



The Effect of Adding Different Percentages of γ -Glycidoxypropyltrimethoxysilane Cross-linker on the Properties of Freeze-dried Gelatin/Chitosan Scaffolds upon Introducing an Optimum Condition to Cross-link the Chitosan/Gelatin Scaffolds in Bone Tissue Engineering

Fatemeh Banafatizadeh ¹, Ali Zamanian ^{2*}

¹ Ph. D. Candidate, Biomaterials Research Group, Department of Nanotechnology and Advanced Materials, Materials and Energy Research Center, Karaj, Iran

² Professor, Biomaterials Research Group, Department of Nanotechnology and Advanced Materials, Materials and Energy Research Center, Karaj, Iran

*Corresponding Author's Email: a-zamanian@merc.ac.ir (A. Zamanian)

Paper History:

Received: 2022-07-05

Revised in revised form: 2022-09-10

Scientific Accepted: 2022-09-14

Keywords:

Gelatin,
Chitosan,
Cross-linker,
Bone Tissue Engineering

Abstract

Use of γ -glycidoxypropyltrimethoxysilane (GPTMS) enhances the stability and strength of hydrogels and improves the bioactivity and cellular performance of the scaffolds in bone applications. Given that one of the leading factors that affects the properties of the scaffold is the percentage of the cross-linking agent, chitosan and gelatin scaffolds with different percentages of GPTMS were prepared and evaluated through freeze-drying method. The results from Scanning Electron Microscope (SEM) confirmed the achievement of porous scaffolds with open pores and upon increasing the amount of cross-linking agent, the size of the pores reached approximately 290 microns. The results of the infrared spectrum showed the interaction among the polymers and process of cross-linking with the formation of silane groups. In this study, upon increasing the amount of the transverse bonding agent, the contact angle decreased, the optimal contact angle of the sample with 75 (weight percent) GPTMS reached 60.7 ± 3.5 degrees, and the percentages of both swelling and degradation ultimately decreased. It should be noted that the mechanical properties were improved by adding GPTMS up to 1590 ± 267 kPa. According to the findings of this study, application of GPTMS led to an enhancement in the bioactivity properties and deposition of the hydroxyapatite layer, and the X-ray diffraction pattern confirmed this claim. The obtained results support the hypothesis that gelatin-chitosan scaffolds with 75 (wt %) GPTMS seem to be the best samples for use in bone tissue engineering.



<https://doi.org/10.30501/jamt.2022.347635.1229>

URL: https://www.jamt.ir/article_156933.html

1. INTRODUCTION

Given that large bone injuries cannot be repaired by themselves, they require external interventions. Since use of grafts is associated with limitations [1], tissue engineering has been introduced as a new method. Material selection is one of the most influential parameters in scaffold properties. Chitosan is a hydrophilic, biocompatible, biodegradable polymer with antibacterial properties [2]. Gelatin is also a biocompatible, biodegradable, hydrophilic, and economical natural polymer that can dissolve in aqueous solutions [3]. Glycidoxypropyltrimethoxysilane (GPTMS) is a suitable crosslinking agent for chitosan-gelatin [4]. Tonda-Toro et al. [5] used GPTMS to crosslink a gelatin freeze-cast scaffold, which enhanced the stability of the scaffolds in an aqueous environment as well as their mechanical and cellular properties. The weight percentage is also an important factor in the application of reticulating agents.

In this study, chitosan/gelatin scaffolds were fabricated by freeze-drying and cross-linked using

different weight ratios of GPTMS. The effect of adding different weight ratios of the cross-linking agent on different properties of the scaffold was evaluated through different in-vitro tests, and the scaffold with the best weight percentage of the cross-linking agent optimized for bone applications was identified.

2. MATERIALS AND METHODS

To prepare a 2 % (w/v) chitosan/gelatin solution, chitosan (3 gr) was added to the acetic acid solution and stirred at the temperature of 35 °C. Then, gelatin (3 gr) was added to the solution. In order to crosslink the solutions, different amounts (30, 40, 50, 75, and 150 % (w/v)) of GPTMS were added to 30 ml of the prepared chitosan/gelatin solution. The samples are called the control, GP30, GP40, GP50, GP75, and GP150, respectively, based on the GPTMS concentrations.

2.1. In-vitro tests

In order to observe the morphology of the scaffolds, a Scanning Electron Microscope (SEM, Vega, Czech

Please cite this article as: Banafatizadeh, F., Zamanian, A., "The effect of adding different percentages of γ -glycidoxypropyltrimethoxysilane cross-linker on the properties of freeze-dried gelatin/chitosan scaffolds upon introducing an optimum condition to cross-link the chitosan/gelatin scaffolds in bone tissue engineering", *Journal of Advanced Materials and Technologies (JAMT)*, Vol. 12, No. 2, (2023), 39-54. (<https://doi.org/10.30501/jamt.2022.347635.1229>).



Republic) was used. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) was taken from the prepared samples. Then, the contact angle, swelling, and biodegradation tests were taken from the scaffolds to evaluate their ability to interact with water. The mechanical properties of the scaffolds were tested. In order to compare the ability of the GPTMS crosslinked scaffolds to support apatite deposition, they were immersed in 50 mL of Simulated Body Solution (SBF) (pH of 7.3). The results were presented as mean \pm standard deviation.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Morphology observations

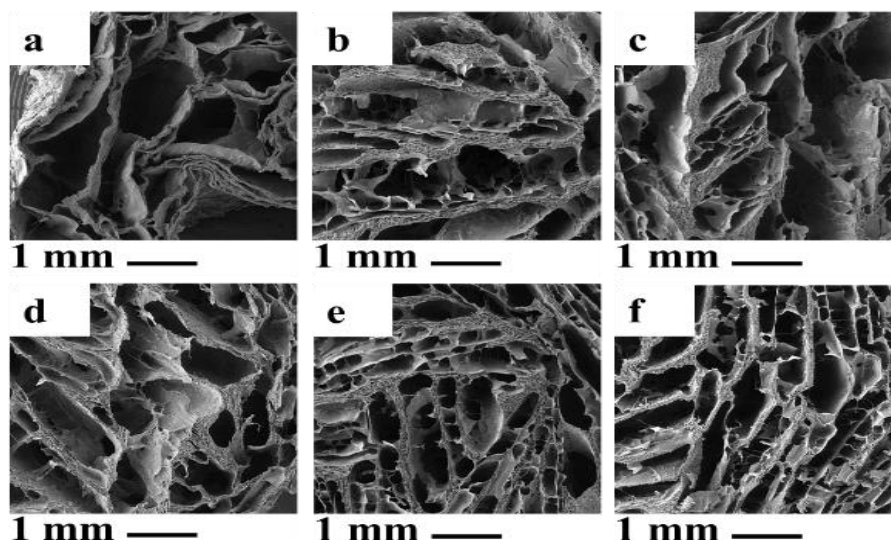
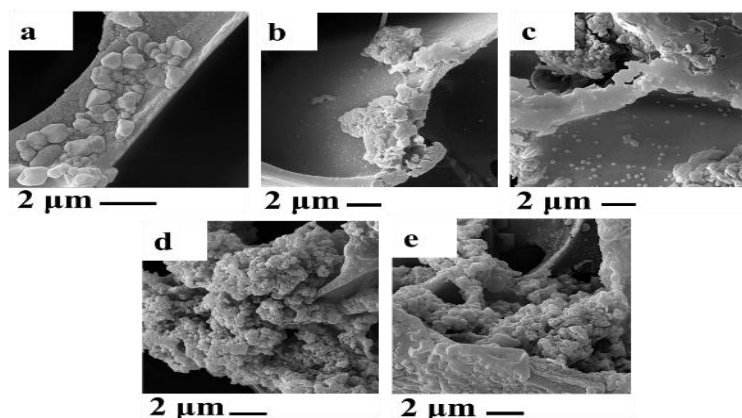


Figure 1. SEM images of GP30, GP40, GP50, GP75, and GP150 samples (a-g) and control sample (f)

The bioactivity and apatite deposition ability of the scaffolds containing GPTMS were investigated through incubation of scaffolds in the SBF solution for 14 days (Figure 2 (a-e)). Apatite is formed by the formation of the spherical mineral particles on the inner and outer walls of the pores of scaffolds. Followed by comparing the SEM images, it was concluded that the amount of the apatite particles increased significantly with an increase in the GPTMS content of the scaffold. This can be attributed to the reduction in the surface energy for the nucleation of apatite minerals on the surface of the scaffolds due to the GPTMS crosslinking agent [7]. In fact, the interaction between the Si-O-Si and Si-OH

The porous structure, with an appropriate pore size, is very effective in cell adhesion and proliferation, nutrient, oxygen, and cellular waste material transport [6]. Figures 1 (a-g) demonstrate the SEM images. The sample without the cross-linking agent is considered the control sample. According to the images, the scaffolds have a highly porous structure with open pores, which is essential for cell growth and adhesion. The scaffold of the control sample, with a heterogeneous structure, has a larger and rounder pore size than that of other samples. Upon increasing the percentage of the cross-linking agent, the structure becomes more regular than before as a result of which, the shape of the pores changes and becomes elongated.

groups in GPTMS and calcium ions, due to the change of surface charge, creates nucleation sites with the positive absorption of calcium ions [8]. In order to confirm the formation of apatite on the samples, X-ray diffraction spectra were also taken from them (Figure 2(f)). The XRD pattern of hydroxyapatite was according to JCPDS card #0432-09 with some peaks at 2θ s of 31.75, 32.67, 46.03, 56.13, 65.45, and 76.4° [9] that confirmed the formation of apatite on the samples. The results demonstrated that the amount of the deposited layer increased with an increase in the GPTMS percentage.



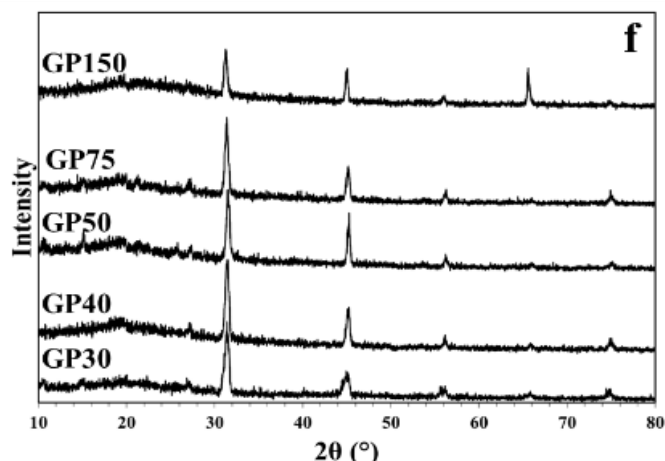


Figure 2. SEM images of hydroxyapatite deposited on the surface of GP30, GP40, GP50, GP75, and GP150 scaffolds (a-e), and X-ray diffraction patterns of the deposited hydroxyapatite (f)

4. CONCLUSION

Optimizing the amount of the used GPTMS is one of the most important parameters in the design of gelatin/chitosan scaffolds for bone tissue engineering applications. In this study, various weight percentages of GPTMS cross-linking agents were used for this purpose, and the scaffolds were subjected to various in-vitro tests. The increase in GPTMS reduced the pore sizes that in turn made the morphology of the pores more homogeneous and more longitudinal. With an increase in GPTMS, the mechanical and bioactive properties of the scaffolds were improved while the wettability was reduced. According to the results, the GP75 sample was introduced as the best sample for bone applications, which needs further investigation in the future.

5. ACKNOWLEDGEMENT

The authors would like to express their gratitude to the Materials and Energy Research Center, Karaj, Alborz, Iran for their cooperation and support.

REFERENCES

- Kim, H. D., Hong, X., An, Y. H., Park, M. J., Kim, D. G., Greene, A. K., Padwa, B. L., Hwang, N. S., Lin, R. Z., Melero-Martin, J. M., "A biphasic osteovascular biomimetic scaffold for rapid and self-sustained endochondral ossification", *Advanced Healthcare Materials*, Vol. 10, No. 13, (2021), 2100070. <https://doi.org/10.1002/adhm.202100070>
- Sahranavard, M., Zamanian, A., Ghorbani, F., Shahrezaee, M. H., "A critical review on three dimensional-printed chitosan hydrogels for development of tissue engineering", *Bioprinting*, Vol. 17, (2020), e00063. <https://doi.org/10.1016/j.bprint.2019.e00063>
- Tang, G., Tan, Z., Zeng, W., Wang, X., Shi, C., Liu, Y., He, H., Ceng, R., Ye, X., "Recent advances of chitosan-based injectable hydrogels for bone and dental tissue regeneration", *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, Vol. 8, (2020), 1-15. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.587658>
- EzEldeen, M., Loos, J., Mousavi Nejad, Z., Cristaldi, M., Murgia, D., Braem, A., Jacobs, R., "A. Materials, O. Sciences, 3d-printing-assisted fabrication of chitosan scaffolds from different sources and cross-linkers for dental tissue engineering", *European Cells and Materials*, Vol. 40, (2021), 485-501. <https://doi.org/10.22203/eCM.v041a31>
- Tonda-Turo, C., Gentile, P., Saracino, S., Chiono, V., Nandagiri, V. K., Muzio, G., Canuto, R. A., Ciardelli, G., "Comparative analysis of gelatin scaffolds crosslinked by genipin and silane coupling agent", *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 49, No. 4, (2011), 700-706. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.07.002>
- Dhawan, A., Kennedy, P. M., Rizk, E. B., Ozbolat, I. T., "Three-dimensional bioprinting for bone and cartilage restoration in orthopaedic surgery", *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, Vol. 27, No. 5, (2019), E215-E226. <https://doi.org/10.5435/JAAOS-D-17-00632>
- Madhumathi, K., Binulal, N. S., Nagahama, H., Tamura, H., Shalumon, K. T., Selvamurugan, N., Nair, S. V., Jayakumar, R., Canuto, R. A., Ciardelli, G., "Preparation and characterization of novel β -chitin-hydroxyapatite composite membranes for tissue engineering applications", *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 44, No. 1, (2009), 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2008.09.013>
- Rasti, M., Hesaraki, S., Nezafati, N., "Effects of GPTMS concentration and powder to liquid ratio on the flowability and biodegradation behaviors of 45S5 bioglass/tragacanth bioactive composite pastes", *Journal of Applied Polymer Science*, Vol. 136, No. 22, (2019), 17-22. <https://doi.org/10.1002/app.47604>
- Roh, H. S., Lee, C. M., Hwang, Y. H., Kook, M. S., Yang, S. W., Lee, D., Kim, B. H., "Addition of MgO nanoparticles and plasma surface treatment of three-dimensional printed polycaprolactone/hydroxyapatite scaffolds for improving bone regeneration", *Materials Science and Engineering C*, Vol. 74, (2017), 525-535. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.12.054>



مقاله کامل پژوهشی

تأثیر افزودن عامل شبکه‌ای‌کننده گلیسیدوکسی پروپیل تری‌متوکسی سیلان در خواص داربست‌های ژلاتین/کیتوسان تهیه‌شده به روش خشکاندن انجمادی و معرفی شرایط بهینه شبکه‌ای کردن داربست‌های کیتوسان/ژلاتین برای کاربردهای مهندسی بافت استخوان

فاطمه بناقتی‌زاده^۱، علی زمانیان^{۲*}^۱ دانشجوی دکتری، گروه بیومواد، پژوهشکده فناوری نانو و مواد پیشرفته، پژوهشگاه مواد و انرژی، کرج، ایران^۲ استاد، گروه بیومواد، پژوهشکده فناوری نانو و مواد پیشرفته، پژوهشگاه مواد و انرژی، کرج، ایران

تاریخچه مقاله:

ثبت اولیه: ۱۴۰۱/۰۴/۱۴

دریافت نسخه اصلاح‌شده: ۱۴۰۱/۰۶/۱۹

پذیرش علمی: ۱۴۰۱/۰۶/۲۳

کلیدواژه‌ها:

ژلاتین،

کیتوسان،

عامل شبکه‌ای‌کننده،

مهندسی بافت استخوان

چکیده گلیسیدوکسی پروپیل تری‌متوکسی سیلان (GPTMS)، افزون بر بهبود عملکرد زیست‌فعال و سلولی داربست‌ها، به افزایش پایداری و استحکام هیدروژل‌ها در کاربردهای استخوانی منجر می‌شود. درصد عامل شبکه‌ای‌کننده افزوده‌شده یکی از عوامل مؤثر در خواص داربست است. به همین دلیل، در این مطالعه، داربست‌های کیتوسان و ژلاتین با درصد‌های وزنی گوناگون GPTMS به روش خشکاندن انجمادی آماده و ارزیابی شدند. نتایج میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) نشانگر دستیابی به داربست‌های متخلخل است که اندازه تخلخل‌ها، با افزایش مقدار عامل شبکه‌ای‌کننده، به حدود ۲۹۰ میکرون رسیدند. نتایج طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه نشان داد که پلیمرها و فرایند شبکه‌ای‌شدن با تشکیل گروه‌های سیلان به‌هم‌کنش دارند. همچنین، زاویه تماس با افزایش مقدار عامل شبکه‌ای‌کننده کاهش یافت و نمونه دارای ۷۵ درصد وزنی GPTMS دارای زاویه تماس مطلوب 30.7 ± 3.5 درجه بود و درصد تورم و تخریب کاهش یافت. با این حال، خواص مکانیکی با افزودن GPTMS تا 26.7 ± 1.59 کیلوپاسکال افزایش یافت. همچنین، GPTMS به افزایش خواص زیست‌فعال و رسوب لایه هیدروکسی آپاتیت منجر شد که الگوی تفرق پرتو ایکس نیز این ادعا را تأیید می‌کند. به نظر می‌رسد که داربست ژلاتین-کیتوسان، با ۷۵ درصد وزنی GPTMS، بهترین نمونه برای استفاده در مهندسی بافت استخوان است.



<https://doi.org/10.30501/jamt.2022.347635.1229> URL: https://www.jamt.ir/article_156933.html

۱- مقدمه

جایگزین‌های استخوانی استفاده می‌شوند که این‌ها نیز با محدودیت‌هایی مانند انتقال بیماری و پس‌زده شدن توسط سیستم ایمنی بدن مواجه هستند [۴-۲]. بنابراین، نیاز روزافزون به جانشین‌های استخوانی، دانشمندان را به سمت ارائه روش‌های نوین برای ساخت این جایگزین‌ها سوق می‌دهد [۵]. امروزه، مهندسی بافت به‌منزله روشی نوین برای ایجاد داربست‌های جایگزین استخوان معرفی شده است.

موفقیت داربست‌های مهندسی‌شده به کنترل به‌هم‌کنش سلول‌ها و داربست بستگی دارد. پس طراحی و خواص داربست

آسیب‌های بزرگ استخوانی خودبه‌خود قابل ترمیم نیستند و به مداخلات خارجی نیاز دارند. تخمین زده شده است که سالانه بیش از ۴۰۰ تا ۶۰۰ هزار عمل جراحی پیوند استخوانی به‌ترتیب در اروپا و آمریکا انجام می‌شود [۱]. امروزه، استفاده از پیوندهای خود شخص به‌منزله استاندارد طلایی جایگزین‌های استخوانی پیشنهاد می‌شود. با این حال، با محدودیت‌هایی مانند نیاز به عمل جراحی ثانویه و محدودیت محل برداشت همراه هستند. پیوندهای مشتق‌شده از اجساد و حیوانات نیز به‌منزله

*عهده دار مکاتبات: علی زمانیان

نشانی: ایران، کرج، پژوهشگاه مواد و انرژی، پژوهشکده فناوری نانو و مواد پیشرفته، گروه بیومواد، تلفن: ۰۲۶-۳۶۲۸۰۰۴۰، دورنگار: ۰۲۶-۳۶۲۰۱۸۸۸

پیام‌نگار: a-zamaniaan@merc.ac.ir

پیش از این نشان داده شد که گلو تارالدئید کمی سمیت از خود نشان می‌دهد [۱۷] و درعین حال ترکیب‌های سیلان ایجاد شده بر اثر استفاده از GPTMS، بیشتر از جنیپین، به بهبود رسوب آپاتیت منجر می‌شود و ترمیم استخوان را بهبود می‌بخشد [۱۸]. در نتیجه، در کاربردهای استخوانی استفاده از GPTMS پیشنهاد می‌شود. درصد وزنی به کار برده شده یکی دیگر از موارد مهم در استفاده از عامل‌های شبکه‌ای کننده است. در بررسی‌های گوناگون از درصد‌های وزنی گوناگون GPTMS استفاده شده است. برای مثال، در مطالعه‌ای، سهرابی^۷ و همکاران [۱۹] از GPTMS به منظور بهبود خواص مکانیکی و ایجاد شبکه در ترکیب شیشه زیست‌فعال، کیتوسان و ژلاتین در کاربرد مهندسی بافت استخوانی استفاده کردند. بدین منظور، از دو درصد وزنی متفاوت ۱۰ و ۲۰ درصد GPTMS استفاده شد و نتایج نشان داد که نمونه دارای ۲۰ درصد وزنی GPTMS استحکام فشاری بیشتری دارد. همچنین، این داربست‌ها از زنده‌مانی سلول‌های بنیادی مزانشیمال انسانی، پیش‌سازهای استئوبلاستی و سلول‌های اندوتلیال حمایت کردند و خاصیت آنتی‌باکتریایی در برابر استافیلوکوکوس آئوروس و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس داشتند. بنابراین، نتایج نشان دادند که افزایش درصد وزنی عامل شبکه‌کننده GPTMS به بهبود خواص داربست منجر می‌شود. همچنین، در بررسی دیگری لیو^۸ و همکاران [۱۵] از درصد‌های وزنی گوناگون ۵-۵۰ درصد وزنی GPTMS به منظور شبکه‌ای کردن داربست‌های سیلیکا - کیتوسان استفاده کردند. نتایج نشان داد که افزایش درصد وزنی GPTMS به بهبود پایداری ساختار منجر می‌شود. بنابراین، تغییر درصد وزنی عامل شبکه‌کننده می‌تواند در خواص داربست مؤثر باشد. پس، با توجه به مطالعات پیشین، در این بررسی از GPTMS به‌منزله عامل شبکه‌ای‌کننده داربست‌های کیتوسان/ژلاتین استفاده شد و درصد‌های وزنی ۳۰، ۴۰ و ۵۰ درصد وزنی عامل اتصال‌دهنده و نمونه بدون شبکه‌کننده ارزیابی شدند. درصد‌های مورد استفاده براساس مطالعات پیشین انتخاب شدند [۲۰-۱۸]، اما ذکر نشد تا چه درصدی شاهد بهبود خواص داربست هستیم و آیا با افزایش درصد وزنی، خواص دیگر داربست تحت تأثیر قرار

در بهبود عملکرد و موفقیت داربست در فرایند ترمیم تأثیرگذار هستند [۶]. انتخاب نوع مواد استفاده شده یکی از پارامترهای تأثیرگذار در خواص داربست است. کیتوسان پلیمری آب‌دوست، زیست‌سازگار، زیست‌تخریب‌پذیر با خواص آنتی‌باکتریایی است [۷-۹]. همچنین، ژلاتین یک پلیمر طبیعی زیست‌سازگار، زیست‌تخریب‌پذیر، آب‌دوست و مقرون‌به‌صرفه است که قابلیت انحلال در محلول‌های آبی را دارد [۱۰ و ۱۱]. این پلیمر طبیعی از طریق دناتور شدن^۱ گرمایی کلاژن پوست و استخوان حیوانات به دست می‌آید [۱۲]. از ترکیب ژلاتین و کیتوسان به‌وفور در مهندسی بافت استخوانی استفاده می‌شود. اُفکلی^۲ و همکاران [۱۳] نوعی کرایوزل ژلاتین/کیتوسان را به‌منظور استفاده در مهندسی بافت استخوان پیشنهاد کردند. آن‌ها از پلیمرهای طبیعی کیتوسان و ژلاتین به‌دلیل خواص منحصربه‌فردشان همچون زیست‌سازگاری، زیست‌تخریب‌پذیری، عدم‌نیاز به عمل جراحی ثانویه برای خروج جایگزین و عدم‌نیاز به حلال‌های سمی استفاده کردند. اگرچه ژلاتین و کیتوسان، پتانسیل بالقوه‌ای به‌منزله جایگزین استخوانی دارند، اما به‌منظور افزایش بهره‌وری در مهندسی بافت استخوان، بهتر است یک ماده زیست‌فعال به آن افزوده شود. گلیسیدوکسی پروپیل تری‌متوکسی سیلان^۳ (GPTMS) عامل شبکه‌ای‌کننده مناسبی برای کیتوسان - ژلاتین است که شامل گروه‌های اپوکسی و متوکسی سیلان است [۱۴]. گروه‌های Si-O-Si و Si-OH مشتق شده از GPTMS مکان‌های مناسبی را برای اتصال سلول و تکثیر سلول فراهم می‌کنند که بر اهمیت یون‌های سیلیکات در ارتقای تمایز سلول تأکید می‌کنند [۱۵]. توندا-تورو^۴ و همکاران [۱۶] از GPTMS و جنیپین^۵ به‌منظور شبکه‌ای کردن داربست ریخته‌گری انجمادی ژلاتین استفاده کردند. شبکه‌ای شدن ژلاتین با جنیپین و GPTMS باعث افزایش پایداری داربست‌ها در محیط آبی و افزایش خواص مکانیکی می‌شود. هر دو داربست شبکه‌ای شده از چسبندگی و تکثیر سلول استئوبلاست MG-63 پشتیبانی می‌کنند. اگرچه عامل‌های شبکه‌ای‌کننده متفاوتی افزون بر GPTMS برای شبکه‌ای کردن ژلاتین و کیتوسان مانند جنیپین و گلو تارالدئید^۶ وجود دارند.

⁵ Genipin⁶ Glutaraldehyde⁷ Sohrabi⁸ Liu¹ Denaturation² Ofkeli³ Glycidoxypropyltrimethoxysilane⁴ Tonda-Turo

به‌منظور شبکه‌کردن محلول‌ها، مقادیر درصد وزنی (۳۰، ۴۰، ۵۰، ۷۵ و ۱۵۰) از GPTMS به ۳۰ میلی‌لیتر محلول کیتوسان/ژلاتین آماده‌شده افزوده شد. محلول به‌مدت یک و نیم ساعت روی همزن در دمای اتاق هم خورد تا هموژن شود. سپس، داربست‌های حاوی عامل شبکه‌ای‌کننده یا بدون آن به قالب‌های آلومینیمی با قطر یک میلی‌متر و ارتفاع ۱۷۰ میلی‌متر منتقل شدند و به‌مدت ۲۴ ساعت در فریزر با دمای ۲۰- درجه سلسیوس یخ زدند. سپس، فرایند خشک‌کردن انجمادی به‌کمک خشک‌کن انجمادی (پیش‌تاز، ایران) در ۰/۵ تور در دمای ۵۸- درجه سلسیوس به‌مدت ۴۸ ساعت انجام شد. نمونه‌ها مطابق جدول ۱ نام‌گذاری شدند.

جدول ۱. کد ترکیبات و شرایط آماده‌سازی نمونه‌ها

درصد وزنی عامل شبکه‌ای‌کننده به کل محلول	ترکیبات	نمونه
۰	۲ درصد وزنی کیتوسان/ژلاتین	کنترل
۳۰		GP30
۴۰		GP40
۵۰		GP50
۷۵		GP75
۱۵۰		GP150

۲-۳-۲- آزمون‌ها

۲-۳-۲-۱- مشاهدات ریخت‌شناسی و اندازه تخلخل

به‌منظور مشاهده ریخت‌شناسی داربست‌ها از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM, Vega, Czech Republic) استفاده شد. بدین‌منظور، سطح همه نمونه‌ها با لایه نازکی از طلا پوشانده شد و سپس تصاویر از نمونه‌ها در ولتاژ ۲۰ کیلوولت در بزرگ‌نمایی‌های متفاوت گرفته شد. ارزیابی اندازه و درصد تخلخل‌ها به‌کمک تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی و با استفاده از نرم‌افزار Image J انجام شد. در این بررسی، از هر نمونه، ۵ تصویر ارزیابی شد و اندازه و درصد تخلخل به‌صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش شد.

۲-۳-۲-۲- طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه

می‌گیرند یا نه؟ بنابراین، در درصد‌های بالاتر GPTMS، ۷ و ۱۵۰ درصد وزنی نیز ارزیابی شدند. در این مطالعه، داربست‌های کیتوسان/ژلاتین به روش خشکاندن انجمادی ساخته شدند و با استفاده از نسبت‌های وزنی گوناگون GPTMS شبکه‌ای شدند. تأثیر افزودن نسبت‌های وزنی گوناگون عامل شبکه‌ای‌کننده در خواص متفاوت داربست با آزمون‌های گوناگون درون آزمایشگاهی ارزیابی شد و بهترین داربست با درصد وزنی عامل شبکه‌ای‌کننده بهینه‌شده برای کاربردهای استخوانی معرفی شد.

۲- روش تحقیق

۲-۱- مواد استفاده‌شده

در این تحقیق، از کیتوسان (۴۴۸۸۷۷)، وزن مولکولی متوسط = ۳۱۰-۱۹۰ کیلودالتون، ۷۵-۸۵ درصد) شرکت سیگما و ژلاتین (۱۰۴۰۷۰)، وزن مولکولی = ۴۰-۵۰ کیلودالتون)، γ -Glycidoxypropyltrimethoxysilane (GPTMS)، ۸۴۱۸۰۷، وزن مولکولی = ۲۳۶/۳۴ گرم بر مول)، اتانول (۱۰۰۹۸۳)، وزن مولکولی = ۶۷/۰۷ گرم بر مول)، استیک اسید (۱۰۰۰۵۶)، وزن مولکولی = ۶۰/۰۵ گرم بر مول) شرکت مرک آلمان استفاده شد. فسفات بافر سالین (pH = ۷/۲-۷/۴) و محلول شبیه‌ساز بدن (pH = ۷/۷-۲/۴) از شرکت آپرین تهران گرفته شد. همه مواد با درجه آزمایشگاهی تهیه شدند و محلول‌های آبی آب بدون یون هستند.

۲-۲- آماده‌سازی داربست‌های ژلاتین و کیتوسان

شبکه‌ای‌شده با GPTMS

ابتدا ۶ میلی‌لیتر استیک اسید در ۳۰۰ میلی‌لیتر آب ریخته می‌شود تا محلول استیک اسید (۲ درصد) به دست آید. برای آماده‌سازی محلول ۲ درصد وزنی کیتوسان/ژلاتین، ۳ گرم کیتوسان به محلول استیک اسید اضافه شد و در دمای ۳۵ درجه سلسیوس به‌مدت ۲۴ ساعت و با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه هم زده شد تا محلول هموژنی ایجاد شود. سپس، ۳ گرم ژلاتین به محلول اضافه شد و به‌مدت یک ساعت و نیم در دمای ۳۵ درجه سلسیوس با سرعت ۲۰۰ دور بر دقیقه هم زده شد.

۲-۳-۵- خواص مکانیکی

تست خواص مکانیکی داربست‌ها با استفاده از آزمون استحکام فشاری مطابق با استاندارد (ASTM-20) توسط دستگاه (SANTAM، STM 20، ایران) با نرخ فشار ۰/۵ mm/min با لود سل ۱۰۰ نیوتونی بررسی شد. برای هر اندازه‌گیری، ۵ نمونه ارزیابی شد و سپس میانگین اندازه‌گیری‌ها به منزله خواص مکانیکی گزارش شد.

۲-۳-۶- زیست‌فعالی

به منظور مقایسه توانایی داربست‌های شبکه‌ای شده با GPTMS، برای حمایت از رسوب آپاتیت، در ۵۰ میلی‌لیتر SBF (محلول شبیه‌ساز بدن) ($\text{pH} = 7.3$) غوطه‌ور شدند. بدین منظور، داربست‌ها به مدت ۱۴ روز در ترموشیکر^۲ در دمای 37 ± 0.5 درجه سلسیوس با ۳۰۰ دور بر دقیقه قرار گرفتند. هر ۲ روز یک بار، محلول نمونه‌ها عوض شد. پس از ۲ هفته، تشکیل آپاتیت روی داربست‌ها با استفاده از پراش پرتو ایکس^۳ (XRD) (پرتو ایکس زیمنس D-500) با تابش $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$) آنالیز شد. آزمایش در ۴۰ کیلوولت و ۰/۸ میلی‌آمپر در محدوده 2θ برابر ۰-۷۵ درجه با سرعت اسکن 2 min^{-1} با اندازه گام ۰/۰۲ درجه انجام شد. همچنین، از نمونه‌ها با کمک میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM, Vega, Czech Republic) تصویربرداری شد. بدین منظور، سطح همه نمونه‌ها با لایه نازکی از طلا پوشانده شد و سپس تصاویر از نمونه‌ها در ولتاژ ۲۰ کیلوولت در بزرگ‌نمایی‌های متفاوت گرفته شد.

۲-۳-۷- تجزیه و تحلیل‌های آماری

داده‌های هر آزمایش با استفاده از نرم‌افزار Microsoft Excel 2016 (Microsoft, Redmond, WA, USA) جمع‌آوری شد و نتایج به صورت میانگین \pm انحراف استاندارد ارائه شدند. هر آزمایش حداقل پنج بار تکرار شد. مقدار $p < 0.05$ ، * و $p < 0.001$ ، ** از نظر آماری معنادار در نظر گرفته شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- مشاهدات ریخت‌شناسی و تخلخل

به منظور شناسایی گروه‌های عاملی و واکنش‌های احتمالی، از نمونه‌های تهیه‌شده طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه^۱ (FTIR) در عدد موج $4000-400 \text{ cm}^{-1}$ گرفته شد. بدین منظور، نمونه‌ها با نمک KBr مخلوط شدند و سپس طیف گرفته شد.

۲-۳-۳- برهم‌کنش با آب

از داربست‌ها دو تست زاویه تماس و تورم برای بررسی قابلیت برهم‌کنش با آب گرفته شد. به منظور بررسی زاویه تماس، به روش سسیل دراپ، روی داربست‌ها یک قطره آب قرار گرفت و سپس زاویه بین قطره آب و داربست اندازه‌گیری شد (Kruss DSA 100، آلمان). همچنین، به منظور بررسی تورم داربست‌ها، نمونه‌های با قطر ۱۰ میلی‌متر و ضخامت ۳۰ میلی‌متر آماده شدند و وزن شدند (W_0). سپس، نمونه‌ها به مدت ۵، ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه در محلول فسفات بافر سالین ($\text{pH} = 7.4$) غوطه‌ور شدند و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس روی همزن قرار گرفتند. بعد از هر فاصله زمانی، نمونه از محلول خارج شد، روی کاغذ صافی قرار گرفت و مجدداً توزین شد (W_1). با استفاده از معادله ۱ محاسبات انجام شد [۲۱]:

$$(1) \quad \text{درصد تورم} = (W_1 - W_0) / W_0 \times 100$$

۲-۳-۴- تخریب‌پذیری

به منظور بررسی قابلیت تخریب نمونه‌ها، داربست‌ها با ابعاد قطر ۱۰ میلی‌متر و ضخامت ۳۰ میلی‌متر در محلول فسفات بافر سالین ($\text{pH} = 7.4$) به مدت ۲ هفته غوطه‌ور شدند. پیش از غوطه‌وری وزن اولیه آن‌ها یادداشت شد (W_1) و سپس بعد از غوطه‌وری بعد از گذشت ۱، ۲، ۷ و ۱۴ روز مجدداً اندازه‌گیری شدند. بدین منظور، نمونه‌ها از محلول خارج شدند، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق خشک شدند و وزن (W_2) آن‌ها اندازه‌گیری شد و مطابق معادله ۲ محاسبه شد [۲۲]:

$$(2) \quad \text{درصد تخریب} = (W_2 - W_1) / W_1 \times 100$$

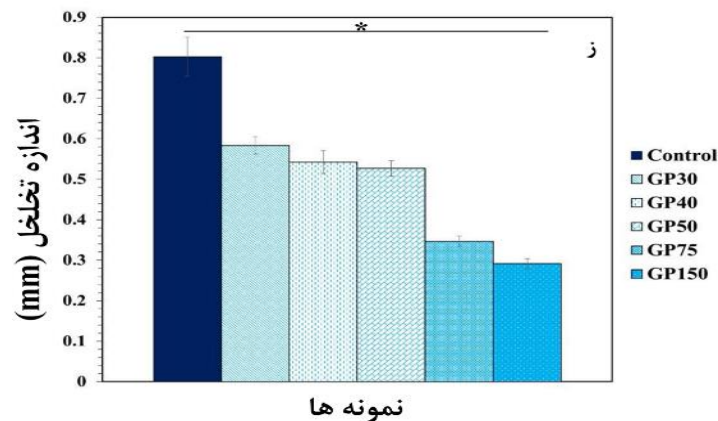
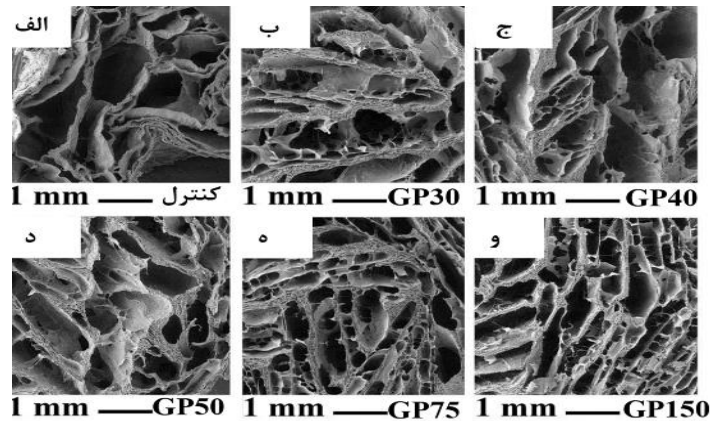
³ X-Ray Diffraction

¹ Fourier Transform Infrared

² Thermoshaker

شکل گرفته اند. نتایج اندازه‌گیری میانگین قطر تخلخل‌ها نیز در شکل ۱ برحسب (g) نشان داده شدند. با افزایش درصد عامل شبکه‌ای‌کننده، اندازه تخلخل‌ها کاهش پیدا می‌کند و از 0.048 ± 0.002 میلی‌متر در نمونه کنترل به ترتیب برای نمونه‌های GP30، GP40، GP50، GP75 و GP150 به 0.021 ± 0.003 ، 0.027 ± 0.005 ، 0.019 ± 0.005 ، 0.012 ± 0.003 و 0.012 ± 0.003 میلی‌متر رسیده است. بررسی‌های پیشین نشان دادند که اندازه تخلخل‌های ۳۵۰-۴۰۰ میکرومتر برای رشد استئوبلاست‌ها و ترمیم استخوان مناسب است [۱] که در نتیجه، با افزایش درصد عامل شبکه‌ای‌کننده، تخلخل‌ها در این محدوده قرار می‌گیرند. در واقع، فقط داربست GP75 در محدوده ابعادی مهندسی بافت استخوان قرار دارد.

ساختار متخلخل، با اندازه تخلخل مناسب، در چسبندگی و تکثیر سلولی، انتقال مواد غذایی و اکسیژن و همچنین دفع مواد زائد سلولی بسیار مؤثر است [۲۳]. شکل ۱ (الف-و) تصاویر SEM و (ز) اندازه تخلخل‌های آماده‌شده با درصد‌های وزنی گوناگون GPTMS را نشان می‌دهد. نمونه بدون عامل شبکه‌ای‌کننده نمونه کنترل در نظر گرفته شد. با توجه به تصاویر، داربست‌ها دارای ساختار بسیار متخلخل با تخلخل‌های باز هستند که برای رشد و چسبندگی سلولی ضروری است. داربست نمونه کنترل دارای اندازه تخلخل بزرگ‌تر و گردتر است و ساختار ناهمگنی را نشان می‌دهد. با افزایش درصد عامل شبکه‌ای‌کننده ساختار منظم‌تر می‌شود و شکل تخلخل‌ها نیز تغییر می‌کند و طولی می‌شود. این کانال‌های طولی در جهت انجماد



شکل ۱. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نمونه‌های GP30، GP40، GP50، GP75 و GP150 (الف-و) و نمودار اندازه تخلخل (ز)

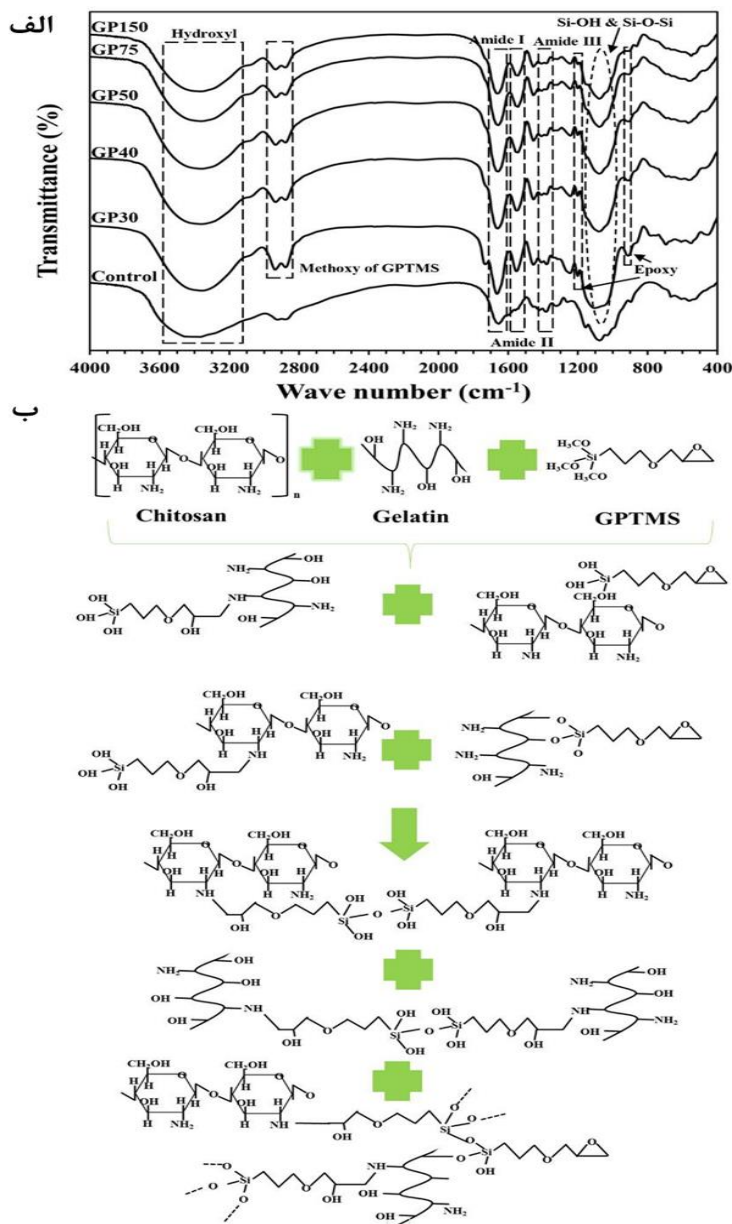
پیک پهن ظاهر شده در حدود $3200-3500 \text{ cm}^{-1}$ به دلیل وجود گروه هیدروکسیل در تمام نمونه‌هاست [۲۴]. پیک‌های شناسایی شده در حدود 1650 ، 1560 و 1380 cm^{-1} به دلیل ظهور گروه‌های آمید I، II و III کیتوسان بوده‌اند که به ترتیب شامل کشش C=O، خمش NH و کشش CN است [۲۵-۲۷].

۳-۲- طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه

به منظور ارزیابی گروه‌های عاملی و برهم‌کنش‌های احتمالی، طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه از نمونه‌ها گرفته شد و نتایج در شکل ۲ (الف) به نمایش درآمدند. پیک‌های مربوط به کیتوسان و ژلاتین در همه نمونه‌ها مشاهده می‌شوند.

ژلاتین و کیتوسان به دلیل وجود GPTMS را تأیید می‌کند [۳۰]. سازوکار فرایند شبکه‌ای شدن GPTMS در ترکیب کیتوسان/ژلاتین توسط حلقه اکسیران GPTMS و گروه آمین و هیدروکسیل ژلاتین و کیتوسان انجام می‌شود. فرایند باز شدن حلقه گروه‌های اپوکسی و دپروتونه شدن گروه‌های هیدروکسیل و آمین کیتوسان و ژلاتین پس از هیدراسیون گروه‌های تری‌متوکسی GPTMS باعث ایجاد گروه‌های سیلانول می‌شود. واکنش تراکم گروه‌های سیلانول باعث ایجاد پیوند کووالانسی Si-O-Si و به فرایند شبکه‌ای شدن دو پلیمر کیتوسان و ژلاتین منجر می‌شود [۱۸ و ۳۱]. شماتیک پیشنهادی فرایند شبکه‌ای شدن GPTMS در شکل ۲ (ب) نشان داده شد.

پیک‌های دیده‌شده در حوالی ۱۶۵۰ و ۱۵۶۰ cm^{-1} می‌تواند مربوط به گروه‌های C=O و C-N ژلاتین نیز باشند که همپوشانی کردند [۲۸]. پیک مشاهده‌شده در حدود ۳۰۰۰-۳۲۰۰ cm^{-1} نیز مربوط به کشش NH و پیک C-O-C کیتوسان است. با اضافه شدن عامل شبکه‌ای‌کننده GPTMS، گروه متوکسی GPTMS در ۲۸۷۳ و ۲۹۳۷ cm^{-1} دیده می‌شود. علاوه بر این، پیک در حدود ۱۱۹۲ و ۹۰۸ cm^{-1} به دلیل گروه اپوکسی GPTMS است [۲۹]. هیدرولیز گروه‌های تری‌متوکسی GPTMS در فرایند شبکه‌ای شدن به تشکیل پیک Si-OH در حدود ۹۲۰ cm^{-1} منجر می‌شود. همچنین، تشکیل پیک مربوط به Si-O-Si، در حدود ۱۰۲۰ و ۱۱۵۰ cm^{-1} ، فرایند شبکه‌ای شدن



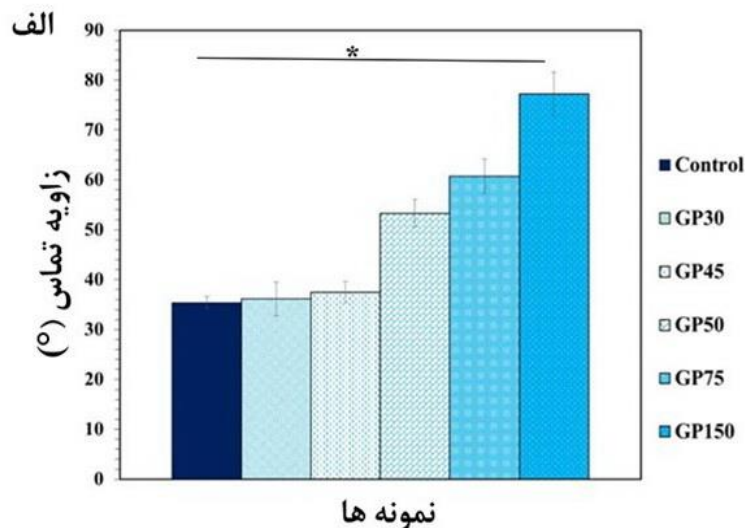
شکل ۲. طیف نمونه‌های تهیه‌شده در این بررسی (الف) و شماتیک پیشنهادی واکنش بین مواد (ب)

۳-۳- زاویه تماس و تورم

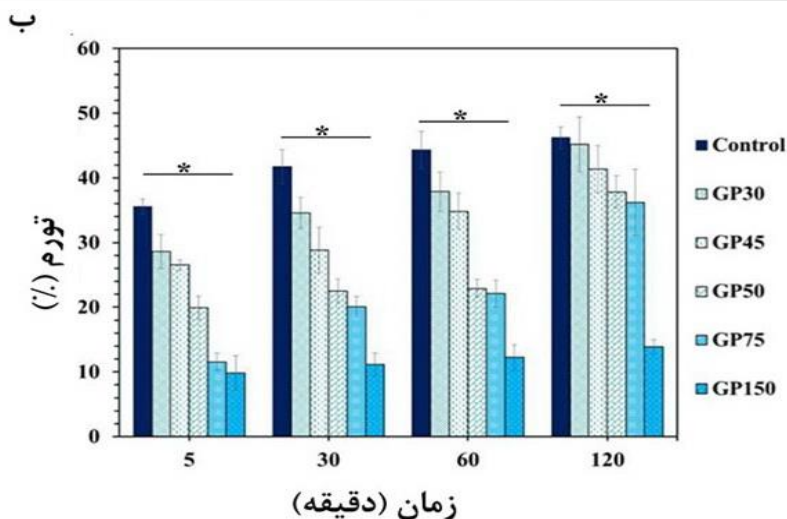
به دلیل اهمیت آب‌دوستی در رفتار سلولی و در نتیجه ترمیم بافت، در این بررسی، زاویه تماس و مقدار تورم داربست‌ها در طی ۱۲۰ دقیقه اندازه‌گیری شد و نتایج به ترتیب در شکل ۳ (الف) و (ب) نشان داده شدند. مشاهده می‌شود که نمونه کنترل بدون عامل شبکه‌ای‌کننده کمترین زاویه تماس را دارد که در حدود $1/2 \pm 35/4$ درجه است. زاویه تماس نمونه کنترلی کیتوسان/ژلاتینی در مطالعه ليو و همکاران [۳۲] نیز $1/2 \pm 43/6$ درجه بود که با افزودن ترکیبات آب‌گریز افزایش یافته است. بعد از افزودن GPTMS، زاویه تماس به تدریج زیاد می‌شود و در نمونه GP150 به بالاترین مقدار خود یعنی $4/4 \pm 77/26$ درجه رسید که این کاهش آب‌دوستی می‌تواند به دلیل خاصیت آب‌گریز GPTMS و قرار گرفتن گروه‌های آب‌گریز سیلوکسان روی زنجیره‌های پلیمری باشد. البته، این امر می‌تواند به دلیل درگیری گروه‌های آب‌دوست ترکیبات ژلاتین و کیتوسان مانند هیدروکسیل در فرایند شبکه‌ای شدن نیز باشد [۳۳] و [۳۴]. بنا بر مطالعات قبلی، زاویه تماس بین ۷۰-۴۰ درجه برای چسبندگی سلولی مناسب‌تر است [۳۵]. بنا بر آزمون‌ها، زاویه تماس نمونه‌های GP50 و GP75 بهترین زاویه تماس را به ترتیب با $2/8 \pm 53/3$ درجه و $3/5 \pm 60/7$ درجه نشان دادند.

رفتار تورم یک نمونه به ساختار پلیمرها، برهم‌کنش‌های پلیمر و حلال، ویژگی‌های ساختاری و درجه شبکه‌ای شدن بستگی دارد [۳۶]. بنابراین، نتایج آزمون تورم نیز روند تقریباً مشابهی را نشان می‌دهند. نمونه کنترل بیشترین مقدار جذب آب

را در تمام زمان‌های اندازه‌گیری نشان می‌دهد. این نمونه، بعد از گذشت تنها ۵ دقیقه، $1/20 \pm 35/58$ درصد را نشان داد که بعد از گذشت ۱۲۰ دقیقه به $1/67 \pm 46/23$ درصد رسید. همچنین، با افزایش درصد عامل شبکه‌ای‌کننده، مقدار تورم کاهش پیدا کرده است. نمونه GP75 نیز، بعد از ۱۲۰ دقیقه، مقدار $5/13 \pm 36/22$ درصد جذب آب نشان داد. نمونه GP150 کمترین مقدار تورم را نشان می‌دهد. این نمونه، با گذشت ۱۲۰ دقیقه، $1/12 \pm 13/86$ درصد جذب آب داشت. در بررسی باداوی^۱ و همکاران [۳۷] نشان داده شد که افزودن گلو تارالدئید به کاهش نرخ تورم منجر می‌شود و نمونه دارای ۲ درصد گلو تارالدئید، بعد از گذشت ۷۲ ساعت، $170/0$ درصد تورم نشان داده است که در مقایسه با نمونه دارای ۰/۲۵ درصد گلو تارالدئید که ۵۲۴ درصد تورم داشته است کاهش چشمگیری داشت. با افزایش حجم عامل شبکه‌ای‌کننده، حجم فشرده داربست، زنجیره‌های آزاد و قابلیت حرکت آن‌ها با ایجاد پل‌های گوناگون بین زنجیره‌های پلیمری کاهش پیدا می‌کند، مقدار نفوذ محلول آبی کم می‌شود و در نتیجه تورم کاهش پیدا می‌کند [۳۷]. اگرچه خاصیت تورم و زاویه تماس برای چسبندگی سلولی ضروری هستند، افزایش بیش از حد تورم برای مهندسی بافت استخوان مناسب نیست و نمی‌تواند خواص مکانیکی مورد نیاز برای ترمیم بافت استخوان را فراهم بیاورد [۳۸]. بنابراین، به نظر می‌رسد نمونه‌های دارای مقادیر بیشتر عامل شبکه‌ای‌کننده GPTMS برای کاربرد مهندسی بافت استخوان مناسب‌تر باشند.



¹ Badawy

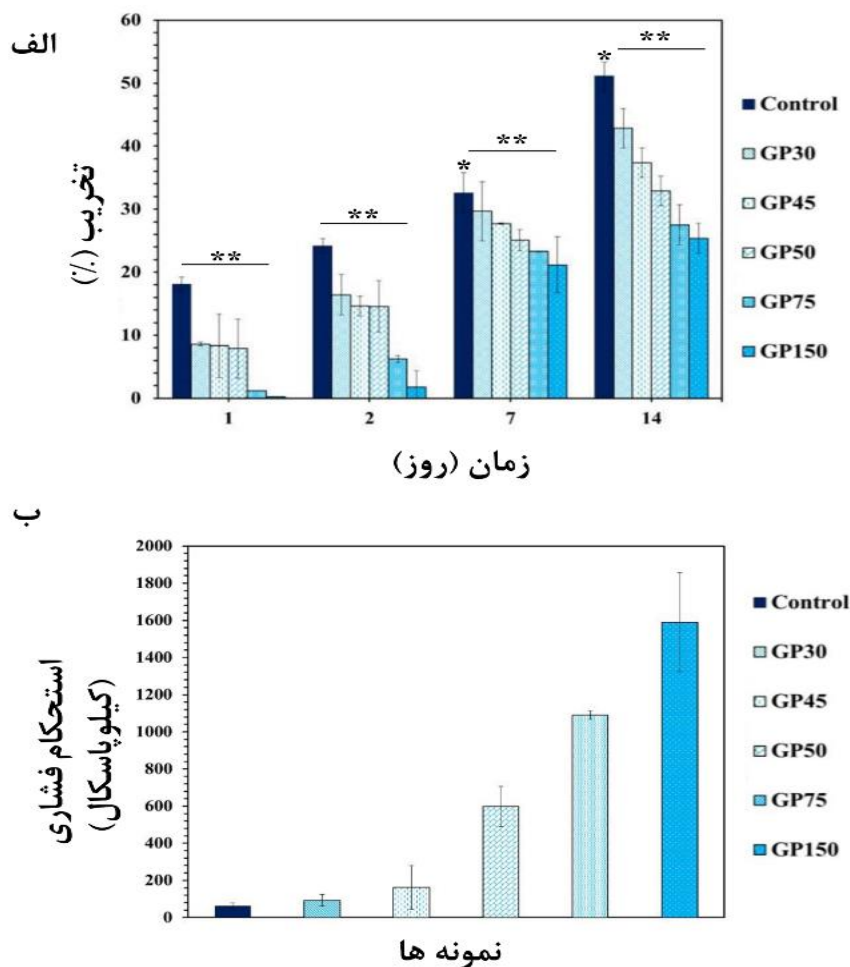


شکل ۳. زاویه تماس (الف) و درصد تورم (ب) نمونه‌های ژلاتین/کیتوسان شبکه‌ای شده با درصدهای وزنی گوناگون GPTMS

نیز نشان داده شده است که شبکه‌ای کردن می‌تواند سرعت تخریب داربست را کاهش دهد [۴۲]. در مطالعه پیترا و همکاران [۴۳] نیز نشان داده شد که داربست‌های کیتوسان/ژلاتینی، بعد از یک هفته، تخریب می‌شوند. با این حال، مقدار تخریب به نسبت کیتوسان/ژلاتین و درصد افزودنی مانند شبکه‌کننده بستگی دارد. افزایش درصد عامل شبکه‌ای‌کننده به کاهش سرعت تخریب منجر می‌شود. در بررسی دیگری که درباره ترکیب کیتوسان/ژلاتین انجام شد، نشان داده شده است که افزودن نانوذرات سرامیکی به کاهش سرعت تخریب این ترکیب منجر می‌شود. این ترکیب بدون عامل شبکه‌ای‌کننده، بعد از گذشت ۲۵ روز، حدود ۴۰ درصد تخریب داشته است، اما با افزودن نانوذرات سرامیکی، حدود ۱۶ درصد کاهش پیدا می‌کند. پس به نظر می‌رسد که افزودن عامل سرامیکی و عامل شبکه‌ای‌کننده در کاهش سرعت تخریب این ترکیب مؤثر باشند، اما در مقایسه با این پژوهش به نظر می‌رسد عامل سرامیکی نرخ تخریب کمتری را ایجاد کند. در مطالعه دیگری، نشان داده شد که بیشتر از ۵۰ درصد از ترکیب کیتوسان/ژلاتین تخریب شده است. با افزودن عامل شبکه‌ای‌کننده، مقدار تخریب کاهش پیدا می‌کند. با این حال، افزودن نوع عامل شبکه‌ای‌کننده در میزان تخریب مؤثر بوده است [۴۴].

۳-۴- زیست تخریب پذیری

خاصیت تخریب پذیری داربست، در محیط فیزیولوژیک، پارامتری حیاتی برای ترمیم بافت است. روند تخریب باید با بافت میزبان هماهنگ باشد تا هم بتواند حمایت فیزیکی مناسبی برای رشد سلول را فراهم بیاورد و هم فضایی خالی برای رشد بافت و رگزایی ایجاد کند [۳۹]. ژلاتین در محلول آبی به سرعت هیدرولیز می‌شود [۴۰]. کیتوسان نیز در بدن بیشتر تحت تأثیر تخریب آنزیمی قرار می‌گیرد. در این مطالعه، روند تخریب داربست در مدت ۲ هفته مطالعه شده است و نتایج به دست آمده در شکل ۴ (الف) نشان داده شدند. با توجه به نتایج به دست آمده، داربست‌ها قابلیت تخریب پذیری از خود نشان می‌دهند و، با افزایش نسبت عامل شبکه‌ای‌کننده، مقدار تخریب پذیری کاهش پیدا می‌کند. در نمونه کنترل بدون عامل شبکه‌ای‌کننده، بعد از حدود دو هفته، تقریباً نیمی از داربست تخریب شده است (۱۶/۱ ± ۵۱/۲ درصد)، ولی با افزایش مقدار GPTMS، مقدار تخریب داربست کاهش یافت و، در نمونه GP150، بعد از دو هفته، ۲/۳ ± ۲۵/۳۹ درصد داربست تخریب شد و تقریباً روند تخریب به حدود یک‌دوم کاهش یافت. از آنجاکه خاصیت آب‌دوستی و تورم در نفوذ و انتقال مایعات تأثیر می‌گذارند و در نتیجه در سرعت تخریب نیز مؤثر هستند [۴۱]، پیش از این



شکل ۴. درصد زیست‌تخریب‌پذیری (الف) و استحکام فشاری (ب) نمونه‌های ژلاتین/کیتوسان شبکه‌ای شده با درصد‌های وزنی گوناگون GPTMS

۳-۵- خواص مکانیکی

ریخت‌شناسی (شکل ۱)، با افزایش درصد عامل شبکه‌ای‌کننده، تخلخل‌ها بیشتر طولی شدند و ساختار هموزن‌تری را ایجاد کردند که در بهبود خواص مکانیکی مؤثر است. از طرفی، از آنجاکه استخوان تربکولار طبیعی دارای استحکام فشاری به میزان ۱۶۰۰-۱۰۰ کیلوپاسکال است [۴۷]، نمونه‌های دارای GPTMS بیشتر برای این کار پیشنهاد می‌شوند که در نمونه‌های این مقاله، نمونه‌های GP75 و GP150 از سایر نمونه‌ها نتایج بهتری را نشان داده‌اند. با وجود این، باید مجموعه خواص مکانیکی برای معرفی نمونه بهینه مد نظر قرار گیرد. در بررسی نی^۱ و همکاران [۴۰] نشان داده شد که خواص مکانیکی، با افزایش عامل شبکه و نانوذرات، بهبود پیدا می‌کنند. در این بررسی، از دو روش شبکه‌شدن استفاده شد که هم شامل روش شیمیایی و هم فیزیکی است. به نظر می‌رسد این فرایندها، افزون بر استفاده از نانوذرات، به بهبود خواص مکانیکی منجر شده‌اند.

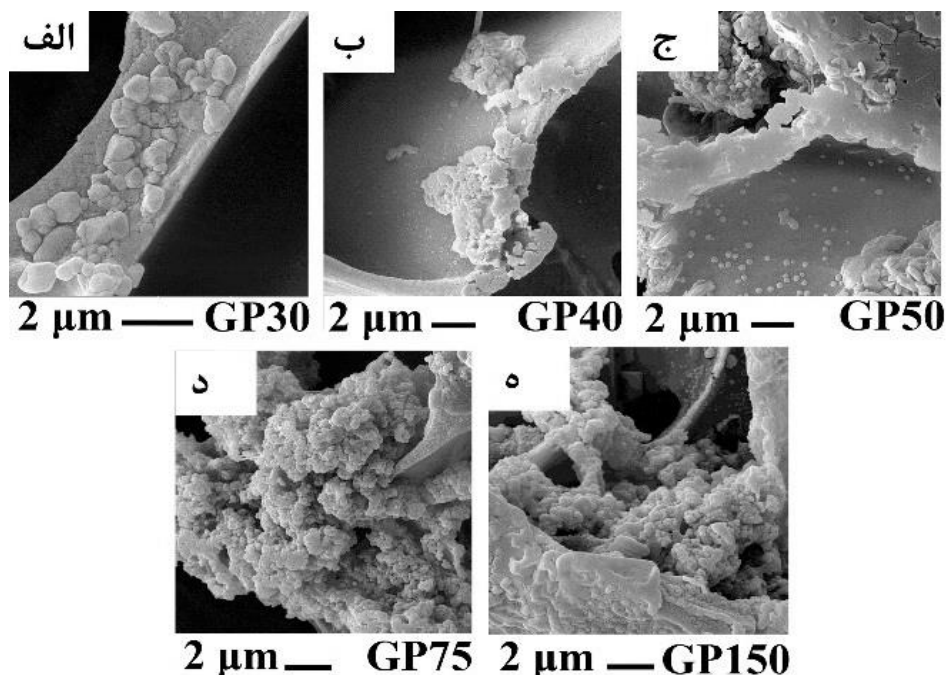
یکی از مهم‌ترین پارامترها در کاربرد مهندسی بافت، خواص مکانیکی داربست‌ها است [۴۵]. ترکیب مواد، درصد تخلخل و همچنین اندازه تخلخل‌ها و جهت‌گیری آن‌ها نیز در بهبود خواص مکانیکی داربست مؤثر هستند [۴۶]. در این بررسی، استحکام فشاری داربست‌ها ارزیابی شدند و نتایج در شکل ۵ نشان داده شده‌اند. همان‌طور که مشاهده می‌شود، با افزایش درصد عامل شبکه‌ای‌کننده، ساختار استحکام فشاری روند افزایشی نشان داده است. در نمونه کنترل، استحکام فشاری کمی دیده می‌شود و میزان آن حدود 1 ± 62 کیلوپاسکال گزارش شد که با افزایش شبکه‌کننده در نمونه‌های GP75 و GP150 به ترتیب به مقدار 23 ± 1090 و 267 ± 1590 کیلوپاسکال رسید. این موضوع می‌تواند به دلیل افزایش پیوندهای ایجادشده توسط عامل شبکه‌ای‌کننده باشد. افزون بر این، با توجه به تصاویر

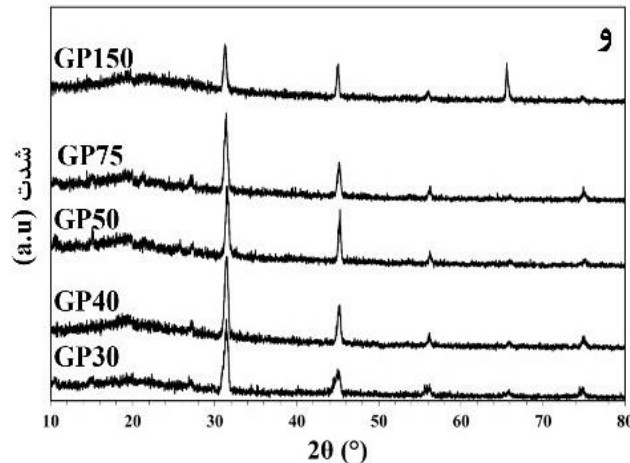
¹ Nie

به‌گونه‌ای که استحکام فشاری به میزان ۱/۲-۲/۲ رسیده است. اگرچه در بررسی حاضر، مقدار استحکام کمتری از افزودن نانوذرات یا استفاده از نانوذرات مشاهده می‌شود، اما از عامل‌های شیمیایی سمی استفاده نشده است که می‌تواند مزیت این بررسی باشد. بررسی حاضر تنها به مطالعه اثر عامل شبکه‌کننده پرداخته است، پس نانوذرات افزوده نشدند. با این حال، می‌توان به‌منظور بهبود خواص فیزیکی به نمونه بهینه شبکه‌شده با GPTMS نیز نانوذرات را افزود.

۳-۶- زیست‌فعالی

زیست‌فعالی و قابلیت رسوب آپاتیت روی داربست‌های حاوی GPTMS از طریق انکوباسیون داربست‌ها در محلول SBF به مدت ۱۴ روز بررسی شد. شکل ۵ (الف-ه) میکروگراف‌های FE-SEM روی سطح داربست‌ها را پس از ۱۴ روز غوطه‌وری در محلول SBF نشان می‌دهد. با تشکیل ذرات معدنی کروی روی دیواره‌های داخلی و خارجی منافذ داربست‌ها، آپاتیت تشکیل می‌شود. با مقایسه میکروگراف‌ها می‌توان نتیجه گرفت که میزان آپاتیت ذرات، با افزایش محتوای GPTMS داربست، به‌طور قابل توجهی افزایش می‌یابد. این مورد را می‌توان به کاهش انرژی سطحی برای هسته‌سازی کانی‌های آپاتیت در سطح داربست‌ها به دلیل عامل شبکه‌ای‌کننده GPTMS نسبت داد [۴۸]. در واقع، برهم‌کنش گروه‌های Si-O-Si و





شکل ۵. تصاویر هیدروکسی آپاتیت رسوب‌کرده روی داربست‌های GP150، GP75، GP50، GP40، GP30 (الف-ه) و الگوی تفرق پرتو ایکس رسوب هیدروکسی آپاتیت (و)

۴- نتیجه‌گیری

کیتوسان و ژلاتین دو ماده پرکاربرد در مهندسی بافت استخوان هستند. با این حال، به دلیل خواص مکانیکی ضعیف، استحکام پایین و تخریب شدن زودهنگام، استفاده از آن‌ها، بدون عامل شبکه‌ای‌کننده در کاربرد استخوانی، با مشکل روبه‌رو می‌شود. عامل‌های شبکه‌ای‌کننده متعددی برای این کار یافت می‌شوند که معمولاً خواص سمی دارند. اما GPTMS، علاوه بر فرایند شبکه‌ای شدن، به بهبود خواص زیست‌فعالی نمونه‌ها منجر می‌شود که در کاربرد استخوانی اهمیت فراوانی دارد. بهینه‌کردن مقدار GPTMS به‌کاربرده شده از مهم‌ترین پارامترها در کارکرد این داربست‌هاست. در این بررسی، درصد‌های وزنی گوناگونی از این عامل شبکه‌ای‌کننده برای این منظور استفاده شد و داربست‌ها تحت آزمون‌های گوناگون قرار گرفتند. افزایش GPTMS اندازه تخلخل‌ها را کاهش داده است و همچنین ریخت‌شناسی تخلخل‌ها هموزن‌تر و بیشتر طولی شده‌اند. با افزایش GPTMS، مقدار زاویه تماس مطلوب چسبندگی سلولی ظاهراً خواص ترشوندگی مطلوب‌تری از سایر نمونه‌ها داشت و خواص مکانیکی و زیست‌فعالی و رسوب هیدروکسی آپاتیت بهبود پیدا کردند. اگرچه زاویه تماس، تورم و تخریب با افزایش GPTMS کاهش پیدا کردند، به نظر می‌رسد پلیمرها، با توجه به روند تخریب سریع، در محدوده مطلوبی قرار گرفتند. GPTMS، با توجه به مطالعات پیشین و محدوده خواص ذکر شده مانند زاویه تماس، ریخت‌شناسی، تورم، تخریب و رشد آپاتیت نمونه

GP75 به نظر می‌رسد خواص مطلوب‌تری را برای ترمیم بافت استخوانی در مقایسه با سایر نمونه‌ها ارائه داده است. با توجه به نتایج، نمونه GP75 به‌منزله بهترین نمونه برای کاربردهای استخوانی معرفی شد که نیاز به بررسی بیشتری در آینده دارد.

۵- سپاسگزاری

پژوهش حاصل، بخشی از رساله دکتری رشته مهندسی پزشکی است که در آزمایشگاه پژوهشگاه مواد و انرژی انجام شده است. نویسندگان مقاله از مسئولان محترم آزمایشگاه تحقیقاتی این مرکز، به دلیل حمایت‌های اجرایی، کمال تشکر و امتنان را دارند.

مراجع

- Zhang, Y., Liu, X., Zeng, L., Zhang, J., Zuo, J., Zou, J., Ding, J., Chen, X., "Polymer fiber scaffolds for bone and cartilage tissue engineering", *Advanced Functional Materials*, Vol. 29, No. 36, (2019), 1-20. <https://doi.org/10.1002/adfm.201903279>
- Kim, H. D., Hong, X., An, Y. H., Park, M. J., Kim, D. G., Greene, A. K., Padwa, B. L., Hwang, N. S., Lin, R. Z., Melero-Martin, J. M., "A biphasic osteovascular biomimetic scaffold for rapid and self-sustained endochondral ossification", *Advanced Healthcare Materials*, Vol. 10, No. 13, (2021), 2100070. <https://doi.org/10.1002/adhm.202100070>
- Tang, G., Tan, Z., Zeng, W., Wang, X., Shi, C., Liu, Y., He, H., Ceng, R., Ye, X., "Recent advances of chitosan-based injectable hydrogels for bone and dental tissue regeneration", *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, Vol. 8, (2020), 1-15. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.587658>
- Doozandeh, Z., Saber-Samandari, S., Khandan, A., "Preparation of novel Arabic gum-C6H9NO biopolymer as a bed sore for wound care application", *Acta Medica Iranica*, (2020), 520-530. <https://doi.org/10.18502/acta.v58i10.4915>

20. Shirotsaki, Y., Tsuru, K., Hayakawa, S., Osaka, A., Lopes, M. A., Santos, J. D., Costa, M. A., Fernandes, M. H., "Physical, chemical and in vitro biological profile of chitosan hybrid membrane as a function of organosiloxane concentration", *Acta Biomaterialia*, Vol. 5, No. 1, (2009), 346-355. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.07.022>
21. Moreira, T. F. M., de Oliveira, A., da Silva, T. B. V., Dos Santos, A. R., Gonçalves, O. H., da Silva Gonzalez, R., Droval, A. A., Leimann, F. V., "Hydrogels based on gelatin: Effect of lactic and acetic acids on microstructural modifications, water absorption mechanisms and antibacterial activity", *LWT-Food Science and Technology*, Vol. 103, (2019), 69-77. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.12.040>
22. Lee, J. B., Ko, Y. G., Cho, D., Park, W. H., Kwon, O. H., "Modification and optimization of electrospun gelatin sheets by electronbeam irradiation for soft tissue engineering", *Biomaterials Research*, Vol. 21, No. 1, (2017), 1-9. <https://doi.org/10.1186/s40824-017-0100-z>
23. Dhawan, A., Kennedy, P. M., Rizk, E. B., Ozbolat, I. T., "Three-dimensional bioprinting for bone and cartilage restoration in orthopaedic surgery", *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, Vol. 27, No. 5, (2019), E215-E226. <https://doi.org/10.5435/JAAOS-D-17-00632>
24. Imtiaz, N., Niazi, M. B. K., Fasim, F., Khan, B. A., Bano, S. A., Shah, G. M., Badshah, M., Menna, F., Uzair, B., "Fabrication of an original transparent PVA/gelatin hydrogel: In vitro antimicrobial activity against skin pathogens", *International Journal of Polymer Science*, (2019). <https://doi.org/10.1155/2019/7651810>
25. Milad, F., Mirzaei, E., "Nanofibrillated chitosan/polycaprolactone bionanocomposite scaffold with improved tensile strength and cellular behavior", *Nanomedicine Research Journal*, Vol. 5, (2018), 77-89. <https://doi.org/10.22038/nmj.2018.005.004>
26. Yang, S., Han, X., Jia, Y., Zhang, H., Tang, T., "Hydroxypropyltrimethyl ammonium chloride chitosan functionalized-PLGA electrospun fibrous membranes as antibacterial wound dressing: In vitro and in vivo evaluation", *Polymers*, Vol. 9, No. 3, (2017), 1-19. <https://doi.org/10.3390/polym9120697>
27. Mohamed, N., "Synthesis of hybrid chitosan silver nanoparticles loaded with doxorubicin with promising anti-cancer activity", *Bionanoscience*, Vol. 10, (2020), 758-765. <https://doi.org/10.1007/s12668-020-00760-y>
28. Aljohani, W., Ullah, M. W., Li, W., Shi, L., Zhang, X., Yang, G., "Three-dimensional printing of alginate-gelatin-agar scaffolds using free-form motor assisted microsyringe extrusion system", *Journal of Polymer Research*, Vol. 25, No. 3, (2018). <https://doi.org/10.1007/s10965-018-1455-0>
29. Song, J., Yoon, B., Kim, H., Kim, H., "Bioactive and degradable hybridized nanofibers of gelatin-siloxane for bone regeneration", *Journal of Biomedical Materials Research-Part A*, Vol. 84, No. 4, (2008), 875-884. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31330>
30. Tonda-Turo, C., Cipriani, E., Gnani, S., Chiono, V., Mattu, C., Gentile, P., Perroteau, I., Zanetti, M., Ciardelli, G., "Crosslinked gelatin nanofibres: Preparation, characterisation and in vitro studies using glial-like cells", *Materials Science and Engineering C*, Vol. 33, No. 5, (2013), 2723-2735. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.02.039>
31. Ghorbani, F., Zamanian, A., Behnamghader, A., Daliri Joupari, M., "A novel pathway for in situ synthesis of modified gelatin microspheres by silane coupling agents as a bioactive platform", *Journal of Applied Polymer Science*, Vol. 135, No. 41, (2018), 1-10. <https://doi.org/10.1002/app.46739>
32. Liu, J., Wang, S., Xu, K., Fan, Z., Wang, P., Xu, Z., Ren, X., Hu, S., Gao, Z., "Fabrication of double crosslinked chitosan/gelatin membranes with Na⁺ and pH dual-responsive controlled permeability", *Carbohydrate. Polymer*, Vol. 236, (2020). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.115963>
33. Ghorbani, F., Zamanian, A., Aidun, A., "Conductive electrospun polyurethane-polyaniline scaffolds coated with poly(vinyl alcohol)-GPTMS under oxygen plasma surface modification", *Materials Today Communications*, Vol. 22, (2020), 100752. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2019.100752>
34. Nouri-Felekori, M., Khakbiz, M., Nezafati, N., Mohammadi, J., Eslaminejad, M. B., "Comparative analysis and properties evaluation of gelatin microspheres crosslinked with glutaraldehyde and 3-glycidoxypropyltrimethoxysilane as drug delivery systems
5. Ghorbani, F., Sahranavard, M., Mousavi Nejad, Z., Li, D., Zamanian, A., Yu, B., "Surface functionalization of three dimensional-printed polycaprolactone-bioactive glass scaffolds by grafting GelMA under UV irradiation", *Frontiers in Materials*, Vol. 7, (2020), 1-17. <https://doi.org/10.3389/fmats.2020.528590>
6. Maji, K., Dasgupta, S., "Characterization and in vitro evaluation of gelatin-chitosan scaffold reinforced with bio ceramic nanoparticles for bone tissue engineering", *Journal of Materials Research*, Vol. 34, (2019), 2807-2818. <https://doi.org/10.1557/jmr.2019.170>
7. Sahranavard, M., Zamanian, A., Ghorbani, F., Shahrezaee, M. H., "A critical review on three dimensional-printed chitosan hydrogels for development of tissue engineering", *Bioprinting*, Vol. 17, (2020), e00063. <https://doi.org/10.1016/j.bprint.2019.e00063>
8. Aghabarari, B., "Biodiesel production using hybrid amino functionalized chitosan-carbon support as green catalyst", *Journal of Renewable Energy and Environment (JREE)*, Vol. 3, (2016), 57-62. <https://doi.org/10.30501/jree.2016.70085>
9. Karimi, M., Asefnejad, A., Aflaki, D., Surendar, A., Baharifar, H., Saber-Samandari, S., Khandan, A., Khan, A., Toghraie, D., "Fabrication of shapeless scaffolds reinforced with baghdadite-magnetite nanoparticles using a 3D printer and freeze-drying technique", *Journal of Materials Research and Technology*, Vol. 14, (2021), 3070-3079. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2021.08.084>
10. Parin, F. N., Terzioğlu, P., Sicak, Y., Yildirim, K., Öztürk, M., "Pine honey-loaded electrospun poly (vinyl alcohol)/gelatin nanofibers with antioxidant properties", *The Journal of The Textile Institute*, Vol. 112, No. 4, (2021), 628-635. <https://doi.org/10.1080/00405000.2020.1773199>
11. Orshesh, Z., Hesaraki, S., Khanlarkhani, A., "Investigation of macroporous calcium phosphate cement obtained by foamed gelatin polymer", *Advanced Ceramics Progress (ACERP)*, Vol. 2, (2017), 18-24. <https://doi.org/10.30501/ACP.2016.70032>
12. Zhou, Z., Chen, J., Peng, C., Huang, T., Zhou, H., Ou, B., Chen, J., Liu, Q., He, S., Cao, D., Huang, H., Xiang, L., "Fabrication and physical properties of gelatin/sodium alginate/hyaluronic acid composite wound dressing hydrogel", *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry*, Vol. 51, No. (2014), 318-325. <http://dx.doi.org/10.1080/10601325.2014.882693>
13. Öfkeli, F., Demir, D., Bölgen, N., "Biomimetic mineralization of chitosan/gelatin cryogels and in vivo biocompatibility assessments for bone tissue engineering", *Journal of Applied Polymer Science*, Vol. 138, (2021), 1-12. <https://doi.org/10.1002/app.50337>
14. EzEldeen, M., Loos, J., Mousavi Nejad, Z., Cristaldi, M., Murgia, D., Braem, A., Jacobs, R., "A. Materials, O. Sciences, 3d-printing-assisted fabrication of chitosan scaffolds from different sources and cross-linkers for dental tissue engineering", *European Cells and Materials*, Vol. 40, (2021), 485-501. <https://doi.org/10.22203/eCM.v041a31>
15. Liu, Y. L., Su, Y. H., Lai, J. Y., "In situ crosslinking of chitosan and formation of chitosan-silica hybrid membranes with using γ-glycidoxypropyltrimethoxysilane as a crosslinking agent", *Polymer*, Vol. 45, (2004), 6831-6837. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2004.08.006>
16. Tonda-Turo, C., Gentile, P., Saracino, S., Chiono, V., Nandagiri, V. K., Muzio, G., Canuto, R. A., Ciardelli, G., "Comparative analysis of gelatin scaffolds crosslinked by genipin and silane coupling agent", *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 49, No. 4, (2011), 700-706. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.07.002>
17. Hong, J., Jung, D., Park, S., Oh, Y., Oh, K. K., Lee, S. H., "Immobilization of lactase via cross-linked enzyme aggregates prepared using genipin as a natural cross-linker", *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 169, (2021), 541-550. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.136>
18. Aidun, A., Zamanian, A., Ghorbani, F., "Novel bioactive porous starch-siloxane matrix for bone regeneration: Physicochemical, mechanical, and in vitro properties", *Biotechnology and Applied Biochemistry*, Vol. 66, (2019), 43-52. <https://doi.org/10.1002/bab.1694>
19. Sohrabi, M., Eftekhari Yekta, B., Rezaie, H., Naimi-Jamal, M. R., Kumar, A., Cochis, A., Miola, M., Rimondini, L., "Enhancing mechanical properties and biological performances of injectable bioactive glass by gelatin and chitosan for bone small defect repair", *Biomedicine*, Vol. 8, No. 12, (2020), 1-19. <https://doi.org/10.3390/biomedicine8120616>

- Materials Science and Engineering: C*, Vol. 33, No. 7, (2013), 3958-3967. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.05.039>
45. Feroz, S., Dias, G., "Hydroxypropylmethyl cellulose (HPMC) crosslinked keratin/hydroxyapatite (HA) scaffold fabrication, characterization and in vitro biocompatibility assessment as a bone graft for alveolar bone regeneration", *Heliyon*, Vol. 7, No. 11, (2021), e08294. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08294>
 46. Arabi, N., Zamanian, A., Rashvand, S. N., Ghorbani, F., "The tunable porous structure of gelatin-bioglass nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering applications: Physicochemical, mechanical, and in-vitro properties", *Macromolecular Materials and Engineering*, Vol. 303, No. 3, (2018), 1700539. <https://doi.org/10.1002/mame.201700539>
 47. Martins, A. M., Santos, M. I., Azevedo, H. S., Malafaya, P. B., Reis, R. L., "Natural origin scaffolds with in situ pore forming capability for bone tissue engineering applications", *Acta Biomaterialia*, Vol. 4, No. 6, (2008), 1637-1645. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.06.004>
 48. Madhumathi, K., Binulal, N. S., Nagahama, H., Tamura, H., Shalumon, K. T., Selvamurugan, N., Nair, S. V., Jayakumar, R., Canuto, R. A., Ciardell, G., "Preparation and characterization of novel β -chitin-hydroxyapatite composite membranes for tissue engineering applications", *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 44, No. 1, (2009), 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2008.09.013>
 49. Rasti, M., Hesaraki, S., Nezafati, N., "Effects of GPTMS concentration and powder to liquid ratio on the flowability and biodegradation behaviors of 45S5 bioglass/tragacanth bioactive composite pastes", *Journal of Applied Polymer Science*, Vol. 136, No. 22, (2019), 17-22. <https://doi.org/10.1002/app.47604>
 50. Mirhaj, M., Mahmoodi, M., Mirafzali, S. A., Alizadeh, M., Tavakoli, M., "Enhanced biomineralization of stem cells and adsorption of extracellular matrix proteins on bioactive scaffold reinforced with carboxylated multi-walled carbon nanotubes", *Journal of Advanced Materials and Technologies (JAMT)*, Vol. 10, No. 4, (2022), 89-106. <https://doi.org/10.30501/jamt.2021.278619.1164>
 51. Kiran, A. S. K., Kumar, T. S., Sanghavi, R., Doble, M., Ramakrishna, S., "Antibacterial and bioactive surface modifications of titanium implants by PCL/TiO₂ nanocomposite coatings", *Nanomaterials*, Vol. 8, No. 10, (2018). <https://doi.org/10.3390/nano8100860>
 52. Roh, H. S., Lee, C. M., Hwang, Y. H., Kook, M. S., Yang, S. W., Lee, D., Kim, B. H., "Addition of MgO nanoparticles and plasma surface treatment of three-dimensional printed polycaprolactone/hydroxyapatite scaffolds for improving bone regeneration", *Materials Science and Engineering C*, Vol. 74, (2017), 525-535. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.12.054>
 53. Hassanzadeh Nemati, N., Ghasempour, E., Zamanian, A., "Effect of dual releasing of β -glycerophosphate and dexamethasone from Ti nanostructured surface for using in orthopedic applications", *International Journal of Engineering, Transactions A: Basics*, Vol. 32, No. 10, (2019), 1337-1344. <https://doi.org/10.5829/ije.2019.32.10a.01>
 - for the antibiotic vancomycin", *International Journal of Pharmaceutics*, Vol. 557, (2019), 208-220. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.12.054>
 35. Liber-Kneć, A., Łagan, S., "Energy, surface testing of dental biomaterials—Determination of contact angle and surface free energy", *Materials*, Vol. 14, No. 11, (2021). <https://doi.org/10.3390/ma14112716>
 36. Koc, F. E., Altuncekic, T. G., "Investigation of gelatin/chitosan as potential biodegradable polymer films on swelling behavior and methylene blue release kinetics", *Polymer Bulletin*, (2020). <https://doi.org/10.1007/s00289-020-03280-7>
 37. Badawy, M. E., Taktak, N. E., Awad, O. M., Elfiki, S. A., El-Ela, N. E. A., "Preparation and characterization of biopolymers chitosan/alginate/gelatin gel spheres crosslinked by glutaraldehyde", *Journal of Macromolecular Science, Part B*, Vol. 56, No. 6, (2017), 359-372. <https://doi.org/10.1080/00222348.2017.1316640>
 38. Yang, G., Xiao, Z., Long, H., Ma, K., Zhang, J., Ren, X., Zhang, J., "Assessment of the characteristics and biocompatibility of gelatin sponge scaffolds prepared by various crosslinking methods", *Scientific Reports*, Vol. 8, (2018), 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20006-y>
 39. Sadeghinia, A., Soltani, S., Aghazadeh, M., Khalilifard, J., Davaran, S., "Design and fabrication of clinoptilolite-nanohydroxyapatite/chitosan-gelatin composite scaffold and evaluation of its effects on bone tissue engineering", *Journal of Biomedical Materials Research-Part A*, Vol. 108, No. 2, (2020), 221-233. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36806>
 40. Nie, L., Wu, Q., Long, H., Hu, K., Li, P., Wang, C., Sun, M., Dong, J., Wei, X., Suo, J., Hua, D., Liu, S., Yuan, H., Yang, S., "Development of chitosan/gelatin hydrogels incorporation of biphasic calcium phosphate nanoparticles for bone tissue engineering", *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, Vol. 30, No. 17, (2019), 1636-1657. <https://doi.org/10.1080/09205063.2019.1654210>
 41. Rezaei, H., Asefnejad, A., Joupari, M. D., Joughehdoust, S., "The physicochemical and mechanical investigation of siloxane modified gelatin/sodium alginate injectable hydrogels loaded by ascorbic acid and β -Glycerophosphate", *Materials Today Communications*, Vol. 26, (2020), 101914. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2020.101914>
 42. Adekogbe, I., Ghanem, A., "Fabrication and characterization of DTBP-crosslinked chitosan scaffolds for skin tissue engineering", *Biomaterials*, Vol. 26, (2005), 7241-7250. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.05.043>
 43. Peter, M., Ganesh, N., Selvamurugan, N., Nair, S. V., Furuike, T., Tamura, H., Jayakumar, R., "Preparation and characterization of chitosan-gelatin/nanohydroxyapatite composite scaffolds for tissue engineering applications", *Carbohydrate Polymer*, Vol. 80, No. 3, (2010), 687-694. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.11.050>
 44. Alizadeh, M., Abbasi, F., Khoshfetrat, A. B., Ghaleh, H., "Microstructure and characteristic properties of gelatin/chitosan scaffold prepared by a combined freeze-drying/leaching method",