

## Podziękowania

J.K. dziękuje Fundacji na rzecz Nauki Polskiej za wsparcie badań w ramach programu POMOST, współfinansowanego przez Unię Europejską (Fundusz Rozwoju Regionalnego).

Badania TEM zostały wykonane w Laboratorium Mikroskopii Elektronowej, w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego. Do badań wykorzystano aparaturę zainstalowaną w ramach projektu współfinansowanego przez Unię Europejską (Fundusze Strukturalne): Centrum Zaawansowanych Technologii – wyposażenie Laboratorium Obrazowania Biologicznego i Medycznego.

## OCENA TRWAŁOŚCI WŁÓKIEN PRZEZNACZONYCH NA PODŁOŻA DLA INŻYNIERII TKANKOWEJ W PŁYNACH FIZJOLOGICZNYCH

IZABELLA RAJZER<sup>1\*</sup>, RYSZARD KWIATKOWSKI<sup>2</sup>

ATH AKADEMIA TECHNICZNO-HUMANISTYCZNA W BIELSKU-BIAŁEJ, UL. WILLOWA 2, 43-309 BIELSKO-BIAŁA, POLSKA:

<sup>1</sup>WYDZIAŁ BUDOWY MASZYN I INFORMATYKI, KATEDRA PODSTAW BUDOWY MASZYN, ZAKŁAD INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ

<sup>2</sup>WYDZIAŁ NAUK O MATERIAŁACH I ŚRODOWISKU, INSTYTUT INŻYNIERII TEKSTYLÓW I MATERIAŁÓW POLIMEROWYCH.

\* E-MAIL: IRAJZER@ATH.BIELSKO.PL

### Streszczenie

Bardzo dużą rolę w procesie degradacji implantów odgrywa środowisko płynów fizjologicznych, których wpływ zależy od właściwości fizycznych i chemicznych materiału polimerowego oraz od jego reaktywności. W niniejszej pracy oceniono wpływ płynu PBS na trwałość kompozytowych włókien polikaprolakton / hydroksyapatyt w warunkach *in vitro*. Stopień degradacji włókien określano na podstawie zmian pH medium, stężenia jonów sodu i potasu w płynie po inkubacji próbek oraz zmian masy próbek podczas inkubacji. Ocenę zmian zachodzących we włóknach pod wpływem płynu PBS przeprowadzono wykorzystując skaningową mikroskopię elektronową (SEM) oraz rentgenowską analizę strukturalną (WAXD). Badania degradacji włókien przeprowadzone podczas inkubacji próbek w płynach fizjologicznych wykazały, że wytworzone włókna kompozytowe charakteryzują się stabilnością w środowisku płynów ustrojowych przez długi okres czasu. Niewielkie zmiany na powierzchni włókien, zaobserwowane po 10 miesiącach inkubacji, w płynie fizjologicznym, wskazują na rozpoczęcie procesu degradacji, stąd też można przypuszczać, że czas całkowitej biodegradacji włókien może być skorelowany z czasem potrzebnym do kompletnego odtworzenia tkanki.

**Słowa kluczowe:** włókna bioaktywne, podłoża, Inżynieria Tkankowa, degradacja, polikaprolakton [Inżynieria Biomateriałów, 128-129, (2014), 11-15]

## Acknowledgements

J.K. thanks the Foundation for Polish Science for supporting her with the Parent-Bridge Programme that was co-financed by the EU European Regional Development Fund.

The TEM studies were performed in the Laboratory of Electron Microscopy, Nencki Institute of Experimental Biology, Warsaw, Poland. We used equipment installed within the project sponsored by the EU Structural Funds: Centre of Advanced Technology BIM – Equipment purchased for the Laboratory of Biological and Medical Imaging containing selenite ions. The toxicity of the obtained materials were also studied.

## ASSESSMENT OF THE STABILITY OF PCL-FIBRES INTENDED FOR USE AS SCAFFOLDS FOR TISSUE ENGINEERING IN PHYSIOLOGICAL FLUIDS

IZABELLA RAJZER<sup>1\*</sup>, RYSZARD KWIATKOWSKI<sup>2</sup>

ATH UNIVERSITY OF BIELSKO-BIALA, 1 WILLOWA STREET, 43-309 BIELSKO-BIALA, POLAND:

<sup>1</sup>FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING AND COMPUTER SCIENCE, DEPARTMENT OF MECHANICAL ENGINEERING FUNDAMENTALS, DIVISION OF MATERIALS SCIENCE.

<sup>2</sup>FACULTY OF MATERIALS AND ENVIRONMENTAL SCIENCES. INSTITUTE OF TEXTILE ENGINEERING AND POLYMER MATERIALS.

\* E-MAIL: IRAJZER@ATH.BIELSKO.PL

### Abstract

Very important role in the process of implant degradation is played by the physiological fluid environment, the impact of which depends on the physical and chemical properties of the polymers and on its reactivity. This study evaluates the effect of PBS on the stability of composite polycaprolactone/hydroxyapatite fibres *in vitro*. The degree of degradation of the fibres was determined by the changes in pH of the fluid, the concentration of sodium and potassium ions in the fluid after incubation of the sample, and the changes in the weights of samples during incubation. Assessment of the changes in the fibres under the influence of PBS was carried out using scanning electron microscopy (SEM) and X-ray structural analysis (WAXD). The study of the degradation of fibres carried out during the incubation of samples in physiological fluids showed that the composite fibres produced are stable in the environment of physiological fluids over a long period of time. Minor changes on the surface of the fibres, observed after 10 months of incubation, in a body fluid, indicate the start of a process of degradation, hence it can be assumed that the time of total biodegradation of the fibres may be correlated with the time needed for a complete restoration of tissue.

**Keywords:** Bioactive fibres, scaffold, tissue engineering, degradation, polycaprolactone [Engineering of Biomaterials, 128-129, (2014), 11-15]

Polikaprolakton (PCL), jest biogodnym polimerem o dłuższym czasie degradacji niż inne polimery z grupy poliestrów alifatycznych, dzięki temu biomateriały wykonane z tego polimeru mogą być wszczepiane w miejscach narażonych na szczególne obciążenia [1]. Zastosowanie PCL, cieszącego się lepszymi parametrami mechanicznymi, do wytwarzania włókien a z nich podłoży do leczenia ubytków tkanek, pozwala na utrzymanie odpowiedniej przestrzeni między komórkami wymaganej dla wzrostu komórek i formowania matrycy zewnątrzkomórkowej, nie tylko do momentu wytworzenia nowej tkanki, ale do momentu uzyskania przez nią odpowiednich parametrów mechanicznych [2].

Degradacja włókien z polikaprolaktonu w środowisku roztworów wodnych zależy od wielu czynników. Z jednej strony od budowy i własności samego polimeru takich jak budowa chemiczna, masa molowa, polidispersja, temperatura zeszczenia ( $T_g$ ), temperatura topnienia ( $T_m$ ), krystaliczność, moduł elastyczności, pole powierzchni próbki i jej hydrofilowość czy hydrofobowość [3]. Obecność płynów powoduje hydrolizę nietrwałych wiązań w przypadku poliestrów oraz sprzyja wytwarzaniu rodników hydroksylowych lub innych reaktywnych grup, które mogą inicjować reakcje wolnorodnikowe. Ponadto istotnym czynnikiem mającym wpływ na sposób degradacji włókien są warunki panujące w otaczającym je środowisku (temperatura, pH itp.) [4].

PCL jest powszechnie stosowany do wytwarzania trójwymiarowych podłoży dla inżynierii tkankowej [5-6]. Jednakże słaba hydrofilowość podłoży z PCL wpływa na gorszą adhezję, proliferację i różnicowanie się komórek. Ponadto podłoża z PCL nie wykazują właściwości bioaktywnych, dlatego często modyfikowane są bioaktywnymi dodatkami [7]. W niniejszej pracy oceniono wpływ płynu PBS na trwałość kompozytowych włókien polikaprolakton/ hydroksyapaty w warunkach *in vitro*. Włókna z czystego polikaprolaktonu jak również włókna kompozytowe modyfikowane hydroksyapatytem poddano ocenie trwałości, określając wpływ płynu PBS na zachowanie się próbek w środowisku *in vitro*. W organizmie człowieka polikaprolakton ulega powolnej, trwającej około 2 lata biodegradacji, która zachodzi na skutek hydrolizy wiązań estrowych. Przeprowadzone badania miały na celu określenie trwałości włókien w warunkach *in vitro* podczas inkubacji w płynie PBS

## Materiały i metody

Do badań wykorzystano dwa rodzaje włókien wytworzonych metodą formowania ze stopu: (1) włókna PCL niemodyfikowane oraz (2) włókna modyfikowane 5% dodatkiem hydroksyapatytu. Dokładny opis sposobu formowania włókien oraz wpływu dodatku hydroksyapatytu na strukturę i własności włókien opisano w poprzedniej publikacji [8]. Do wytwarzania włókien wykorzystano poli( $\epsilon$ -kaprolakton) firmy Sigma Aldrich (PCL) o masie cząsteczkowej 70000-90000 g/mol oraz nano-hydroksyapatyt syntetyczny (n-HAp) wytworzony w Katedrze Ceramiki i Materiałów Ogniotrwałych, Wydziału Inżynierii Materiałowej i Ceramiki, Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie [9].

Ocenę trwałości włókien otrzymanych metodą formowania ze stopu przeprowadzono w płynie PBS przez okres 12 miesięcy. Płyn PBS jest wodnym roztworem soli fizjologicznej (0,9% NaCl) buforowanej fosforanami o pH 7,4 (ang. phosphate buffered saline). Próbki zanurzono w płynie PBS i inkubowano przez okres 12 miesięcy w polipropylenowych pojemnikach o pojemności 15 ml (firmy FALCON) w temperaturze 37°C. Stopień degradacji włókien określano na podstawie zmian pH medium, stężenia jonów

## Introduction

Polycaprolactone (PCL) is a biocompatible polymer with longer degradation time than the other polymers from the group of aliphatic polyesters, thus biomaterials made using this polymer can be implanted in areas subjected to increased load [1]. The use of PCL, which has better mechanical parameters, to make fibres, from which scaffolds for the treatment of tissue defects are made, allows for maintaining sufficient space between the cells required for cell growth and extracellular matrix formation, not only until the moment of producing new tissue, but until it obtains the required mechanical parameters [2].

Degradation of polycaprolactone fibres in the environment of aqueous solutions depends on many factors. On the one hand, they include the structure and properties of the polymer itself, such as chemical structure, molecular weight, polydispersity, glass transition temperature ( $T_g$ ), melting temperature ( $T_m$ ), crystallinity, modulus of elasticity, the surface area of the sample and its hydrophilicity or hydrophobicity [3]. The presence of liquid causes the hydrolysis of labile bonds in the case of polyesters and promotes the formation of hydroxyl radicals or other reactive groups which can initiate free radical reactions. Another important factor affecting the way fibres are degraded are conditions in their surrounding environment (temperature, pH, etc.) [4].

PCL is commonly used to make three-dimensional scaffolds for tissue engineering [5-6]. However, poor hydrophilicity of PCL scaffolds results in a less successful adhesion, proliferation, and differentiation of cells. In addition, PCL scaffolds show no bioactive properties, which is why they often are modified with bioactive additives [7]. This study evaluates the effect of PBS on the stability of the composite polycaprolactone/hydroxyapatite fibres *in vitro*. Fibres made of pure polycaprolactone as well as composite fibres modified with hydroxyapatite were evaluated for stability, determining the effect of PBS on the behaviour of the samples *in vitro*. In the human body, polycaprolactone undergoes a slow biodegradation over the period of approximately two years, which occurs as a result of hydrolysis of

## Materials and methods

In the study two types of fibres produced by melt spinning were used: (1) unmodified PCL fibres and (2) modified fibres containing 5% of hydroxyapatite. Detailed description of the method of the fibres production and the effect of the addition of hydroxyapatite on the structure and properties of fibres are described in a previous publication [8]. Poly( $\epsilon$ -caprolactone), with the molecular weight of 70000-90000 g/mol, made by Sigma Aldrich (PCL) was used for the fibres production, and synthetic nano-hydroxyapatite (n-HAp) was prepared in the Department of Ceramics and Refractories, Faculty of Materials Science and Ceramics, University of Science and Technology in Krakow [9].

Evaluation of the stability of fibres obtained by melt spinning was carried out in PBS fluid over a period of 12 months. PBS is a phosphate buffered saline (0.9% NaCl) with pH of 7.4. The samples were immersed in PBS and incubated for a period of 12 months in polypropylene containers with a capacity of 15 ml (made by FALCON) at 37°C. The degree of degradation of the fibres was determined by the changes in pH of the fluid, the concentration of sodium and potassium ions in the fluid sample after incubation, and the changes in the weight of the samples. Testing was performed using the ion analyser EasyLyte Ca/K/Na/pH made by Medica and the pH meter Cp-401 made by Elmetron. Percentage changes in the weight of the samples were calculated using the formula:

sodu i potasu w płynie po inkubacji próbek oraz zmian masy próbek. Badania wykonano przy użyciu analizatora jonów EasyLyte Ca/K/Na/pH firmy Medica oraz pH-metru Cp-401 firmy Elmetron. Procentowe zmiany masy próbek liczone według wzoru:

$$\Delta m = (m_p - m_k) / m_k \cdot 100 [\%]$$

gdzie:  $m_p$  – masa próbki przed inkubacją;  $m_k$  – masa próbki po danym okresie inkubacji.

Ocenę zmian zachodzących w wytworzonych materiałach pod wpływem płynu PBS przeprowadzono wykorzystując skaningową mikroskopię elektronową (mikroskop JEOL 5500 JSM) oraz rentgenowską analizę strukturalną (WAXD). Badania rentgenowskie WAXD przeprowadzono przy użyciu dyfraktometru URD6 (Seifert, Niemcy) metodą krokową pomiaru rozpraszania rentgenowskiego (w zakresie kątów rozpraszania  $2\theta$  od  $5^\circ$  do  $60^\circ$ ), przy użyciu lampy rentgenowskiej z anodą miedzianą (promieniowanie  $\text{CuK}\alpha$ ,  $\lambda = 1,542 \text{ \AA}$ ) zasilanej z generatora rentgenowskiego ISO-DEBYEFLEX 3003.

## Wyniki i dyskusja

Mikrostrukturę włókien PCL oraz PCL/n-HAp przedstawiono na RYS. 1. Włókna przedstawione na zdjęciach SEM różnią się obrazem powierzchni. Niemodyfikowane włókna PCL charakteryzują się gładką powierzchnią, przy większych powiększeniach można było zaobserwować charakterystyczne podłużne prążki. Na powierzchni włókien zawierających nanohydroksyapatyt (RYS. 1c-d) zaobserwowano liczne nierówności (nieobecne w przypadku włókien niemodyfikowanych) potwierdzające obecność hydroksyapatytu w włóknach.

Na RYS. 2 przedstawiono procentowe zmiany masy włókien podczas inkubacji w płynie PBS przez okres 12 miesięcy. Brak zmian masy próbek podczas inkubacji w płynie PBS świadczy o stabilności włókien wytworzonych metodą formowania ze stopu. Nie zaobserwowano zmian w masie włókien kompozytowych wynikających z obecności proszku hydroksyapatytu. Wykres przedstawiający zależność stężenia jonów  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$  w płynie PBS podczas inkubacji próbek włókien przez okres 12 miesięcy przedstawiono na RYS. 3, natomiast zmiany pH płynu w którym inkubowane były próbki włókien przedstawiono na RYS. 4. Również w tym przypadku nie zaobserwowano zmian mogących świadczyć o rozpoczęciu procesu degradacji próbek.

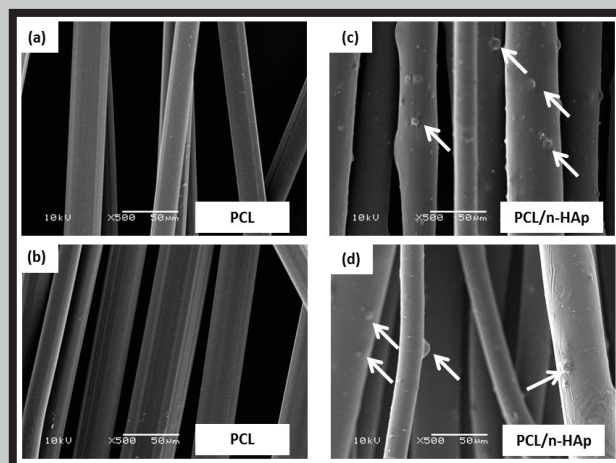
$$\Delta m = (m_p - m_k) / m_k \cdot 100 [\%]$$

where:  $m_p$  - weight of the sample before incubation;  $m_k$  - weight of the sample after incubation.

Assessment of the changes in the materials generated under the influence of PBS was carried out using scanning electron microscopy (JEOL 5500 JSM microscope) and wide angle X-ray diffraction analysis (WAXD). WAXD tests were conducted using the URD6 diffractometer (Seifert, Germany) by stepwise measurement of X-ray scattering (at a range of scattering angles  $2\theta$  from  $5^\circ$  to  $60^\circ$ ), using an X-ray tube with a copper anode ( $\text{CuK}\alpha$  radiation,  $\lambda = 1,542 \text{ \AA}$ ) powered from a generator ISO-DEBYEFLEX 3003.

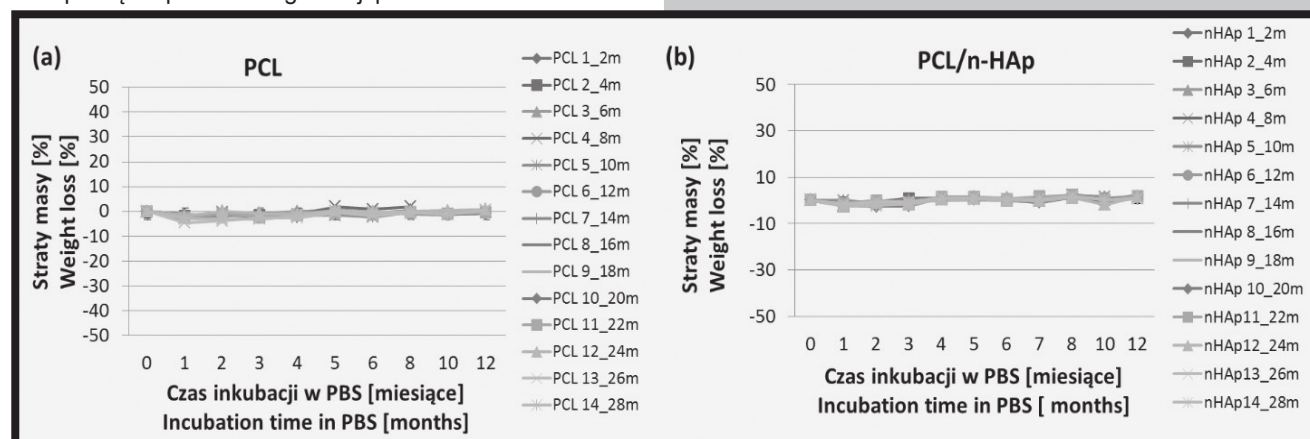
## Results and Discussion

The microstructure of PCL and PCL/n-HAp fibres is shown in FIG. 1. The fibres shown in the SEM images



RYS. 1. Mikrostruktura włókien otrzymanych metodą formowania ze stopu: (a-b) włókna z polikaprolaktonu (PCL); (c-d) włókna z polikaprolaktonu modyfikowane hydroksyapatytem na etapie formowania (PCL/n-HAp).

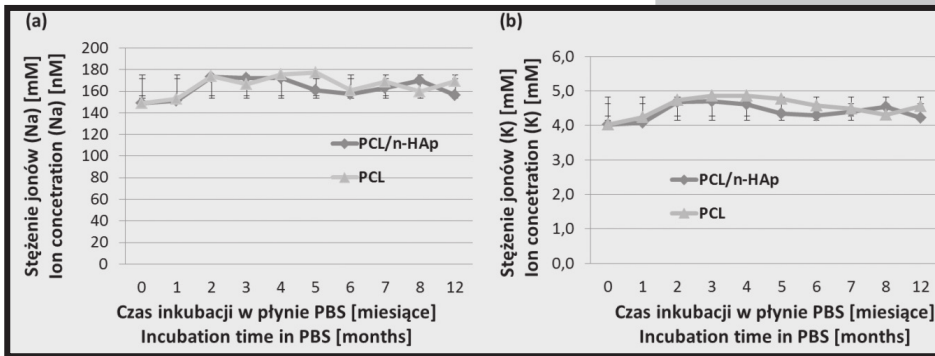
FIG. 1. The microstructure of fibres obtained by melt moulding: (a-b) polycaprolactone fibres (PCL); (c-d) polycaprolactone fibres modified with hydroxyapatite at the stage of moulding (PCL/n-HAp). PBS for a period of 12 months.



RYS. 2. Procentowe zmiany masy włókien podczas inkubacji włókien PCL i PCL/n-HAp w płynie PBS przez okres 12 miesięcy.

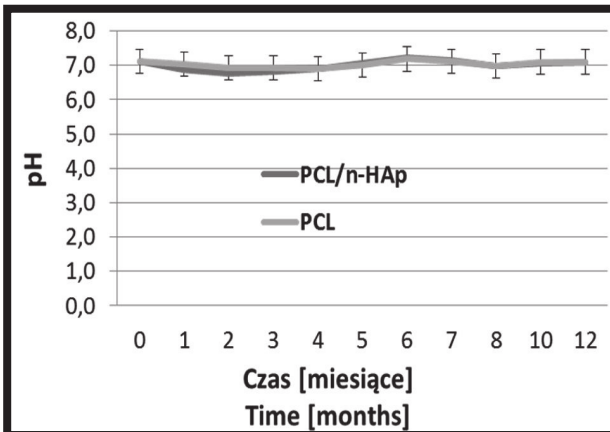
FIG. 2. Percentage changes in the weight of the fibre during incubation of PCL and PCL/n-HAp fibres in PBS for a period of 12 months.

differ in the appearance of their surface. Unmodified PCL fibres have a smooth surface and characteristic longitudinal striations can be seen at the higher magnifications. On the surface of fibres containing nano-hydroxyapatite (FIG. 1 c-d), we observed numerous irregularities (absent in the case of unmodified fibres) confirming the presence of hydroxyapatite in the fibres.



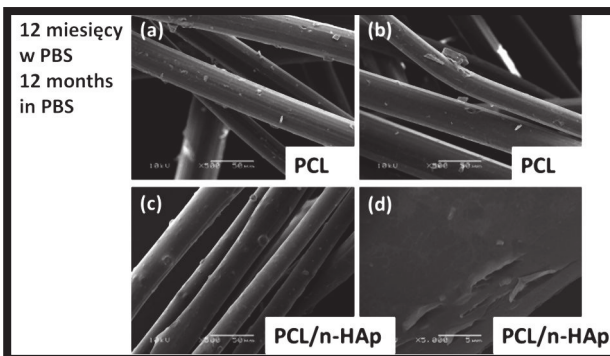
RYS. 3. Zmiany stężenia jonów Na<sup>+</sup> i K<sup>+</sup> w płynie PBS podczas inkubacji próbek włókien PCL i PCL/n-HAp przez okres 12 miesięcy.

FIG. 3. Changes in the concentration of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> in PBS during the incubation of PCL and PCL/n-HAp fibre samples for a period of 12 months.



RYS. 4. Zmiany pH płynu PBS podczas inkubacji próbek włókien PCL i PCL/n-HAp przez okres 12 miesięcy.

FIG. 4. Changes in the pH of PBS during incubation of PCL and PCL/n-HAp fibre samples for a period of 12 months.

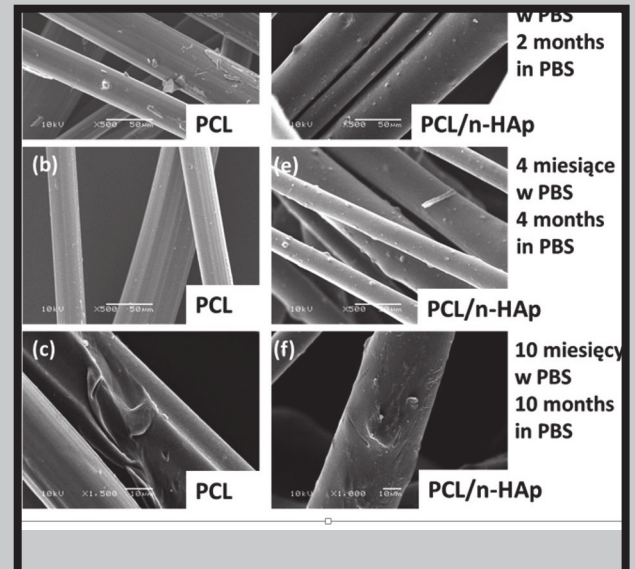


RYS. 6. Zmiany w morfologii włókien po inkubacji próbek w płynie PBS przez okres 12 miesięcy.

FIG. 6. Changes in the morphology of fibres after the incubation of samples in PBS for a period of 12 months.

FIG. 2 shows the percentage changes in the weight of fibres during the incubation in PBS over the period of 12 months. Lack of changes in the weights of the samples incubated in PBS proves the stability of fibres produced by melt spinning. There were no changes in the weight of composite fibres resulting from the presence of hydroxyapatite powder. The graph showing the dependence of the concentration of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> ions in PBS during the incubation of fibre samples for a period of 12 months is shown in FIG. 3, and the changes in pH of the fluid in which the fibre samples were incubated are shown in FIG. 4.

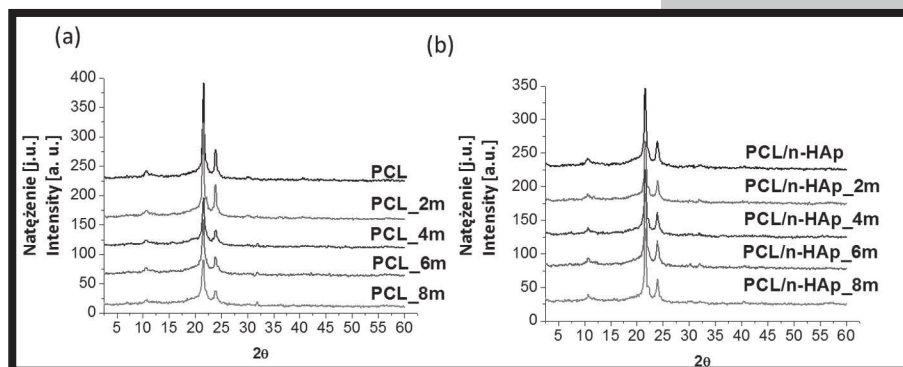
Also, in this case, there were no changes that might indicate the start of the process of degradation of samples.



RYS. 5. Zmiany morfologii włókien podczas inkubacji próbek w płynie PBS przez okres 10 miesięcy.

FIG. 5. Changes in the morphology of fibres during the incubation of samples in PBS for a period of 10 months.

FIGS 5 and 6 show the changes in the morphology of the fibres during the incubation of samples in PBS. The destruction of polymer due to the degradation in PBS probably takes place in several stages. First, the absorption of the fluid occurs, which results in softening the fibres, the appearance of a grid of fine cracks on their surface, the growth of the crack, and the destruction of the fibre in the final stage. Polycaprolactone is a semi-crystalline polymer. The more crystalline phases within the polymer structure the more resistant it is to physiological fluids. The hydrophobic character of PCL fibres and their semi-crystalline structure causes that the fibres are stable in PBS over a long period of time. The first changes on the surface of the fibres were observed after 10 months of incubating the fibres in PBS. Also, X-ray results (WAXD) confirm the stability of the samples incubated for a period of 8 months in PBS.



**RYS. 7. Zestawienie krzywych dyfrakcyjnych dla włókien PCL i PCL/n-HAp inkubowanych w płynie PBS przez okres 8 miesięcy.**

**FIG. 7. Summary of diffraction curves for PCL and PCL/n-HAp fibres incubated in PBS for a period of 8 months.**

Na RYS. 5 i 6 przedstawiono zmiany w morfologii włókien podczas inkubacji próbek w płynie PBS. Zniszczenie polimeru wskutek degradacji w płynie PBS prawdopodobnie przebiega w kilku etapach. Najpierw następuje absorpcja cieczy, czego następstwem jest zmiękczenie włókien, pojawienie się siatki drobnych pęknięć na ich powierzchni, wzrost szczeliny oraz w końcowym etapie zniszczenie włókna. Polikaprolakton jest polimerem semikrystalicznym. Im więcej fazy krystalicznej w strukturze polimeru tym jest on bardziej odporny na działanie płynów fizjologicznych. Hydrofobowy charakter włókien PCL oraz semikrystaliczna struktura sprawia, że włókna wykazują stabilność w płynie PBS przez długi okres czasu. Pierwsze zmiany na powierzchni włókien zaobserwowano po 10 miesiącach inkubacji włókien w płynie PBS. Również badania rentgenowskie (WAXD) potwierdzają stabilność próbek inkubowanych przez okres 8 miesięcy w płynie PBS. Na RYS. 7 przedstawiono zestawienie krzywych dyfrakcyjnych wykonanych po różnych okresach inkubacji próbek. Przeprowadzone badania potwierdzają niezmienny, semikrystaliczny charakter próbeki podczas inkubacji.

## Wnioski

Badania degradacji włókien przeprowadzone podczas inkubacji próbek w płynach fizjologicznych wykazały, że wytworzone włókna kompozytowe charakteryzują się stabilnością w środowisku płynów ustrojowych przez długi okres czasu. Dzięki temu, w przyszłości, wytworzone z włókien kompozytowych podłoża tkankowe będą mogły przenosić obciążenia aż do momentu właściwego odtworzenia się tkanki. Niewielkie zmiany na powierzchni włókien, zaobserwowane po 10 miesiącach inkubacji, w płynie, wskazują na rozpoczęcie procesu degradacji, stąd też można przypuszczać, że czas całkowitej biodegradacji włókien może być skorelowany z czasem potrzebnym do kompletnego odtworzenia tkanki.

## Podziękowania

Praca naukowa finansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki (projekt numer: N N507550938, 2010-2013) oraz ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (Iuventus Plus IP2012033372, 2013-2015). Autorzy składają serdeczne podziękowania pani dr Ewie Sarnie za pomoc w badaniach SEM.

FIG. 7 presents diffraction curves taken after various incubation periods of the samples. The study confirms the unchanging, semi-crystalline nature of the sample during incubation in the specimen based on titanium alloy with regard to the sample based on titanium matrix with the same HAp content was caused by the lower size of Ti-6Al-4V power grains compared to the titanium powder.

## Conclusions

The study of the degradation of fibres carried out during the incubation of samples in physiological fluids showed that the composite fibres produced are stable in the environment of physiological fluids over a long period of time. Thus, in the future, tissue scaffolds made from composite fibres will be able to carry the load until the proper reproduction of the tissue. Minor changes on the surface of the fibres, observed after 10 months of incubation, in a fluid, indicate the start of a process of degradation, hence it can be assumed that the time of total biodegradation of the fibres may be correlated with the time needed for a complete restoration of tissue.

## Acknowledgements

This work was supported by Polish National Science Center (project number: N N507550938, 2010 - 2013) and by the Polish Ministry of Science and Higher Education (project Iuventus Plus III no. IP2013033372). The authors would like to thank Dr E. Sarna (ATH, University of Bielsko-Biala) for help in SEM study

## Piśmiennictwo

## References

- [1] Woodruff MA, Hutmacher DW. The return of a forgotten polymer-Polycaprolactone in the 21st century. *Prog Polym Sci* 2010;35(10):1217-1256.
- [2] Rajzer I. Evaluation of PCL and PCL/HAp scaffolds processed by electrospinning and porogen leaching techniques. *Eng Biomater* 2011;103: 4-7.
- [3] Lei Y, Rai B, Ho KH, Teoh SH. In vitro degradation of novel bioactive polycaprolactone – 20% tricalcium phosphate composite scaffolds for bone engineering. *Mater Sci Eng C* 2007;27:293-298.
- [4] Bosworth LA, Downes S. Physicochemical characterisation of degrading polycaprolactone scaffolds. *Polymer Degradation and Stability* 2010;95:2269-2276.
- [5] Jang J-H, Castano O, Kim H-W. Electrospun materials as potential platforms for bone tissue engineering. *Adv Drug Deliver Rev* 2009;61:1065-1083.
- [6] Plazas Bonilla CE, Trujillo S, Demirdögen B, Perilla JE, Elcin YM, Gómez Ribelles JL. New porous polycaprolactone-silica composites for bone regeneration. *Mater Sci Eng C* 2014;40(1):418-426
- [7] Rajzer I. Fabrication of bioactive polycaprolactone/hydroxyapatite scaffolds with final bilayer nano-/micro- fibrous structures for tissue engineering application. *J Mater Sci* August 2014; 49(16):5799-5807.
- [8] Rajzer I, Fabia J, Graczyk T, Piekarczyk W. Evaluation of PCL and PCL/n-HAp fibres processed by melt spinning. *Eng Biomater* 2013;118:2-4.
- [9] Ślósarczyk A, Paszkiewicz Z, Zima A. The effect of phosphate source on the sintering of carbonate substituted hydroxyapatite. *Ceram Int* 2010;36(2):577-582.