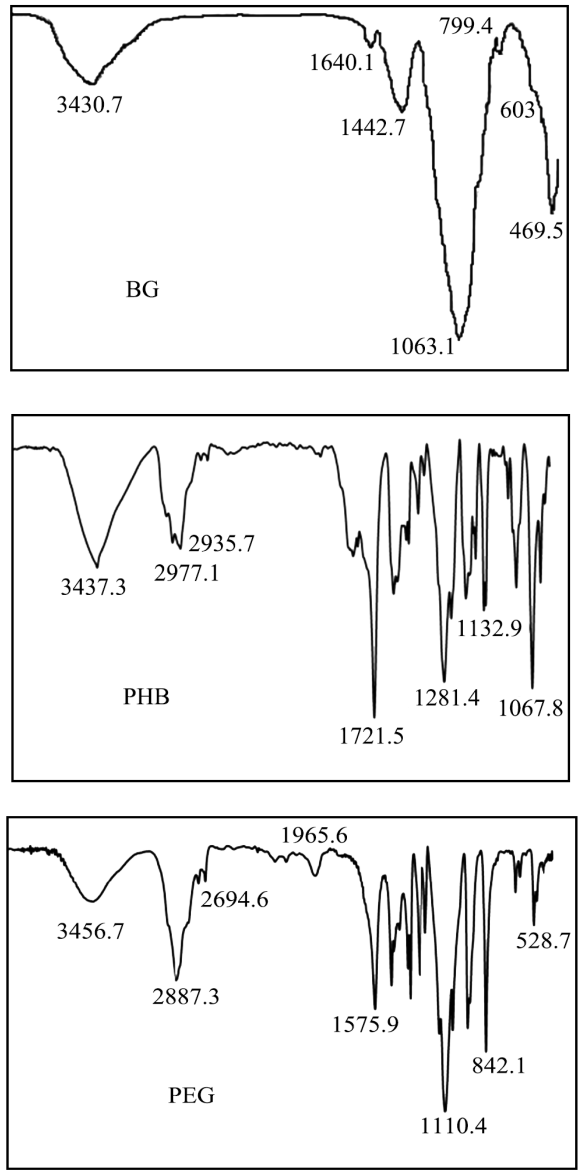
Sample code	P (wt%)	Ca (wt%)	O (wt%)	C (wt%)
PHB	0	0	19.10	80.90
PHB-PEG	0	0	19.76	80.24
PHB-PEG/BG5	0.24	0.03	41.01	58.73
PHB-PEG/BG7.5	0.27	0.02	41.07	58.64
PHB-PEG/BG10	0.54	0.03	40.02	59.41
PHB-PEG/BG12.5	0.34	0.03	40.42	59.21

می‌توان به آن استناد کرد. براساس مطالعات Iron و همکاران [۱۷] افزایش غلظت‌های بیش از ٪۱۰ وزنی-وزنی شیشه زیست‌فعال به محلول پلیمری PHB به پدیده کلوخگی نانوذرات منجر می‌شود و مقدار بهینه در افزودن نانوذرات شیشه ٪۱۰ است. نتایج مطالعات این پژوهشگران تأییدکننده نتایج بررسی EDX بوده و با افزایش بیشتر نانوذرات شیشه زیست‌فعال از ٪۱۰ به ٪۱۲/۵ عناصر مربوط به شیشه



شکل ۴- نقشه EDX عناصر Ca، O، C و P داربست‌های الکتروریسی‌شده دارای شیشه زیست‌فعال.

Fig. 4. EDX-Map of electrospun scaffolds incorporated by bioactive glass (C, O, Ca and P elements).



شکل ۵- نتایج FTIR شیشه زیست‌فعال، پلی(اتیلن گلیکول) و پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات.

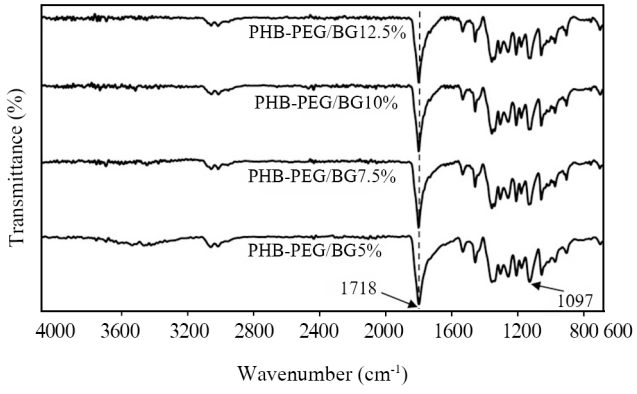
Fig. 5. FTIR results of bioactive glass, poly(ethylene glycol) and polyhydroxybutyrate.

زیست‌فعال کاهش یافته است که به‌احتمال زیاد به کلوخگی نانوذرات در بعضی از نقاط سطح ریزلایه مربوط است.

از آزمون طیف‌سنجی زیرقرمز برای بررسی گروه‌های عاملی و ساختار شیمیایی نانوالیاف تولیدی استفاده شد. شکل ۵ نتایج FTIR سه ماده شیشه زیست‌فعال، PEG و PHB و شکل ۶ نتایج FTIR نمونه‌های نانولیفی PHB-PEG دارای مقدارهای مختلف نانوذرات شیشه زیست‌فعال را نشان می‌دهد. با توجه به طیف FTIR، پیوند کربونیل C=O کشیده‌شده ساختار بلوری گروه‌های استر در عدد موجی ۱۷۲۱ cm^{-1} و نیز پیوند گروه‌های CH– در عدد موجی ۱۱۲۸ cm^{-1} قابل مشاهده است. این دو پیوند در کنار هم وجود ماده PHB را تأیید می‌کند. عددهای موجی موجود در فاصله بین ۱۰۰۰ cm^{-1} تا ۱۳۰۰ cm^{-1} نشان‌دهنده پیوند C-O کشیده‌شده از گروه‌های استری است. وجود گروه‌های CH_3 متیل و CH_2 متیلن کشیده‌شده نامتقارن و متقارن به‌ترتیب در عددهای موجی ۲۸۷۷ و ۲۹۰۰ cm^{-1} قابل مشاهده است [۲۲]. براساس مطالعه Olkhov و همکاران گروه‌های هیدروکسیل از درشت‌مولکول‌های PEG، امکان ایجاد پیوندهای هیدروژنی با زنجیرهای PHB را دارند. بدین معنی که PEG به‌عنوان پلی میان مولکول‌های PHB عمل می‌کند [۲۳]. همچنین پیوندهای هیدروژنی میان ترکیبات PEG با سایر پلیمرها مانند PVA/PEG تأیید شده است.

براساس مطالعات پیشین چهار پیک اصلی در طیف FTIR شیشه زیست‌فعال قابل مشاهده است. پیک ۱۱۰۰–۱۰۴۰ cm^{-1} مربوط به ارتعاش‌های کششی پیوند نامتقارن Si-O-Si و پیک ۸۱۴–۷۹۳ cm^{-1} متعلق به ارتعاش‌های کششی پیوند متقارن Si-O-Si است. پیوند Ca-O-Si در محدوده ۹۵۰ cm^{-1} و پیوند O-H و آب جذب‌شده در محدوده ۳۴۳۰ cm^{-1} قابل مشاهده است.

همچنین، پیک مربوط به CO_2 جو در محدوده ۲۳۶۰ cm^{-1} و پیوند Ca-O نیز در محدوده ۶۷۰–۶۴۰ cm^{-1} ظاهر شدند. با توجه به نتایج می‌توان نشانه‌هایی از برهم‌کنش بین پلیمرها و شیشه زیست‌فعال مشاهده کرد. به‌عنوان نمونه پیک مربوط به کربونیل کمتر شده به‌طوری که از ۱۷۲۱ cm^{-1} به ۱۷۱۸ cm^{-1} انتقال یافته که نشان‌دهنده



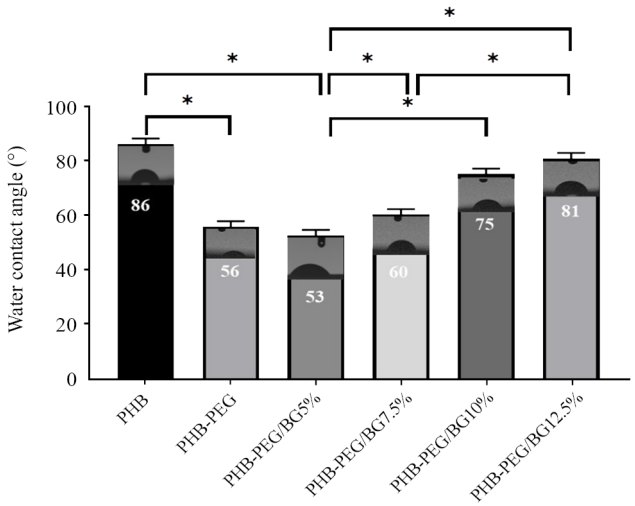
شکل ۶- نتایج FTIR داربست‌های الکتروریسی‌شده دارای شیشه زیست‌فعال.

Fig. 6. FTIR results of electrospun scaffolds incorporated by bioactive glass.

برقراری پیوندهای هیدروژنی میان گروه کربونیل پلیمر با گروه‌های هیدروکسیل و فسفات شیشه زیست‌فعال است. براساس نتایج طیف ترکیب PHB-PEG/BG، وجود گروه‌های مختلف به برهم‌کنش و پیوندهای هیدروژنی میان گروه‌های کربونیل پلیمر و گروه‌های Si-O-Si و نیز Ca-O-Si شیشه زیست‌فعال منجر می‌شود [۱۷]. با توجه به شکل ۶، وجود درصدهای مختلف شیشه زیست‌فعال از ٪۵ تا ٪۱۲/۵ تغییری در طیف ایجاد نکرده است و استفاده از درصدهای مختلف از ماده نام‌برده به ایجاد گروه‌های عاملی متفاوت منجر نخواهد شد.

مقدار آب‌دوستی زیست‌مواد، عامل مهم و تعیین‌کننده در رفتار یاخته‌ای بافت‌های مختلف است که بر مقدار چسبندگی، رشد و تکثیر یاخته‌ای مؤثر است. از سوی دیگر، سطوح اَبرآب‌دوست یا اَبرآب‌گریز نیز نتایج عکس بر مقدار چسبندگی یاخته‌ای خواهند گذاشت. مقدار بهینه زاویه تماس آب که به چسبندگی یاخته‌ای مؤثر منجر می‌شود، حدود ۴۰° تا ۷۰° گزارش شده است [۱۸]. پلیمر PHB با زاویه تماس آب حدود ۹۰° به‌عنوان پلیمر آب‌گریز شناخته می‌شود که در صورت ترکیب با سایر پلیمرهای آب‌دوست عیب آن برطرف خواهد شد. از جمله پلیمرهای آب‌دوست که قابلیت ترکیب با PHB را دارد، پلیمر PEG است که سطحی آب‌دوست ایجاد می‌کند. بنابراین، الکتروریسی محلول پلیمری PHB و PEG رفتار مناسب آب‌دوستی را از خود نشان می‌دهد. در شکل ۷ مقدار زاویه تماس آب نمونه‌های الکتروریسی‌شده مقایسه شده است. پس از اضافه‌کردن جزء شیشه زیست‌فعال مقدار آب‌دوستی افزایش و با افزودن درصد بیشتر کاهش یافته است. با افزایش مقدار بیشتر جزء شیشه زیست‌فعال آب‌دوستی کاهش بیشتری داشته به‌طوری که با افزودن ٪۱۲/۵ شیشه زیست‌فعال مقدار زاویه تماس آب نزدیک به نمونه PHB خالص شده است. براساس مطالعات Luginina و همکاران [۲۴] افزودن شیشه زیست‌فعال به پلیمرهای آب‌گریزی مانند پلی‌کاپرولاکتون اثر چندانی بر بهبود رفتار آب‌دوستی ندارد.

براساس نتایج آزمون آماری مقایسه بین گروه‌ها مشخص است که بین دو گروه PHB و PHB-PEG از نظر آماری اختلاف معناداری وجود دارد. اما، با افزودن ٪۵ شیشه زیست‌فعال، بین دو گروه PHB-PEG و PHB-PEG/BG5% اختلاف معناداری نیست. با افزودن بیشتر ذرات شیشه زیست‌فعال آب‌دوستی کمتر می‌شود و اختلاف معناداری با نمونه‌هایی با درصد کمتر شیشه زیست‌فعال پیدا می‌کند. براساس مطالعات Piatti و همکاران [۲۵] مقدار آب‌دوستی سطح به دو عامل ترکیبات شیمیایی و مقدار تخلخل و زبری سطح بستگی دارد. براساس مطالعه این پژوهشگران [۲۵]

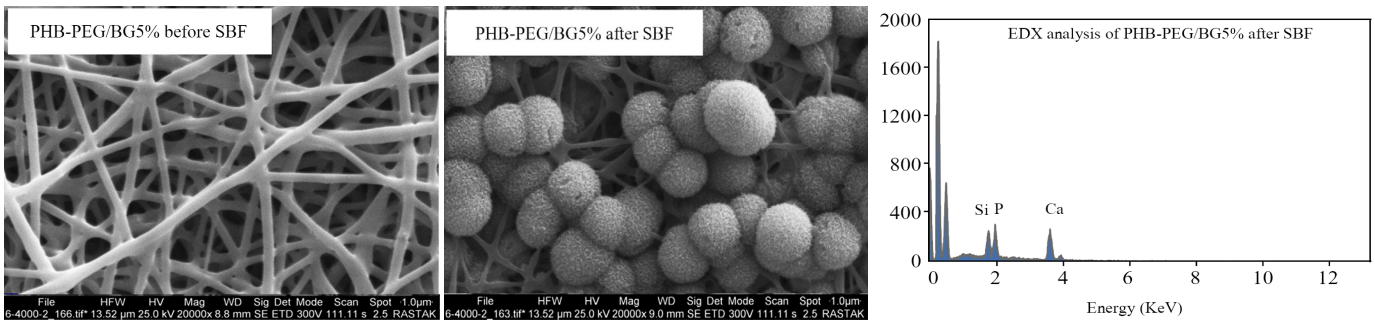


شکل ۷- زاویه تماس آب روی سطح داربست‌های الکتروریسی‌شده (*P-value < ۰/۰۵).

Fig. 7. Water contact angles on the surface of electrospun scaffolds (* P-value < 0.05).

شیشه زیست‌فعال با اضافه‌شدن به پلی‌کاپرولاکتون باید موجب بهبود آب‌دوستی شود و زاویه تماس آب را کاهش دهد، زیرا شیشه زیست‌فعال خاصیت آب‌دوستی دارد. اما با توجه به نتایج نمونه خالص و نمونه دارای شیشه زیست‌فعال کاهش معناداری مشاهده نشد. علت آن پدیده کلوخه‌شدن نانوذرات نام‌برده است که با افزایش مقدار آن احتمال کلوخگی ذرات بیشتر شده و یکنواختی توزیع کمتر می‌شود. در نتیجه کلوخگی ذرات به افزایش زبری سطح و کاهش آب دوستی منجر می‌شود. بنابراین، با توجه به نتایج، وجود فقط ٪۵ شیشه زیست‌فعال به بهترین نتایج آب‌دوستی منجر می‌شود، به‌طوری که با نمونه PHB-PEG اختلاف معناداری ندارد. از طرفی، افزودن مقدارهای مختلف شیشه زیست‌فعال روی قطر نانوالیاف اختلاف معناداری ایجاد نکرد. با توجه به نتایج مقدار بهینه وجود ٪۵ وزنی شیشه زیست‌فعال به تولید نانوالیاف با قطر کمتر و آب‌دوستی بیشتر منجر می‌شود. این نمونه به‌عنوان نمونه بهینه انتخاب و در آزمون عملکردی زیست‌فعالی بررسی شد.

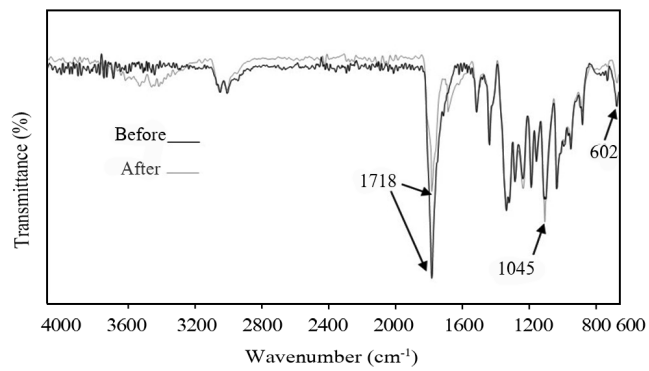
با استفاده از محلول SBF زیست‌فعالی نمونه‌های دارای شیشه زیست‌فعال با گرفتن تصویر SEM از نمونه بررسی شد. با بررسی تصاویر SEM تشکیل فاز هیدروکسی‌آپاتیت در اثر وجود نانوذرات شیشه زیست‌فعال قابل اثبات است. براساس مطالعات پیشین، تشکیل‌نشدن هیدروکسی‌آپاتیت روی سطح نانوالیاف تهیه‌شده از PHB خالص بدون نانوذره گزارش شده است [۱۷]. با توجه به شکل ۸ تشکیل فاز هیدروکسی‌آپاتیت روی نمونه



شکل ۸- تصویرهای SEM (بزرگ‌نمایی ۲۰۰۰۰) داربست الکتروریسی‌شده PHB-PEG/BG5 پیش و پس از عمل‌آوری درون سیال شبیه‌سازی‌شده بدن (SBF) به‌مدت ۲۱ روز به‌همراه آزمون EDX.

Fig. 8. SEM images (20000 magnification) of the PHB-PEG/BG5% electrospun scaffold before and after treated in simulated body fluid (SBF) for 21 days with related EDX analysis.

نانولیفی PHB-PEG/BG5% دارای ٪۵ وزنی نانوذرات شیشه‌زیست فعال پس از گذشت ۲۱ روز تأیید شده است. به‌عبارت دیگر، وجود نانوذرات شیشه زیست‌فعال در ریزلایه‌های نانولیفی تهیه‌شده از PHB و PEG در مجاورت محلول SBF به تشکیل هیدروکسی‌آپاتیت منجر می‌شود. تشکیل هیدروکسی‌آپاتیت با بررسی نتایج آزمون EDX و وجود عناصر کلسیم، فسفر و نبود سیلسیم قابل اثبات است. نتیجه تشکیل هیدروکسی‌آپاتیت، افزایش خاصیت زیست‌فعالی نمونه‌هاست. در شکل ۹ نیز طیف زیرقرمز نمونه بهینه پیش و پس از غوطه‌وری در محلول زیستی PBS به‌مدت ۲۴ h مقایسه شده است. در نمودار شکل ۹ اثر زیست‌تخریب‌پذیری نمونه PHB-PEG دارای ٪۵ شیشه زیست‌فعال در محلول PBS پس از گذشت ۲۴ h روی گروه‌های عاملی آمده است. براساس نمودار به‌دست‌آمده، موقعیت بعضی از گروه‌های عاملی تغییر کرده که بیانگر اثر تخریب سطحی است. شدت بعضی از پیک‌ها نیز در مقایسه با حالت پیش از قرارگیری درون محلول PBS تغییر کرده است. به‌عنوان مثال، شدت پیک پیوند کربونیل C=O با عدد موجی ۱۷۱۸ cm^{-1} پس از تخریب کاهش یافته که بیانگر اثر زیست‌تخریبی PBS روی پیوندهای پلیمری است. این موضوع نشان‌دهنده تولید گروه‌های اسیدی ناشی از آب‌کافت آرام گروه‌های PHB است. پس از تخریب، شدت پیک مربوط به فاز آپاتیت در محدوده ۶۰۲ و ۱۰۴۵ cm^{-1} به‌مقدار جزئی و خیلی کم تغییر کرده و افزایش نشان داده است. این موضوع ناشی از تشکیل لایه‌های بسیار ناچیز آپاتیت روی داربست به‌دلیل وجود نانوذرات شیشه زیست‌فعال است. تغییرات روی گروه‌های عاملی روی داربست‌های تهیه‌شده با ماده پلیمری اصلی PHB پیش و پس از استفاده از محلول زیستی PBS توسط سایر پژوهشگران مانند نیک‌بخت و همکاران [۲۶] بررسی شده و تغییرات مشابهی گزارش شده است.



شکل ۹- نتایج FTIR-ATR داربست الکتروریسی‌شده PHB-PEG/BG5% پیش و پس از تخریب درون محلول بافر نمکی فسفاتی به‌مدت ۲۴ h.

Fig. 9. FTIR-ATR results of PHB-PEG/BG5% electrospun scaffold before and after the degradation in phosphate buffered saline (PBS) for 24 h.

نتیجه‌گیری

هدف از این مطالعه طراحی و ارزیابی داربست نانوکامپوزیتی بافت مهندسی‌شده استخوان متشکل از دو پلیمر پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات و پلی(اتیلن گلیکول) دارای شیشه زیست‌فعال تهیه‌شده با روش الکتروریسی است. محلول پلیمری از دو پلیمر پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات و پلی(اتیلن گلیکول) تهیه شده و درصدهای مختلف شیشه زیست‌فعال به آن اضافه شد. تمام ریزلایه‌های نانولیفی بدون گسستگی در فرایند

الکتروریسی به تولید وب‌های ضخیم منجر شدند. تولید نانوالیاف سالم بدون هر گونه دانه یا چسبندگی نیز تأیید شد. با افزودن جزء شیشه زیست‌فعال با مقدارهای مختلف ٪۵ تا ٪۱۲/۵ وزنی-وزنی به محلول پلیمری PHB-PEG، قطر متوسط نانوالیاف تولیدشده در تمام نمونه‌ها افزایش یافت که این افزایش از نظر آماری معنادار نبود. براساس تجزیه عنصری وجود نانوذرات شیشه فعال در داربست‌های الکتروریسی‌شده تأیید شد. با افزایش درصد شیشه زیست‌فعال آب‌دوستی روند کاهشی داشت که بهترین نتیجه مربوط به نمونه ٪۵ وزنی شیشه بود. با توجه به نتایج مربوط به مشخصه‌یابی، PHB-PEG/BG5% به‌عنوان نمونه بهینه برای انجام آزمون عملکردی زیست‌فعالی انتخاب شد. به‌واسطه تشکیل هیدروکسی‌آپاتیت روی داربست‌های نانولیفی الکتروریسی‌شده، خاصیت زیست‌فعالی داربست‌های الکتروریسی نانوکامپوزیتی متشکل از سه ماده پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات، پلی(اتیلن گلیکول) و شیشه زیست‌فعال تأیید شد.

مراجع

1. Manzini B.M., Machado L.M.R., Noritomi P.Y., and DA Silva J.V.L., Advances in Bone Tissue Engineering: A Fundamental Review, *J. Biosci.*, **46**, 1-18, 2021.
2. Le B.Q., Nurcombe V., Cool S.M., Van Blitterswijk C.A., De Boer J., and LaPointe V.L.S., The Components of Bone and What They Can Teach Us about Regeneration, *Materials*, **11**, 14, 2018.
3. Baino F., Hamzehlou S., and Kargozar S., Bioactive Glasses: Where Are We and Where Are We Going?, *J. Funct. Biomater.*, **9**, 25, 2018.
4. Vichery C. and Nedelec J.M., Bioactive Glass Nanoparticles: From Synthesis to Materials Design for Biomedical Applications, *Materials*, **9**, 288, 2016.
5. Montazeri M., Karbasi S., Foroughi M.R., Monshi A., and Ebrahimi-Kahrizsangi R., Evaluation of Mechanical Property and Bioactivity of Nano-Bioglass 45S5 Scaffold Coated with Poly-3-hydroxybutyrate, *J. Mater. Sci. Mater Med.,* **26**, 62, 2015.
6. Jones J.R., Brauer D.S., Hupa L., and Greenspan D.C., Bioglass and Bioactive Glasses and Their Impact on Healthcare, *Int. J. Appl. Glass Sci.,* **7**, 423-434, 2016.
7. Zhao Y., Zhu J., Zhang J., Chen Z., Li W., Deng L., Chen K., Wan H., Li J., and Li R., Optimization of Biodegradable PEG/PLGA Nanofiber Mats Electrospinning Process for Anti-Adhesion Application, *J. Appl. Polym. Sci.*, **135**, 46282, 2018.
8. Zhou Y., Li Y., Li D., Yin Y., and Zhou F., Electrospun PHB/Chitosan Composite Fibrous Membrane and Its Degradation Behaviours in Different pH Conditions, *J. Funct. Biomater.*, **13**, 58, 2022.
9. Heidarkhan-Tehrani A., Zadhoush A., Karbasi S., and Sadeghi-Aliabadi H., Scaffold Percolative Efficiency: In Vitro Evaluation of the Structural Criterion for Electrospun Mats, *J. Mater. Sci. Mater. Med.,* **21**, 2989-2998, 2010.
10. Sadeghi D., Karbasi S., Razavi S., and Bonakdar S., Electrospun Polyhydroxybutyrate/Chitosan Blend Fibrous Scaffolds for Cartilage Tissue Engineering, *J. Appl. Polym. Sci.*, **133**, 2016.
11. Falqi F.H., Bin-Dahman O.A., Hussain M., and Al-Harthi M.A., Preparation of Miscible PVA/PEG Blends and Effect of Graphene Concentration on Thermal, Crystallization, Morphological, and Mechanical properties of PVA/PEG (10 wt%) Blend, *Int. J. Polym. Sci.,* **2018**, 2018.
12. Spasova M., Stoilova O., Manolova N., Rashkov I., and Altankov G., Preparation of PLLA/PEG Nanofibers by Electrospinning and Potential Applications, *J. Bioact. Compat.,* **22**, 62-76, 2007.
13. Danagody B., Bose N., Rajappan K., Iqbal A., Ramanujam G.M., and Anilkumar A.K., Electrospun PAN/PEG Nanofibrous Membrane Embedded with a MgO/gC_3N_4 Nanocomposite for Effective Bone Regeneration, *ACS. Biomater. Sci. Eng.,* **10**, 468-481, 2024.
14. Daraei-Nejad Z. and Shabani I., Condictive Nanofibrous Scaffolds for Tissue Engineering Applications: A Review, *Iran. J. Polym. Sci. Technol. (Persian)*, **32**, 189-210, 2019.
15. Arvaneh A.R. and Sadat-Shojai M., Biodegradable Aliphatic Polyesters for Application in Tissue Engineering, *Iran. J. Polym. Sci. Technol. (Persian)*, **34**, 319-348, 2021.
16. Hasani F., Ghaffari R., Salami Kenari H., and Taleghani H., Dextran/Bioactive Glass Nanocomposite Hydrogels: Effect of Dextran Molecular Weight and Content on Swelling Behavior and Structural Characteristics, *Iran. J. Polym. Sci. Technol. (Persian)*, **34**, 249-265, 2021.
17. Iron R., Mehdikhani M., Naghashzargar E., Karbasi S.,

and Semnani D., Effects of Nano-Bioactive Glass on Structural, Mechanical and Bioactivity Properties of Poly(3-hydroxybutyrate) Electrospun Scaffold for Bone Tissue Engineering Applications, *Mater. Technol.*, **34**, 540-548, 2019.

18. Foroughi M.R., Karbasi S., Khoroushi M., and Khademi A.A., Polyhydroxybutyrate/Chitosan/Bioglass Nanocomposite as a Novel Electrospun Scaffold: Fabrication and Characterization, *J. Porous. Mater.*, **24**, 1447-1460, 2017.
19. Karahaliloğlu Z., Demirbilek M., Şam M., Sağlam N., Mızrak A.K., and Denkbaş E.B., Surface-Modified Bacterial Nanofibrillar PHB Scaffolds for Bladder Tissue Repair, *Artif. Cells. Nanomed. Biotechnol.,* **44**, 74-82, 2016.
20. Naghashzargar E., Aghajani M., and Ranjbar-Mohammadi M., The Potential of an Electrospun Poly(3-hydroxybutyrate)/ Poly(ethylene glycol) Blend Fibrous Scaffold for Cartilage Tissue Engineering, *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.,* 1-9, 2024.
21. Pan W., Sun Y., and Chen Y., Preparation of Polyacrylonitrile and Polyethyleneglycol Blend Fibers through Electrospinning, *Optoelectron. Adv. Mat.,* 6, 230-234, 2012.
22. Trakunjae C., Boondaeng A., Apiwatanapiwat W., Kosugi A., Araj T., Sudesh K., and Vaithanomsat P., Enhanced Polyhydroxybutyrate (PHB) Production by Newly Isolated Rare *Actinomycetes Rhodococcus sp.* Strain BSRT1-1 Using Response Surface Methodology, *Sci. Rep.,* **11**, 1896, 2021.
23. Ol'khov A.A., Gol'dshtrakh M.A., Ishchenko A.A., and Iordanskii A.L., Formation of Complexes in Polyhydroxybutyrate–Polyethylene Glycol Mixtures, *Russ. J. Phys. Chem. B*, **9**, 961-970, 2015.
24. Luginina M., Schuhladen K., Orrú R., Cao G., Boccaccini A.R., and Liverani L., Electrospun PCL/PGS Composite Fibers Incorporating Bioactive Glass Particles for Soft Tissue Engineering Applications, *Nanomaterials*, **10**, 978, 2020.
25. Piatti E., Miola M., Liverani L., Verné E., and Boccaccini A.R., Poly(ε-caprolactone)/Bioactive Glass Composite Electrospun Fibers for Tissue Engineering Applications, *J. Biomed. Mater. Res. A*, **111**, 1692, 2023.
26. Nikbakht M., Karbasi S., and Rezayat-Seyed M., and Biological Evaluation of the Effects of Hyaluronic acid on Poly(3-hydroxybutyrate) Based Electrospun Nanocomposite Scaffolds for Cartilage Tissue Engineering Application, *Mater. Technol.,* **35**, 141-151, 2020.