

ساخت نانوالیاف فیبروئین ابریشم-کیتوسان به عنوان داربست برای مهندسی بافت غضروف مفصلی

Fabrication of silk fibroin-Chitosan nanofibers as tissue engineering scaffold for articular cartilage

آزاده جعفرزاده^۱، خسرو حسینی پژوه^{۲*}، مهران کیانی‌راد^۲

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد نانو بیو تکنولوژی، تهران، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، پژوهشکده بیوتکنولوژی

۲- تهران، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، پژوهشکده بیوتکنولوژی (صندوق پستی: ۳۳۱۳۱۹۳۶۸۵)

چکیده

نانوالیاف پلیمرهای طبیعی برای ساخت داربست‌های مورد استفاده در مهندسی بافت مورد توجه قرار گرفته‌اند زیرا می‌توانند بدرستی ریزمعماری ماتریکس خارج سلولی بافت طبیعی را تقلید کنند. در این تحقیق داربست نانوالیافی از فیبروئین ابریشم-کیتوسان با دو نسبت ۷۰-۳۰ و ۵۰-۵۰ از محلول فیروئین ابریشم ۱۰ درصد و کیتوسان ۵ درصد به روش الکتروریسی جهت استفاده در مهندسی بافت غضروف مفصلی طراحی و ساخته شد. مورفولوژی و قطر نانوالیاف بوسیله تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی تعیین شد. بررسی گروه‌های عاملی سطح با دستگاه طیف سنجی فرسوخ انجام شد و استحکام مکانیکی و کشسانی داربست نیز بررسی گردید. تخریب پذیری داربست با قرار گرفتن در بافر فسفات سالین برای ۲ ماه به طور هفتگی بررسی شد. آنالیز تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی، نانوالیافی با قطر میانگین $32/14 \pm 8/1$ و $51/24 \pm 8/5$ نانومتر به ترتیب برای نسبت ۷۰-۳۰ و ۵۰-۵۰ و با مورفولوژی یکنواخت و بدون مهره را نشان داد. استحکام مکانیکی در داربست ۵۰-۵۰ MPa ۰/۸۰ و در داربست ۷۰-۳۰ MPa ۰/۵۱ بود و به ترتیب پس از ۲/۸۰ درصد و ۴/۹۴ درصد افزایش از طول اولیه دچار شکست شدند. تخریب‌پذیری داربست ۷۰-۳۰ پس از ۱۲ هفته $0/9 \pm 6/16$ درصد و در داربست ۵۰-۵۰ $0/7 \pm 6/82$ درصد از کل وزن داربست بود. با توجه به نتایج، این داربست بخاطر سرعت آهسته تخریب پذیری در شرایط برون تنی و ماهیت پروتئینی آن و ساختار فییزیکی و مشخصات مکانیکی مناسب آن، می‌تواند بعنوان داربست مناسبی برای ترمیم بافت غضروف مفصلی معرفی شود و در این بین داربست ۷۰-۳۰ نسبت به ۵۰-۵۰ خواص کشسانی و استحکام مکانیکی بهتری دارد.

مقدمه

آرتروز یا آسیب به غضروف در نتیجه آسیب‌دیدگی، افزایش سن و کشیدگی یا پارگی طولانی مدت غضروف از بیماری‌های شایع و ناتوان کننده رایج است. خودترمیمی غضروف به دلیل تراکم کم کندروسیت‌ها (سلول‌های غضروفی)، عدم تحرک آن‌ها در ECM (ماتریکس خارج سلولی) متراکم و متابولیسم پایین آنها و همچنین خود بافت غضروف که فاقد رگ، لنف و عصب در آن است، محدود است [۱-۳] و لذا محدودیت عمده آن عدم توانایی در درمان حتی در جراحات جزئی است [۴]. در موارد شدید برای درمان غضروف آسیب دیده و باز گرداندن توانایی به بیمار نیاز به مداخلات جراحی است. نتایج پروتکل‌های درمانی مرسوم در دراز مدت رضایت

بخش نبوده است، بنابراین نیاز به توسعه نسل جدیدی از جایگزین‌های غضروفی برای ترمیم بافت غضروف که طول عمر بیشتری داشته باشد ضروری به نظر می‌رسد [۳]. بر این اساس، توجه به مهندسی بافت جهت ترمیم، بازسازی و یا بهبود قابلیت‌های غضروف آسیب دیده امیدواری‌هایی را برای درمان این ضایعات بوجود آورده است [۵، ۶]. مهندسی بافت شامل کشت سلول‌های بافت مورد نظر یا سلول‌های بنیادی قابل تمایز به بافت هدف بر روی محیط سه‌بعدی است که بتواند شرایط لازم جهت رشد آن بافت را فراهم کند [۲]. بنابراین داربست یک جزء مهم در مهندسی بافت است. داربست باید دارای ساختار سه بعدی باشد که از بیوپلیمرهای طبیعی و یا سنتزی زیست‌تخریب‌پذیر ساخته می‌شود تا مقلد عملکرد

کلمات کلیدی

مهندسی بافت،
الکتروریسی،
نانوالیاف،
فیبروئین ابریشم،
کیتوسان

از دو محلول و نیز تعیین نسبت‌های مناسب هریک از این محلول‌ها الکتروروسی (توسط دستگاه مدل CO881007NYI، شرکت نانو ساختار آسیا ANSTCO) انجام گردید. الیاف الکتروروسی شده بر روی فویل‌های آلومینیوم پیچیده شده دور کالکتور، جمع شدند و برای تصویربرداری SEM نگهداری شدند.

تعیین قطر الیاف با میکروسکوپ SEM: به منظور اندازه‌گیری قطر نانوالیاف و مورفولوژی آنها از تصویر میکروسکوپ الکترونی گسیل الکترونی FE-SEM (ساخت شرکت TESCAN) استفاده شد. در این تکنیک ابتدا نانوالیاف توسط دستگاه کندوپاش به مدت ۲ دقیقه با لایه‌ای از طلا پوشیده شد و سپس تصویر SEM در ولتاژ ۷ کیلوولت از آنها گرفته شد.

پس از تهیه تصاویر SEM و تعیین قطر و مورفولوژی الیاف، ولتاژ ۱۵ کیلوولت، فاصله ۱۴ سانتی‌متر با نرخ تزریق ۰/۶ ml/h برای ساخت هر دو داربست انتخاب شد [۷، ۱۸، ۱۹]. الکتروروسی تحت شرایط بالا به مدت ۸ ساعت انجام شد تا ضخامت لازم برای ایجاد یک داربست مناسب جهت مهندسی بافت را ایجاد کنند.

تیمار شیمیایی: به منظور کاهش انحلال‌پذیری نانوالیاف تهیه شده در محیط‌های آبی، داربست‌های تهیه شده به مدت ۳۰ دقیقه تحت تیمار شیمیایی اتانول / آمونیاک با غلظت ۷۰٪ / ۷۰٪ در آب قرار گرفتند [۷]. این عمل باعث تغییر در گروه‌های عاملی پلیمرها بر سطح نانوالیاف شده و نانوالیاف به شکل نامحلول در آب در می‌آیند.

بررسی تغییرات گروه‌های عاملی با استفاده از بررسی طیف FTIR: برای بررسی تغییرات ایجاد شده بر پلیمرها از این تکنیک استفاده شد. گروه‌های عاملی متصل به پلیمرها، قبل از تشکیل نانوالیاف و بعد از ترکیب پلیمرها با یکدیگر و تشکیل نانوالیاف، با ارزیابی طیف FTIR (PerkinElmer®) آن‌ها از ۴۰۰ تا ۴۰۰۰ cm⁻¹ با دقت ۲ cm⁻¹ مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی درصد تخریب‌پذیری داربست در شرایط برون تنی: برای بررسی میزان تخریب‌پذیری نانوالیاف ساخته شده قطعات یکسان با سایز ۳×۱ cm² سانتی‌متر از داربست‌فیروئین- کیتوسان ۵۰-۵۰ بریده شده و برای ۱۲ هفته در PBS قرار داده شد (چهار تکرار). با بررسی اختلاف وزن اولیه و ثانویه (مطابق رابطه ۱) بصورت هفتگی درصد تخریب‌پذیری نانوالیاف محاسبه شد. [۲۰، ۲۱].

$$\text{Degradation Rate} = (W_0 - W) / W_0 \times 100 \quad (1)$$

که در این رابطه W_0 وزن اولیه و W وزن در زمان اندازه‌گیری است. بررسی استحکام مکانیکی داربست: استحکام مکانیکی نانوالیاف ساخته شده به عنوان یک جایگزین بافت در برابر فشار و کشش وارده به آن با دستگاه Instron® (Santam-STM20) انجام گرفت این دستگاه با اعمال نیرو بر پلیمر باعث تغییر طول اولیه آن شده و میزان الاستیسیته پلیمر نشان داده می‌شود [۲۲، ۲۳]. این بررسی با سه تکرار بر هر دو داربست مورد بررسی ۷۰-۳۰ و ۵۰-۵۰ به ترتیب از محلول ۱۰ درصد فیروئین ابریشم و محلول ۵ درصد کیتوسان و بر قطعاتی به طول ۴ و عرض ۱ سانتی‌متر و ضخامت ۰/۲۵ میلی‌متر و با سرعت تست ۱۰ mm/min انجام شد. فرمول محاسبه به صورت رابطه ۲ است.

فیزولوژیکی ECM باشد و تا زمان شکل‌گیری بافت (به طور موقت)، جایگزین ماتریکس سلولی شود. داربست باید
 (۱) زیست تخریب‌پذیر و بدون محصولات جانبی سمی باشد
 (۲) متخلخل باشد تا اجازه نفوذ مواد غذایی و مواد زائد را بدهد
 (۳) از تکثیر، تمایز سلول و تولید ECM پشتیبانی کند
 (۴) قادر به ادغام با بافت در محل آسیب باشد و
 (۵) از بافت مهندسی شده پشتیبانی مکانیکی کند. نانوالیاف‌ها به دلیل نسبت بالای سطح به حجم، تخلخل بالا، زیست مقلدی ساختار و عملکرد ماتریکس خارج سلولی (ECM) گزینه مناسبی برای ساخت داربست‌ها هستند [۷].

برای مثال کلاژن عمده‌ترین جزء ECM ضخامت ۳۰-۳۰۰ نانومتری دارد [۸]. همچنین نانوالیاف کشش مقاومتی بیشتری از میکروالیاف‌ها دارند که این ویژگی برای داربست‌های بافت غضروف مفید است. داربست‌های مختلفی برای ترمیم بافت غضروف مفصلی مورد بررسی قرار گرفته شده است که هر کدام معایب و محاسنی داشته‌اند [۹-۱۱]. هدف از این تحقیق عبارت بوده است ساخت داربست نانوالیاف کیتوسان / فیروئین ابریشم مناسب در مهندسی بافت غضروف مفصلی.

مواد و روش‌ها

استخراج فیروئین ابریشم: فیروئین ابریشم از پیل‌های کرم ابریشم (شرکت سهامی کرم ابریشم ایران) استخراج و تخلیص شد. بدین صورت که پیل‌های کرم ابریشم، پس از پاکسازی به قطعات کوچکی تقسیم و در محلول NaHCO₃ با غلظت ۵٪ (w/w) به مدت ۳۰ دقیقه جوشانده شد [۱۲، ۱۳]. این مرحله برای حذف سرپسین از ابریشم انجام شد [۱۴]. ابریشم صمغ‌زدایی شده (فیروئین خام) پس از خشک شدن، در یک حلال از ترکیب کلسیم کلراید (Merck) / اتانول / آب با نسبت‌های مولی ۸/۲/۱ برای چهار ساعت در دمای ۵۵ درجه حل شد [۱۵]. پس از حل شدن فیروئین، محلول حاصل در کیسه دیالیز ریخته و در آب مقطر دیالیز شد. آب مقطر هر ۸ ساعت یک بار برای مدت سه روز تعویض شد [۱۶]. در هر بار تعویض آب مقطر، میزان TDS و pH آن اندازه‌گیری شد. پس از خارج شدن املاح و پایان دیالیز محلول حاصل که کاملاً شفاف بود لیوفیلیزه شد و سپس از نمونه حاصل، طیف FTIR گرفته شد.

الکتروروسی و تولید نانوالیاف: پیش از ساخت نانوالیاف، پلیمرهای استفاده شده باید در حلال مناسب آن حل شوند. حلال TFA:DCM با نسبت ۷:۳ برای انحلال دو پلیمر کیتوسان و فیروئین ابریشم انتخاب شد [۷، ۱۷]. برای این منظور غلظت‌های مختلفی از فیروئین ابریشم (۷ تا ۱۲ درصد) و کیتوسان (۲ تا ۸ درصد) در این حلال تهیه شد.

برای ساخت نانوالیاف، محلول حاوی دو پلیمر فیروئین ابریشم و کیتوسان با غلظت‌های ذکر شده، با هم ترکیب شده و به یک سرنگ ۱۰ ml با سوزن گوژ ۲۱ منتقل شد و در ولتاژ ۱۵ کیلوولت و فاصله ۱۴ سانتی‌متر برای تشکیل لیف بررسی شدند. نمونه‌های بسیار غلیظ (زلی شکل) و بسیار رقیق برای الکتروروسی استفاده نشدند. پس از بررسی بهترین غلظت‌ها

به تشکیل مخروط تیلور نبود. در نتیجه محلول ۴ و ۵ درصد کیتوسان برای الکتروریسی انتخاب شد. در مورد فیبروئین ابریشم نیز محلول‌های ۷ و ۸ بسیار رقیق و ۱۲ درصد بسیار غلیظ بوده و در نتیجه محلول ۹، ۱۰ و ۱۱ درصد وزنی برای الکتروریسی انتخاب شدند. مخلوطی از دو پلیمر فیبروئین ابریشم با غلظت‌های ۹، ۱۰ و ۱۱ درصد و کیتوسان با غلظت‌های ۴ و ۵ درصد با نسبت‌های ۷۰-۳۰ تحت فواصل مختلف در دستگاه و ولتاژدهی مختلف قرار گرفت که تنها مخلوط ۷۰-۳۰ از محلول فیروئین ابریشم ۱۰ درصد و کیتوسان ۵ درصد در فاصله ۱۴ سانتی متر و ولتاژ ۱۵ کیلوولت قادر به تشکیل نانوالیاف بود. تصویر SEM تهیه شده موبد آن است که شرایط ولتاژ ۱۵ کیلوولت و فاصله ۱۴ سانتی متر شرایط بهینه برای ساخت داربست نانوالیاف الکتروریسی شده بود. داربست با مخلوط ۵۰:۵۰ نیز در همین شرایط تهیه شد. در بین محلول‌های تهیه شده پس ارزیابی، نسبت‌های ۵۰-۵۰ و ۷۰-۳۰ به ترتیب از محلول حاوی فیبروئین ۱۰٪ و کیتوسان ۵٪ بهتر از سایر غلظت‌ها و نسبت‌ها لیف تشکیل دادند.

میانگین قطر نانوالیاف فیبروئین ابریشم/کیتوسان با نسبت ۷۰-۳۰ و ۵۰-۵۰ به ترتیب ۳۲/۵۲ ± ۱۴۸/۸ و ۵۱/۲۴ ± ۱۳۸٫۵ نانومتر بود (شکل ۱). شکل ۲ نیز نمودار توزیع قطر نانوالیاف مذکور را به ترتیب در نسبت‌های ۷۰-۳۰ و ۵۰-۵۰ و شکل ۳ مقایسه میانگین قطر این نانوالیاف را در نسبت‌های فوق نشان می‌دهد.

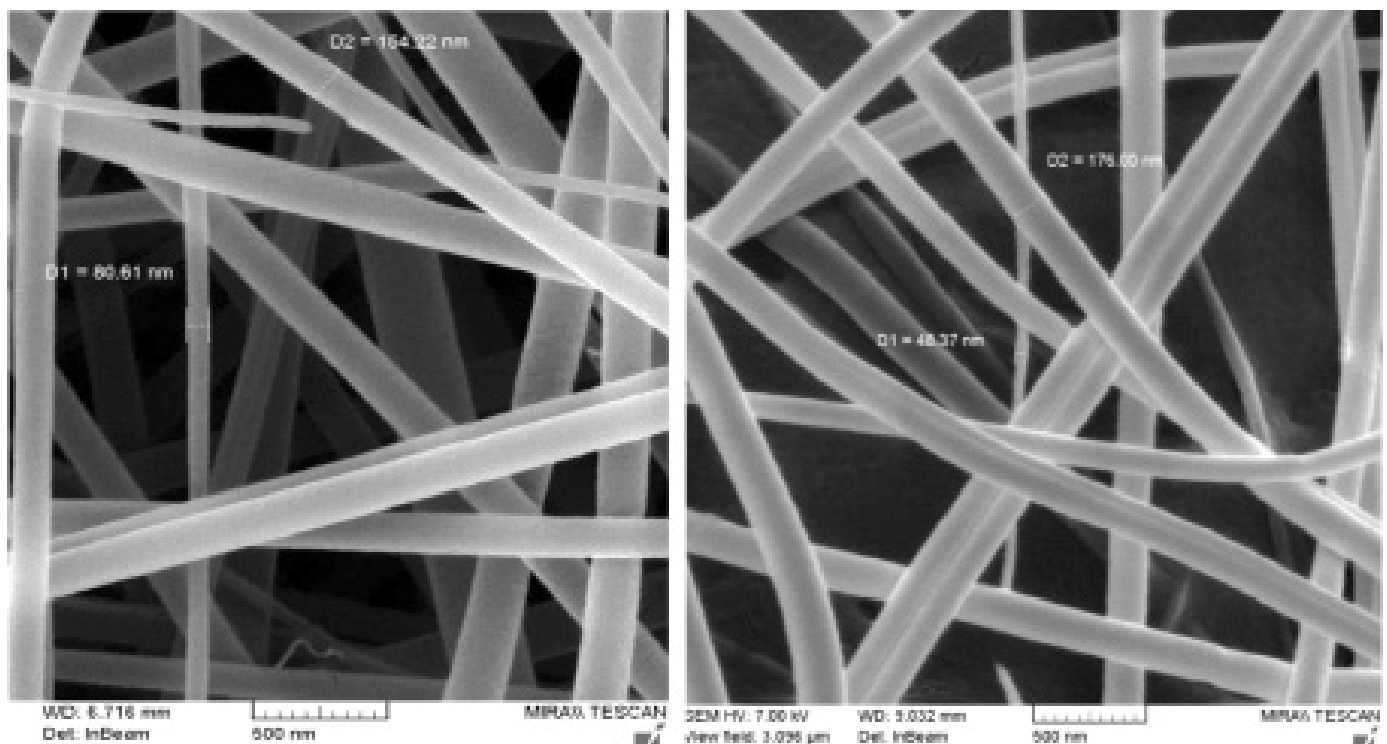
طیف FTIR نانوالیاف: برای بررسی تغییرات گروه‌های عاملی فیبروئین ابریشم و کیتوسان بکار رفته در ساخت این داربست، از طیف FTIR استفاده شد. در این بررسی از پلیمر فیبروئین ابریشم و کیتوسان به عنوان

$$E = \sigma / \varepsilon \quad (2)$$

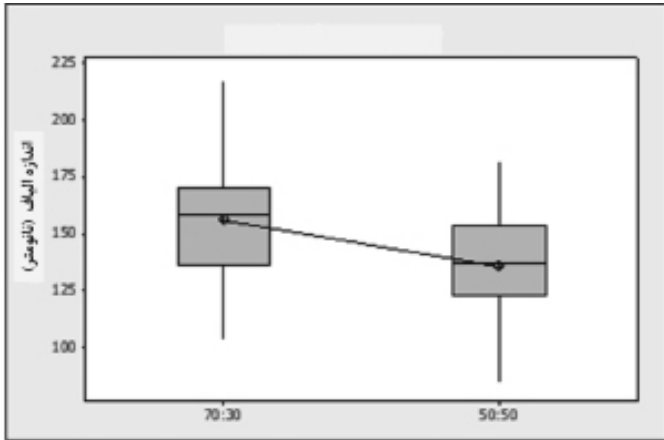
که در این رابطه E مدول یانگ، σ میزان تنش وارده و ε میزان کرنش می‌باشد. واحد مدول یانگ MPa است.

نتایج

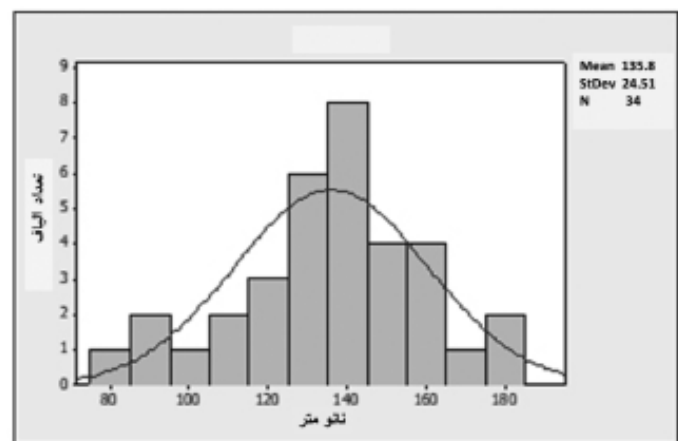
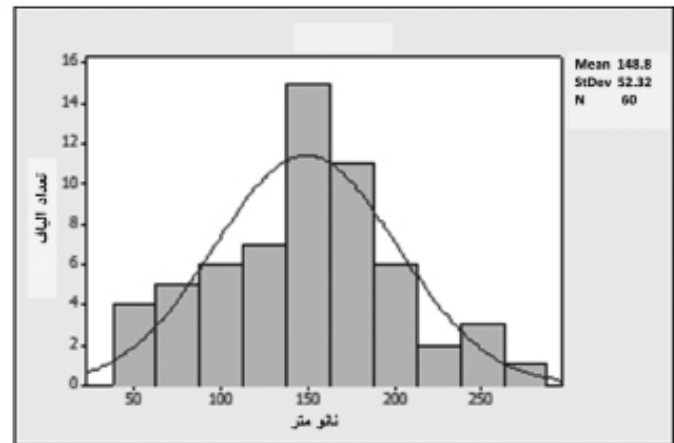
فیبروئین استخراج شده: در مراحل استخراج فیبروئین، پس از حل شدن فیبروئین خام در حلال سه‌گانه، میزان pH، هدایت الکتریکی یا EC (برحسب میکرو زیمنس بر سانتیمتر $(\mu S/cm)$) و مجموع نمک‌های حل شده یا TDS (mg/L) نمونه پیش از دیالیز کردن و در طی تعویض آب مقطر (هر هشت ساعت) و در پایان کار اندازه‌گیری شد. پس از طی شدن سه روز، EC و TDS تعویضی اندازه‌گیری شد که به ترتیب از ۱۲۰۰ و ۱۷۱۸۱ به ۱/۵۲ و ۲/۷۴ رسیدند که مقادیر آن برابر با EC و TDS آب مقطر بود. pH نیز از ۳/۵۹ به ۷/۳۲ رسید. که نشان از جداسدن نمک‌ها (نظیر $CaCl_2$) از فیبروئین و pH نرمال برای فیبروئین استخراج شده بود. برای ساخت نانوالیاف فیبروئین ابریشم-کیتوسان نسبت‌های ۷۰-۳۰ و ۵۰-۵۰ از محلول فیبروئین ابریشم (۷ تا ۱۲ درصد) و کیتوسان (۲ تا ۸ درصد) با هم ترکیب و بررسی شدند. پلیمر محلول کیتوسان با غلظت‌های ۶، ۷ و ۸ درصد وزنی بسیار ویسکوز بوده و ساختاری شبیه به ژل پیدا کرد. در نتیجه این مقادیر برای الکتروریسی استفاده نشد. در مقابل در غلظت‌های ۲ و ۳ درصد وزنی نیز که ویسکوزیته آن بسیار پایین بود قادر



شکل ۱: تصویر SEM با بزرگنمایی ۵۰۰ نانومتر از نانوالیاف فیبروئین ابریشم-کیتوسان با نسبت ۷۰-۳۰ (راست) و نسبت ۵۰-۵۰ (چپ)



شکل ۳: نمودار مقایسه میانگین قطر نانوالیاف فیبروئین ابریشم - کیتوسان در نسبت‌های ۵۰-۵۰ و ۳۰-۷۰ (P-Value: 0.003)



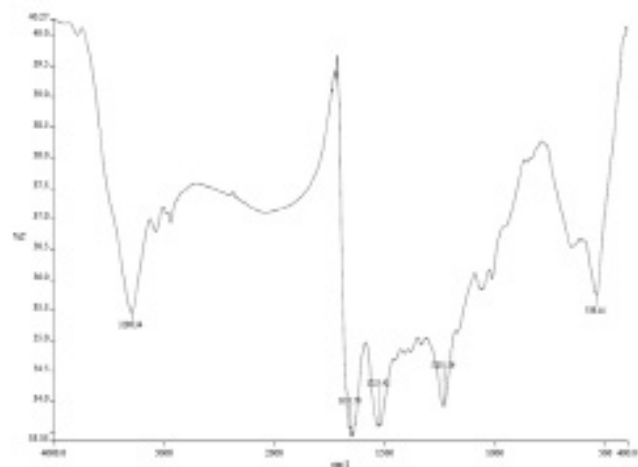
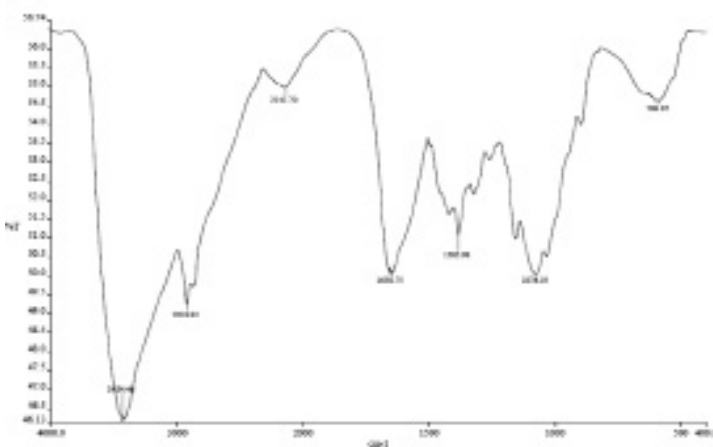
شکل ۲: نمودار توزیع قطر نانوالیاف فیبروئین ابریشم- کیتوسان با نسبت ۳۰-۷۰ (بالا) و ۵۰-۵۰ (پایین)

پس از ۱۲ هفته $6/16 \pm 0/9$ درصد و داربست ۵۰-۵۰، $6/82 \pm 0/7$ از کل وزن داربست بود (شکل ۷).
مقاومت مکانیکی: استحکام مکانیکی و نتایج تغییرات طول نمونه‌ها نسبت به نیروی وارده (نمودار تنش - کرنش) داربست‌های ساخته شده در شکل ۸ و خواص مکانیکی آن در جدول ۱ آمده است.

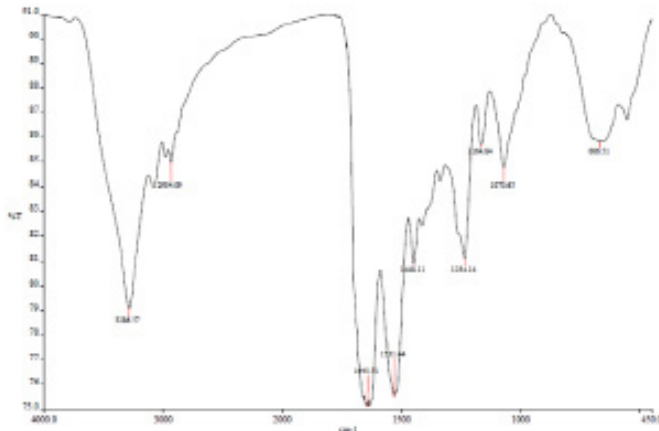
بحث

داربست‌های پلیمری سه بعدی که دارای تخلخل بالا، سایز حفره مناسب و استحکام مکانیکی مطلوب برای کاربردهای مهندسی بافت باشند مورد توجه اند. از داربست‌های متنوعی برای تمایز کندروژنیک استفاده شده است که هر یک محاسن و معایبی دارد
آنچه که در ساخت داربست مناسب جهت مهندسی بافت یک چالش دیگر محسوب می‌شود انتخاب پلیمر یا پلیمرهای مناسب برای ساخت داربست جهت بافت مورد نظر می‌باشد. در کاربردهای زیست پزشکی

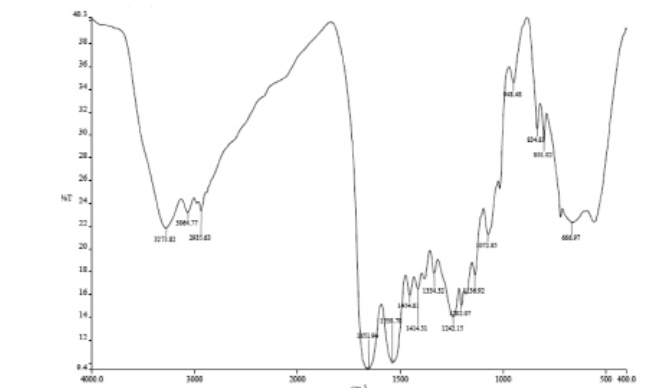
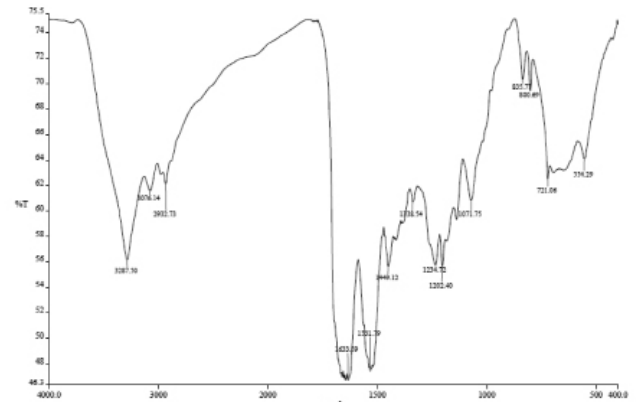
کنترل استفاده شد و نتایج آن با طیف داربست ۵۰-۵۰ و ۳۰-۷۰ و همچنین طیف داربست تیمار شیمیایی شده، مقایسه شد (اشکال ۴-۶).
بررسی خواص تخریب پذیری: در بررسی میزان تخریب پذیری نانوالیاف ساخته شده درصد تخریب داربست نانوالیاف فیبروئین- کیتوسان ۳۰-۷۰



شکل ۴ طیف FTIR از نمونه فیبروئین (راست) کیتوسان (چپ) استخراج شده



شکل ۶- نمودار طیف FTIR از داربست ۵۰:۵۰ بعد از تیمار شیمیایی

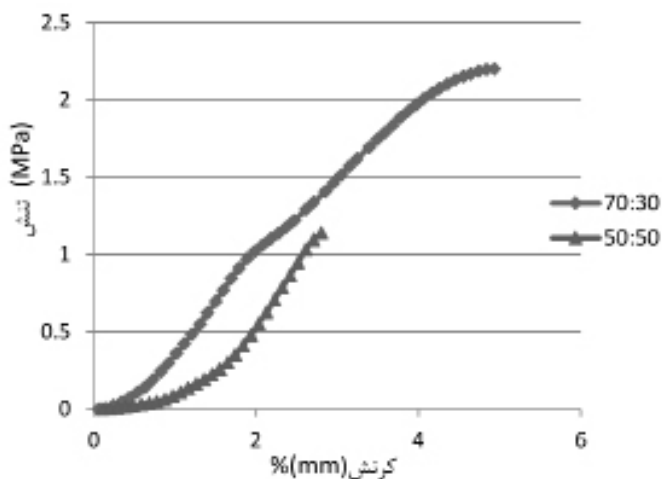


شکل ۵- نمودار طیف FTIR از داربست نانوالیاف فیبروئین ابریشم- کیتوسان با نسبت ۵۰-۵۰ (بالا) و ۷۰-۳۰ (پایین)

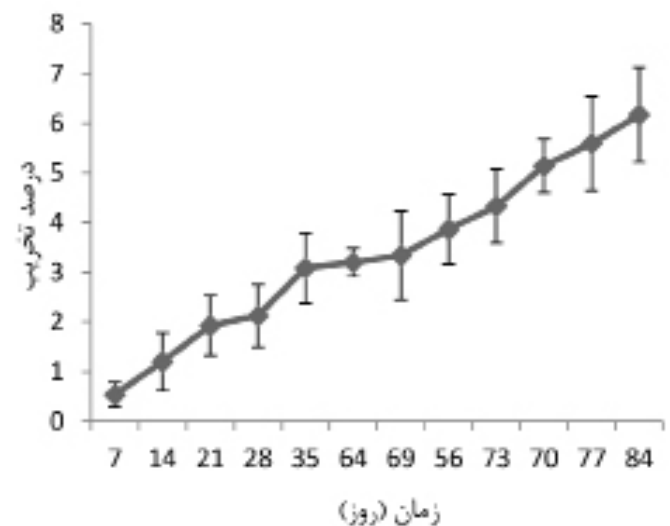
پلیمرهای مصنوعی گرچه ویژگی‌های مکانیکی مناسبی برای طراحی بافت دارند، اما برخی از آن‌ها دارای معایبی است از جمله: برخوردار نبودن از زیست سازگاری مناسب و عدم چسبندگی سلولی. جلوگیری از رشد سلول‌ها در یک ساختار سه بعدی ناشی سطح آب‌گریز آن‌ها [۲۶ و ۲۷]. کمبود گروه‌های فعال در دسترس که باعث می‌شود سطوح این پلیمرها به آسانی قادر به تغییر و اصلاح نباشند [۲۸]. در مورد انواع داربست‌های طبیعی مهم نیز معایبی وجود دارد. ژل‌های کلاژن از پایداری کمی برخوردار است و فاقد ویژگی‌های مکانیکی مناسب است، همچنین سرعت تخریب بالایی دارد. به‌علاوه داربست‌های کلاژن موجب جمع‌شدگی و چروک بافت شده و بر رشد و مهاجرت سلول‌ها تأثیر منفی می‌گذارد [۲۹].

تحقیقات نشان می‌دهد که پلیمر طبیعی کیتوسان به دلیل فقدان اجزای ماتریکس خارج سلولی فعال، برای طراحی بافت غضروفی کافی نیست و باید همراه با دیگر ترکیبات به کار رود [۳۰]. یکی از ترکیباتی که می‌تواند همراه کیتوسان بکار رود فیبروپپین ابریشم است. در سال‌های اخیر فیبروئین ابریشم به دلیل خواص خوب از جمله جرم مخصوص کم، استحکام بالا

، شیمی مواد، وزن مولکولی، حلالیت، شکل و ساختار، آبدوستی یا آبگریزی، انرژی سطح، تخریب حاصل از جذب آب و مکانیزم فرسایش [۶] هر یک معیارهایی است که در نهایت سبب تعیین زیست سازگاری، زیست تخریب پذیری، پایداری مکانیکی، چسبندگی بالای سلولی [۲۴]، قابلیت استریلیزاسیون و عدم خوردگی در pH و دمای محیط بدن [۲۵]، آن پلیمر می‌شود. بنابراین چالش بر سر انتخاب یک پلیمر برای ساخت داربست مطلوب جهت مهندسی بافت غضروف همپنان ادامه دارد.



شکل ۸: نمودار تنش - کرنش دو داربست نانوالیاف فیبروئین ابریشم - کیتوسان با نسبت‌های ۵۰:۵۰ و ۳۰:۷۰. شیب نمودار بیانگر مدول یانگ است



شکل ۷- نمودار درصد تخریب داربست فیبروئین ابریشم- کیتوسان ۷۰-۳۰

جدول ۱: خواص مکانیکی برای هر دو نوع داربست

نوع داربست	مقاومت تا حد پارگی (MPa)	ازدیاد طول تا پارگی (%)	مدول یانگ (MPa)
۵۰:۵۰	۰/۰۳±۱/۱۴	۰/۰۴ ± ۲/۸	۰/۰۲±۰/۸۰
۷۰:۳۰	۰/۲ ± ۲/۲	۰/۰۳±۴/۹۴	۰/۰۸±۰/۵۱
روناس	۱۰/۸۷	۳۴	۲/۰۵

و ولتاژ ۱۸ کیلوولت) [۷]. قطر میانگین تمامی موارد ذکر شده و پراکندگی سائز آن‌ها بیش از قطر میانگین نانوالیاف ساخته شده در این تحقیق بوده است. تناسب ولتاژ و فاصله (ولتاژ ۱۵ کیلوولت و فاصله ۱۴ سانتی‌متر) همراه با غلظت مناسب این دو پلیمر (کیتوسان ۵٪ و فیبروئین ۱۰٪) در مطالعه حاضر نتایج مطلوبی را ارائه داده است.

در نمودار طیف FTIR تهیه شده از فیبروئین ابریشم سه گروه آمیدی پلیمر فیبروئین (آمید I، II و III) در عدد موجی 1651 cm^{-1} (آمید I)، 1525 cm^{-1} (آمید II) و 1231 cm^{-1} (آمید III) کاملاً مشهود است که مشخصه سه گروه آمیدی در پلیمر فیبروئین ابریشم می‌باشد و بیانگر خالص شدن این پلیمر از سرسین می‌باشد. در حقیقت محدوده ۶۰۰ تا ۱۴۰۰ محدوده پیوندهای یگانه مانند C-O، C-C و C-N است. محدوده ۱۵۲۰-۱۸۰۰ محدوده باندهای دوگانه C=O، C=C و C=N می‌باشد این محدوده مربوط به گروه‌های (کربوکسیل و آمین) شرکت کننده در ساختارهای اولیه و ثانویه پروتئین‌هاست. محدوده ۲۰۰۰ تا ۲۵۰۰ محدوده باندهای سه گانه C≡N و C≡C است که ماده حاضر خالی از این ترکیبات است. محدوده ۲۷۰۰ تا ۳۵۰۰ نیز محدوده پیوندهای یگانه متصل به هیدروژن O-H، C-H و N-H می‌باشد.

می و همکاران در سال ۲۰۱۰ طی تحقیقی نتایج طیف FTIR از فیبروئین ابریشم را منتشر کردند که پروتئین اعداد موجی 1657 cm^{-1} (آمید I)، 1536 cm^{-1} (آمید II) و 1235 cm^{-1} (آمید III) را نشان داد [۳۵].

در تحقیق دیگری که توسط چن و همکارانش در سال ۲۰۱۲ بر روی نانوالیاف فیبروئین ابریشم صورت گرفته، عدد موجی سه گروه‌های آمیدی برای فیبروئین ابریشم را به ترتیب در 1650 cm^{-1} (آمید I)، 1527 cm^{-1} (آمید II) و 1235 cm^{-1} (آمید III) گزارش شده است [۷]. طیف FTIR فیبروئین خالص در این تحقیق منطبق بر طیف‌های FTIR گزارش شده از فیبروئین خالص در سایر تحقیقات بوده است. در مقابل پلیمر کیتوسان تنها دارای گروه آمید I، (ناحیه ۱۶۵۰) می‌باشد. کیتوسان در ناحیه ۱۳۸۳ باند قوی دارد که مربوط به گروه‌های C-H، C-C و C-O-H می‌باشد.

پس از تشکیل نانوالیاف باند ۱۶۵۰ و ۱۶۵۱ گروه آمید I در کیتوسان و فیبروئین ابریشم به سمت ۱۶۴۳ شیفت می‌دهد (گروه C=O) که این ناحیه مربوط به ساختار β -sheet بوده و باعث می‌شود ساختار حالت کریستالی تری بیاید و این روند سرعت تخریب را کاهش می‌دهد (ساختار کریستالی دیرتر از آمورف تخریب می‌شوند). این باند در ترکیب فیبروئین با کیتوسان پهن‌تر شده است. باند ۱۵۲۵ مربوط به گروه آمید II در فیبروئین نیز به سمت ۱۵۳۸ شیفت داده است. آمید III ارتباط چندانی با ساختار ثانویه ندارد.

در داربست ۷۰-۳۰ که غلظت کیتوسان کمتر و فیبروئین بیشتر است دو

مقاومت و سازگاری زیستی با بدن موجود زنده نظر محققان در زمینه الیاف و پزشکی به خود جلب نموده است. داربست‌های به وجود آمده در مهندسی بافت باید خصوصیات شیمیایی سطحی مناسبی را داشته باشند تا پس از کشت سلولی چسبندگی و اتصال مناسبی بین سلول‌ها و داربست به وجود آید. از ترکیب فیبروئین و کیتوسان برای ساخت داربست‌هایی جهت کشت کراتینوسیت‌ها [۳۱]، کندروسیت‌ها [۳۲ و ۳۳] به کار رفته است.

این بررسی با هدف ساخت داربستی از فیبروئین ابریشم و کیتوسان بود که بتواند بیشترین مشابهت را با ماتریکس خارج سلولی بافت غضروف مفصلی داشته باشد.

در بین محلول‌های تهیه شده پس ارزیابی، نسبت‌های ۵۰-۵۰ و ۷۰-۳۰ به ترتیب از محلول حاوی فیبروئین ۱۰٪ و کیتوسان ۵٪ بهتر از سایر غلظت‌ها و نسبت‌ها لیف تشکیل دادند. میانگین قطر نانوالیاف فیبروئین ابریشم / کیتوسان با نسبت ۷۰-۳۰ و ۵۰-۵۰ به ترتیب $148/8 \pm 52/32$ و $138/5 \pm 24/51$ نانومتر بود. مقایسه میانگین قطر نانوالیاف ساخته شده با نسبت ۷۰-۳۰ و ۵۰-۵۰ بیانگر کاهش قطر میانگین در نانوالیاف با نسبت ۵۰-۵۰ است که به نظر می‌رسد با افزایش نسبت کیتوسان میانگین قطر نانوالیاف نیز کاهش یافته است.

مقایسه نانوالیاف کیتوسان- فیبروئین ابریشم ساخته شده با سایر تحقیقات انجام شده نشان از کاهش سائز این نانوالیاف و پراکندگی کمتر آنها در تحقیق حاضر دارد. در تحقیقی که توسط کای و همکارانش در سال ۲۰۱۱ برای تهیه نانوالیاف کیتوسان- فیبروئین ابریشم انجام شد، قطر میانگین نانوالیاف $249/7 \pm 157/1$ نانومتر برای نسبت ۸۰-۲۰ این دو پلیمر و قطر میانگین $214 \pm 108/7$ برای نسبت ۵۰-۵۰ از مخلوط فیبروئین ۱۲٪ و کیتوسان ۶٪ گزارش شد (شرایط الکتروریسی برای این نانوالیاف ۲۰ کیلوولت و فاصله ۱۲ سانتی متر بود) [۱۹]. پینگ چن و همکاران قطر میانگین نانوالیافی برابر با 215 ± 95 نانومتر برای نسبت ۷۵-۲۵ و 447 ± 168 نانومتر را برای نسبت ۵۰-۵۰ فیبروئین- کیتوسان گزارش کردند (شرایط الکتروریسی نانوالیاف ۱۸ کیلوولت و فاصله ۱۶ سانتی متر با کیتوسان ۸٪ و فیبروئین ۱۲٪ بود) [۷].

تحقیق دیگری توسط ژیانگژین و همکارانش در سال ۲۰۱۳ قطر نانوالیاف ۳۰۰ تا ۵۰۰ نانومتر گزارش شد برای ساخت مخلوط این دو پلیمر صورت گرفت. غلظت فیبروئین ابریشم در این تحقیق ۱۰٪ و کیتوسان ۳٪ بوده و شرایط الکتروریسی برای نانوالیاف ولتاژ ۱۶ کیلوولت و فاصله ۱۲ سانتی متر بود. [۳۴].

Jyun و همکارانش در سال ۲۰۱۴، نانوالیافی با قطر میانگین $167/48 \pm 446/93$ نانومتر با نسبت ۵۰-۵۰ از مخلوط کیتوسان ۶٪ و فیبروئین ۱۲،۵٪ تولید کردند (شرایط الکتروریسی برای الیاف فاصله ۱۲ سانتی متر

این پلیمر و عدم حالت ارتجاعی در آن است. Yin و همکارانش در سال ۲۰۱۱ فیبروئین ابریشم - ژلاتین را طراحی نمودند که مدول یانگ اندازه گیری شده در بررسی استحکام مکانیکی از این داربست مدول یانگ $16/79 \text{ MPa}$ و نقطه شکست $1/07 \text{ MPa}$ را نشان داد که بیانگر حالت ارتجاعی کمتر از داربست حاضر است [۴۱]. Gui و همکارانش در سال ۲۰۱۱ داربست نانوالیاف فیبروئین ابریشم - پلی لاکتیک - ژلاتین را طراحی کردند. آنها مدول یانگ محاسبه شده در بررسی مکانیکی را برای داربست حاصل از این سه پلیمر $2/2 \text{ MPa}$ گزارش کردند [۴۲]. در سال ۲۰۱۲ ژانگ و همکارانش در بررسی‌های مقاومت کششی داربست فیبروئین ابریشم - کیتوسان با نسبت ۸۰-۲۰ را دارای استحکام کششی $1/99 \text{ MPa}$ گزارش کردند [۲۳] که این رقم در داربست حاضر با نسبت ۷۰-۳۰ به $2/2 \text{ MPa}$ افزایش یافته که بیانگر استحکام بیشتر در نسبت‌های ۷۰-۳۰ در این داربست است. از طرفی مقایسه مدول یانگ این دو داربست با یکدیگر بیانگر این است که داربست نانوالیاف فیبروئین ابریشم - کیتوسان ۷۰-۳۰ نسبت به ۵۰-۵۰ خواص کشسانی و استحکام مکانیکی بهتری دارد.

در یک بررسی اخیرا انجام شده بر روی مواد زیستی مبتنی بر ابریشم برای مهندسی بافت غضروف، نشان داده شده است که امکان استفاده بالینی از سازه‌های مبتنی بر فیبروئین ابریشم در ترمیم دیسک بین مهره‌ای، رباط صلیبی قدامی، منیسک و نقایص پوکی استخوان وجود دارد [۴۳]. همچنین با استفاده از روش ساده‌ای از تجمع ریز ذرات فیبروئین ابریشم یک داربست سه بعدی مشابه بافت استخوان اسفنجی به دست آمده است [۴۴].

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل در این تحقیق بیانگر این است که داربست نانوالیاف فیبروئین ابریشم - کیتوسان تولید شده دارای ویژگی‌های برتری نسبت به سایر داربست‌های پلیمری طبیعی است. ترکیب پلیمر فیبروئین ابریشم با کیتوسان، خواص تخریب پذیری پلیمر کیتوسان را که سرعت تخریب بالایی دارد، بسیار بهبود بخشیده و ساختاری منظم و مستحکم تر یافته است و استفاده از ولتاژ فاصله مناسب تیپ تا کالکتور با نرخ تزریق ml/h $0/6$ ، نانوالیاف فیبروئین ابریشم - کیتوسان با میانگین خوب ایجاد کرده است که نسبت به سایر داربست‌های ساخته شده با این دو پلیمر، قطر میانگین کمتر و با پراکندگی کمتر و مطلوب تر و بدون پارگی، دانه دار شدن داراست. این داربست‌ها همچنین به لحاظ خواص مکانیکی، نتایج مطلوبی را نشان داده‌اند. از جمله ایجاد داربستی با خواص کشسانی مطلوب شده است. لذا این داربست به دلایل فوق و همچنین به دلیل ماهیت پروتئینی آن که ایجاد دمین‌هایی برای اتصال سلولی می‌کند، می‌تواند بعنوان کاندید مناسبی برای داربست‌های مهندسی بافت باشد.

لازم به ذکر است که این داربست‌ها از نظر رشد و بقاء سلول‌های کندروسیت به صورت خارج تنی [۴۵] و درون تنی [۴۶] مورد بررسی قرار گرفت که نتایج بسیار مناسب بوده است

باند 1414 و 1454 وجود دارد که در داربست $50-50$ این دو باند حذف و باند جدید و بزرگتر 1449 تشکیل شده است (محدوده 1400 تا 1460 باند C-H مربوط به گروه‌های متیل می‌باشد). همچنین در این داربست با افزایش غلظت کتیوزان باند 1651 نیز به سمت 1633 (گروه C=C) شیفیت می‌دهد. گروه آمید III در فیبروئین در تمامی طیف‌ها ثابت بوده است. بعد از تیمار شیمیایی داربست با اتانول و آمونیاک باند 1338 حذف شده است. ترکیب حلال حاضر TFA با گروه‌های آمیدی پلیمر $(\text{NH}_3^+ - \text{CF}_3\text{COO}^-)$ تشکیل سه باند با عدد موجی 835 و 800 ، 721 و 835 می‌دهد که در تیمار شیمیایی، این سه باند حذف شده، که بیانگر حذف کامل حلال از نانوالیاف است.

درصد تخریب داربست نانوالیاف کیتوسان - فیبروئین پس از ۱۲ هفته $0/2 \pm 6,12$ درصد از کل وزن داربست بود. مقایسه این میزان از تخریب با سایر داربست‌های نانوالیاف ساخته شده از دیگر پلیمرهای طبیعی بیانگر افزایش مقاومت مطلوب این داربست است. اوکویلا و همکاران در گزارشی در سال ۲۰۱۱ درصد تخریب داربست نانوالیاف طبیعی ژلاتین - فیبروئین ابریشم را 10% از کل وزن آن تنها پس از گذشت ۱۴ روز در شرایط اینویترو گزارش کرده است [۳۶]. در گزارشی از درصد تخریب پذیری داربست نانوالیاف کلاژن - کیتوسان که توسط لان چن و همکارانش در سال ۲۰۱۲ ارائه شد، داربست پس از ۶ هفته در شرایط برون تنی بطور کامل تخریب شد [۳۷]. در تحقیقی که توسط چن و همکارانش در سال ۲۰۱۲ بر روی نانوالیاف فیبروئین ابریشم - کیتوسان صورت گرفت، بدون کاهش وزن محسوس در داربست طی دو ماه گزارش شد [۷]. در تحقیقی دیگری که به سال ۲۰۱۳ توسط Li و همکارانش بر روی داربست ساخته شده از پلیمر کیتوسان - پلی کاپرولاکتون صورت گرفت، 10% درصد از وزن داربست پس از ۲ ماه کاسته شده بود [۳۸]. تخریب سریع پلیمرهای طبیعی همیشه یکی از مشکلات آنها در استفاده از داربست‌ها بوده است اما همانطور که پیشتر گفته شد فیبروئین ابریشم یک استثنا محسوب می‌شود و همین خواص فیبروئین در ترکیب با پلیمر کیتوسان باعث بهبود خواص تخریب پذیری کیتوسان و در نتیجه داربست حاضر شده است.

نتایج استحکام مکانیکی نانوالیاف فیبروئین ابریشم - کیتوسان بیانگر افزایش حالت کشسانی کیتوسان در ترکیب با داربست نانوالیاف کیتوسان - فیبروئین ابریشم است. در ترکیب این پلیمر با فیبروئین ابریشم این رقم در داربست $50:50$ به $0,80 \text{ MPa}$ و در داربست $70-30$ به $0,51 \text{ MPa}$ رسیده است (مدول یانگ کمتر حالت ارتجاعی بالاتری به پلیمر می‌دهد). پلیمر فیبروئین حالت ارتجاعی کیتوسان را افزایش داده است. همچنین مقایسه دو داربست نشان می‌دهد که داربست $70-30$ پس از کشیده شدن تا $4,94\%$ از طول اولیه دچار شکست (پارگی) شده در حالی که داربست $50-50$ پس از افزایش $2,8\%$ از طول خود دچار شکست می‌شود. نیروی لازم برای ایجاد شکست در داربست $70-30$ $2,2 \text{ MPa}$ و در داربست $50:50$ $1,14 \text{ MPa}$ می‌باشد.

مدول یانگ نانوالیاف کیتوسان در تحقیقی که در سال ۲۰۰۸ توسط شیف من و همکارانش از طریق بررسی استحکام مکانیکی انجام شد، گزارشی $154/\text{MPa}$ شده است [۳۹، ۴۰]، که این بیانگر سختی و سفتی

مراجع

- Kock L, van Donkelaar CC, Ito K. Tissue engineering of functional articular cartilage: the current status. *Cell and tissue research*. 2012;347(3):613-27.
- Chung C, Burdick JA. Engineering cartilage tissue. *Advanced drug delivery reviews*. 2008;60(2):243-62.
- Zhang L, Webster TJ. Nanotechnology and nanomaterials: promises for improved tissue regeneration. *Nano Today*. 2009;4(1):66-80.
- Matsiko A, Levingstone TJ, O'Brien FJ. Advanced Strategies for Articular Cartilage Defect Repair. *Materials*. 2013;6(2):637-68.
- Zhang L, Hu J, Athanasiou KA. The role of tissue engineering in articular cartilage repair and regeneration. *Critical Reviews™ in Biomedical Engineering*. 2009;37(1-2).
- Dhandayuthapani B, Yoshida Y, Maekawa T, Kumar DS. Polymeric scaffolds in tissue engineering application: a review. *International Journal of Polymer Science*. 2011;2011.
- Chen J-P, Chen S-H, Lai G-J. Preparation and characterization of biomimetic silk fibroin/chitosan composite nanofibers by electrospinning for osteoblasts culture. *Nanoscale research letters*. 2012;7(1):1-11.
- Martins A, Araújo JV, Reis RL, Neves NM. Electrospun nanostructured scaffolds for tissue engineering applications. 2007.
- Izadifar Z, Chen X, Kulyk W. Strategic Design and Fabrication of Engineered Scaffolds for Articular Cartilage Repair. *Journal of Functional Biomaterials*. 2012:1-40.
- Ashammakhi N, Ndreu A, Nikkola L, Wimpenny I, Yang Y. Advancing tissue engineering by using electrospun nanofibers. 2008.
- McCullen SD, Autefage H, Callanan A, Gentleman E, Stevens MM. Anisotropic fibrous scaffolds for articular cartilage regeneration. *Tissue engineering Part A*. 2012;18(19-20):2073-83.
- Chang G, Kim H-J, Kaplan D, Vunjak-Novakovic G, Kandel R. Porous silk scaffolds can be used for tissue engineering annulus fibrosus. *European Spine Journal*. 2007;16(11):1848-57.
- Sionkowska A, Planecka A. Preparation and characterization of silk fibroin/chitosan composite sponges for tissue engineering. *Journal of Molecular Liquids*. 2013;178:5-14.
- Zhang Y-Q. Applications of natural silk protein sericin in biomaterials. *Biotechnology advances*. 2002;20(2):91-100.
- You R, Zhang Y, Liu Y, Liu G, Li M. The degradation behavior of silk fibroin derived from different ionic liquid solvents. *Natural Science*. 2013;5:10.
- Baran ET, Tuzlakoğlu K, Mano JF, Reis RL. Enzymatic degradation behavior and cytocompatibility of silk fibroin-starch-chitosan conjugate membranes. *Materials Science and Engineering: C*. 2012;32(6):1314-22.
- Ohkawa K, Cha D, Kim H, Nishida A, Yamamoto H. Electrospinning of chitosan. *Macromolecular Rapid Communications*. 2004;25(18):1600-5.
- Lai G-J, Shalumon K, Chen S-H, Chen J-P. Composite chitosan/silk fibroin nanofibers for modulation of osteogenic differentiation and proliferation of human mesenchymal stem cells. *Carbohydrate polymers*. 2014;111:288-97.
- Cai Z-x, Mo X-m, Zhang K-h, Fan L-p, Yin A-l, He C-l, et al. Fabrication of chitosan/silk fibroin composite nanofibers for wound-dressing applications. *International journal of molecular sciences*. 2010;11(9):3529-39.
- Zhang Z, Cui H. Biodegradability and biocompatibility study of poly (chitosan-g-lactic acid) scaffolds. *Molecules*. 2012;17(3):3243-58.
- Wang S, Zhang Y, Wang H, Yin G, Dong Z. Fabrication and properties of the electrospun polylactide/silk fibroin-gelatin composite tubular scaffold. *Biomacromolecules*. 2009;10(8):2240-4.
- De-bing S, Zhi-hui D, Wei-guo F. Study on the properties of the electrospun silk fibroin/gelatin blend nanofibers for scaffolds. *Journal of applied polymer science*. 2009;111(3):1471-7.
- Zhang K, Qian Y, Wang H, Fan L, Huang C, Mo X. Electrospun Silk Fibroin-Hydroxybutyl Chitosan Nanofibrous Scaffolds to Biomimic Extracellular Matrix. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2011;22(8):1069-82.
- Chung, H.J., Park, T.G., 2007. Surface engineered and drug releasing pre-fabricated scaffolds for tissue engineering. *Advanced drug delivery reviews* 59, 249-262.
- Sharma, C., Gautam, S., Dinda, A.K., Mishra, N.C., 2011. Cartilage tissue engineering: current scenario and challenges. *Adv. Mater. Lett* 2, 90-99.
- Chen G, Ushida T, Tateishi T. A biodegradable hybrid sponge nested with collagen microsponges. *J Biomed Mater*

- Res 2000 ;51: 273-79.
27. Lahiji A, Sohrabi A, Hangerford DS. Chitosan supports the expression of extracellular matrix proteins in human osteoblasts and chondrocytes. *J Biomed Mater Res* 2000; 51: 586-95.
 28. Thomson RC, Yaszemski MJ, Powers JM. Fabrication of biodegradable polymer scaffolds to engineer trabecular bone. *J Biomater Sci Polym Ed* 1995; 7:23-38.
 29. Frenkel SR, Bradica G, Brekke JH, Goldman SM. Regeneration of articular cartilage – evaluation of osteochondral defect repair in the rabbit using multiphasic implants. *Osteoart Cartil* 2005;13: 798-09.
 30. Chen YL, Lee HP, Chan HY, Sung LY, Chen HC, Hu YC. Composite chondroitin-6-sulfate/dermatan sulfate/chitosan scaffolds for cartilage tissue engineering. *Biomaterials* 2007; 28: 2294-305.
 31. Guan L1, Tian P, Ge H, Tang X, Zhang H, Du L, Liu P. Chitosan-functionalized silk fibroin 3D scaffold for keratocyte culture. *J Mol Histol*. 2013 Oct;44(5):609-18.
 32. Zeng S, Liu L, Shi Y, Qiu J, Fang W, Rong M, et al. (2015) Characterization of Silk Fibroin/Chitosan 3D Porous Scaffold and In Vitro Cytology. *PLoS ONE* 10(6): e0128658.
 33. Da-Wei Lia1, Xiaohua Leib1, Feng-Li Hea, JinHea Ya-Li Lia, Ya-Jing Yea, Xudong Deng, a Enkui Duan, b Da-Chuan Yin. Silk fibroin/chitosan scaffold with tunable properties and low inflammatory response assists the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *International Journal of Biological Macromolecules* Volume 105, Part 1, December 2017, Pages 584-597
 34. He J, Guo N, Cui S. Structure and mechanical properties of electrospun tussah silk fibroin nanofibres: variations in processing parameters. *Iran Polym J*. 2011;20:713-24.
 35. Zhang X, Wyeth P. Using FTIR spectroscopy to detect sericin on historic silk. *Science China Chemistry*. 2010;53(3):626-31.
 36. Okhawilai M, Rangkupan R, Kanokpanont S, Damrongsakkul S. Preparation of Thai silk fibroin/gelatin electrospun fiber mats for controlled release applications. *International journal of biological macromolecules*. 2010;46(5):544-50.
 37. Chen L, Zhu C, Fan D, Liu B, Ma X, Duan Z, et al. A human-like collagen/chitosan electrospun nanofibrous scaffold from aqueous solution: Electrospun mechanism and biocompatibility. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2011;99(3):395-409.
 38. Li C, Zhang J, Li Y, Moran S, Khang G, Ge Z. Poly (l-lactide-co-caprolactone) scaffolds enhanced with poly (β -hydroxybutyrate-co- β -hydroxyvalerate) microspheres for cartilage regeneration. *Biomedical Materials*. 2013;8(2):025005.
 39. Sun K, Li Z. Preparations, properties and applications of chitosan based nanofibers fabricated by electrospinning. *Express Polymer Letters*. 2011;5(4):342-61.
 40. Schiffman JD, Schauer CL. Cross-linking chitosan nanofibers. *Biomacromolecules*. 2007;8(2):594-601.
 41. Yin G-B, Zhang Y-Z, Wu J-L, Wang S-D, Shi D-B, Dong Z-H. Study on Electrospun Poly (lactic acid)/Silk Fibroin-Gelatin Composite Nanofibrous Scaffold for Tissue Engineering. *Journal of Fiber Bioengineering and Informatics*. 2010;2(3):182-8.
 42. Gui-Bo Y, You-Zhu Z, Shu-Dong W, De-Bing S, Zhi-Hui D, Wei-Guo F. Study of the electrospun PLA/silk fibroin-gelatin composite nanofibrous scaffold for tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2010;93(1):158-63.
 43. Nisal, A., Sayyad, R., Dhavale, P. et al. Silk fibroin micro-particle scaffolds with superior compression modulus and slow bioresorption for effective bone regeneration. *Sci Rep* 8, 7235 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25643-x>
 44. Mehdi Farokhi, Fatemeh Mottaghitalab, Yousef Fatahi, Mohammad Reza Saeb, Payam Zarrintaj, Subhas C. Kundu, Ali Khademhosseini, Silk fibroin scaffolds for common cartilage injuries: Possibilities for future clinical applications, *European Polymer Journal*, Volume 115, 2019, Pages 251-267,
 45. Jafarzadeh A, Hoseinipajoo K, Kiani rad M. A study on growth of bovine chondrocytes on silk fibroin/ chitosan electrospun nanofibers scaffold. *Journal of Cell & Tissue*. 2018;9(2):139-49.
 46. Dehghan MM, Mahdigholi N, Hoseini Pajoo K, Tavasoli A, Farzad S, Gholami H, et al. Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Cultured on Three-Dimensional Nano Fibrous Chitosan-Silk Fibroin Scaffold Enhanced the Repair of Critical-Sized Defects of Articular Cartilage in Rabbit. *orthopedic research society, MEETING ANNUAL*. March 20-22, 2017 (Poster No. 1427).