



مقاله کامل پژوهشی

## ساخت و بررسی خواص داربست استخوانی کامپوزیتی بر پایه نانوالیاف پلی‌کاپرولاکتون و فیبروئین ابریشم سولفونه

نگین واحدی<sup>۱</sup>، ژامک نورمحمدی<sup>۲\*</sup>، نیلوفر پهلوانی<sup>۳</sup>، سحر نخستین حسینی<sup>۱</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، تهران، ایران

<sup>۲</sup> دانشیار، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، تهران، ایران

<sup>۳</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشکده فنی و مهندسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، تهران، ایران

**چکیده** هدف از این پژوهش، ساخت و بررسی خواص داربست نانولیفی از پلی‌کاپرولاکتون- فیبروئین ابریشم سولفونه برای کاربردهای مهندسی بافت استخوان است. بدین منظور، فیبروئین ابریشم، بعد از تخلیص از پیله ابریشم، با استفاده از پیریدین و کلروسولفونیک اسید، سولفونه شد. مقدار مشخصی از فیبروئین ابریشم سولفونه، با پلی‌کاپرولاکتون مخلوط و با ولتاژ ۱۱ کیلوولت و سرعت ۰/۴ میلی‌لیتر بر ساعت الکترورسی شد. آزمون‌های مختلفی مانند بررسی ترکیب شیمیایی، ساختار، زیست‌فعالی، سمیت و چسبندگی سلولی انجام شد. با بررسی طیف‌سنجی تبدیل فوریه فروسرخ، مشخص شد که گروه‌های سولفات و سولفوناتی، با موفقیت، در ساختار فیبروئین ابریشم ایجاد شده‌اند. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی، حاکی از تشکیل ساختاری لیفی شکل با لیاف پیوسته و بدون گره در ترکیبات الکترورسی شده بود. افزودن فیبروئین ابریشم سولفونه شده به پلی‌کاپرولاکتون، سبب کاهش قطر لیاف از ۲۴۴ نانومتر به ۱۳۸ نانومتر شد. همچنین، نتایج نشان داد که میزان جذب آب در داربست پلی‌کاپرولاکتون، بر اثر افزودن فیبروئین ابریشم سولفونه، به ترتیب از ۱۲/۴ درصد به ۱۶۷ درصد افزایش یافته است. نتایج به‌دست‌آمده از آزمون‌های زیست‌فعالی و کشت سلولی حاکی از آن بود که فیبروئین ابریشم سولفونه، سبب رسوب لایه کلسیم فسفات آباتیتی و همچنین، بهبود تکثیر و چسبندگی سلولی در لیاف پلی‌کاپرولاکتون شده است.

**تاریخچه مقاله:**

ثبت اولیه: ۱۳۹۹/۰۷/۰۵

دریافت نسخه اصلاح‌شده: ۱۳۹۹/۰۸/۱۴

پذیرش قطعی: ۱۴۰۰/۰۵/۳۱

**کلیدواژه‌ها:**

لی‌کاپرولاکتون،

فیبروئین سولفونه،

رسوب کلسیم فسفات،

داربست استخوان







<https://doi.org/10.30501/jamt.2021.250243.1128>

URL: [https://www.jamt.ir/article\\_126414.html](https://www.jamt.ir/article_126414.html)

### Original Research Article

Journal of Advanced Materials and Technologies (JAMT): Vol. 10, No. 1, (Spring 2021), 75-84

## Preparation and Characterization of Composite Bone Scaffold Based on Polycaprolactone and Sulfonated Silk Fibroin Nanofibers

Negin Vahedi<sup>1</sup> , Jhamak Nourmohammadi<sup>2\*</sup> , Niloofar Pahlevani<sup>3</sup> , Sahar Nakhostin Hosseini<sup>1</sup> 

<sup>1</sup> M. Sc. Student, Faculty of New Sciences and Technologies, University of Tehran, Tehran, Tehran, Iran

<sup>2</sup> Associate Professor, Faculty of New Sciences and Technologies, University of Tehran, Tehran, Tehran, Iran

<sup>3</sup> M. Sc. Student, Faculty of Technology and Engineering, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Tehran, Iran

\*عهده دار مکاتبات

نشانی: تهران، تهران، دانشگاه تهران، دانشکده علوم و فنون نوین، تلفن: ۰۲۱-۸۸۴۹۷۳۲۴، دورنگار: ۰۲۱-۸۸۴۹۷۳۲۴

پیام نگار: [j\\_nourmohammadi@ut.ac.ir](mailto:j_nourmohammadi@ut.ac.ir)

Please cite this article as: Vahedi, N., Nourmohammadi, J., Pahlevani, N., Nakhostin Hosseini, S., "Preparation and characterization of composite bone scaffold based on polycaprolactone and sulfonated silk fibroin nanofibers", *Journal of Advanced Materials and Technologies (JAMT)*, Vol. 10, No. 1, (2021), 75-84. (<https://doi.org/10.30501/jamt.2021.250243.1128>).

2783-0829/© 2021 The Author(s). Published by MERC.

This is an open access article under the CC BY license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



**Paper History:**

Received: 2020-09-26

Revised in revised form: 2020-11-04

Accepted: 2021-08-22

**Keywords:**Polycaprolactone,  
Sulfonated Silk Fibroin,  
Calcium Phosphate Deposition,  
Bone Scaffold**Abstract**

The objective of this study was to fabricate and characterize the characteristics of polycaprolactone-sulfonated silk fibroin nanofibrous scaffold for bone tissue engineering applications. Thus, after extraction of silk fibroin (SF) from *Bombyx mori* cocoons, silk fibroin (SF) was sulfonated using chlorosulfonic acid and pyridine. Afterwards, a certain amount of sulfonated SF was mixed with polycaprolactone (PCL) solution, and then electrospinning was done using 11 kV high voltage and feeding rate 0.4 mL/h. Various characterization tests were applied to analyze such items such as the structure, chemical composition, bioactivity, cellular attachment, and viability. Fourier transform infrared spectroscopy analyses proved the successful incorporation of sulfate and sulfonate groups in SF structure. The scanning electron microscope shows the formation of continuous and beadless fibers. The average fiber diameter in polycaprolactone nanofibers reduced from 244 nm to 138 nm with the addition of sulfonated SF. Moreover, the water uptake of PCL nanofibers improved from 12.4 % to 167 % after the addition of sulfonated silk fibroin to polycaprolactone. The results of bioactivity and cell culture experiments indicated that sulfonated SF promotes apatitic calcium phosphate deposition and also enhances cellular attachment and viability of PCL nanofibers.


<https://doi.org/10.30501/jamt.2021.250243.1128>
[URL: https://www.jamt.ir/article\\_126414.html](https://www.jamt.ir/article_126414.html)
**۱- مقدمه**

داربست ایده‌آل باید از ماده‌ای زیست‌سازگار و

زیست‌تخریب‌پذیر ساخته شود و دارای درصد و اندازه تخلخل مناسب، خواص مکانیکی مطلوب و خاصیت هدایت استخوانی باشد. ساختار متخلخل، محیط مناسبی برای ترمیم و بازسازی بافت آسیب‌دیده فراهم می‌کند [۶]. پلیمرهای زیست‌تخریب‌پذیر مصنوعی و طبیعی مختلفی برای ساخت داربست، در مهندسی بافت استخوان، به کار گرفته شده است [۷]. پلی‌کاپرولاکتون<sup>۲</sup>، یکی از پلیمرهای مصنوعی پرکاربرد در مهندسی بافت است. خواص مکانیکی خوب، انعطاف‌پذیری و زیست‌تخریب‌پذیری از ویژگی‌های مطلوب این ماده است [۸]. مطالعات بسیاری در خصوص داربست‌های پلی‌کاپرولاکتون با کاربرد ترمیم بافت استخوان انجام شده است. در این پژوهش‌ها با افزودن نان‌ذرات هیدروکسی‌آپاتیت و نانولوله‌های کربنی و نانوذرات سیلیکا<sup>۳</sup> به پلی‌کاپرولاکتون، به دنبال افزایش آب‌دوستی و زیست‌فعالی آن بوده‌اند [۸-۱۰]. فیبروئین<sup>۴</sup> ابریشم نیز یکی از پرمصرف‌ترین پلیمرهای طبیعی در مهندسی بافت است. خواص مکانیکی قابل‌توجه، سرعت زیست‌تخریب‌پذیری خوب، زیست‌سازگاری، آب‌دوستی، فرایندپذیری و قیمت مناسب موجب شده است که در بسیاری از پژوهش‌ها به آن توجه شود. علاوه بر موارد مذکور، اثر پروتئین طبیعی بر پاسخ سلولی، استفاده از این ماده را برای کاربرد مهندسی بافت استخوان بیش از همه، حائز اهمیت کرده است [۱۱]. از سوی دیگر، مولکول‌هایی با بار منفی، توانایی جوانه‌زنی و رشد فاز معدنی استخوان را دارند. با توجه به نتایج بسیاری از پژوهش‌ها، پلی‌ساکاریدهای سولفونه، مانند

یکی از چالش‌های مهم در زمینه ارتوپدی، درمان ضایعات بزرگ استخوانی است. با همه تلاش‌هایی که انجام شده است، روش‌هایی مانند پیوند بافت و استفاده از کاشتنی‌ها، با محدودیت‌هایی همراه است. در چند دهه اخیر، ظهور مهندسی بافت، جایگزین مناسبی برای روش‌های درمانی سابق بوده است [۱]. نکته مهم در مهندسی بافت استخوان، طراحی داربست مناسب است تا بتواند ماتریس خارج سلولی استخوان و شرایط ترمیم را فراهم کند [۲]. بنابراین، شناخت ساختار و ترکیب ماتریس خارج سلولی، برای طراحی داربست مناسب، امری ضروری است. ماتریس خارج سلولی طبیعی استخوان، کامپوزیتی متشکل از مواد آلی و غیرآلی با ساختاری سه‌بعدی و متخلخل است. بخش آلی ماتریس شامل پروتئین‌ها و گلیکوزامینوگلیکان‌های سولفاته و غیرسولفاته است و بخش معدنی شامل هیدروکسی‌کربنات آپاتیت نیمه‌بلورین است که باعث مقاومت فشاری در استخوان می‌شود [۳].

الکتروریسی، روش مناسبی برای تولید الیاف فوق نازک با قطری در محدوده میکرون و نانومتر است [۴]. ویژگی‌هایی مانند نسبت سطح به حجم بالا و دانسیته تخلخل بالا، الیاف تولیدشده با این روش را به گزینه مناسبی برای کاربردهای زیستی و پزشکی تبدیل کرده است. همچنین، شباهت ساختار الیاف رسیده‌شده به الیاف کلاژن در ماتریس خارج سلولی طبیعی استخوان نیز عامل دیگری است که این روش را برای تولید داربست‌های استخوانی مطلوب می‌کند [۵]. علاوه بر ساختار مطلوب، انتخاب ماده برای ساخت داربست نیز بسیار مهم است.

<sup>2</sup> Polycaprolactone

<sup>3</sup> Silica

<sup>4</sup> Fibroin

<sup>1</sup> Glycosaminoglycan

آدریچ امریکا با کد شیمیایی (۸-۱۹-۴۹۷) به آب دیونیزه در دمای جوش اضافه شد. در ادامه، ۲/۵ گرم پبله کرم ابریشم به محلول مورد نظر اضافه و به مدت ۴۵ دقیقه حرارت داده شد. حضور کربنات سدیم سبب جدا شدن سربسین<sup>۷</sup> از پبله‌ها و حل شدن سربسین در آب می‌شود. در مرحله دوم، ابریشم از آب، خارج شد و در آب مقطر سرد، شست‌وشو داده شد و برای مدت ۲۴ ساعت در آن ۴۰ درجه سلسیوس خشک شد. سپس، ۱۶/۱۴ گرم برمید لیتیم (تهیه‌شده از شرکت سیگما آدریچ امریکا با کد شیمیایی (۹-۸۲-۸۵۰۱۷)) در ۲۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه حل شد و فیروئین خشک‌شده به مدت ۴ ساعت در دمای ۶۰ درجه سلسیوس در محلول برمید لیتیم قرار داده شد. پس از ۴ ساعت، محلولی زردرنگ، حاوی برمید لیتیم و فیروئین، مشاهده شد. به‌منظور جداسازی برمید لیتیم از فیروئین، از کیسه دیالیز ۱۲۰۰۰ دالتون استفاده و محلول به‌دست‌آمده، ۳ روز در آب دیونیزه، دیالیز شد. طی این مدت، چندین بار آب دیونیزه تعویض شد تا فرایند دیالیز بهتر انجام شود. سپس، محلول فیروئین، برای جدا کردن ناخالصی به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس و سرعت ۶۰۰۰ دور بر دقیقه، سانتریفیوژ شد. محلول به‌دست‌آمده در فریزر -۷۰ درجه سلسیوس منجمد شد و در نهایت، با استفاده از خشک‌کن انجمادی (Operon FDB 5503)، اسفنج فیروئین ابریشم به دست آمد [۱۲].

به‌منظور سولفون کردن فیروئین، ۱۰ میلی‌لیتر کلروسولفونیک اسید (تهیه‌شده از شرکت سیگما آدریچ امریکا با کد شیمیایی (۵-۹۴-۷۷۹۰)) به ۶۰ میلی‌لیتر پیریدین (تهیه‌شده از شرکت سیگما آدریچ امریکا با کد شیمیایی (۱-۸۶-۱۱۰))، در حمام یخ، قطره‌قطره افزوده شد. یک گرم فیروئین در دمای ۸۰ درجه سلسیوس، درحالی‌که هم‌زده می‌شد، با ۴۰ میلی‌لیتر پیریدین به‌مدت نیم ساعت مخلوط شد. مخلوط فیروئین و پیریدین، در دمای ۸۰ درجه سلسیوس، به مخلوط کلروسولفونیک اسید افزوده و مدت ۸ ساعت، واکنش سولفون‌شدن انجام شد. بعد از واکنش، ۲۰۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه اضافه شد. محلول به‌دست‌آمده، توسط محلول یک مولار سدیم هیدروکسید (تهیه‌شده از شرکت سیگما آدریچ

کاراگینان، هپارین<sup>۱</sup> و کندروتین سولفات<sup>۲</sup>، تمایز سلول‌های استخوانی و تشکیل استخوان را افزایش می‌دهند. همچنین، آب‌دوستی گروه‌های سولفات نیز امری قابل توجه است [۱۴-۱۲]. نتایج تحقیق ونکاتاسن<sup>۳</sup> و همکاران نشان داد که افزودن کندروتین سولفات به داربست کیتوزان<sup>۴</sup>/هیدروکسی‌آپاتیت موجب افزایش تکثیر سلول‌ها شده است [۱۳]. همچنین، طبق نتایج تحقیق گم‌سدرلیگوه<sup>۵</sup> و همکاران، هپارین سولفات، تمایز و تکثیر سلول‌های پیش‌ساز استخوان MC3T3-E1 را افزایش داده است، اما قیمت بالا و خاصیت ژل‌شوندگی کم، کاربرد این مواد را محدود می‌کند [۱۴]. در تحقیقی دیگر که توسط سین<sup>۶</sup> و همکارانش انجام شد، گزارش شده که افزودن فیروئین ابریشم به پلی‌کاپرولاکتون، به افزایش چسبندگی سلولی‌های فیروبلاست روی داربست‌های الکترورسی منجر شده است [۱۵]. بنابراین، هدف این پژوهش، ساخت داربستی مناسب از نانوالیاف فیروئین ابریشم سولفون‌شده و پلی‌کاپرولاکتون، به‌منظور ایجاد خاصیت زیست‌فعالی و بهبود پاسخ‌های سلولی برای کاربرد در مهندسی بافت استخوان است. به همین منظور، ابتدا فیروئین ابریشم حاصل از پبله‌های کرم ابریشم، توسط کلروسولفونیک اسید، سولفون‌شده و سپس با استفاده از روش الکترورسی، داربست کامپوزیتی از پلی‌کاپرولاکتون و فیروئین ابریشم سولفون‌شده تولید شد و خواص آن نظیر ریخت‌شناسی، قطر الیاف، جذب آب، زیست‌فعالی و پاسخ‌های سلولی با داربست نانولیفی پلی‌کاپرولاکتون ساده مقایسه شد.

## ۲- روش تحقیق

### ۲-۱- استخراج و سولفون‌کردن فیروئین ابریشم و مشخصه‌یابی

پبله‌های کرم ابریشم از تولیدکنندگان بومی استان گلستان خریداری شده است. به‌منظور استخراج فیروئین ابریشم، ۲/۱۲ گرم کربنات سدیم (تهیه‌شده از شرکت سیگما

<sup>1</sup> Heparin  
<sup>2</sup> Chondroitin Sulfate  
<sup>3</sup> Venkatesan  
<sup>4</sup> Chitosan  
<sup>5</sup> Gumubdsderelioglu  
<sup>6</sup> Singh

<sup>7</sup> Sericin

برای انجام فرایند الکتروریسی، ولتاژ ۱۱ کیلوولت با استفاده از منبع تغذیه ولتاژ بالا ایجاد شد. جمع‌کننده با استفاده از فویل آلومینیمی پوشانده شد و در فاصله ۱۰ سانتی‌متری، سرنگ پر شده از محلول الکتروریسی قرار داده شد. سپس، محلول، با سرعت ۰/۴ میلی‌لیتر بر ساعت، ریسیده شد. برای جلوگیری از انحلال فیبروئین ابریشم، الیاف به‌دست‌آمده در متانول به مدت ۱۵ دقیقه، غوطه‌ور شدند تا صفحات بلورین ورقه‌های بتا در فیبروئین تقویت شود [۱۷].

### ۲-۳-۳- مشخصه‌یابی‌های فیزیکی و شیمیایی

۲-۳-۱- بررسی ساختار با میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

پس از انجام الکتروریسی، برای بررسی ریزساختار الیاف، از میکروسکوپ الکترونی روبشی<sup>۱</sup> (Hitachi, S4160) استفاده شد تا علاوه بر بررسی قطر الیاف، تأثیر وجود گروه‌های سولفات بر ریزساختار بررسی شود. سپس، با استفاده از نرم‌افزار ImageJ، قطر الیاف تعیین شد. از هر تصویر، قطر ۲۰ لیف اندازه‌گیری و میانگین آن گزارش شد.

### ۲-۳-۲- اندازه‌گیری مقدار جذب آب

برای محاسبه جذب آب تعادلی نمونه‌ها، سه نمونه از هر ترکیب با وزن مشخص ( $W_0$ )، به مدت ۲۴ ساعت، در محلول آب دیونیزه با دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شدند. در نهایت، بعد از حذف آب اضافی، توزین شدند ( $W_s$ ) و با استفاده از رابطه زیر مقدار جذب آب تعادلی ( $WU$ )، محاسبه شد.

$$WU (\%) = \frac{W_s - W_0}{W_0} \times 100 \quad (1)$$

### ۲-۳-۲- بررسی زیست‌فعالی

برای بررسی زیست‌فعالی، از هر ترکیب، سه نمونه با وزن اولیه ۱۰ میلی‌گرم، در محلول شبیه‌سازی شده بدن<sup>۲</sup> (SBF) قرار داده شد. نمونه‌ها در ۳ میلی‌لیتر محلول SBF، به مدت ۱۴ روز در دمای ۳۸ درجه سلسیوس در انکوباتور، نگهداری شد.

امریکا)، به pH خنثی رسانده شد. بعد از عبور دادن محلول نهایی از کاغذ صافی به شماره ۴۲، با ۵۰۰ میلی‌لیتر اتانول مطلق (۹۹/۹۷ درصد، تهیه شده از شرکت هامون طب، ایران) مخلوط شد. رسوب به‌دست‌آمده توسط سانتریفیوژ جدا شده و بعد از حل شدن در مقدار کمی آب دیونیزه، منجمد شد. در نهایت، با استفاده از خشک‌کن انجمادی خشک شد و اسفنج فیبروئین سولفون‌شده به دست آمد [۱۶]. تشکیل گروه‌های سولفونات در فیبروئین ابریشم توسط آزمون طیف‌سنجی تبدیل فوریه فروسرخ (FTIR; Perkin Elmer) بررسی شد. بدین منظور، طیف فروسرخ، در گستره عدد موج  $4000-400 \text{ cm}^{-1}$ ، از پودرهای فیبروئین ابریشم سولفون‌شده (نمونه S-SF) گرفته و سپس، با طیف نمونه فیبروئین ابریشم مقایسه شد.

### ۲-۲- الکتروریسی

برای ساخت الیاف پلی‌کاپرولاکتون/ابریشم سولفون‌شده، از روش الکتروریسی استفاده شد. برای تهیه نانوالیاف پلی‌کاپرولاکتون (نمونه  $A_1$ )، ابتدا فرمیک اسید (تهیه شده از شرکت سیگما آلد ریچ امریکا با کد شیمیایی (۶۴-۱۸-۶۴)) و استیک اسید (تهیه شده از شرکت سیگما آلد ریچ امریکا با کد شیمیایی (۶۴-۱۹-۷))، با نسبت حجمی ۳ به ۱، مخلوط شدند. سپس، محلول ۱۳ درصد پلی‌کاپرولاکتون (تهیه شده از شرکت سیگما آلد ریچ امریکا با کد شیمیایی (۴۴۰۷۴۴))، در محلول اسید مذکور در دمای محیط و با استفاده از هم‌زن مغناطیسی، تهیه شد. برای تهیه نمونه  $A_2$ ، محلول ۱۴ درصد وزنی فیبروئین ابریشم سولفون‌شده در اسید فرمیک تهیه شد. سپس، محلول فیبروئین سولفون‌شده با محلول پلی‌کاپرولاکتون، با نسبت حجمی ۹۰ به ۱۰ مطابق جدول ۱، مخلوط شدند.

جدول ۱. ترکیب محلول الکتروریسی

کد نمونه	درصد حجمی محلول پلی‌کاپرولاکتون	درصد حجمی محلول فیبروئین سولفون‌شده
$A_1$	۱۰۰	۰
$A_2$	۹۰	۱۰

<sup>1</sup> Scanning Electron Microscope

<sup>2</sup> Simulated Body Fluid

مطالعه قرار داد. بنابراین، ابتدا محیط کشت اطراف نمونه‌ها خارج شد، سپس، محلول گلوکارآلدئید ۴ درصد تا حدی که سطح نمونه را بپوشاند، روی داربست ریخته شد. پس از گذشت نیم ساعت، محلول گلوکارآلدئید از هر چاهک خارج شد و با غلظت‌های مختلف محلول اتانول-آب، نمونه‌ها خشک شد و در انتها، نمونه‌ها در زیر هود به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق قرار داده شد تا کاملاً خشک شوند. بعد از اطمینان از خشک شدن نمونه‌ها، داربست‌ها، با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی، آنالیز شدند.

تأثیر داربست‌ها در میزان زنده‌مانی سلول‌ها، توسط آزمون دی‌متیل تیازول دی‌فنیل تترازولیم بروماید<sup>۴</sup> (MTT) غیرمستقیم و بر اساس استاندارد ایزو ۱۰۹۹۳-۵ بررسی شد. در این روش، ابتدا عصاره نمونه‌ها (سه بار تکرار) در زمان ۳ و ۷ روز تهیه شد. برای این منظور، به‌ازای هر ۵ میلی‌گرم داربست، ۱ سی‌سی محیط کشت افزوده شد و نمونه‌ها در انکوباتور، در شرایط رطوبت ۹۵ درصد و گاز ۵ درصد دی‌اکسیدکربن، برای مدت مورد نظر، نگهداری شدند. محیط کشت بدون داربست به‌عنوان نمونه شاهد در نظر گرفته شد.

در ادامه، تعداد  $10^4 \times 1$  سلول، درون هریک از چاهک‌های ظرف کشت سلولی ۹۶ خانه ریخته شد و سپس، به‌مدت ۲۴ ساعت، در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و ۵ درصد دی‌اکسیدکربن قرار گرفت تا سلول‌ها به کف هر چاهک بچسبند. در مرحله بعد، عصاره گرفته‌شده از هر نمونه، به هریک از چاهک‌ها افزوده شد و سلول‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت دیگر در مجاورت این عصاره‌ها قرار گرفتند. پس از آن، محیط کشت از هر چاهک خارج شد و ۱۰۰ میکرولیتر محلول MTT، با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، به هر چاهک اضافه شد. پس از گذشت ۴ ساعت، محیط روی سلول‌ها خارج شد و ۵۰ میکرولیتر دی‌متیل سولفوکساید (سیگما-۸۴۱۸) به هر چاهک، برای حل کردن بلورهای بنفش‌رنگ فورمازان<sup>۵</sup> ایجادشده، اضافه شد. پس از گذشت نیم ساعت، جذب نوری محلول توسط دستگاه الیزا (استات-فاکس مدل ۲۱۰۰، ساخت امریکا)، در طول موج ۵۷۰ نانومتر، اندازه‌گیری شد.

و هر ۲۴ ساعت، محلول تعویض شد. سپس، نمونه‌ها با آب دیونیزه شسته شد و در دمای محیط خشک شد. نمونه‌ها به‌وسیله آزمون‌های میکروسکوپ الکترونی روبشی، طیف‌سنجی پراش انرژی پرتو ایکس<sup>۱</sup> (EDS) و پراش پرتو ایکس<sup>۲</sup> (XRD) بررسی شدند تا ریزساختار و ماهیت ماده تشکیل‌شده روی الیاف مشخص شود. میزان رسوب ایجادشده، با توجه به رابطه زیر، محاسبه شد [۱۸]:

$$W_{CaP} \text{ (mg)} = M_1 - \left( \frac{M_2}{1+WU} \right) \quad (2)$$

در رابطه بالا،  $M_1$  و  $M_2$ ، به ترتیب، وزن نمونه‌ها قبل و بعد از ۱۴ روز غوطه‌وری در محلول SBF، WU، میزان جذب آب تعادلی نمونه‌ها و  $W_{CaP}$ ، میزان رسوب کلسیم فسفات هستند.

### ۲-۳-۴- بررسی سلولی

هر داربست، علاوه بر داشتن خواص فیزیکی و شیمیایی مناسب، باید زیست‌سازگار باشد. به این معنا که در مجاورت بافت و محیط بیولوژیک، سمیت ایجاد نکرده و کارکرد بافت اطراف را مختل نکند. این خصوصیت معمولاً، با استفاده از آزمون سنجش سمیت سلولی، بررسی می‌شود. برای بررسی چسبندگی و میزان زنده‌مانی سلول‌ها، ابتدا نمونه‌ها با استفاده از اتانول ۷۰ درصد و محلول بافر فسفاتی سترون شدند. برای کشت سلول‌های MG63، از محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد حجمی سرم جنین گاوی (FBS) و یک درصد حجمی پنستروپ<sup>۳</sup> استفاده شد.

برای بررسی چسبندگی سلولی، ابتدا نمونه‌ها در چاهک‌های ظرف کشت سلول ۹۶ خانه قرار گرفتند. سوسپانسیون سلولی، به تعداد  $10^5 \times 2/5$  سلول به‌ازای هر چاهک، روی نمونه‌ها ریخته و در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و ۵ درصد دی‌اکسیدکربن به‌مدت ۳ روز، قرار داده شد. به‌منظور بررسی مورفولوژی و چسبندگی سلول‌های کشت داده‌شده، بایستی سلول‌ها روی سطح داربست تثبیت شوند تا بتوان آن‌ها را با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی مورد

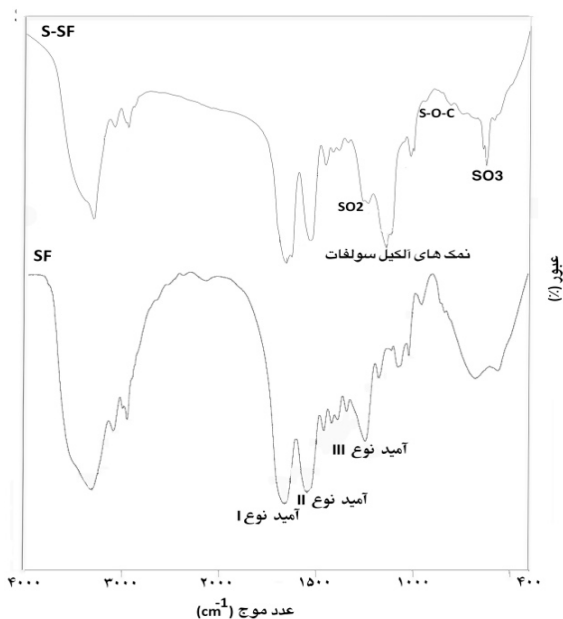
<sup>4</sup> 3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide  
<sup>5</sup> Formazan

<sup>1</sup> Energy Dispersive X-ray Spectroscopy

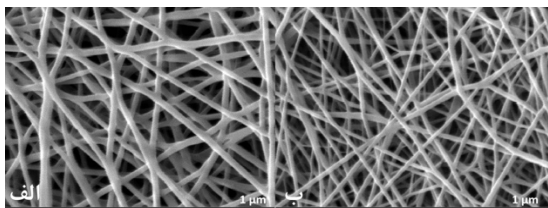
<sup>2</sup> X-ray Diffraction

<sup>3</sup> Penstrep

شکل (۲)، تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی فیبروئین ابریشم را قبل و بعد از واکنش سولفون‌شدن نشان می‌دهد. هر دو نمونه دارای الیافی بدون گره، با جهت‌گیری اتفاقی هستند. همان‌طور که مشاهده می‌شود، قطر الیاف بعد از فرایند سولفون‌کردن کاهش یافته است. نتیجه به‌دست‌آمده از میانگین قطر الیاف، با نرم‌افزار ImageJ نیز این پدیده را تصدیق می‌کند. میانگین قطر الیاف در نمونه A<sub>1</sub> و A<sub>2</sub>، به ترتیب، ۲۳ ± ۲۴۴ نانومتر و ۱۲ ± ۱۳۸ نانومتر است. کاهش میانگین قطر الیاف در داربست A<sub>2</sub> به هدایت الکتریکی مناسب محلول الکتروریسی که در اثر اضافه کردن فیبروئین ابریشم سولفون‌به وجود آمده است، مرتبط می‌شود. گروه‌های سولفات‌ی در فیبروئین ابریشم، که دارای بار منفی هستند، سبب افزایش هدایت الکتریکی محلول می‌شوند. افزایش هدایت الکتریکی محلول الکتروریسی سبب افزایش نیروی کششی اعمالی بر جت شده و در نتیجه، الیافی با قطر کوچک‌تر ایجاد می‌شود [۵].



شکل ۱. طیف فروسرخ فیبروئین ابریشم قبل و بعد از واکنش سولفون‌



شکل ۲. تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از نانوالیاف الکتروریسی‌شده، (الف) نمونه A<sub>1</sub> و (ب) نمونه A<sub>2</sub> (مقیاس: ۱ میکرون)

داربست‌هایی که رشد سلولی بیشتری دارند، چگالی نوری<sup>۱</sup> (OD) بالاتری را نشان می‌دهند. در آخر، بر اساس رابطه زیر، میزان بقای سلولی محاسبه شد [۱۹]:

$$\text{زنده مانی سلول (\%)} = \frac{OD_s}{OD_c} \times 100 \quad (۳)$$

## ۲-۴- آنالیز آماری

هریک از آنالیزها برای سه نمونه از هر ترکیب تکرار شد و نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف از استاندارد گزارش شد. به کمک آنوای یک‌طرفه<sup>۲</sup>، میزان معنی‌دار بودن داده‌ها محاسبه شد به طوری که \* برابر ۰/۰۵ ≤ p و \*\*\* برابر ۰/۰۰۱ ≤ p در نظر گرفته شد.

## ۳- نتایج و بحث

### ۳-۱- طیف‌سنجی تبدیل فوریه فروسرخ (FTIR) فیبروئین

#### ابریشم و فیبروئین ابریشم سولفون‌

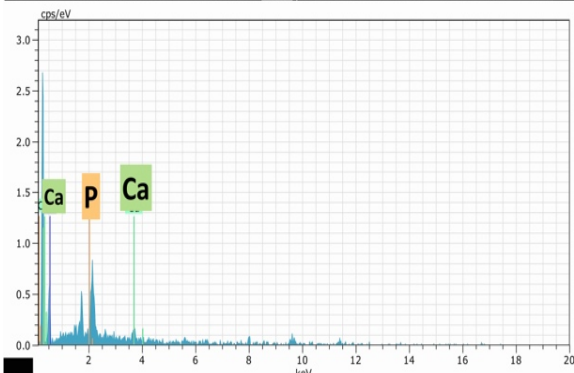
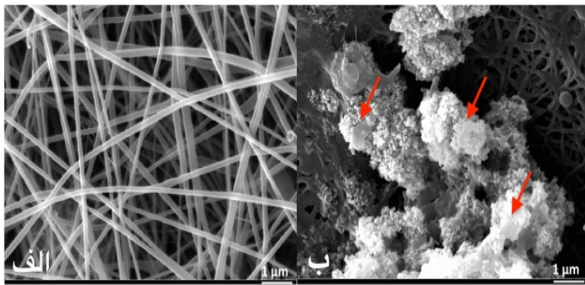
طیف فروسرخ فیبروئین ابریشم، قبل (نمونه SF) و بعد از واکنش سولفون‌ (نمونه S-SF)، در شکل (۱) نشان داده شده است. همان‌طور که در شکل دیده می‌شود، باندهای ۱۶۵۵ cm<sup>-1</sup> و ۱۵۴۰ cm<sup>-1</sup> در هر دو نمونه، به ترتیب، ارتعاشات آمید نوع I و نوع II را نشان می‌دهند که هر دو از باندهای جذبی مشخصه پروتئین‌ها و پپتیدها هستند [۱۱]. پیدایش باندهای جدید در طیف فیبروئین ابریشم سولفون‌شده، در ۶۲۳ cm<sup>-1</sup> [۲۰]، ۸۶۶ cm<sup>-1</sup> و ۱۱۴۰ cm<sup>-1</sup> [۲۱]، به ترتیب، ارتعاشات SO<sub>3</sub>، S-O-C و نمک‌های آلکیل سولفات را نشان می‌دهند. همچنین، وجود باندهایی در عدد موج‌های ۱۲۰۰ و ۱۴۰۰ cm<sup>-1</sup>، در طیف فیبروئین ابریشم سولفون‌، به ترتیب، ارتعاشات کششی متقارن و غیرمتقارن SO<sub>2</sub> را نشان می‌دهند [۲۱]. وجود این باندها بیانگر این واقعیت است که گروه‌های سولفات و سولفونات در مولکول‌های فیبروئین ابریشم با موفقیت ایجاد شده‌اند.

### ۳-۲- بررسی ریزساختار با میکروسکوپ الکترونی روبشی

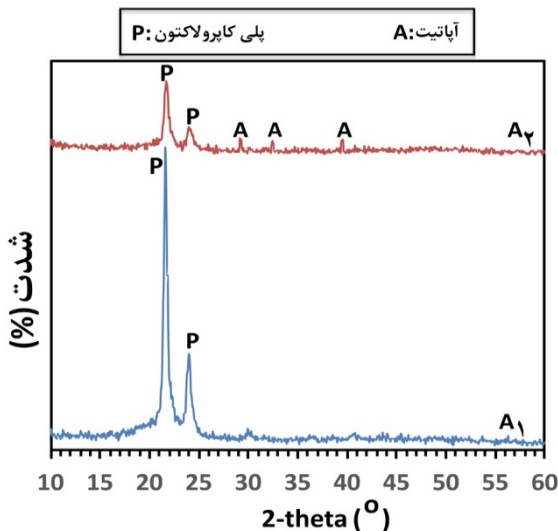
<sup>1</sup> Optical Density

<sup>2</sup> One-Way Anova

پلی‌کاپرولاکتون کاسته شده و پیک‌های جدیدی در زوایای ۲۹، ۳۲ و ۳۹ درجه ظاهر شده است که به ترتیب، مربوط به صفحات بلوری (۲۱۰)، (۲۱۱) و (۳۱۰) هیدروکسی‌آپاتیت هستند [۲۴]. تغییرات حاصل در پیک‌های پرتو ایکس، بیانگر رسوب لایه آپاتیتی روی نانوالیاف پلی‌کاپرولاکتون و فیبروئین ابریشم سولفون‌شده است. میزان آپاتیت رسوب‌کرده روی نمونه  $A_2$ ،  $0.3 \pm 2/2$  میلی‌گرم محاسبه شد.



شکل ۳. تصویر SEM و آنالیز EDS بعد از ۱۴ روز غوطه‌وری در SBF، (الف) نمونه  $A_1$  و (ب و ج) نمونه  $A_2$



شکل ۴. طیف پراش پرتو ایکس داربست‌ها بعد از ۱۴ روز غوطه‌وری در SBF

### ۳-۳- بررسی جذب آب داربست‌ها

جذب آب، به صورت میزان آبی که توسط ماده از محیط اطراف جذب می‌شود و در اصل، به دو عامل تخلخل و آب‌دوستی سطح وابسته است، تعریف می‌شود. بخشی از جذب آب ماده مربوط به آبی است که توسط تخلخل‌ها و موئینه‌های ماده از محیط جذب می‌شود، به همین دلیل است که در مقایسه با مواد متراکم، مواد متخلخل میزان جذب آب بیشتری دارند [۲۲]. مطابق نتایج جدول (۲)، میزان جذب آب در داربستی که حاوی فیبروئین ابریشم سولفون‌شده است، افزایش یافته است. علت افزایش جذب آب در نمونه  $A_2$ ، افزایش میزان آب‌دوستی سطح است که ناشی از حضور گروه‌های سولفات در فیبروئین ابریشم سولفون‌شده است [۲۰].

جدول ۲. نتایج آزمون جذب آب

کد نمونه	درصد جذب آب
$A_1$	$12/4 \pm 7$
$A_2$	$167 \pm 9$

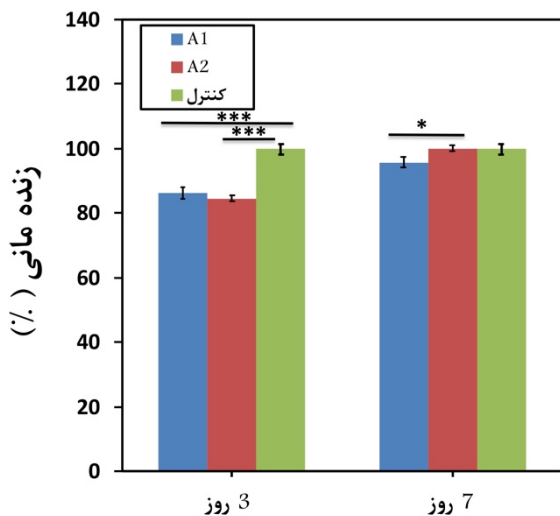
### ۳-۴- بررسی زیست‌فعالیت داربست‌ها

شکل (۳) تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از دو نمونه  $A_1$  و  $A_2$  را پس از ۱۴ روز غوطه‌وری در محلول SBF، نشان می‌دهد. همان‌طور که در شکل (۳-ب) دیده می‌شود، روی سطح الیاف در نمونه  $A_2$ ، پس از گذشت ۱۴ روز قرارگیری در محلول SBF، رسوباتی پدید آمده است. وجود اتم‌های Ca و P در رسوب، نشان می‌دهد که رسوب پدیدآمده، از ترکیبات کلسیم فسفاتی است. نسبت اتمی کلسیم به فسفر این رسوبات تقریباً  $1/86$  است که در محدوده کلسیم فسفات آپاتیتی است [۶].

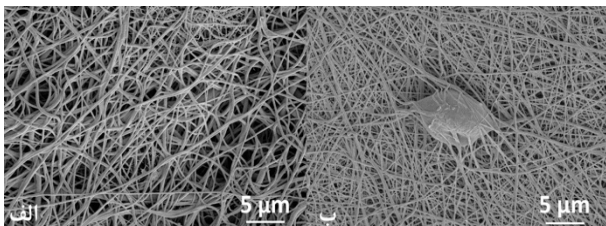
شکل (۴)، الگوی پراش پرتو ایکس الیاف پلی‌کاپرولاکتون ( $A_1$ ) و پلی‌کاپرولاکتون-فیبروئین ابریشم سولفون‌شده ( $A_2$ ) را بعد از ۱۴ روز غوطه‌وری در محلول SBF، در محدوده ۱۰ تا ۸۰ درجه، نشان می‌دهد. در نمونه  $A_1$ ، دو پیک قوی در زوایای  $21/9$  و  $24/2$  درجه وجود دارد که مربوط به صفحات (۱۰۰) و (۲۰۰) در پلی‌کاپرولاکتون هستند [۲۳]. همان‌طور که در شکل (۴) دیده می‌شود، پس از ۱۴ روز غوطه‌وری نمونه  $A_2$  در محلول SBF، از شدت پیک‌های



چسبندگی سلولی بر اثر آب‌گریزی سطح، در نتایج پژوهش‌های دیگری نیز مشاهده شده است [۲۶]. در حالی که در نمونه A<sub>2</sub>، سلول با تشکیل پاهای کاذب به خوبی روی سطح چسبیده است و دارای ریخت شناسی<sup>۱</sup> دوکی شکل شده است. چسبندگی سلولی بهتر روی نمونه A<sub>2</sub>، می‌تواند ناشی از وجود گروه SO<sub>3</sub> در فیروئین ابریشم سولفونه باشد. وجود گروه عاملی، با بار منفی، موجب جذب بیشتر پروتئین و در نتیجه چسبندگی و تکثیر بهتر سلول می‌شود [۲۸].



شکل ۵. نتایج آزمون زنده‌مانی (MTT) سلول‌های MG63 روی داربست‌ها در دو بازه زمانی (\*\*\* $p \leq 0.001$ ، \* $p \leq 0.05$ )



شکل ۶. تصویر SEM از چسبندگی سلولی روی داربست‌ها، (الف) نمونه A<sub>1</sub> و (ب) نمونه A<sub>2</sub> با بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰۰ برابر

#### ۴- نتیجه‌گیری

در این تحقیق، سعی شد با ساخت داربست نانولیفی فیروئین ابریشم سولفونه-پلی‌کاپرولاکتون، خواص زیست‌فعالی و برهم‌کنش سلولی الیاف پلی‌کاپرولاکتون بهبود یابد. نتایج طیف‌سنجی تبدیل فوریه فروسرخ، تشکیل

پژوهش‌های بسیاری که در زمینه رسوب کلسیم فسفات‌های مختلف در محلول انجام شده است، نشان می‌دهد رسوب کلسیم فسفات‌ها، طی سازوکار جوانه‌زنی شروع می‌شود و با رشد بلور ادامه می‌یابد [۱۲]. در الیاف پلی‌کاپرولاکتون (نمونه A<sub>1</sub>)، به دلیل آب‌گریزی بالا و نبودن گروه‌های عاملی مناسب برای جوانه‌زنی و رشد آپاتیت، پس از قرارگیری در محلول شبیه‌سازی شده بدن، قادر به رسوب کلسیم فسفات نیست. در حالی که با افزودن فیروئین ابریشم سولفونه (نمونه A<sub>2</sub>)، رسوبات آپاتیته روی سطح الیاف ایجاد می‌شود که به دلیل بار منفی گروه‌های سولفونات و سولفات در فیروئین ابریشم است. از آنجاکه محلول SBF حاوی غلظت‌های بالاتری از یون‌های کلسیم و فسفات است، یون‌های کلسیم از محلول جذب گروه‌های بار منفی سولفوناتی در فیروئین ابریشم می‌شوند و بنابراین، سطح دارای بار مثبت می‌شود. با گذشت زمان یون‌های فسفات محلول که بار منفی دارند، جذب سطح الیاف با بار مثبت می‌شوند و جوانه‌های کلسیم فسفات شکل می‌گیرند. با افزایش زمان غوطه‌وری، جوانه‌های ایجاد شده طی جوانه‌زنی ثانویه، تجمع می‌یابند و اجزاء بزرگ‌تری را ایجاد می‌کنند. با گذشت زمان، این اجزاء به هم می‌پیوندند و در نهایت، لایه کلسیم، سطح الیاف را می‌پوشاند [۲۵].

#### ۳-۵- بررسی سلولی

زنده‌مانی سلول‌های MG63 روی داربست‌ها، با کشت سلول در دو دوره زمانی ۳ و ۷ روز، به وسیله آزمون MTT ارزیابی شد. مطابق شکل ۵، درصد زنده‌مانی سلول‌ها، برای هر دو نمونه در روز سوم، بالای ۸۴ درصد است. این امر نشان‌دهنده زیست‌سازگاری و عدم سمیت سلولی است. با افزایش زمان، میزان تکثیر سلولی افزایش می‌یابد، به طوری که در نمونه A<sub>2</sub> مشاهده می‌شود که درصد زنده‌مانی سلولی افزایش یافته و به میزان نمونه کنترل رسیده است.

چسبندگی سلول‌های MG63 روی سطح داربست‌ها، پس از تصویربرداری با میکروسکوپ الکترونی روبشی، در شکل (۶) نشان داده شده است. همان‌طور که در شکل دیده می‌شود، داربست A<sub>1</sub> فاقد سلول است. علت این امر می‌تواند آب‌گریزی بالای سطح داربست پلی‌کاپرولاکتون باشد. عدم

<sup>1</sup> Morphology



- Engineering Journal*, Vol. 360, (2019), 519-530. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.11.176>
9. Gao, X., Song, J., Ji, P., Zhang, X., Li, X., Xu, X., Wang, M., Zhang, S., Deng, Y., Deng, F., Wei, S. "Polydopamine-templated hydroxyapatite reinforced polycaprolactone composite nanofibers with enhanced cytocompatibility and osteogenesis for bone tissue engineering", *ACS Applied Materials & Interfaces*, Vol. 8, (2016), 3499-3515. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b12413>
  10. Tohidloo, M., Shafiei, S., Shiralipour, F., "Preparation and evaluation of polycaprolactone amine functionalized carbon nanotube electrospun nanocomposite scaffold containing mesenchymal stem cells for use in hard tissue engineering", *Journal of Advanced Materials and Technologies (JAMT)*, Vol. 8, (2020), 19-30. <https://doi.org/10.30501/JAMT.2020.93226>
  11. Olivveira, A. L., Sun, L., Kim, H. J., Hu, X., Rice, W., Kluge, J., Kaplan, D. L., "Aligned silk-based 3-D architectures for contact guidance in tissue engineering", *Acta Biomaterialia*, Vol. 8, No. 4, (2012), 1530-1542. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.12.015>
  12. Nourmohammadi, J., Roshanfar, F., Farokhi, M., Nazarpak, M. H., "Silk fibroin/kappa-carrageenan composite scaffolds with enhanced biomimetic mineralization for bone regeneration applications", *Material Science and Engineering: C*, Vol. 76, (2017), 951-958. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.166>
  13. Venkatasana, J., Pallella, R., Bhatnagar, I., Kim, S. K., "Citosan-amylopectin/hydroxyapatite and chitosan-chondroitin sulphat/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue", *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 51, No. 5, (2012), 1033-1042. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.08.020>
  14. Gumusderelioglu, M., Aday, S., "Heparin-functionalized chitosan scaffolds for bone tissue engineering", *Carbohydrate Research*, Vol. 346, No. 5, (2011), 606-613. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2010.12.007>
  15. Singh, R., Eitler, D., Morelle, R., Friedrich, R. P., Dietel, B., Alexiou, C., Cicha, I., "Optimization of cell seeding on the electrospun PCL-silk fibroin scaffolds", *European Polymer Journal*, Vol. 134, (2020), 109838. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.109838>
  16. Liu, X., Xu, W., Zhang, C., Liu, H., Fang, J., "Homogeneous sulfation of silk fibroin in an ionic liquid", *Materials Letters*, Vol. 143, (2015), 302-304. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2014.12.140>
  17. Meechaisue, C., Wutticharoenmongkol, P., "Preparation of electrospun silk fibroin fiber mats as bone scaffolds: A preliminary study", *Biomedical Materials*, Vol. 2, No. 3, (2007), 181-188.
  18. Moaddab, M., Nourmohammadi, J., Rezayan, A. H., "Bioactive composite scaffolds of carboxymethyl chitosan-silk fibroin containing chitosan nanoparticles for sustained release of ascorbic acid", *European Polymer Journal*, Vol. 103, (2018), 40-50. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2018.03.032>
  19. Nourmohammadi, J., Ghaee, A., Hosseini Livali, S. H., "Preparation and characterization of bioactive composite scaffolds from polycaprolactone nanofibers-chitosan-oxidized starch for bone regeneration", *Carbohydrate Polymers*, Vol. 138, (2016), 172-179. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.11.055>
  20. Taddei, P., Arosio, C., Monti, P., Tsukada, M., Arai, T., Freddi, G., "Chemical and physical properties of sulfated silk fabrics", *Biomacromolecules*, Vol. 8, No. 4, (2007), 1200-1208. <https://doi.org/10.1021/bm061017y>
  21. Tamada, Y., "Sulfation of silk fibroin by sulfuric acid and anticoagulant activity", *Journal of Applied Polymer Science*, Vol. 87, No. 14, (2003), 2377-2383. <https://doi.org/10.1002/app.12022>
  22. Sultana, N., Khan, T. H., "Water absorption and diffusion characteristics of nanohydroxyapatite (nHA) and poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate-) based composite tissue engineering scaffolds ans nanoporous thin films", *Journal of Nanomaterials*, (2013). <https://doi.org/10.1155/2013/479109>
  23. Balu, R., Kumar, T. S., Ramalingam, M., Ramakrishna, S., "Electrospun polycaprolactone/poly (1, 4-butylene adipate-co-polycaprolactam) blends: Potential biodegradable scaffold for bone tissue regeneration", *Journal of Biomaterials and Tissue*

گروه‌های سولفات‌ی و سولفوناتی را پس از واکنش فیبروئین ابریشم با کلروسولفونیک اسید، نشان داد. مطابق نتایج به‌دست‌آمده، افزودن فیبروئین ابریشم سولفون‌شده به پلی‌کاپرولاکتون، به کاهش قطر الیاف از  $23 \pm 244$  نانومتر به  $138 \pm 12$  نانومتر منجر شد. همچنین، داربست‌های الکترورسی‌شده از الیاف فیبروئین ابریشم سولفون‌- پلی‌کاپرولاکتون، سبب جوانه‌زنی و رشد بلورهای آپاتیت، بهبود جذب آب و تکثیر و چسبندگی سلولی در مقایسه با داربست‌های لیفی‌شکل پلی‌کاپرولاکتون ساده شد. به‌طور کلی، نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش نشان داد که کامپوزیت نانولیفی از فیبروئین ابریشم سولفون‌- پلی‌کاپرولاکتون می‌تواند داربستی مناسب برای اهداف مهندسی بافت استخوان باشد.

## ۵- سپاسگزاری

نویسندگان لازم می‌دانند از دانشگاه تهران درخصوص همکاری و حمایت از انجام این پژوهش، قدرانی و تشکر نمایند.

## مراجع

1. Iron, R., Karbasi, S., Mehdikhani, M., Semnani, D., "Preparation of nanocomposite fibrous scaffolds of Poly-3-Hydroxybutyrate/bioactive glass by electrospinning method for bone tissue engineering", *Journal of Advanced Materials and Technologies (JAMT)*, Vol. 3, (2015), 11-19. <https://doi.org/10.30501/JAMT.2635.70278>
2. Orciani, M., Fini, M., Di Primio, R., Mattioli-Belmonte, M., "Biofabrication and bone tissue regeneration: cell source, approaches, and challenges", *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, Vol. 5, (2017), 17. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2017.00017>
3. Gentili, R., Cancedda, R., "Cartilage and bone extracellular matrix", *Current Pharmaceutical Design*, Vol. 5, (2009), 1334-1348. <https://doi.org/10.2174/138161209787846739>
4. Haug, Z. M., Zhang, Y. Z., "A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites", *Composites Science and Technology*, Vol. 63, No. 15, (2003), 2223-2253. [https://doi.org/10.1016/S0266-3538\(03\)00178-7](https://doi.org/10.1016/S0266-3538(03)00178-7)
5. Haider, A., Haider, S., Kang, I. K., "A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology", *Arabian Journal of Chemistry*, Vol. 11, No. 8, (2018), 1165-1188. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.11.015>
6. Hadisi, Z., Nourmohammadi, J., Mohammadi, J., "Composite for porous starch-silk fibroin nanofiber-calcium phosphate for bone regeneration", *Ceramics International*, Vol. 41, No. 9, (2015), 10745-10754. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2015.05.010>
7. Koons, G. L., Diba, M., Mikos, A. G., "Materials design for bone-tissue engineering", *Nature Reviews Materials*, Vol. 5, (2020), 584-603. <https://doi.org/10.1038/s41578-020-0204-2>
8. Jeon, H. J., Lee, M., Yun, S., "Fabrication and characterization of 3D-printed biocomposite scaffolds based on PCL and silanated silica particles for bone tissue regeneration", *Chemical*

- Chemistry*, Vol. 8, No. 4, (2008), 270-280. <https://doi.org/10.2174/156802608783790901>
27. Xion, S., Zhang, X., Wu, Y., Wang, Q, Sun, H., Ouyang, H., "A gelatin-sulfonated silk composite scaffold based on 3D printing technology enhances skin regeneration by simulating epidermal growth and dermal neovascularization", *Scientific Reports*, Vol. 7, No. 1, (2017), 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04149-y>
28. Liu, X., Zhou, G., Fan, Y., "Electrospun sulfated silk fibroin nanofibrous scaffolds for vascular tissue engineering", *Biomaterials*, Vol. 32, No. 15, (2011), 3784-3793. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.02.002>
- Engineering*, Vol. 1, (2011), 30-39. <https://doi.org/10.1166/jbt.2011.1004>
24. Turkkan, S., Pazarcevirten, A. E., Keshin, D., "Nanosized CaP-silk fibroin-PCL-PEG-PCL/PCL based bilayer membranes for guided bone regeneration", *Materials Science and Engineering: C*, Vol. 80, (2017), 484-493. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.06.016>
25. Shahriarpanah, S., Nourmohammadi, J., Amooabediny, G., "Fabrication and characterization of carboxylated starch-chitosan bioactive scaffold for bone regeneration", *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 93, (2016), 1069-1078. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.09.045>
26. Tang, L., Thevenot, P., Hu, W., "Surface chemistry influences implant biocompatibility", *Current Topics in Medicinal*