

## داربست چاپ سه بعدی پلی کاپرولاکتون با پوشش فیبروئین ابریشم و نانوسلولز اکسید شده برای کاربردهای زخم پوش

افسانه احسان دوست<sup>۱</sup>، الناز تمجید<sup>۲\*</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی دکتری، گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران  
<sup>۲</sup> دانشیار، گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

\* صندوق پستی ۱۷۵-۱۴۱۱۵، تهران، ایران  
tamjid@modares.ac.ir

پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۲۰

دریافت: ۱۴۰۲/۱۰/۰۲

### چکیده

در سال های اخیر، تلاش های قابل توجهی بر پیشرفت مواد زیستی جدید مبتنی بر پلیمر طبیعی و استفاده از روش های کارآمد مانند مهندسی بافت پوست برای درمان زخم متمرکز شده است. در این مطالعه، یک داربست پلی کاپرولاکتون چاپ سه بعدی پوشش دهی شده از طریق غوطه وری در یک ترکیب ۱:۴ از فیبروئین ابریشم ۴۰ درصد استخراج شده از پيله های کرم ابریشم بومبیکس موری و نانوسلولز اکسید شده با تمپو، ساخته شد. اندازه منافذ و تخلخل به ترتیب ۱۸۰ میکرومتر و ۸۵ درصد بود. نتایج افزایش جذب تراوه (تورم و جذب آب به ترتیب ۱۳۴۲ و ۸۰ درصد)، بهبود مدول ذخیره سازی ( $G'$ ) از ۵۰۰ به ۴۰۰۰ پاسکال، و همچنین گرانروی کشسانی تا ۶۰ درصد نشان دهنده خواص مطلوب این ساختار برای کاربردهای پانسمان زخم است. علاوه بر این، مطالعات ترشوندگی و زیست تخریب پذیری افزایش کلی زاویه تماس و نرخ تخریب را به ترتیب  $19.9 \pm 3$  درجه و ۹۵٪ نشان داد. مطالعات زنده مانی و مهاجرت سلولی بر روی سلول های فیرو بلاست (L۹۲۹) با استفاده از روش MTT، رنگ آمیزی دابی / فالوئیدین و آزمایش خراش، به ترتیب بیش از ۹۰ درصد زنده مانی تا ۷ روز و ترمیم کامل خراش در ۲۴ ساعت را نشان داد. این یافته ها نشان می دهد که داربست های پلی کاپرولاکتون پرینت شده سه بعدی که با فیبروئین ابریشم و نانوسلولز اکسید شده پوشش دهی شده اند، برای کاربردهای بهبود زخم امیدبخش بوده و ممکن است راه را برای پانسمان های زخم بر پایه پلیمر طبیعی هموار کنند.

واژگان کلیدی: چاپ سه بعدی، پلی کاپرولاکتون، فیبروئین ابریشم، نانوسلولز اکسید شده، زخم پوش، گرانروی کشسانی، زنده مانی، مهاجرت سلولی

## ۱- مقدمه

پوست بزرگترین عضو بدن است که علاوه بر نقش حفاظتی، به عنوان یک سیستم حسی عمل می کند و در تنظیم دما و رطوبت نقش دارد [۱]. زخم ها می توانند این سد را آسیب بزنند و باعث افزایش حساسیت محل زخم نسبت به عفونت های میکروبی شوند. این موضوع می تواند به تأخیر در بهبود زخم و افزایش آسیب بیشتر منجر شود [۵]. بنابراین، استفاده از پانسمان خارجی می تواند بهبودی زخم را تسریع داده و آسیب وارد شده را موقتاً جبران کند [۶]. رویکردهای فعلی برای درمان زخم های مزمن شامل مراقبت از زخم، درمان آنتی بیوتیکی، و در موارد شدید، قطع عضو است [۹]. چالش اصلی در مدیریت زخم، ایجاد یک محیط بهینه برای حمایت از بهبود بی وقفه و دستیابی به بسته شدن زخم در زمان کوتاه است [۱۰]. یک پانسمان موثر زخم نه تنها باید عملکردهای اساسی را انجام دهد، بلکه باید بتواند به آسانی و بدون ایجاد آسیب بیشتر، از بین برود [۱۱].

پانسمان های مختلف مانند هیدروژل ها، هیدروکلوئیدها، فوم ها و فیلم ها در مدیریت زخم های مزمن استفاده می شوند و نیازهای خاص بیماران را برطرف می کنند [۱۲]. هیدروژل ها، به ویژه، ساختاری دارند که به ریزمحیط<sup>۱</sup> پوست سالم شباهت دارد و برای حمایت از بازسازی زخم مناسب هستند [۱۳]. اما باید توجه داشت که هر پانسمان برای درمان انواع زخم مناسب نیست. مثلاً، زخم های تمیز و دانه بندی شده<sup>۲</sup> نیاز به محیط مرطوب دارند، در حالی که در زخم های عفونی، هدف اصلی جذب ترشحات است [۱۴]. آبدوست بودن پانسمان اگرچه به توانایی آن در جذب ترأوه<sup>۳</sup> و بر بقای سلول ها و ارتباطات میان آنها تأثیر می گذارد اما می تواند منجر به جذب باکتری ها و سایر

ناخالصی ها نیز باشد و از این روی ممکن است سطوح آگریز گزینه بهتری برای کاربردهای دارورسانی باشند [۱۶، ۱۸]. همچنین، پانسمان های سنتی زخم معمولاً به طور یکنواخت برای همه بیماران و انواع زخم ها ارائه می شوند، در حالی که زخم ها از نظر اندازه، شکل و شدت متفاوت هستند. چاپ سه بعدی مهندسی بافت زخم را متحول کرده است، این روش به سفارشی سازی ویژگی های خاص زخم بیمار، مانند عمق و محل، می پردازد و از تناسب دقیق تر و افزایش اثربخشی درمانی پانسمان اطمینان حاصل می کند [۲۰]. به علاوه، پانسمان های فعال<sup>۴</sup> نه تنها جریان ترشحات و اکسیژن را در زخم تنظیم می کنند، بلکه ممکن است به طور مؤثری آزاد سازی مواد کمکی و داروهایی که روند بهبود زخم را تسریع می کنند، تنظیم کنند [۲۲]. در نهایت، پانسمان های چاپ سه بعدی دارورسانی موضعی مؤثری را ارائه می دهند و مزایای درمان های موضعی نسبت به درمان های تمام بدنی<sup>۵</sup> را دارند [۱۹].

هیدروژل ها به عنوان گزینه های امیدوارکننده برای این منظور مطرح می شوند، زیرا با شبیه سازی بافت ها از نظر ترکیب و ساختار و عمل به عنوان جایگزین های مصنوعی بستر خارج سلولی<sup>۶</sup>، تمام الزامات مورد نیاز را برآورده می کنند [۲۴]. ماهیت آبدوست و خواص شبیه بافت نرم آنها، همراه با قابلیت انتقال مواد مغذی و اکسیژن، آنها را به نامزدهای اصلی برای ایجاد پانسمان های پیشرفته زخم برای درمان زخم های بزرگ، سوختگی ها و سایر ضایعات پوستی تبدیل می کند [۲۵].

فیبروئین ابریشم و مشتقات آن به دلیل خواص مناسب برای کاربردهای پانسمان زخم بسیار مورد توجه قرار گرفته اند [۲۶]. این ویژگی ها شامل زیست سازگاری، زیست تخریب پذیری، خواص مکانیکی عالی، ظرفیت

<sup>۴</sup> Active dressings<sup>۵</sup> Systemic<sup>۶</sup> Extracellular matrix<sup>۱</sup> Microenvironment<sup>۲</sup> Granular wounds<sup>۳</sup> Exudate

جذب آب و ایمنی‌زایی پایین است [۲۷]. جدای از این فیبروئین ابریشم مهاجرت و تکثیر سلولی را تحریک می‌کند و مشخص شده است که مستقیماً با خواص تسریع التیام زخم در ارتباط هستند [۲۸]. هیدروژل مبتنی بر فیبروئین ابریشم با قابلیت انبساط بالا، قابلیت خود ترمیمی، چسبندگی مناسب، تورم‌پذیری خوب، زیست سازگاری و خاصیت ضد باکتریایی توسعه یافته‌اند. بنابراین دارای پتانسیل برای کاربردهای پزشکی آینده مانند چسب بافت هستند [۲۹].

سلولز یک بیوپلیمر آنیونی محلول در آب است که به‌عنوان یک اصلاح‌کننده گرانروی<sup>۱</sup> و ضخیم‌کننده در پانسمان‌های زخم استفاده می‌شود [۳۱]. این پانسمان‌ها مزایای منحصر به فردی از جمله زیست‌سازگاری عالی، زیست‌تخریب‌پذیری، و جذب آب بالا را دارند و می‌توانند به‌طور موثر رطوبت را مدیریت و محیط مرطوبی را برای بهبود زخم ایجاد کنند و همچنین یک سد محافظ در برابر بیماری‌زاهای<sup>۲</sup> خارجی بوجود آورند [۳۵]. همچنین، این پانسمان‌ها توانایی تطبیق‌پذیری با فرایندهای مختلف را دارند و می‌توانند به‌صورت محلی عوامل درمانی را در محل زخم تحویل دهند [۳۶]. با استفاده از فناوری‌های اخیر، مشتقات سلولز به روش‌هایی همه‌کاره<sup>۳</sup> برای مطابقت با نیازهای مختلف زیست‌پزشکی تبدیل شده‌اند، که این امر باعث افزایش تحقیقات در زمینه استفاده از آنها برای ساخت پانسمان‌های زخم و داربست‌های مهندسی بافت در زمینه پزشکی بازساختی شده است [۴۱].

روش‌های تولید سازه‌ها و داربست‌های سه بعدی با استفاده از هیدروژل‌های طبیعی در مهندسی بافت و پزشکی بازساختی به دلیل عدم موفقیت در حفظ معماری پیچیده ساختارها در طول یا پس از آن، با شکست مواجه

شده‌اند [۴۲]. در عوض، پلیمرهای گرمانرم<sup>۴</sup>، با ویژگی‌های مکانیکی مناسب و حفظ ویژگی‌های ساختاری ضروری، توجه بسیاری را به خود جلب می‌کنند [۴۴]. با این حال، به دلیل حالیت ضعیف و فقدان گروه‌های سطحی عملکردی برای تقویت اتصال سلولی، نمی‌توانند محیط بسیار آبداری<sup>۵</sup> را برای سلول‌ها فراهم کنند و برای بهبود زیست سازگاری، نیاز به اضافه کردن عملکرد سطحی اضافی دارند [۴۵، ۴۶، ۴۷]. پلی‌کاپرولاکتون، یکی از پلیمرهای گرمانرم مهم در پزشکی بازساختی، به دلیل زیست سازگاری و استحکام نسبتاً بالا (۱۰/۵ تا ۱۶/۱ مگاپاسکال) مورد استفاده قرار می‌گیرد [۴۹]. با این حال، تجزیه‌پذیری آهسته زیستی و فقدان سایت‌های اتصال سلولی و امضاهای زیست مولکولی، محدودیت‌هایی برای دامنه کاربردهای بالقوه آنها محسوب می‌شوند [۵۱]. ترکیب ویژگی‌های مطلوب پلیمرهای گرمانرم مانند پلی‌کاپرولاکتون و هیدروژل‌های مبتنی بر پلیمرهای طبیعی مانند سلولز و فیبروئین ابریشم، در داربست‌های هیبریدی، کاربردهای جدیدی را معرفی می‌کند که به‌طور همزمان دامنه پایداری مکانیکی را با خواص زیست فعال افزایش می‌دهد [۵۲].

چاپ زیستی سه بعدی بر اساس اکستروژن، به ویژه برای ساخت داربست‌های بازسازی‌کننده بافت از مواد زیست سازگار، توجیه مناسبی دارد [۵۶]. این فناوری، به خصوص برای ساخت سازه‌های بافت سه بعدی که برای اهداف بازسازی بافت استفاده می‌شوند، جذاب است زیرا داربست‌های آزاد با سلول جامد را با خواص مکانیکی مناسب ارائه می‌دهد [۵۷]. چالش اصلی در این تکنیک‌ها حفظ یکپارچگی مکانیکی و وفاداری به شکل ساختارها در طول فرایند چاپ یا کشت سلولی است. اما امکان

<sup>۴</sup> Thermoplastic<sup>۵</sup> Hydrated<sup>۱</sup> Viscosity<sup>۲</sup> Pathogene<sup>۳</sup> Versatile

استفاده از یک رویکرد "هیبریدی" در چاپ زیستی که مخلوطی از پلیمرهای گرماترم سفت و هیدروژل‌های نرم‌تر است، امیدوارکننده به حل این مسائل است [۵۹].

در این مطالعه با استفاده از یک فرایند چاپ زیستی روزن‌رانی<sup>۱</sup> سه بعدی هیبریدی، داربست‌هایی با خواص مکانیکی و فیزیکوشیمیایی قابل تنظیم از نظر تخلخل، سفتی، تورم و تخریب پذیری ساخته شد. چنین داربست‌هایی برای کاربردهای پیشرفته مهندسی بافت و طراحی پانسمان‌های زخم جدید مناسب هستند. از روش چاپ لایه به لایه برای تولید داربست سه بعدی پلی‌کاپرولاکتونی استفاده شده و پانسمان آماده شده شامل ساختار سه بعدی چاپ شده پو شانده شده با دو پلیمر طبیعی فیبروئین ابریشم و نانو سلولز اکسید شده به روش تمپو است که بخش مرکزی مسئول ایجاد پایداری مکانیکی پانسمان، و بخش پوششی مسئول ایجاد خواص زیست فعال آن است. با ترکیب هر دو پلیمر در نسبت‌های مختلف، ویژگی‌های تقویت شده را می‌توان در یک فرمول هیدروژل هیبریدی به دست آورد. افزودن نانوسلولز اکسید شده به فیبروئین ابریشم، مکانیسم ژل شدن را افزایش می‌دهد و منجر به بهبود جزئی خواص مکانیکی می‌شود که به ماندگاری آنها بر روی داربست پس از ورود به محیط کشت کمک می‌کند. همچنین افزودن کلسیم کلراید در نقش اتصال دهنده عرضی و شستشوی آن پیش از اضافه شدن سلول‌ها نیز در حصول اطمینان از این موضوع مطلوب به نظر می‌رسد. وجود هیدروژل‌های طبیعی می‌تواند باعث افزایش ترشوندگی و آبدوستی داربست‌های چاپ سه بعدی و متعاقباً افزایش اتصال سلولی شود و همچنین می‌تواند منجر به افزایش تورم‌پذیری پانسمان و بنابراین بهبود خواص جذب تراوه و افزایش سرعت تخریب سازه شود و نیز وجود

سلول‌های فیروبلات بر روی این پانسمان می‌تواند منجر به ایجاد بستری برای بازسازی بافت شود. بنابراین، داربست‌های پلی‌کاپرولاکتون/فیبروئین ابریشم و نانوسلولز اکسید شده پتانسیل استفاده برای درمان موضعی زخم و ترمیم بافت را دارند. داربست‌ها را می‌توان در محل زخم قرار داد تا نه تنها ویژگی‌های پانسمانی خود را ایفا کنند، بلکه با دارا بودن سلول‌های پوستی منجر به بهبود سریع‌تر شوند و بدون نیاز به تعویض پس از مدتی تجزیه شود [۶۱].

## ۲- مواد و روش‌ها

در این مطالعه، ابتدا فیبروئین ابریشم از مسیرهای استخراج با استفاده از معرف اجیساوا<sup>۲</sup> متشکل از کلسیم کلراید: اتانول: آب در نسبت مولی ۱:۲:۸ استخراج شد [۶۲]. سپس اکسیداسیون با واسطه تمپو بر روی نانوسلولز انجام شد و دو هیدروژل با یکدیگر ترکیب شدند [۶۳]. داربست پلی‌کاپرولاکتونی با استفاده از چاپگر زیستی ساخته شده و درون این محلول‌ها غوطه‌ور شد و کلسیم کلراید نیز در نقش اتصال دهنده عرضی به آنها اضافه شد. آزمون تخریب پذیری برای انتخاب بهترین نسبت برای ترکیب دو هیدروژل انجام شد و بهینه مدت زمان غوطه‌وری ساختار پلی‌کاپرولاکتون درون فیبروئین ابریشم و نانوسلولز اکسید شده با استفاده از آزمون تبدیل طیف فوریه انجام شد. تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی روبشی به منظور بررسی تخلخل و اندازه حفرات انجام شد و همچنین تورم‌پذیری و تخریب پذیری داربست‌ها نیز سنجیده شد. برای بررسی میزان ترشوندگی پانسمان، زاویه قطره آب با سطح آن مورد ارزیابی قرار گرفت و در نهایت برای بررسی میزان زنده‌مانی سلول‌ها از آزمون زنده‌مانی با استفاده از ۳-(۴،۵-دی متیل تیازول-۲-یل)-۲،۵-دی

<sup>۲</sup> Ajisawa

<sup>۱</sup> Extrusion

## ۲-۲ روش‌ها

## ۲-۲-۱ ساخت داربست‌های سه بعدی

## ۲-۲-۱-۱ استخراج فیبروئین ابریشم

الیاف ابریشم از دو پروتئین اصلی تشکیل شده است: فیبروئین به میزان ۷۵ درصد و سریسین به میزان ۲۵ درصد. در این الیاف خام، به همراه این دو پروتئین، ناخالصی‌های طبیعی دیگری مانند چربی، واکس، نمک‌های معدنی و مواد رنگی نیز وجود دارند [۶۴]. برای استخراج پروتئین فیبروئین، ابتدا از سدیم کربنات (یک محلول باز رایج) به همراه جوشاندن در آب برای صمغ زدایی و حذف سریسین استفاده شد [۶۵]. سپس با گرم کردن نخ‌ها به مدت ۶ ساعت در دمای ۷۰ درجه، در ترکیب کلسیم کلراید، اتانول و آب، با نسبت مولی ۱:۲:۸ در غلظت ۱۰ درصد وزنی/حجمی و سپس دیالیز در آب خالص و سانتریفیوژ (سانتریفیوژ یخچالدار سیگما Sigma 3-30KS آلمان) پیوندهای هیدروژنی پایدارکننده صفحه‌های بتا از بین رفته و فیبروئین ابریشم خالص حاصل و برای سهولت در استفاده و نگهداری، به مدت ۴۸ ساعت به روش انجمادی (plus MartinChrist Alpha2-4 LD، آلمان)، خشک شدند [۶۲].

## ۲-۲-۱-۲ اکسیداسیون نانوسلولز

این اکسیداسیون برای افزودن گروه‌های سدیم کربوکسیل به سطوح فیبریل‌های سلولز با اضافه کردن گروه‌های هیدروکسیل آزاد روی کربن شماره ۶ انجام می‌شود اما ریخت‌شناسی و ساختار بلوری و پهنای کریستالهای زنجیره سلولز بدون تغییر باقی مانده و نهایتاً الیاف سلولزی به نانوذلهای شفاف با ابعاد ۳-۴ نانومتر تبدیل می‌شوند. برای انجام این آزمایش، نانو سلولز باکتریایی ۱ در صد در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حاوی ۰/۰۱۶ گرم تمپو و ۰/۱

فنیل-H۲-تترازولیوم بروماید<sup>۱</sup> و همچنین رنگ‌آمیزی‌های فلورسنت با داپی و فالوئیدین و همچنین آزمون خراش استفاده شد.

## ۲-۱ مواد اولیه

پایله‌های ابریشم طبیعی از کرم ابریشم نژاد بومبیکس موری، از شرکت صنایع ابریشم گیلان-ایران، خریداری شد. پلی‌کاپرولاکتون با وزن مولکولی ۴۵ کیلو دالتون و دمای ذوب ۶۰ درجه سانتی‌گراد (۷۰۴۱۰۵)، قرص‌های فسفات بافر سالین (P4417، ۱ قرص برای ۲۰۰ میلی‌لیتر)، (۴،۵-دی متیل تیزول-۲-یل)-۲،۵-دی فنیل-H۲-تترازولیوم بروماید، ۴۷۵۹۸۹، ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، رنگ داپی (۶،۴-دی آمیدینو-۲-فنیلندول دی هیدروکلراید، ۲-۴-آمیدینوفنیل)-۶-اینندولکاربامیدین، ۲۸۷۱۸۹۰۳، وزن مولکولی ۳۵۰/۲۵ و رنگ فالوئیدین (۱۷۴۶۶۴۵۴)، وزن مولکولی ۷۸۸/۸۷ از سیگما آلدریج خریداری شد. کلسیم کلراید دوآبه مرک آلمان (۱۰۲۳۸۲، ۱۰۲۳۸۲ g/mol)، سدیم هیپوکلریت مرک آلمان (۱۰۵۶۱۴، ۱/۲۲ g/cm<sup>۳</sup>)، سدیم برومید مرک آلمان (۱۰۶۳۶۰، ۱۰۲/۹ g/mol) و اتانول مطلق مرک آلمان (۱۰۰۹۸۳) خریداری شد. کیسه دیالیز ۱۲ و ۱۴ کیلو دالتون (ظرفیت ۱۰-۲۵۰ میکرولیتر) شرکت سیگما آلدریج تهیه شد. نانوسلولز باکتریایی (۱ درصد وزنی) از شرکت نانونین پلیمر ساری، ایران تهیه شد. تمپو اکسیداز مرک آلمان (۸۱۴۶۸۱، ۰/۹۱۲ g/cm<sup>۳</sup>) تهیه شد. محیط کشت Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)، با گلوکز بالا و حاوی بافر HEPES، سرم جنین گاوی<sup>۲</sup>، تریپسین-اتیلن دی آمین تتراستیک اسید<sup>۳</sup>، پنی سیلین/استرپتومایسین (۱/۰ میکرومتر، فیلتر شده، ۴۴۵۸P) و دی متیل سولفوکسید<sup>۴</sup> (گرید سلولی)، از شرکت زیست ایده نو ترکیب، ایران تهیه شد.

<sup>۱</sup> Trypsin-EDTA<sup>۲</sup> Dimethyl sulfoxide (DMSO)<sup>۳</sup> MTT assay<sup>۴</sup> Fetal Bovine Serum (FBS)

گرم سدیم بروماید معلق شده و سوپانسیون سلولز با استفاده از همزن مغناطیسی در دمای اتاق در حال هم زدن با دور ۵۰۰ دور در دقیقه نگهداری شد [۶۳].

فرایند اکسیداسیون با افزودن آهسته مقدار معین از محلول سدیم هیپوکلریت، مربوط به  $5/-$  تا  $12/0$  میلی مول بر گرم سلولز آغاز و از محلول سدیم هیدروکسید نیم مولار برای حفظ pH استفاده شد. زمان به پایان رسیدن واکنش با عدم مصرف سدیم هیدروکسید بیشتر مشخص شد. سلولز اکسید شده با واسطه تمپو با شستن کامل سلولز فیبری با آب و اتانول روی کاغذ صافی در قیف بوخنر<sup>۱</sup> به دست آمد و در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد.

#### ۲-۲-۱-۳ آزمون تزریق پذیری

آزمون تزریق پذیری برای یافتن بهترین گرانیوی از ترکیب دو ماده نانوسلولز و فیبروئین ابریشم از نوک سوزن و برای تهیه پلیمری هیبریدی با ویژگی‌های روانه‌شناسی<sup>۲</sup> مناسب برای پوشاندن سطح ساختار پلی‌کاپرولاکتونی، انجام شد. برای این کار، سه نسبت مختلف از دو ماده فیبروئین ابریشم و اکسید نانوسلولز (۱:۱/۴/۱:۴) ترکیب و اشکال مستطیل شکلی با عرض ۲ سانتی‌متر و طول ۳ سانتی‌متر با استفاده از سوزن  $0/3$  میلی‌متری درون یک دیش پتری تزریق شدند.

#### ۲-۲-۱-۴ چاپ و پوشش دهی داربست‌های سه بعدی

چاپ زیستی با دستگاه چاپگر سه بعدی Bio fab X2 (Omid Afarinan Mohandesi Ayande، ایران) انجام شد. برای انجام چاپ سه بعدی، مدل یک لایه با ابعاد ۱۰ میلی متر ۱۰ میلی‌متر ۱،۲ میلی‌متر با استفاده از نرم‌افزار اتوکد (Autodesk AutoCAD 2024.1.1) طراحی و به صورت فایل STL ذخیره شد. سپس، این فایل با استفاده از نرم‌افزار Simplifier (simplify3d ۱،۲،۴) به G-code

تبدیل و در داخل نرم‌افزار مربوط به چاپگر سه بعدی قرار داده شد تا با انجام تنظیمات داخل نرم‌افزار، بر روی چسب مخصوص که قبل از شروع چاپ به صفحه چاپگر سه بعدی زده شده بود، چاپ شود. پس از ذوب گلوله های پلی‌کاپرولاکتونی در دمای ۱۱۰ درجه سانتیگراد درون نازل فلزی، کل ساختار در یک مرحله و با قطر نازل  $0/3$  میلی‌متر و فشار  $1-1/5$  بار اکستروژد شد. برای افزایش ماندگاری و چسبندگی بهتر مواد بر روی داربست‌ها، زیرسازی بسیار ضعیفی در سطح آنها لازم بود که برای این منظور، محلول ۳۰ درصد اسید فسفریک برای مدت زمان ۱ دقیقه به سطح نمونه اضافه شد و سپس نمونه‌ها تا زمانی که pH به  $7/4$  برسد با آب یون‌زدایی شده شسته شدند [۶۶]. سپس، داربست‌ها با اتانول ۷۰ درصد استریل و در ترکیب دو هیدروژل فیبروئین ابریشم و نانوسلولز تمپو اکسید شده به مدت  $0/5$ ، ۱ و  $1/5$  ساعت غوطه‌ور و پس از آن به مدت ۲۴ ساعت با استفاده از روش خشک شدن انجمادی (Alpha2-4 LD plus MartinChrist، آلمان)، خشک شدند. تعیین بهترین مدت زمان غوطه‌وری داربست‌های چاپ شده درون مخلوط فیبروئین ابریشم-نانوسلولز-کلسیم کلراید، داربست پلی‌کاپرولاکتونی چاپ شده نیز برای جلوگیری از شسته شدن مواد موجود در سطح داربست پس از ورود به محیط کشت با استفاده از طیف‌سنجی تبدیل فوریه بررسی شد.

#### ۲-۲-۲ مشخصه‌یابی ساختار

۲-۲-۲-۱ تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی روبشی ریخت‌شناسی داربست‌های پلی‌کاپرولاکتون و پلی‌کاپرولاکتون/نانوسلولز اکسید شده و فیبروئین ابریشم با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (Nanosem FEI 450، امریکا) در ولتاژ ۲ کیلو ولت مشاهده شد.

<sup>۱</sup> Gauge

<sup>۱</sup> Büchner funnel

<sup>۲</sup> Rheologic

نمونه‌ها با نوار دو طرفه بر روی قطعات آلومینیومی نصب شده و با پوشش طلا با کدوپاش پوشانده شدند. میانگین اندازه منافذ با استفاده از نرم‌افزار ImageJ (NIH, 1.52v, آمریکا) از تصاویر به دست آمده، تعیین شد.

#### ۲-۲-۲ ارزیابی خواص مکانیکی زخم پوش

برای انجام آنالیزهای مکانیکی، ساختار حاصل درون دستگاه روانه‌سنجی<sup>۱</sup> چند عملکردی صفحه - صفحه (صفحه ی موازی)، با قطر ۲۵ میلی‌متر و فاصله شکاف ۱ میلی‌متر (HR 20 Discovery Hybrid Rheometer، آلمان) قرار داده شد. ساختارهایی که به عنوان پانسمان زخم مورد استفاده قرار می‌گیرند باید استحکام کافی داشته باشند، زیرا استحکام و خواص گرانروی کشسانی<sup>۲</sup> برای سازگاری حرکت آنها بر روی بافت های زیرین برای محافظت در برابر فشار خارجی ضروری است [۶۸]. خواص مکانیکی ساختار با اندازه‌گیری‌های روانه شناسی نوسانی بررسی شد. اول، جاروب زمانی<sup>۳</sup> ساختارها در فرکانس ۱ هرتز و ۱ درصد کرنش<sup>۴</sup> برای اندازه‌گیری مدول<sup>۵</sup> ذخیره‌سازی (G') و نشان دادن اثرات مدت زمان غوطه‌وری انجام شد. سپس برای جاروب کرنش<sup>۶</sup>، ساختار تحت کرنش پایدار ۶۰ درصد قرار گرفت که محدوده گرانروی کشسانی خطی پوست است [۶۹] تا سازگاری آن با انقباض و آرامش پوست در ناحیه زخم بررسی شود.

#### ۲-۲-۳ سنجش تخلخل ساختار

برای تعیین تخلخل، ساختار حاصل درون اتانول مطلق تا زمانی که به حالت اشباع برسد غوطه شد و وزن قبل و بعد از غوطه‌وری توزین و تخلخل با استفاده از رابطه ۱ محاسبه شد، همه نمونه‌ها در آزمایش سه بار تکرار شدند.

$$\text{رابطه ۱: } \text{تخلخل} = \frac{(\text{وزن قبل از غوطه‌وری} - \text{وزن بعد از غوطه‌وری})}{\text{حجم اتانول} \times \text{حجم قبل از غوطه‌وری}}$$

#### ۲-۲-۴ آزمون زاویه تماس

زوایای تماس افت قطره آب بر روی سطح داربست‌های چاپ سه بعدی در دمای اتاق اندازه‌گیری شد. زوایای تماس حاصل از تصاویر با استفاده از نرم‌افزار ImageJ (NIH, 1.52v, آمریکا) اندازه‌گیری شد. آزمایش سه بار تکرار شد و میانگین زاویه ها گزارش شد. هرچه زاویه تماس قطره آب با سطح هیدروژل به صفر نزدیک‌تر باشد ترشوندگی<sup>۷</sup> بیشتر است و هرچه زاویه تماس به ۱۸۰ درجه نزدیک‌تر باشد آب‌گریزی افزایش می‌یابد [۷۰].

#### ۲-۲-۵ آزمون تورم پذیری

برای بررسی میزان جذب آب توسط ساختار، نمونه‌هایی با وزن و اندازه یکسان، با سه تکرار در بافر فسفات سالین در دمای ۳۷ درجه غوطه ور شدند و پس از گذشت زمان های مشخص (۱ ساعت، ۳ ساعت، ۵ ساعت، ۲۴ ساعت، ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت) از بافر خارج و پس از حذف آب سطحی جذب نشده با کاغذ صافی، توزین شدند تا وزن تر محاسبه شود و سپس نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت لیوفیلیزه و توزین شدند تا وزن خشک نمونه‌ها نیز محاسبه شود. درصد تورم پذیری نمونه‌ها در زمان های مختلف، با استفاده از رابطه ۲ محاسبه و براساس نتایج، نمودار تورم پذیری بر حسب زمان رسم شد.

$$\text{رابطه ۲: } \text{درصد تورم‌پذیری} = \left( \frac{\text{وزن تر} - \text{وزن خشک}}{\text{وزن خشک}} \right) \times 100$$

#### ۲-۲-۶ آزمون زیست تخریب پذیری

سازه‌ها در ابعاد و وزن‌های مساوی چاپ و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۵ روز در PBS (pH 7.4) حاوی لیوزیم (۱۰۰۰۰ یونیت در میلی‌لیتر) انکوبه شدند (۵ درصد دی اکسید کربن، ۳۷ درجه، CB, BINDER).

<sup>4</sup> Strain  
<sup>5</sup> Modulus  
<sup>6</sup> Strain Sweep  
<sup>7</sup> Wettability

<sup>۱</sup> Rheometry  
<sup>۲</sup> Viscoelastic  
<sup>۳</sup> Time Sweep

160، آلمان). پس از گذشت ۷، ۱۴، ۲۱، ۲۸، ۳۵ روز، آنها تحت شستشو با آب یون‌زدایی شده قرار گرفتند تا یون‌های جذب شده بر روی سطح آنها حذف شود و سپس به روش انجمادی خشک شده<sup>۱</sup> (Alpha2-4 LD plus MartinChrist، آلمان) و دوباره وزن کشتی شدند. برای هر داربست از سه تکرار استفاده شد و با استفاده از فرمول زیر (رابطه ۳)، تخریب سازه‌ها محاسبه شد:

$$\text{رابطه ۳: } 100 \times \left( \frac{\text{وزن خشک} - \text{وزن اولیه}}{\text{وزن اولیه}} \right) = \text{درصد تخریب}$$

## ۲-۲-۷ بررسی حفرات پس از غوطه‌وری

پس از تعیین بهترین مدت زمان غوطه‌وری، در جهت حصول اطمینان از عدم بسته شدن کامل حفرات و وجود فضای کافی برای قرار گیری و رشد سلول‌ها، شکل حفرات با استفاده از میکروسکوپ نوری (KERN & Sohn GmbH، OCD 825، آلمان)

## ۲-۲-۳ مطالعات سلولی ساختار

## ۲-۲-۱ کشت سلول‌های فیروبلاست بر روی داربست

پس از تعیین بهترین نوع داربست، برای رشد سلول‌ها بر روی آن، لازم بود تا داربست‌ها به‌طور کامل سترون<sup>۲</sup> باشند، به همین روی ابتدا با اتانول ۷۰ درصد و سپس با استفاده از اعمال نور فرابنفش نوع C با طول موج ۲۸۰ نانومتر و به مدت زمان ۴۵ دقیقه درون هود سترون لامینار (TAL TAJHIZ، JTLV02، ایران) سترون شدند.

به منظور کشت سلول‌های فیروبلاست بر روی داربست، ابتدا سوسپانسیون سلولی با غلظت ۱۰<sup>۶</sup> سلول در هر میلی‌لیتر از محیط کشت DMEM (زیست ایده نو ترکیب، ایران) شامل ۱۰ درصد FBS (زیست ایده نو ترکیب، ایران)، ۱ درصد پنی سیلین / استرپتومایسین (۰/۱ میکرومتر، فیلتر شده، ۴۴۵۸P)، تهیه (هود سترون لامینار JTLV02،

TAL TAJHIZ، ایران) پس از قرار گیری هر داربست درون پلیت ۲۴ خانه، طی ۳ مرحله، ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی به هر داربست اضافه و برای ۱۵ دقیقه درون انکوباتور (۵ درصد دی اکسید کربن، ۳۷ درجه سانتی‌گراد، CB ۱۶۰، BINDER، آلمان) قرار گرفت، و سپس ۳۰۰ میکرولیتر دیگر از همان سوسپانسیون سلولی به داربست‌ها اضافه شد و برای ۳۰ دقیقه درون انکوباتور قرار گرفت و نهایتاً ۵۰۰ میکرولیتر نهایی نیز بر روی داربست‌ها اضافه شد و این بار برای ۴ ساعت درون انکوباتور قرار گرفت. سپس سوسپانسیون سلولی به آرامی و به‌طوری‌که منجر به کنده شدن سلول‌ها از سطح داربست نشود، از هر چاهک حذف و به جای آنها، محیط کشت تازه به هر چاک اضافه شد و برای ۲۴ ساعت درون انکوباتور قرار گرفته و نتیجه اتصال سلولی با استفاده از میکروسکوپ نوری بررسی شد.

## ۲-۲-۲ آزمون زنده‌مانی

برای بررسی میزان تکثیر و زنده ماندن سلول‌های کشت شده بر روی داربست، از آزمون رنگ سنتی MTT (دی متیل تیا زول ۲ و ۵ دی فنیل تترا زولیوم برمید) استفاده شد. اساس این روش بر پایه شدت نور تولید شده توسط فعالیت میتوکندری در سلول‌ها می‌باشد که در محدوده طول موج ۵۴۰ الی ۶۳۰ نانومتر توسط دستگاه خوانش جذب (Bio Tek-ELX800، Thomas Scientific، آمریکا) انجام می‌شود. بنابراین، شدت نور رابطه مستقیم با تعداد سلول‌های زنده خواهد داشت و رنگ ارغوانی نماینگر زنده‌مانی سلول می‌باشد.

## ۲-۲-۳ رنگ آمیزی سلول‌ها

برای بررسی ریخت شناسی و زنده‌مانی سلول‌ها، ابتدا با استفاده از میکروسکوپ نوری (KERN & Sohn GmbH، OCD ۸۲۵، آلمان) با بزرگنمایی 10X و سپس با استفاده

<sup>2</sup> Sterile

<sup>1</sup> lyophilize



از رنگ آمیزی دابی<sup>۱</sup> و فالوئیدین<sup>۲</sup> و میکروسکوپ فلورسنت (OLYMPUS, IX81Inverted, ژاپن) سلول های زنده موجود بر روی داربست مورد بررسی و عکس برداری قرار گرفتند. برای این منظور، ابتدا محیط کشت از سلول ها حذف شد و سپس سلول ها با پارافرم آلدئید ۴ درصد به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق تثبیت و با ۰٫۵ درصد Triton X-100 (در PBS) به مدت ۵ دقیقه نفوذ پذیر و سپس با FBS ۱ درصد تیمار و در نهایت با PBS شسته شدند و نهایتاً به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق تحت اثر رنگ دابی (۱ میکروگرم بر میلی لیتر) و فالوئیدین (۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر) قرار داده شده و تحت عکس برداری فلورسنت قرار گرفتند. سپس، تصاویر با استفاده از نرم افزار ImageJ (موسسه ملی بهداشت ایالات متحده، MD, Bethesda) تجزیه و تحلیل و زنده مانگی سلول ها با استفاده از رابطه ۴ تعیین شد.

رابطه ۴:

$$\text{زنده مانگی} = \frac{\text{ناحیه سلول های زنده}}{\text{مساحت سلول های زنده + ناحیه سلول های مرده}}$$

۲-۳-۴-۵ آزمون خراش

برای تخمین پتانسیل اپی تلیال شدن مجدد یک زخم تحت تاثیر یک عصاره یا ترکیب و قابلیت های گسترش و مهاجرت سلول های فیرو بلاست از روش آزمون خراش که گسترش یک جمعیت سلولی را بر روی سطوح اندازه گیری می کند، استفاده می شود [۷۲]. سلول ها درون دیش پتری حاوی محیط کشت DMEM (زیست ایده نو ترکیب، ایران) شامل ۱۰ درصد FBS (زیست ایده نو ترکیب، ایران)، ۱ درصد پنی سیلین / استرپتومایسین (۰/۱ میکرومتر، فیلتر شده، ۴۴۵۸P) در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، در غلظت ۱۰<sup>۵</sup> سلول در میلی لیتر کشت داده شدند. سپس، یک زخم خطی در تک لایه سلولی رشد یافته با پیپت پلاستیکی ۱۰۰ میکرو لیتری سترون تولید و

سلول های کنده شده با شسته شو با محیط کشت حذف شدند. سپس عصاره های پلی کاپرولاکتون / فیبروئین ابریشم و نانو سلولز اکسید شده، پلی کاپرولاکتون هر کدام در سه تکرار به خراش ها اضافه شد و سه تکرار نیز به نمونه های کنترل که هیچ عصاره ای به آنها اضافه نشده بود اختصاص یافت. نمونه ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با ۵ درصد دی اکسید کربن انکوبه شده و سپس با استفاده از میکروسکوپ نوری (KERN & Sohn GmbH, ۸۲۵OCD، آلمان) عکس برداری شدند.

## ۲-۴-۴ تحلیل آماری

تمام داده ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار بیان شد. اهمیت آماری تفاوت های بین هر گروه با آزمون t بررسی شد. سطح معناداری در سطح  $p > 0.05$  تنظیم شد. بررسی سلولی، تخریب پذیری، تورم پذیری، زنده مانگی سلولی و بررسی های مکانیکی با ۳ تکرار انجام شد. قطر منافذ در تصاویر میکروسکوپ روبشی و بررسی تصاویر میکروسکوپ نوری و فلورسنت با استفاده از نرم افزار ImageJ (موسسه ملی بهداشت ایالات متحده، Bethesda, MD) انجام شد.

## ۳- نتایج و بحث

### ۳-۱ ساخت داربست های سه بعدی

با استفاده از روش ذکر شده در بخش قبل (۱-۲-۲)، ساخت محلول فیبروئین ابریشم با درصدهای ۲، ۵، ۱۰ و ۴۰ درصد با حل کردن پودر حاصل از خشک کردن انجمادی (Alpha2-4 LD plus MartinChrist، آلمان) آن درون آب انجام شد و جهت سنجش ترکیبات شیمیایی هیدروژل های ساخته شده و مواد خام، جذب گروه های عاملی نمونه ها با استفاده از طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوری در محدوده ی طول موج ۴۰۰۰-۲۰۰ بر سانتی متر، در شرایط اتاق سنجیده شد. همانطور که در شکل ۲

<sup>۲</sup> Phalloidin

<sup>۱</sup> DAPI

مشاهده می‌شود، سه پیک ۱۲۶۰/۸۵ بر سانتی‌متر، ۱۵۴۱/۸۶ بر سانتی‌متر و ۱۶۳۶/۹۰ بر سانتی‌متر به ترتیب پیک‌های مرتبط با گروه C=O و N-H، C-O (گروه‌های عاملی فیروئین ابریشم) است [۷۳]. همچنین، حضور سه پیک ۱۲۵۵، ۱۵۲۳ و ۱۶۳۰ بر سانتی‌متر به ترتیب اثبات‌کننده وجود آمید نوع سه، دو و یک و به‌طور کلی نشان‌دهنده استخراج کامل فیروئین ابریشم است.

برای تایید اکسید شدن نانوسلولز حاصل، جذب گروه‌های عاملی نمونه‌ها با استفاده از طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه<sup>۱</sup> در محدوده‌ی طول موج ۴۰۰-۴۰۰۰ بر سانتی‌متر، در شرایط اتاق سنجیده شد. طیف‌های جذب مربوط به گروه‌های شیمیایی نانوسلولز اکسیدشده به روش تمپو در شکل ۲ ارائه شده است. باند طیفی گسترده در ۳۳۴۰ بر سانتی‌متر ارتعاشات کششی گروه‌های هیدروکسیل موجود در سلولز و آب را نشان می‌دهد [۷۴]. طیف شاخص در ۲۹۲۰ بر سانتی‌متر مربوط به کشش C-H و طیف مشخصه سلولز است [۷۵]. از سوی دیگر، وجود کشش C-O و OH ارتعاشات مربوط به گروه‌های پلی ساکارید در سلولز نیز پیک شدید در ۱۰۳۰ بر سانتی‌متر را ایجاد می‌کند. بنابراین، نشان‌دهنده نانوسلولز اکسید شده و تاییدی بر اکسید موفقیت‌آمیز نانوسلولز به روش تمپو است. در نهایت وجود گروه‌های عاملی NH<sub>2</sub>، COOH و OH بر روی سطوح آنها می‌تواند سایت‌های تشخیص سلول را برای ارتقای تعاملات سلول-ماده ایجاد کند. برای تعیین بهترین نسبت ترکیب دو محلول فیروئین ابریشم و نانوسلولز اکسید شده، انواع نسبت‌های ذکر شده از این دو ماده (۱:۱، ۱:۴ و ۴:۱) مورد آزمون تزریق پذیری با سرنگ قرار گرفتند و نتایج شکل ۱ نشان‌دهنده مطلوب تر بودن نسبت بیشتر از نانوسلولز اکسید شده به نسبت

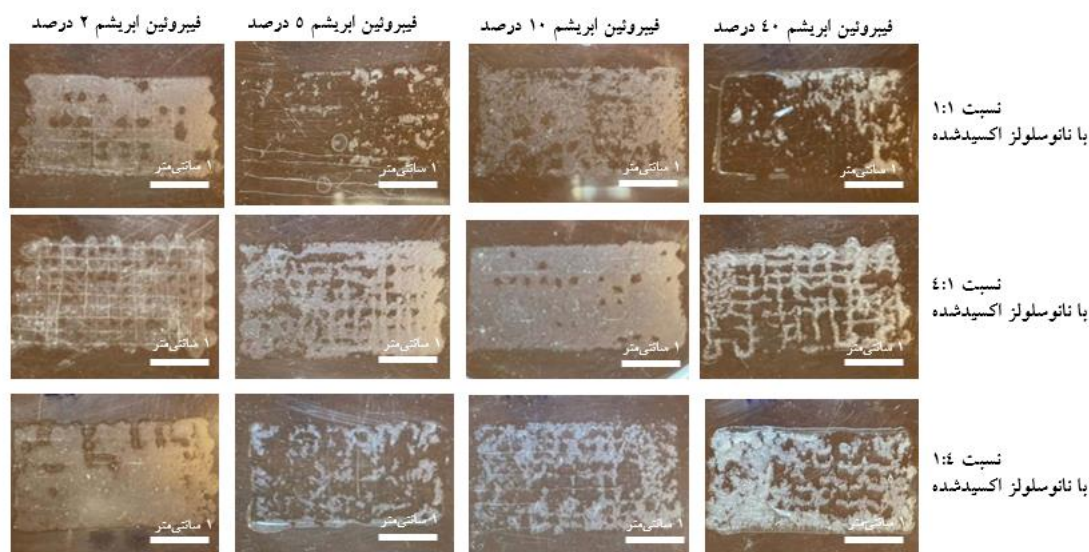
کمتر از فیروئین ابریشم است و در این نسبت، خروج ماده از سر سرنگ و سپس پایداری ساختار بهتر خواهد بود.

برای بررسی مدت زمان مناسب غوطه‌وری داربست‌ها درون مخلوط فیروئین-نانوسلولز-کلسیم کلراید، به‌طوری‌که پس از قرارگیری درون محیط کشت، از روی داربست شسته نشوند، نمونه‌های مختلف در ناحیه عدد موجی بین ۴۰۰ تا ۴۰۰۰ بر سانتی‌متر توسط طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه مورد ارزیابی قرار گرفت.

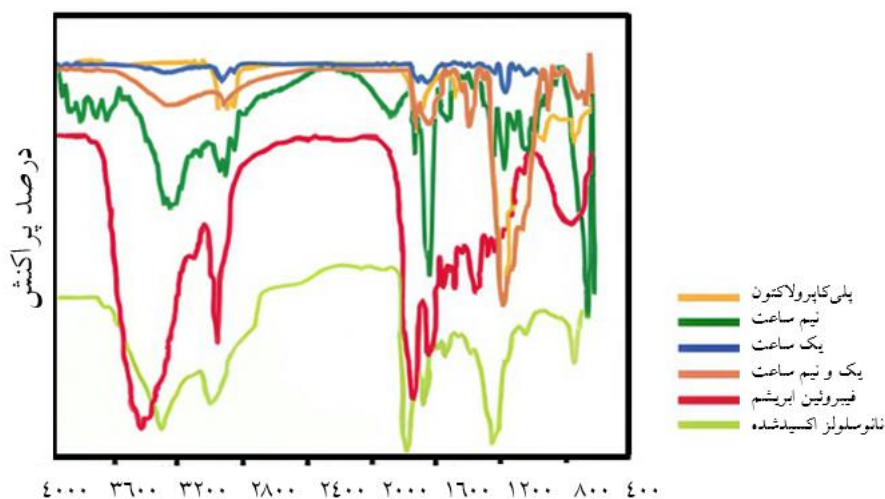
درطیف مربوط به پلی کاپرولاکتون (شکل ۲)، پیک‌های ناحیه ۲۸۶۰ و ۲۹۳۶ بر سانتی‌متر مربوط به ارتعاش کششی کربن-هیدروژن (C-H) به‌عنوان مثال گروه‌های متوکسیل، متیل و متیلن نمونه‌ها است. نوار جذبی ظاهر شده در ۱۷۲۴ بر سانتی‌متر مربوط به گروه کربونیل درگروه استر پلی کاپرولاکتون است. همچنین، ناحیه ۱۰۰۰ تا ۱۲۰۰ بر سانتی‌متر مربوط به ارتعاش کششی C-O به وضوح مشخص است. نوار جذبی ظاهر شده در ۷۳۰ بر سانتی‌متر مربوط به Long-chain band در زنجیره اصلی ساختار پلی کاپرولاکتون است (یعنی حداقل چهار گروه CH<sub>2</sub> در طول زنجیر پشت سر هم وجود دارد). همچنین، پیک ظاهر شده در ناحیه ۱۳۶۶ تا ۱۴۴۰ بر سانتی‌متر مربوط به گروه CH<sub>2</sub> است. نوار جذبی ظاهرشده در ۱۳۷۵ بر سانتی‌متر مربوط به گروه CH<sub>3</sub> خمشی در ساختار پلی کاپرولاکتون است.

همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، در طیف مربوط به انواع زمان‌های غوطه‌وری داربست پلی کاپرولاکتون درون ترکیب فیروئین ابریشم و نانوسلولز اکسید شده، به‌طور کلی پنج پیک اصلی نمایان می‌شود.

<sup>1</sup> Fourier Transform Infrared Spectroscopy



شکل ۱ ارزیابی نسبت بهینه فیبروئین ابریشم به محلول‌های نانوسلولز اکسید شده برای تزریق پذیری: مجموعه‌ای از ترکیبات از جمله نسبت‌های ۱:۱، ۱:۴ و ۴:۱ مورد آزمایش قرار گرفت که در ردیف‌های اول، دوم و سوم نشان داده شده است. محلول‌ها از طریق سرنگ و با غلظت‌های مختلف از فیبروئین ابریشم (۲، ۵، ۱۰ و ۴۰ درصد از چپ به راست) تزریق شد.



شکل ۲ طیف‌سنجی تبدیل فوریه فروسرخ مواد اولیه استخراج شده و مدت زمان‌های مختلف از غوطه‌وری ساختار درون پلیمرهای طبیعی.

۲۸۶۰ تا ۳۰۰۰ بر سانتی‌متر مربوط گروه C-H کششی در گروه‌های متیل و متیلین ساختار است. همچنین، پیک شاخص ظاهر شده در ناحیه ۱۶۲۲ تا ۱۷۲۲ بر سانتی‌متر مربوط به گروه‌های N-H خمشی و C=O کششی در گروه‌های عاملی آمین و کربونیل ساختار است. پیک‌های ظاهر شده در

پیک ظاهر شده در ناحیه ۳۳۰۰ تا ۳۶۰۰ بر سانتی‌متر مربوط به N-H کششی در گروه عاملی آمین موجود در ساختار سلیک فیبروئین است. همچنین، پیک پهن ظاهر شده در ناحیه ۳۰۰۰ تا ۱۳۳۰ بر سانتی‌متر مربوط به گروه هیدروکسیل (OH) است. نوارهای جذبی ظاهر شده در

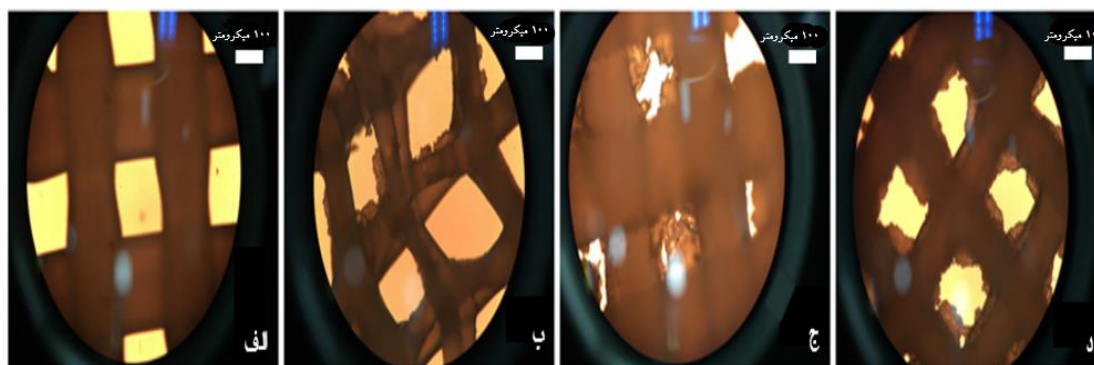
اثرگذار است [۷۷]. زیست مواد با تخلخل بالا، نفوذ آسان مواد مغذی به داخل هیدروژل و خروج مواد زائد از آن را به همراه دارند [۷۸]. در پژوهش‌های مختلف، اندازه مناسب حفرات جهت عملکردهای پزشکی و فعالیتهای مهندسی بافت، در محدوده  $180 \pm 20$  میکرومتر گزارش شده است [۷۹]. در مطالعات میکروسکوپ نوری انجام شده بر روی داربست‌ها، متوسط اندازه حفرات  $180$  میکرومتر و همچنین در صد تخلخل حدود  $85$  درصد است که تاییدی بر مناسب بودن داربست حاصل برای حمل ضایعات و مواد مغذی، رشد سلولی و رگ‌زایی است. با این حال، ایجاد اتصالات عرضی بیشتر میان فیبروئین ابریشم و نانوسلولز اکسید شده، منجر به ایجاد ساختاری متراکم تر با اندازه حفرات کوچک‌تر شده است که نتیجه به‌طور کامل در شکل ۳ قابل مشاهده است. به‌طور کلی سطح ناهموارتر منافذ در داربست ترکیب نانوسلولز و فیبروئین ابریشم، مناسب تر بودن هیدروژل‌ها برای اتصال سلولی را نشان می‌دهد و از طرفی در صد بالای تخلخل به مبادلات مواد و اکسیژن نیز کمک کرده و ویژگی مناسبی را برای مهندسی بافت و عملکردهای پزشکی چون ترمیم زخم ایجاد کرده است.

نواحی  $1450$  تا  $1600$  بر سانتی‌متر مربوط به حلقه‌ی آروماتیک در ساختار نانو سلولز اکسید شده است. نوار جذبی ظاهر شده در ناحیه  $1325$  بر سانتی‌متر مربوط به C-N خمشی موجود در ساختار و نوارهای جذبی ظاهر شده در محدوده‌ای  $700$  تا  $900$  بر سانتی‌متر مربوط به موقعیت قرار گرفتن استخلاف بر روی حلقه آروماتیک است که با پیک اورتون ظاهر شده در ناحیه  $1800$  بر سانتی‌متر تأیید شده است. همچنین، پیک جذبی ظاهر شده در ناحیه  $1278$  بر سانتی‌متر مربوط به گروه  $CH_3$  در ساختار است. با مقایسه این ۳ پیک مشخص می‌شود که در مدت زمان ۱ ساعت بیشترین اتصال میان گروه‌های مختلف صورت گرفته است و به همین علت شدت همه پیک‌ها در این زمان بیشتر و همه طیف‌ها تیزتر هستند.

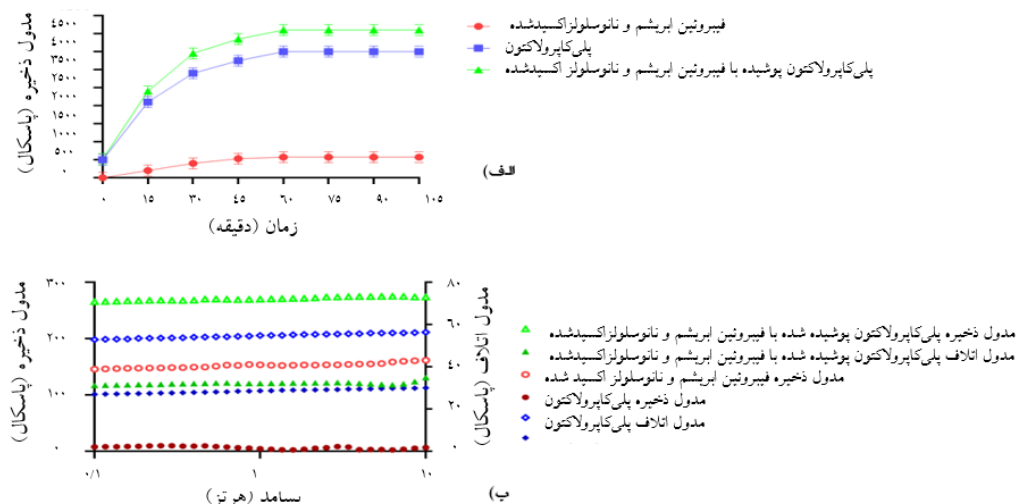
### ۲-۳ مشخصه‌یابی ساختار

#### ۱-۲-۳ بررسی حفرات و میزان تخلخل داربست‌ها پس از غوطه‌وری

اندازه حفرات و در صد تخلخل هیدروژل‌ها بر روی فرایند ترمیم و رگ‌زایی و در روند مهاجرت سلولی موثر است [۷۶]. تخلخل و اندازه حفرات، اتصال و رشد سلولی و انتقال مواد را تسهیل می‌کنند که بر روی فرایند تشکیل بافت جدید



شکل ۳ بررسی حفرات ساختارها با استفاده از میکروسکوپ نوری: الف) پلی‌کاپرولاکتون ب) پلی‌کاپرولاکتون/ نانوسلولز اکسید شده ج) پلی‌کاپرولاکتون/ ابریشم ۴۰ درصد د) پلی‌کاپرولاکتون/ فیبروئین ابریشم ۴۰ درصد و نانوسلولز اکسید شده.



شکل ۴ خواص گرانیوی کشسانی ساختارهای (۱) فیبروئین ابریشم و نانوسلولز اکسید شده (۲) پلی کاپرولاکتونی (۳) پلی کاپرولاکتون/فیبروئین ابریشم و نانوسلولز اکسید شده، : الف) تغییرات مدول کشسانی برحسب زمان در فرکانس ۱ هرتز ب) آزمون روبش فرکانس.

می‌دهد که ساختار حاصل می‌تواند سازگار با انقباض و آرامش پوست در نزدیکی زخم باشد و بنابراین دارای استحکام و خواص گرانیوی کشسانی مناسب به‌عنوان زخم پوش است.

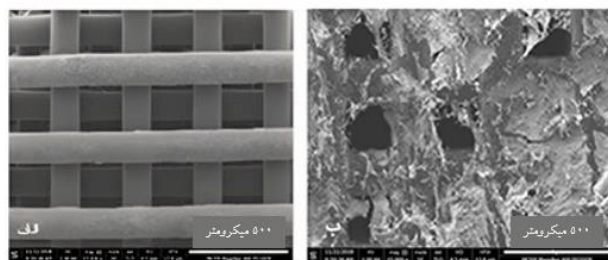
### ۳-۲-۳ تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی روبشی

داربست‌های پلی کاپرولاکتونی، پس از چاپ با ورقه‌ی نازکی از طلا پوشش داده شده و تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی روبشی با بزرگ‌نمایی‌های مختلف از آن‌ها برای بررسی دقت چاپ و اندازه حفرات صورت گرفت. شکل ۵ اندازه حفرات همگن با متوسط اندازه ۱۸۰ میکرومتر را نشان می‌دهد و گویای آن است که نازل بر اساس مختصات مورد انتظار حرکت کرده و ماده به‌صورت یکنواخت از سرنگ خارج شده است و در همه لایه‌ها اتصال مناسبی بین سطح و رشته‌ی جدید برقرار شده است.

### ۳-۲-۲ ارزیابی رفتار مکانیکی زخم‌پوش

همانطور که در شکل ۴-الف نشان داده شده است، تمام ساختارها در طی زمان افزایش یافت و در عرض ۱ ساعت به حالت ثابت رسید و  $G'$  به‌طور قابل توجهی از ۵۰۰ به ۴۰۰۰ پاسکال افزایش یافته است. این یافته نشان می‌دهد که افزایش مدت زمان غوطه‌وری داربست پلی کاپرولاکتون در ترکیب دو هیدروژل فیبروئین ابریشم و نانوسلولز اکسید شده، منجر به ایجاد ساختاری سفت‌تر و شبکه‌ای قوی‌تر ناشی از افزایش چگالی اتصالات عرضی بالاتر می‌شود، اما افزایش مدت زمان غوطه‌وری بیشتر از ۱ ساعت، تاثیری در ایجاد اتصالات عرضی بیشتر نخواهد داشت.

در نتیجه جاروب کرنش، همانطور که در شکل ۴-ب نشان داده شده است، هر دو ساختار پلی کاپرولاکتون، پلی کاپرولاکتون/فیبروئین ابریشم و نانوسلولز اکسید شده تحت کرنش ۶۰ درصد که نماینده بیشترین گرانیوی کشسانی خطی در پوست است، پایدار بودند. این نتیجه نشان



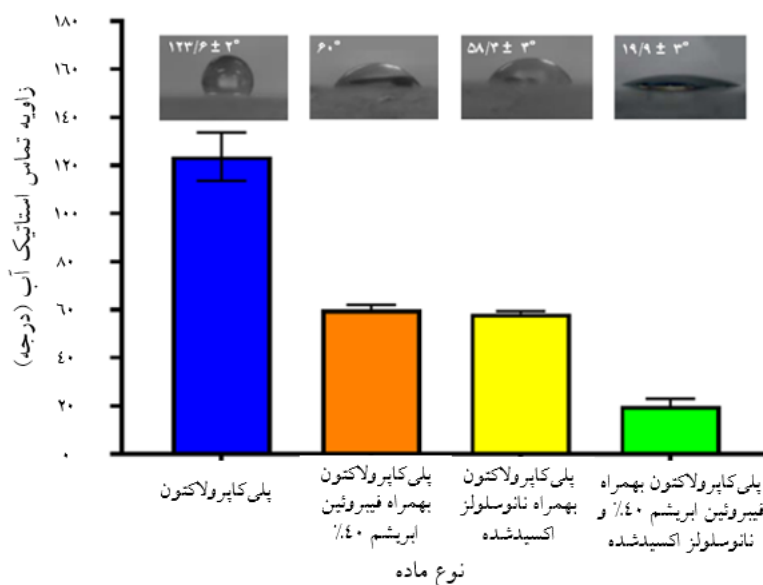
شکل ۵ تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از: الف) پلی کاپرولاکتون چاپ شده ب) پلی کاپرولاکتونی چاپ شده غوطه ور شده درون فیبروئین ابریشم ۴۰ درصد و نانوسلولز اکسید شده.

### ۳-۲-۴ خواص ترشوندگی و تورم پذیری

آبدوستی سطح داربست برای چسبندگی و تکثیر سلولی مناسب حیاتی است [۸۱] و همچنین مانع از ایجاد درد ناشی از کشیدگی بر روی زخم می شود [۸۲]. به طور خاص، هنگامی که داربست قرار است به عنوان زخم پوش استفاده شود، خاصیت ترشوندگی ذاتی آنها مهم است. زیرا از دست دادن آب از طریق لایه بیرونی پوست<sup>۱</sup> یکی از ناهنجاری های پوست محسوب می شود و مواد جلوگیری کننده از آن، برای این کاربرد مناسب در نظر گرفته می شوند. بنابراین، برای ارزیابی رفتار خیس شدن این داربست ها، اندازه گیری زاویه تماس با استفاده از یک قطره ۵ میکرولیتری آب یون زدایی شده و مقطر انجام شد. میانگین زوایای تماس برای داربست چاپ سه بعدی همراه با تصاویر مربوطه در شکل ۶ نشان داده شده است. همانطور که در شکل ۶ مشاهده می شود، زاویه تماس به دست آمده برای داربست پلی کاپرولاکتون حدود  $90^{\circ} \pm$  ۱۲۳/۶ است که به این معنی است که داربست بسیار آبگریز و غیر جاذب آب است. از طرف دیگر، قطره آب روی داربست آغشته به فیبروئین ابریشم و نانوسلولز اکسید شده، به میزان زیادی روی سطح داربست پخش می شود و زاویه تماس آب آن  $30^{\circ} \pm 19/9$  است که میزان زیادی از ترشوندگی توسط قطره آب را نشان می دهد. این

واقعیت نشان می دهد که افزودن هیدروژل های طبیعی به علت حضور گروه های آبدوست آنها، قدرت ترشوندگی و جذب آب داربست ها را افزایش می دهد. در واقع زوایای تماس با آب داربست آغشته شده به فیبروئین ابریشم به علت آبدوستی بالای فیبروئین خالص [۸۳]، از  $20^{\circ} \pm$  ۱۲۳/۶ به  $60^{\circ}$  کاهش یافته است، همچنین افزودن نانوسلولز اکسید شده به علت خاصیت بسیار آبدوستی که نانوسلولز به صورت طبیعی داشته که با اکسیداسیون نیز این خاصیت افزایش پیدا می کند، باعث کاهش این عدد به  $40^{\circ} \pm 58/4$  می شود [۸۴]. زیست فعالی ضعیف پلی کاپرولاکتون (مربوط به عدم وجود گروه های عاملی فعال زیستی در سطح) و انرژی سطحی کم پلی کاپرولاکتون به وضوح میل سلولی را کاهش می دهد و هر گونه فعل و انفعالات سلولی را مهار کرده و منجر به نرخ های پایین بازسازی بافت می شود. [۸۵] در نتیجه، تکنیک های اصلاح سطح، که قادر به بهبود عملکرد شیمیایی و زیستی پلیمر های مصنوعی هستند، اهمیت زیادی در زمینه مهندسی بافت پیدا می کنند. در میان این تکنیک ها، استفاده از بیومواد هیبریدی نظیر ترکیب پلی کاپرولاکتون با پلیمر های آبدوست نظیر فیبروئین ابریشم و نانوسلولز اکسید شده به عنوان موثرترین روش برای غلبه به چنین مشکلاتی، باعث ارائه خواص مطلوب برای کاربردهای سلولی ظاهر شده است [۸۶-۸۷].

<sup>۱</sup> Epidermis



شکل ۶ زاویه تماس قطره آب با سطح ساختارها

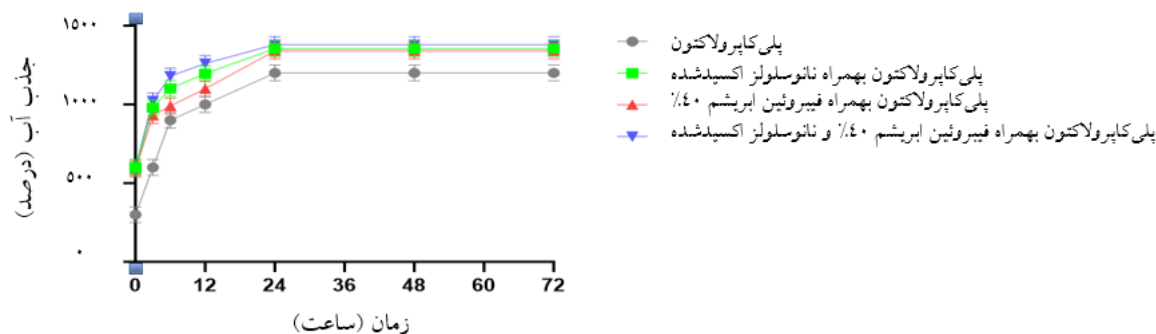
بسیار موثر است. داربست پلی کاپرولاکتونی حاوی هر دو نمونه هیدروژل فیبروئین ابریشم و نانوسلولز اکسید شده، با شیب یکسانی در ابتدا تورم داشته و طی چند ساعت این میزان کاهش یافته و سپس ثابت شده است. اما این افزایش جذب آب در مورد داربست آغشته به هر دو نوع هیدروژل پس از ۲۴ ساعت، بسیار بیشتر بوده است، اما پس از ۷۲ ساعت به علت تخریب، شاهد کاهش وزن و کاهش روند تورم پذیری داربست ها هستیم [۹۲]. تورم پذیری یا جذب آب، میزان نفوذ مایعات، عبور مواد مغذی و مواد زائد به ساختار ترکیبات را مشخص می کند [۹۲]. خواص تورم پذیری و میزان نفوذ مایعات، برای زنده ماندن سلول ها بر روی داربست امری ضروری اما نیازمند کنترل است، زیرا تورم پذیری کنترل نشده می تواند باعث ضعیف شدن و تخریب شدید ساختار پیش از آنکه بتواند خواص زخم پوشی خود را ارائه دهد شود [۸۷]. همانگونه که هیدروژل ها دارای تخلخل مناسب بوده اند تورم پذیری مناسب آن ها نیز، تأیید کننده ویژگی مناسب برای حمل مواد مغذی و زائد و خاصیت اکسیژن رسانی و حفظ رطوبت خوب آنها است.

شکل ۷ مربوط به تورم پذیری داربست ها است و همانطور که در آن نشان داده شده است، سرعت تورم در زمان های اولیه بالا بوده است، اما با گذشت زمان به دلیل کاهش پتانسیل شیمیایی هیدروژل های پوشاننده داربست برای جذب آب، سرعت آن کاهش یافت. در این ساختارها، هیدروژل فیبروئین ابریشم و نانوسلولز اکسید شده آبدوست هستند و می توانند مقدار زیادی آب را جذب کنند [۸۸]. منافذ با تعداد زیاد و اندازه بزرگ و به هم پیوسته در هیدروژل ها نیز نقش کلیدی در افزایش جذب آب داشتند که منجر به تورم سریع تر و حفظ آب می شود [۸۹]. در همین حال، محتوای با نسبت فیبروئین ابریشم کمتر نیز منجر به کمتر بودن تعداد اتصالات عرضی کلی و در نتیجه ایجاد تورم پذیری بیشتر است، که به نفع خاصیت تورم پذیری ساختار است [۹۰]، اما به طور کلی حضور گروه های شیمیایی آبدوست بر میزان اتصالات عرضی، از نظر ایجاد خاصیت تورم پذیری و جذب آب غلبه دارد [۹۱]. همچنین تورم پذیری نانوسلولز پس از اکسیداسیون و ایجاد گروه های کربوکسیل، تا ۱۰۰ برابر افزایش می یابد [۸۶]، که این موضوع نیز در افزایش تورم پذیری داربست ها

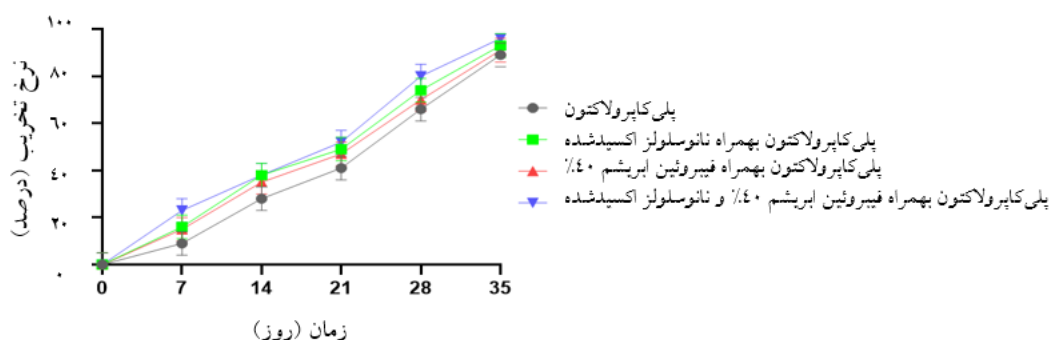


### ۳-۲-۵ آزمون زیست تخریب پذیری

نتایج آزمون تخریب پذیری سازه‌ها در شکل ۸ نشان داده شده است.



شکل ۷. تورم پذیری ساختارهای (۱) پلی کاپرولاکتون (۲) پلی کاپرولاکتون/نانوسلولز اکسید شده (۳) پلی کاپرولاکتون/فیبروئین ابریشم (۴) پلی کاپرولاکتون/فیبروئین ابریشم و نانوسلولز اکسید شده.



شکل ۸. ارزیابی زیست تخریب پذیری ساختارهای (۱) پلی کاپرولاکتون (۲) پلی کاپرولاکتون/نانوسلولز اکسید شده (۳) پلی کاپرولاکتون/فیبروئین ابریشم (۴) پلی کاپرولاکتون/فیبروئین ابریشم و نانوسلولز اکسید شده،

یافته و غلظت محلی بافر حاوی آنزیم جذب شده در اطراف پیوندها که می‌تواند تحت شکاف آنزیمی قرار گیرد افزایش می‌یابد [۹۳]. از آنجا که، تخریب داربست پلی کاپرولاکتونی به غلظت موثر آنزیم بستگی دارد، سرعت تخریب آن را می‌توان با افزایش تورم پذیری پوشش آن، تسریع کرد [۹۴]. لازم به ذکر است پوشش همزمان هر دو پلیمر طبیعی بر روی داربست پلی کاپرولاکتونی منجر به افزایش تخریب پذیری بیشتر از تک تک نمونه‌ها می‌شود که مربوط به تاثیر تجمعی هر دو

این نتایج، در ابعاد و وزن های مساوی و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در PBS (pH=۷/۴) حاوی لیزوزیم (۱۰۰۰۰ یونیت در میلی‌لیتر) پس از ۷، ۱۴، ۲۱، ۲۸، ۳۵ روز انکوبه شدن (۵ درصد دی اکسید کربن، ۳۷ درجه سانتی‌گراد، CB 160، BINDER، آلمان) و شستشو با آب یون‌زدایی شده<sup>۱</sup> برای حذف یون‌های جذب شده، به دست آمده‌اند. درصد تخریب داربست پلی کاپرولاکتونی زمانی که به هر یک از دو نوع پلیمر طبیعی آغشته می‌شود، افزایش می‌یابد، زیرا با افزودن آنها میزان تورم پذیری سطح افزایش

<sup>۲</sup> Enzyme cleavage

<sup>۱</sup> Deionized Water (DI)



پلیمر در افزایش آبدوستی و تورم‌پذیری است [۹۵]. به این معنی که آغشتگی ساختار پلی‌کاپرولاکتون تنها به یکی از انواع پلیمرها، تخریب‌پذیری کمتری را در داربست ایجاد می‌کند، زیرا وجود همزمان گروه‌های عاملی  $\text{NH}_2$ ،  $\text{COOH}$  و  $\text{OH}$  بر روی سطوح آنها می‌تواند سایت‌های جذب بافر حاوی آنزیم را برای افزایش تعاملات آنزیم- ماده ایجاد کند [۹۶]. همه نمونه داربست‌ها، در هفته اول تخریب ضعیف‌تری را نشان دادند و از روز هفتم به بعد، در صد تخریب به صورت معناداری افزایش داشته است. همین موضوع اثبات‌کننده‌ی افزایش آبدوستی ساختار در اثر آغشتگی به پلیمرهای آبدوست است و به این علت اساساً از روز هفتم تخریب آن‌ها شروع شده و تا هفته دوم نزدیک به نیمی از ساختار تخریب شده است. همانطور که از ساختار فیبروئین ابریشم و نانوسلولز انتظار می‌رود، در محیط کاراندام شنا‌سانه<sup>۱</sup> به‌طور پیوسته تخریب می‌شود تا در روز ۲۱-۲۸ به تخریب کامل ساختارها منتهی شود [۹۷، ۶۳]. اما وجود ساختار پایه از جنس پلی‌کاپرولاکتون، این روند را تا هفته پنجم به تاخیر می‌اندازد. این افزایش تخریب‌پذیری ساختار را می‌توان ناشی از هم‌افزایی اثر تعداد و اندازه منافذ موجود در داربست به‌علت چاپ سه بعدی، با خاصیت آبدوستی هیدروژل‌های طبیعی دانست که در وهله اول تعداد مولکول‌های آبی که درون ساختار جمع می‌شوند افزایش یافته و سپس همین موضوع منجر به تخریب سریع‌تر داربست می‌شود [۹۸].

### ۳-۳ مطالعات سلولی ساختار

#### ۳-۳-۱ بررسی زنده‌مانی

جهت انجام آزمون MTT، عصاره‌های روز ۱، ۳ و ۷ از داربست تهیه و به درون پلیت حاوی سلول‌های فیروبلاست کشت شده درون محیط کشت DMEM افزوده شد و به مدت ۲۴ ساعت درون انکوباتور (۵ دی

اکسید کربن درصد، ۳۷ درجه سانتی‌گراد، BINDER، CB ۱۶۰، آلمان) نگهداری و پس از خارج کردن محیط کشت به همراه عصاره‌ها، سلول‌ها با نمک MTT انکوبه شدند (سلول‌های زنده و دارای فعالیت سوخت‌وسازی<sup>۲</sup> نمک زرد رنگ تترازولیوم را به بلورهای بنفش رنگ فورمازان تبدیل کردند) و سپس با افزودن دی‌متیل سولفوکسید به چاهک‌ها، بلورهای فرمازان حل شدند و بلافاصله تغییر رنگ مشاهده شد (میزان بنفش بودن چاهک‌ها نمایانگر بالاتر بودن درصد زنده‌مانی سلول‌ها است [۹۹]). سپس، جذب در ۵۹۰ نانومتر با یک خواننده چندحالتی اسکن طیفی (Bio Tek-ELX800 Scientific، آمریکا) اندازه‌گیری شد. نمونه‌ی کنترل، نمونه سلول‌ها درون محیط کشت بدون حضور هیدروژل‌ها، به‌عنوان زنده‌مانی ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد و زنده‌مانی سایر نمونه‌ها بر اساس آن سنجیده و در نمودار شکل ۹ نشان داده شده است. همچنین، درصد زنده‌مانی با استفاده از رابطه ۵، اثبات‌کننده عدم سمیت نمونه‌ها است [۱۰۰].

رابطه ۵ = تعداد کل سلول‌های زنده

حجم سوسپانسیون × ضریب رقت × میانگین سلول‌های زنده × ۱۰۴

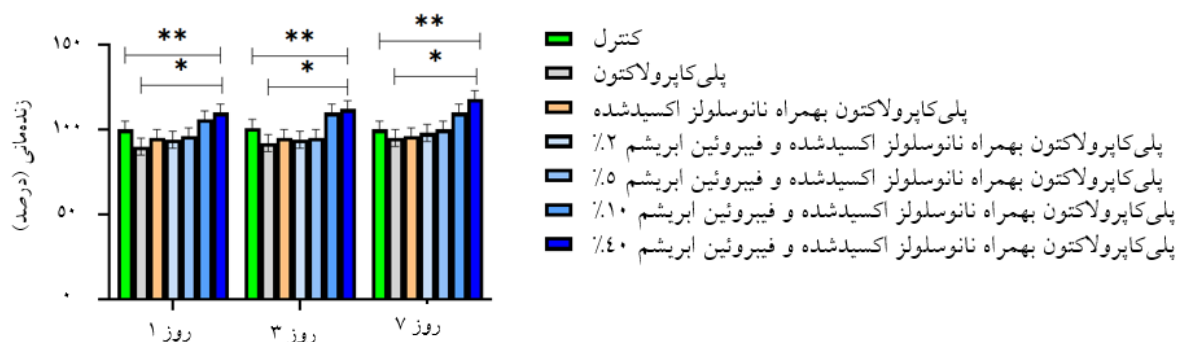
عدم سمیت داربست و زنده‌مانی قابل توجه سلول‌ها به‌صورت کیفی با دارا بودن  $\text{pH}=7$ ، و همچنین با نمایان شدن رنگ بنفش به‌علت بلورهای حل شده فرمازان و به‌صورت کمی با بررسی جذب نمونه‌ها و مقایسه درصد زنده‌مانی سلول‌ها بر مبنای کنترل اثبات شد. همچنین، می‌توان از نمودار چنین استنباط کرد که با افزایش میزان تخریب نمونه‌ها تا روز هفتم، از طرفی افزایش فعالیت تکثیر سلولی، ساخت کلاژن نوع I و III و سنتز فیبرونکتین در سلول‌های فیروبلاست که در حضور پلی‌پپتیدهای کوچک و محلولی از اسید آمینه‌های ناشی از تجزیه

<sup>2</sup> Metabolic

<sup>1</sup> Physiologic

فیبروئین ابریشم در محیط کشت ایجاد می شود و از طرفی رهایش بسیار جزئی دی اکسید کربن در اثر تجزیه نانو سلولز که به عنوان یک بافر برای حفظ pH در محدوده کارانداز شناسی برای رشد سلول ها عمل می کند، منجر به زنده ماندن بیشتر تمامی نمونه ها نسبت به عصاره ی روز اول شده است [۱۰۳-۱۰۱]. همچنین، رهایش متان ناشی از تجزیه نانو سلولز در کاهش نشانگرهای التهابی و مهار نفوذ سلول های التهابی با نقش زخم پوش تناسب بالایی دارد [۱۰۴].

افزایش زنده ماندن با افزایش آزادسازی عصاره ها را می توان در بالا رفتن نرخ تخریب هیدروژل های فیبروئین ابریشم و نانو سلولز اکسید شده از روز هفتم که فضا را برای زنده ماندن سلول ها فراهم می کنند، نیز دانست [۱۰۵]. در واقع سازه های بسیار متخلخل با منافذ بزرگ و به هم پیوسته می تواند باعث بهبود نفوذ سلول در ساختار و کمک به انتقال مواد مغذی به سلول ها و همچنین انتقال مواد زائد سوخت و ساز شود [۱۰۶].



شکل ۹ مقایسه زنده ماندن سلول ها بر روی ساختارها.

### ۳-۳-۲ رنگ آمیزی سلول ها

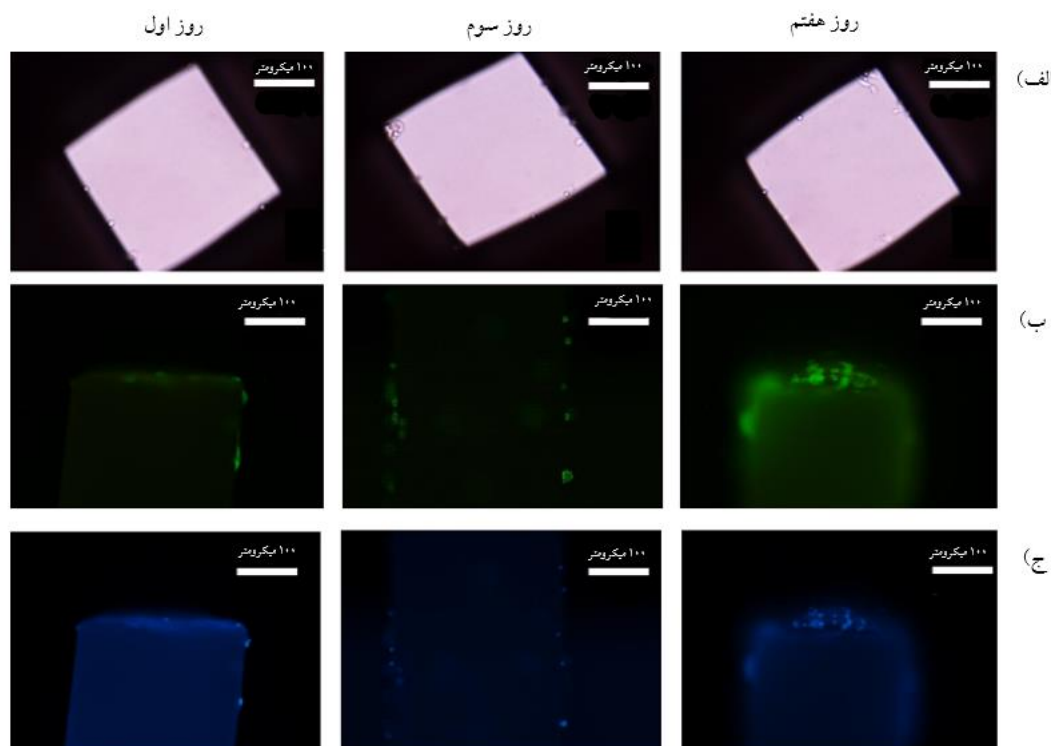
برای تقلید داربست های سه بعدی از فضای بستر خارج سلولی برای کاربردهای مهندسی بافت، زیست سازگاری و کارایی بسترهای سه بعدی در زنده ماندن و تکثیر سلولی باید ارزیابی شود [۱۰۷]. بنابراین، مهمترین هدف آزمایش عملکرد بسترهای تولید شده در حمایت از بقای سلول های فیروپلاست و ارزیابی توانایی آنها در تکثیر سلولی بود که در مهندسی بافت حیاتی است [۱۰۸]. مطالعه زنده ماندن سلولی بر روی داربست از طریق رنگ آمیزی DAPI و فالوئیدین انجام شد و مشاهده ی وضعیت سلول ها و تصویربرداری از آنها توسط میکرو سکوپ نوری (OLYMPUS) IX81 Inverted سنت (KERN & Sohn GmbH, آلمان) و همچنین میکرو سکوپ فلور سنت (OLYMPUS) IX81 Inverted، ژاپن انجام شد که تصاویر در شکل ۱۰ قابل مشاهده است. برای رنگ آمیزی ساختارهای حاوی سلول با استفاده

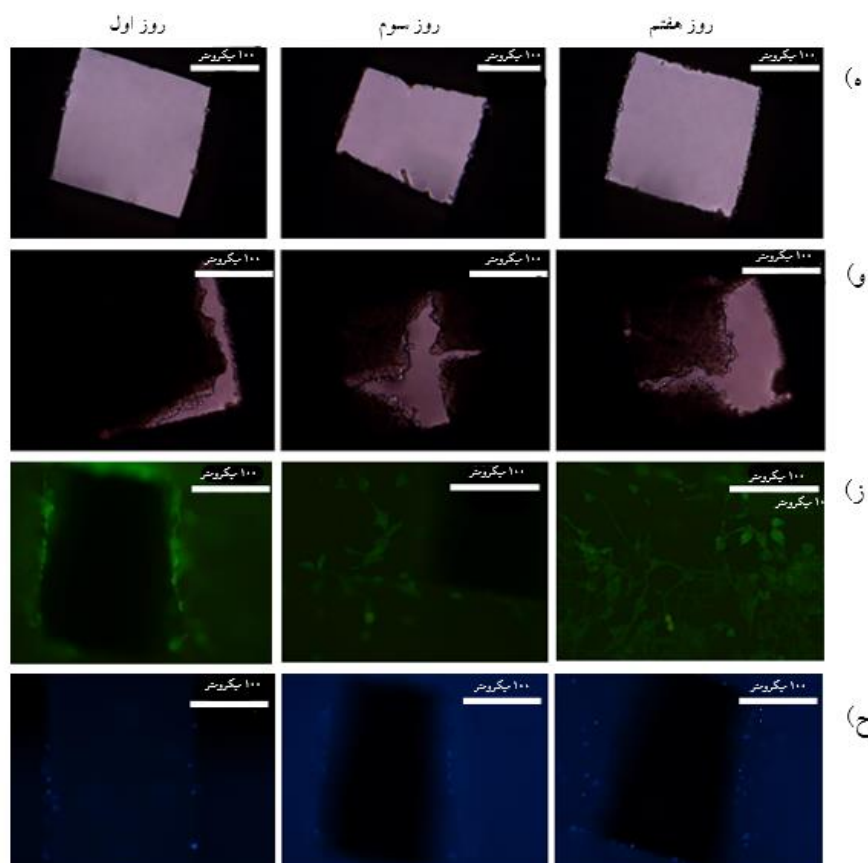
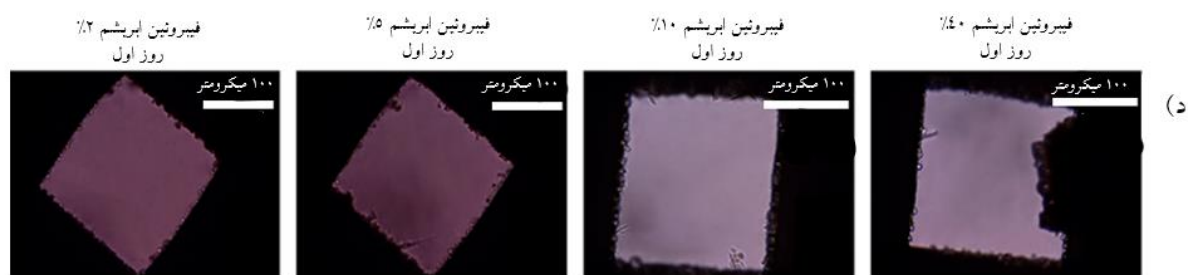
مطابق با نمودار شکل ۹، زنده ماندن مشاهده شده بر روی داربست خالی پلی کاپرولاکتون در حدود ۹۰ درصد گزارش شده است که خود نشان دهنده عدم سمیت آن در کاربردهای مهندسی بافت است. افزودن هر یک از صدهای فیبروئین ابریشم و همچنین نانو سلولز اکسید شده به داربست پلی کاپرولاکتونی، موجب افزایش زنده ماندن بوده است، اما تفاوت این افزایش نسبت به نمونه پلی کاپرولاکتون از نظر آماری معنادار نیست. بر اساس تجزیه و تحلیل آماری، زنده ماندن سلول های فیروپلاست بر روی داربست پلی کاپرولاکتون/ فیبروئین ابریشم و نانو سلولز اکسید شده به علت حضور همزمان هر دو هیدروژل طبیعی (فیبروئین ابریشم ۴۰ درصد و نانو سلولز اکسید شده) بیشترین میزان است و تفاوت معناداری با نمونه پلی کاپرولاکتون و همچنین کنترل، در هر کدام از بازه های زمانی از خود نشان داده است.

شکل ۱۰ ردیف ۴ مربوط به داربست‌های پلی‌کاپرولاکتونی پوشش داده شده با درصد‌های مختلف از فیبروئین ابریشم است و همانطور که در شکل مشخص است، نه تنها فیبروئین به‌علت زیست سازگاری بالایی که ایجاد می‌کند موجب افزایش تعداد سلول‌های اتصال یافته به داربست و افزایش زنده‌مانی آنها می‌شود، بلکه با افزایش درصد آن، این میزان افزایش می‌یابد.

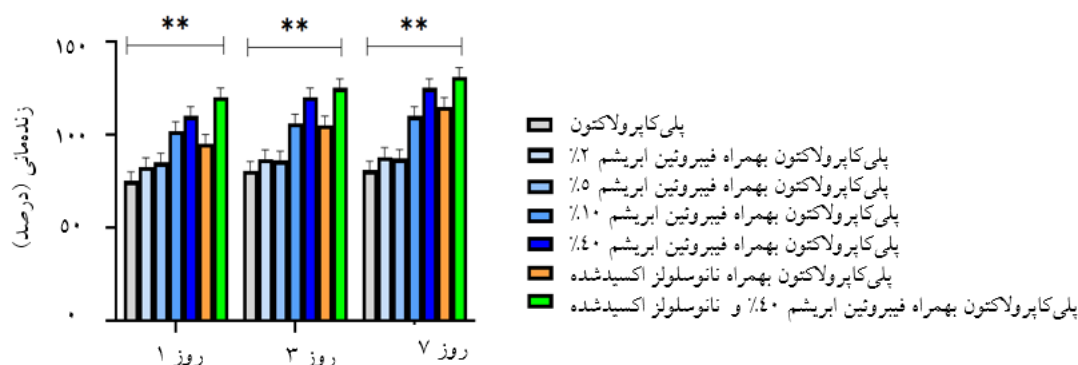
شکل ۱۰ ردیف ۵ مربوط به سلول‌های کشت یافته بر روی داربست پلی‌کاپرولاکتونی آغشته به نانوسلولز اکسید شده در روزهای ۱، ۳ و ۷ است که باز هم به‌علت زیست سازگاری بالای نانوسلولز، تعداد بیشتری سلول در مقایسه با داربست پلی‌کاپرولاکتونی پوشش نیافته و پلی‌کاپرولاکتونی آغشته به فیبروئین ابریشم، به داربست اتصال یافته و زنده‌مانی سلولی به خوبی در روز هفتم نیز مشاهده می‌شود و سلول‌ها ریخت شناسی بالغ خود را نیز پیدا کرده‌اند.

از رنگ دابی و فالوئیدین در روز ۱، ۳ و ۷، ابتدا محیط‌های کشت آنها حذف شد و سپس به آرامی (برای جلوگیری از شسته شدن سلول‌های مرده) با PBS و کلسیم ۴ میکرومولار شسته شدند و پس از انجام تثبیت و نفوذپذیری در آنها، برای رنگ‌آمیزی هسته سلول‌ها با ۴،۶ diamidino-2-phenylindole، رقت ۱:۲۰۰۰ آن در PBS تهیه شد. همچنین برای رنگ‌آمیزی اکتین‌ها، فالوئیدین با رقت ۰/۱۷ میکروگرم در میلی‌لیتر در آلبومین سرم گاوی ۱ درصد تهیه و پس از اضافه شدن به کشت سلولی، به مدت ۳ دقیقه در تاریکی انکوبه (۵ در صد دی اکسید کربن، ۳۷ درجه سانتی‌گراد، CB 160، BINDER، آلمان) و سپس ساختارها با PBS شسته و در زیر میکرو سکوپ فلور سنت (X81 Inverted، OLYMPUS، ژاپن) مشاهده شدند. شکل ۱۰ ردیف ۱ و ۲ و ۳ نشان می‌دهد که تنها تعداد کمی سلول بر روی داربست پلی‌کاپرولاکتونی باقی مانده است. اما همان سلول‌ها در طی روز سوم و هفتم نیز زنده مانده و ریخت شناسی بالغ تری پیدا کرده‌اند.





شکل ۱۰ سلول‌های فیبروبلاست کشت داده شده بر روی: الف، ب، ج) پلی‌کاپرولاکتون با تصویر میکروسکوپ نوری، فلورسنس با رنگ‌آمیزی با داپی و فلورسنس با رنگ‌آمیزی با فالوئیدین؛ د) پلی‌کاپرولاکتون آغشته به فیبرونئین ابریشم با درصدهای مختلف؛ ه) پلی‌کاپرولاکتون/نانوسلولز اکسید شده؛ ز، ح) پلی‌کاپرولاکتون/فیبرونئین ابریشم ۴۰ درصد + نانوسلولز اکسید شده با تصویر میکروسکوپ نوری، فلورسنس با رنگ‌آمیزی با داپی، فلورسنس با رنگ‌آمیزی با فالوئیدین.



شکل ۱۱ گزارش کمی از تصاویر میکروسکوپ نوری و میکروسکوپ فلورسنس از زنده‌مانی سلول‌های فیبروبلاست کشت شده بر روی ساختارها.

ها هستند. نتایج زنده‌مانی سلول‌ها بر روی هر داربست همچنین با استفاده از نرم‌افزار ImageJ (NIH, 1.52v, امریکا) به صورت کمی بررسی شد [۱۱۲] و نتایج تایید کننده افزایش معنی دار زنده‌مانی داربست در مقایسه با نمونه پلی‌کاپرولاکتون خالی در هر بازه زمانی است. (شکل ۱۱)

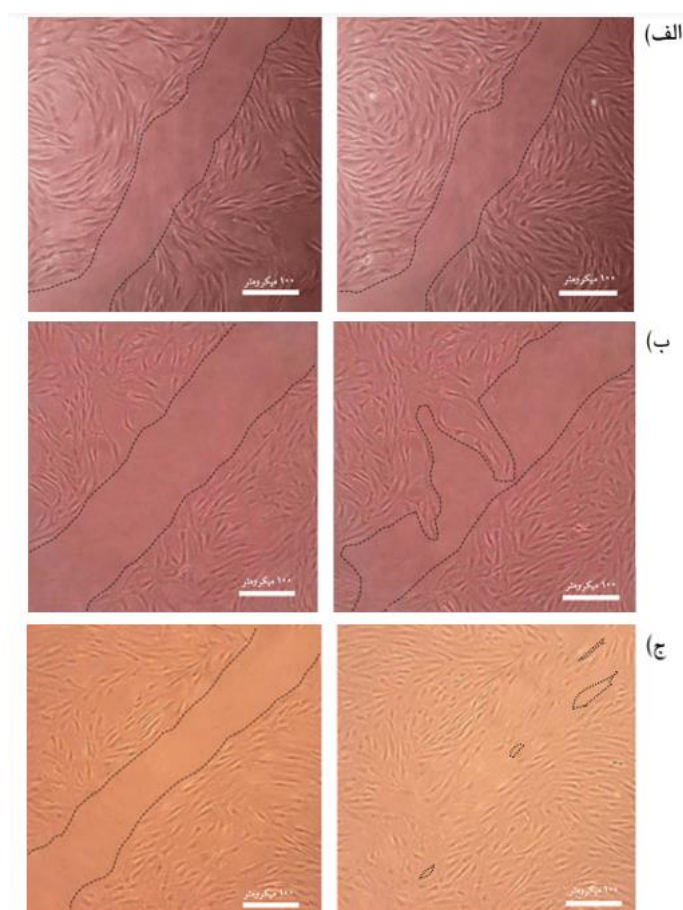
### ۳-۳-۳ آزمون خراش

برای انجام این آزمون، پس از رشد سلول‌ها به صورت تک لایه‌ای، با استفاده از میکروسکوپ نوری ۸۲۵ (KERN & Sohn GmbH, آلمان)، در دو بازه زمانی صفر و ۲۴ ساعت پس از اضافه شدن هر عصاره به خراش، از آنها عکس‌برداری شد و مهاجرت سلولی و پر شدن خراش توسط سلول‌های فیبروبلاست مورد بررسی قرار گرفت [۱۱۳-۱۱۵]. همانطور که انتظار می‌رفت و همانطور که در شکل ۱۲ نشان داده شده است، سلول‌های کشت شده در محیطی حاوی عصاره نانوسلولز اکسید شده و فیبروئین ابریشم، تحت تاثیر تکرار مولکول‌های گلوکز در نانوسلولز که اولین خط تماس را با سلول‌ها را ایجاد می‌کند و واسطه چسبندگی سلولی و مهاجرت سلولی است و همچنین نقشی که فیبروئین ابریشم در افزایش بیان و فسفریلاسیون فاکتور رونویسی c-Jun ایفا می‌کند، منجر به جذب گیرنده‌های سطح سلولی متشکل از اینتگرین‌ها و

شکل ۱۰ ردیف ۶ و ۷ و ۸ که هدف اصلی این پژوهش می‌باشد، کشت سلول‌های فیبروبلاست بر روی داربست پلی‌کاپرولاکتونی آغشته به ترکیب هر دو پلیمر طبیعی نانوسلولز اکسید شده و فیبروئین ابریشم است که در آن سلول‌ها به خوبی به داربست متصل شده و زنده‌مانی سلول‌ها در روز سوم و هفتم نیز به خوبی مشاهده می‌شود و با بررسی نمونه‌های کنترل که برای نانوسلولز اکسید شده و فیبروئین ابریشم به صورت جداگانه بررسی شدند، این افزایش تعداد سلول‌ها را می‌توان مربوط به افزایش زیست سازگاری ناشی از این دو پلیمر طبیعی دانست [۹۵]. مرگ سلولی پایین تر و تکثیر سلولی بهتر این ساختار را می‌توان به دلیل تفاوت نفوذ و توزیع سلول در شبکه‌های سه بعدی بستر دانست [۱۰۹]. در واقع سلول‌های فیبروبلاست به علت خاصیت آبدوستی دو هیدروژل طبیعی، به داربست جذب شده و به داخل شبکه‌های داخلی نفوذ می‌کنند یا آنکه به دلیل اثر دانان و اثر اسمزی بعدی در طول تورم داربست‌ها [۱۱۰] با استفاده از آب به داربست وارد می‌شوند. بنابراین، سلول‌ها می‌توانند به طور مساوی توزیع شوند، رشد کنند و در درون داربست تکثیر شوند [۱۱۱]. این نتایج نشان می‌دهد که پانسمان‌های حاصل، گزینه‌های امیدوارکننده‌ای به عنوان بستری برای مطالعه کشت سلولی سه بعدی و سایر بافت

پایان ۲۴ ساعت از زمان ایجاد خراش در نمونه کنترل مهاجرت سلولی آغاز شده و تا تکمیل شکاف نیازمند گذشت زمان بیشتری است. علاوه بر این، تراکم سلول در پشت محل خراش نیز با گذشت زمان در حال افزایش است که از بسته شدن بهتر زخم پشتیبانی می‌کند [۱۲۱]. این مشاهدات نشان دهنده پتانسیل ساختارهای ساخته شده در تسریع بسته شدن زخم و بنابراین قابلیت ترمیم دهنده آنها است.

پروتئوگلیکان‌ها شده و ظرفیت مهاجرت سلول‌ها را افزایش می‌دهند و به نظر می‌رسد که سلول‌های فیبروبلاست واقع در نزدیکی لبه ناحیه خراشیده در مقایسه با شاهد‌ها (بدون اضافه شدن عصاره و همچنین داربست پلی‌کاپرولاکتون خالی) حرکت بیشتری داشته‌اند و با گذشت زمان ۲۴ ساعت (در مقایسه با ۴۸ ساعت که مربوط به نمونه پلی‌کاپرولاکتونی گزارش شده است) به سمت منطقه خالی می‌رسند [۱۲۰-۱۱۶]. در مقابل، در



شکل ۱۲ تعیین اثر ترمیم زخم عصاره‌ی ساختار با استفاده از آزمون خراش در زمان ایجاد خراش (تصاویر سمت چپ) و پس از ۲۴ ساعت از اضافه شدن عصاره‌ها (تصاویر سمت راست): (الف) نمونه کنترل. (ب) عصاره‌ی پلی‌کاپرولاکتون. (ج) عصاره پلی‌کاپرولاکتون/نانوسلولز اکسید شده+فیبروژن ابریشم.

## ۴- نتیجه گیری

در این پژوهش، برای کاربردهای پانسمان زخم، هیدروژل ترکیب فیبروئین ابریشم و نانو سلولز اکسید شده تهیه و به عنوان پوشش به داربست‌های پلی‌کاپرولاکتونی چاپ شده با استفاده از دستگاه چاپگر سه بعدی اضافه شد تا همزمان از خواص مکانیکی داربست پلی‌کاپرولاکتونی و از خواص زیست سازگاری دو پلیمر طبیعی دیگر استفاده شود و نهایتاً سلول‌های فیبروبلاست نیز برای بهبود سریعتر بر روی آنها کشت شد. نتایج مشخصه‌یابی شیمیایی توسط آزمون تبدیل فوریه نشان داد، فیبروئین ابریشم محلول در آب به خوبی از پیل‌های ابریشم کرم ابریشم بومبیکس موری استخراج و نانوسلولز نیز به خوبی با استفاده از روش تمپو اکسید شد. نتایج نشان داد که بهترین نسبت از ترکیب نانو سلولز اکسید شده با فیبروئین ابریشم نسبت بیشتر از نانو سلولز اکسید شده و نسبت کمتر از فیبروئین ابریشم است (۱:۴)، بهترین غلظت از فیبروئین ابریشم ۴۰ درصد است و بهترین مدت زمان این آغشته سازی (غوطه‌وری) ۱ ساعت است. نتایج ترشوندگی حاکی از افزایش آبدوستی داربست پلی‌کاپرولاکتون در اثر افزوده شدن هیدروژل‌های طبیعی است و متعاقباً بررسی تورم‌پذیری داربست‌ها نیز نشان دهنده درجه ی جذب آب بالای ۸۰ درصد است. آزمون تخریب پذیری نشان داد که داربست‌ها زمانی که حاوی پلیمرهای طبیعی باشند، به علت افزایش آبدوستی، سریعتر تجزیه می‌شوند (بیش از ۹۰ درصد طی پنج هفته) و به طور کلی خاصیت زیست تخریب پذیری مطلوبی نشان می‌دهند که این خاصیت می‌تواند در کاربردهای پزشکی به خصوص ترمیم زخم نوید بخش تخریب خود به خود هیدروژل پس از طی دوره درمان و ترمیم بافت باشد. با استفاده از تصاویر میکروسکوپ نوری، وجود حفرات بزرگ ۱۸۰ میکرومتری و تخلخل کلی ۸۵ درصد تایید شد که وجود این حفرات بهم پیوسته تضمین کننده فضای

کافی برای جذب آب و تراوه و همچنین اتصال تعداد کافی از سلول‌هاست. از آزمون رنگ سنجی MTT و همچنین رنگ‌آمیزی با دو رنگ دابی و فالوئیدین، زنده‌مانی، رشد و تکثیر سلول‌های فیبروبلاست اثبات و از آزمون خراش نیز، امکان مهاجرت آنها درون این ساختار اثبات شد. آزمون جاروب زمانی هیدروژل‌ها نشان دادن بهترین مدت زمان غوطه‌وری ۱ ساعت است و سپس جاروب کرنش نیز حاکی از سازگاری ساختار حاصل با انقباض و آرامش پوست در ناحیه زخم بود و بنابراین ساختار حاصل مقاومت، استحکام و خواص گرانروی کشسانی لازم در نقش پانسمان زخم را از خود نشان داد. مجموع این ویژگی‌ها نشان‌دهنده قدرت بسیار امیدوارکننده پانسمان تولید شده در استفاده برای تسریع ترمیم زخم است.

## ۵- منابع

- [1] Sun, W., Liu, Z., Xu, J., Cheng, Y., Yin, R., Ma, L., ... & Zhang, H. (2023). 3D skin models along with skin-on-a-chip systems: A critical review. *Chinese Chemical Letters*, 34(5), 107819.
- [2] Rogers, A. P., Mileto, S. J., & Lyras, D. (2023). Impact of enteric bacterial infections at and beyond the epithelial barrier. *Nature Reviews Microbiology*, 21(4), 260-274.
- [3] Zhang, S., Liu, H., Li, W., Liu, X., Ma, L., Zhao, T., ... & Liu, W. (2023). Polysaccharide-based hydrogel promotes skin wound repair and research progress on its repair mechanism. *International Journal of Biological Macromolecules*, 125949.
- [4] Popescu, V., Cauni, V., Petrutescu, M. S., Rustin, M. M., Bocai, R., Turculeț, C. R., ... & Mastalier, B. (2023). Chronic Wound Management: From Gauze to Homologous Cellular Matrix. *Biomedicines*, 11(9), 2457.
- [5] Yang, Y., Li, M., Pan, G., Chen, J., & Guo, B. (2023). Multiple Stimuli-Responsive Nanozyme-Based Cryogels with Controlled NO Release as Self-Adaptive Wound Dressing for Infected Wound Healing. *Advanced Functional Materials*, 2214089.

Research Part B: Applied Biomaterials, 111(1), 220-233.

[15] Zhou, B., Jiang, X., Zhou, X., Tan, W., Luo, H., Lei, S., & Yang, Y. (2023). GelMA-based bioactive hydrogel scaffolds with multiple bone defect repair functions: therapeutic strategies and recent advances. *Biomaterials Research*, 27(1), 86.

[16] Almajidi, Y. Q., Gupta, J., Sheri, F. S., Zabibah, R. S., Faisal, A., Ruzibayev, A., ... & Farhood, B. (2023). Advances in chitosan-based hydrogels for pharmaceutical and biomedical applications: A comprehensive review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 127278.

[17] Reizabal, A., Costa, C. M., Pérez-Álvarez, L., Vilas-Vilela, J. L., & Lanceros-Méndez, S. (2023). The New Silk Road: Silk Fibroin Blends and Composites for Next Generation Functional and Multifunctional Materials Design. *Polymer Reviews*, 1-64.

[18] Wuran, W., Aihemaitijiang, X., Zhu, T., & He, H. Application of silk fibroin composite scaffold in bone tissue engineering.

[19] Sun, X., Zhang, Y., Cui, J., Zhang, C., Xing, C., Bian, H., ... & Su, L. (2023). Advanced multilayer composite dressing with co-delivery of gelsevirine and silk fibroin for burn wound healing. *Composites Part B: Engineering*, 253, 110549.

[20] Liu, Y., Zhang, Z., Zhang, Y., Luo, B., Liu, X., Cao, Y., & Pei, R. (2023). Construction of adhesive and bioactive silk fibroin hydrogel for treatment of spinal cord injury. *Acta Biomaterialia*, 158, 178-189.

[21] Tiwari, N., Kumar, D., Priyadarshani, A., Jain, G. K., Mittal, G., Kesharwani, P., & Aggarwal, G. (2023). Recent progress in polymeric biomaterials and their potential applications in skin regeneration and wound care management. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 104319.

[22] Mikhailidi, A., Ungureanu, E., Belosinschi, D., Tofanica, B. M., & Volf, I. (2023). Cellulose-Based Metallogels—Part 3: Multifunctional Materials. *Gels*, 9(11), 878.

[23] Mohammadi, S., Jabbari, F., & Babaeipour, V. (2023). Bacterial cellulose-based composites as vehicles for dermal and transdermal drug delivery: A

[6] Pita-Vilar, M., Concheiro, A., Alvarez-Lorenzo, C., & Diaz-Gomez, L. (2023). Recent advances in 3D printed cellulose-based wound dressings: A review on in vitro and in vivo achievements. *Carbohydrate Polymers*, 121298.

[7] Nguyen, H. M., Le, T. T. N., Nguyen, A. T., Le, H. N. T., & Pham, T. T. (2023). Biomedical materials for wound dressing: Recent advances and applications. *RSC advances*, 13(8), 5509-5528.

[8] Solanki, D., Vinchhi, P., & Patel, M. M. (2023). Design Considerations, Formulation Approaches, and Strategic Advances of Hydrogel Dressings for Chronic Wound Management. *ACS omega*, 8(9), 8172-8189.

[9] Jose, J., Khot, K. B., Thomas, S. P., Chopra, H., Gopan, G., Bandiwadekar, A., ... & Vora, V. (2023). Advances in microneedles-based drug delivery system on promoting wound healing. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 105163.

[10] Tan, Y., Yang, Q., Zheng, M., Sarwar, M. T., & Yang, H. (2023). Multifunctional Nanoclay-Based Hemostatic Materials for Wound Healing: A Review. *Advanced Healthcare Materials*, 2302700.

[11] Jayakumar, A., Mathew, S., Radoor, S., Kim, J. T., Rhim, J. W., & Siengchin, S. (2023). Recent advances in two-dimensional nanomaterials: properties, antimicrobial, and drug delivery application of nanocomposites. *Materials Today Chemistry*, 30, 101492.

[12] Uchida, D. T., & Bruschi, M. L. (2023). 3D Printing as a Technological Strategy for the Personalized Treatment of Wound Healing. *AAPS PharmSciTech*, 24(1), 41.

[13] Zboinska, M. A., Sämfors, S., & Gatenholm, P. (2023). Robotically 3D printed architectural membranes from ambient dried cellulose nanofibril-alginate hydrogel. *Materials & Design*, 112472.

[14] Saraiva, M. M., Campelo, M. D. S., Camara Neto, J. F., Lima, A. B. N., Silva, G. D. A., Dias, A. T. D. F. F., ... & Ribeiro, M. E. N. P. (2023). Alginate/polyvinyl alcohol films for wound healing: Advantages and challenges. *Journal of Biomedical Materials*



- in Tissue Engineering: A Review. *Materials*, 16(12), 4267.
- [33] Budharaju, H., Suresh, S., Sekar, M. P., De Vega, B., Sethuraman, S., Sundaramurthi, D., & Kalaskar, D. M. (2023). Ceramic Materials for 3D Printing of Biomimetic Bone Scaffolds—Current state-of-the-art & Future Perspectives. *Materials & Design*, 112064.
- [34] Li, N., Khan, S. B., Chen, S., Aiyiti, W., Zhou, J., & Lu, B. (2023). Promising New Horizons in Medicine: Medical Advancements with Nanocomposite Manufacturing via 3D Printing. *Polymers*, 15(20), 4122.
- [35] Zeng, J., Xiong, S., Zhou, J., Wei, P., Guo, K., Wang, F., ... & Wu, D. (2023). Hollow hydroxyapatite microspheres loaded with rhCXCL13 to recruit BMSC for osteogenesis and synergetic angiogenesis to promote bone regeneration in bone defects. *International Journal of Nanomedicine*, 3509-3534.
- [36] Wang, L., Qu, Y., Li, W., Wang, K., & Qin, S. (2023). Effects and metabolism of fish collagen sponge in repairing acute wounds of rat skin. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 11, 1087139.
- [37] Popal, Z., Nickel, K. F., Wöltje, M., Aibibu, D., Knipfer, C., Smeets, R., & Renné, T. (2023). Polyphosphate-loaded silk fibroin membrane as hemostatic agent in oral surgery: a pilot study. *International Journal of Implant Dentistry*, 9(1), 1-8.
- [38] Xu, H., Sanchez-Salvador, J. L., Blanco, A., Balea, A., & Negro, C. (2023). Recycling of TEMPO-mediated oxidation medium and its effect on nanocellulose properties. *Carbohydrate Polymers*, 319, 121168.
- [39] Wang, K., Ma, Q., Zhou, H. T., Zhao, J. M., Cao, M., & Wang, S. D. (2023). Review on Fabrication and Application of Regenerated Bombyx Mori Silk Fibroin Materials. *Autex Research Journal*, 23(2), 164-183.
- [40] Yang, C., Yao, L., & Zhang, L. (2023). Silk sericin-based biomaterials shine in food and pharmaceutical industries. *Smart Materials in Medicine*.
- [41] Lin, Y., Ou, Y., Xu, M., & Chen, J. (2023). Enhancing bone regeneration with bionic hydrolysis and biomimetic polydopamine coating on 3D-printed PCL scaffolds: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 124955.
- [24] Raut, M. P., Asare, E., Syed Mohamed, S. M. D., Amadi, E. N., & Roy, I. (2023). Bacterial cellulose-based blends and composites: Versatile biomaterials for tissue engineering applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(2), 986.
- [25] Jongprasitkul, H. (2023). Tailoring the Printability of Photocrosslinkable Polypeptide and Polysaccharide-based Bioinks for Extrusion-based 3D Bioprinting.
- [26] Wu, Y., Fang, J., Wu, C., Li, C., Sun, G., & Li, Q. (2023). Additively manufactured materials and structures: A state-of-the-art review on their mechanical characteristics and energy absorption. *International Journal of Mechanical Sciences*, 108102.
- [27] Elgarahy, A. M., Eloffy, M. G., Guibal, E., Alghamdi, H. M., & Elwakeel, K. Z. (2023). Use of biopolymers in wastewater treatment: A brief review of current trends and prospects. *Chinese Journal of Chemical Engineering*.
- [28] Du, H., Chen, Z., Gong, X., Jiang, M., Chen, G., & Wang, F. (2023). Surface grafting of sericin onto thermoplastic polyurethanes to improve cell adhesion and function. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 1-16.
- [29] Zhao, L., Zhou, Y., Zhang, J., Liang, H., Chen, X., & Tan, H. (2023). Natural Polymer-Based Hydrogels: From Polymer to Biomedical Applications. *Pharmaceutics*, 15(10), 2514.
- [30] Rahimkhoei, V., Padervand, M., Hedayat, M., Seidi, F., Dawi, E. A., & Akbari, A. (2023). Biomedical applications of electrospun polycaprolactone-based carbohydrate polymers: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 126642.
- [31] Emadi, H., Karevan, M., Masoudi Rad, M., Sadeghzade, S., Pahlevanzadeh, F., Khodaei, M., ... & Lotfian, S. (2023). Bioactive and biodegradable polycaprolactone-based nanocomposite for bone repair applications. *Polymers*, 15(17), 3617.
- [32] Vach Agocsova, S., Culenova, M., Birova, I., Omanikova, L., Moncmanova, B., Danisovic, L., ... & Alexy, P. (2023). Resorbable Biomaterials Used for 3D Scaffolds

- films. *Composites Part C: Open Access*, 12, 100393.
- [50] Divakaran, D., Suyambulingam, I., Sanjay, M. R., Raghunathan, V., Ayyappan, V., & Siengchin, S. (2023). Isolation and characterization of microcrystalline cellulose from an agro-waste tamarind (*Tamarindus indica*) seeds and its suitability investigation for biofilm formulation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 127687.
- [51] Elakkiya, K., Bargavi, P., & Balakumar, S. (2023). Unveiling pro-angiogenesis and drug delivery using dual-bio polymer with bio-ceramic based nanocomposite hydrogels. *Chemosphere*, 341, 140131.
- [52] Liu, H., Chen, H., Han, Q., Bin, S., Liu, Y., Zhang, A., ... & Wang, J. (2023). Recent advancement in vascularized tissue-engineered bone based on materials design and modification. *Materials Today Bio*, 100858.
- [53] Khan, M. U. A., Aslam, M. A., Abdullah, M. F. B., Hasan, A., Shah, S. A., & Stojanović, G. M. (2023). Recent perspective of polymeric biomaterial in tissue engineering—a review. *Materials Today Chemistry*, 34, 101818.
- [54] Krstić M., Ibrić S., Self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS) and self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS) as lipid nanocarriers for improving dissolution rate and bioavailability of poorly soluble drugs. *Lipid Nanocarriers for Drug Targeting*, 2018. p. 473-508.
- [55] Dhaniala, S., Rani, R., Kumar, R., & Thakur, R. (2023). Fabricated polyhydroxyalkanoates blend scaffolds enhance cell viability and cell proliferation. *Journal of Biotechnology*, 361, 30-40.
- [56] Behm, D. G., Alizadeh, S., Daneshjoo, A., & Konrad, A. (2023). Potential Effects of Dynamic Stretching on Injury Incidence of Athletes: A Narrative Review of Risk Factors. *Sports Medicine*, 1-15.
- [57] Zhang, K., Wang, H., Huang, C., Su, Y., Mo, X., & Ikada, Y. (2010). Fabrication of silk fibroin blended P (LLA-CL) nanofibrous scaffolds for tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials*, The Japanese Society for comparative study. *Materials Today Communications*, 37, 107262.
- [42] Eivazzadeh-Keihan, R., Farrokhi-Hajiabad, F., Aliabadi, H. A. M., Ziabari, E. Z., Geshani, S., Kashtiaray, A., ... & Mahdavi, M. (2023). A novel magnetic nanocomposite based on alginate-tannic acid hydrogel embedded with silk fibroin with biological activity and hyperthermia application. *International Journal of Biological Macromolecules*, 224, 1478-1486.
- [43] Park, J., Kim, T. Y., Kim, Y., An, S., Kim, K. S., Kang, M., ... & Seo, J. (2023). A Mechanically Resilient and Tissue-Conformable Hydrogel with Hemostatic and Antibacterial Capabilities for Wound Care. *Advanced Science*, 10(30), 2303651.
- [44] Wong, S. H. D., Deen, G. R., Bates, J. S., Maiti, C., Lam, C. Y. K., Pachauri, A., ... & Dodda, J. M. (2023). Smart Skin-Adhesive Patches: From Design to Biomedical Applications. *Advanced Functional Materials*, 33(14), 2213560.
- [45] Rodrigues, T. Z. L., Flor, J. C. D., Palermo, L. C., & Mansur, C. R. Evaluation of the polymer hydrogels as a potential relative permeability modifier. *Journal of Applied Polymer Science*, e54879.
- [46] An, Y., He, F., Ye, Q., Fan, S., Zeng, Y., Tang, M., ... & Li, K. (2023). Identification of CpbZIP11 in *Cyclocarya paliurus* Involved in Environmental Stress Responses. *Forests*, 14(10), 2104.
- [47] Balachandran, A., Choi, S. B., Beata, M. M., Małgorzata, J., Froemming, G. R., Lavilla Jr, C. A., ... & Okechukwu, P. N. (2023). Antioxidant, Wound Healing Potential and In Silico Assessment of Naringin, Eicosane and Octacosane. *Molecules*, 28(3), 1043.
- [48] Karimi, T., Mottaghitalab, F., Keshvari, H., & Farokhi, M. (2023). Carboxymethyl chitosan/sodium carboxymethyl cellulose/agarose hydrogel dressings containing silk fibroin/polydopamine nanoparticles for antibiotic delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 80, 104134.
- [49] Mamudu, U., Dufresne, A., & Lim, R. C. (2023). Synthesis and characterization of phosphorylated cellulose nanocrystals for enhanced UV stability of epoxy nanocomposite

- linker type and cross-linking density. *Macromolecules*, 33(11), 4291-4294.
- [67] Liang, L., Bhagia, S., Li, M., Huang, C., & Ragauskas, A. J. (2020). Cross-linked nanocellulosic materials and their applications. *ChemSusChem*, 13(1), 78-87.
- [68] Depan, D., Shah, J. S., & Misra, R. D. K. (2013). Degradation mechanism and increased stability of chitosan-based hybrid scaffolds cross-linked with nanostructured carbon: Process-structure-functional property relationship. *Polymer degradation and Stability*, 98(11), 2331-2339.
- [69] Smith, R. C., Leung, A., Kim, B. S., & Hammond, P. T. (2009). Hydrophobic effects in the critical destabilization and release dynamics of degradable multilayer films. *Chemistry of Materials*, 21(6), 1108-1115.
- [70] Bartnikowski, M., Dargaville, T. R., Ivanovski, S., & Hutmacher, D. W. (2019). Degradation mechanisms of polycaprolactone in the context of chemistry, geometry and environment. *Progress in Polymer Science*, 96, 1-20.
- [71] Spicer, C. D. (2020). Hydrogel scaffolds for tissue engineering: The importance of polymer choice. *Polymer Chemistry*, 11(2), 184-219.
- [72] Dai, R., Meng, L., Fu, Q., Hao, S., & Yang, J. (2021). Fabrication of anisotropic silk fibroin-cellulose nanocrystals cryogels with tunable mechanical properties, rapid swelling, and structural recoverability via a directional-freezing strategy. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 9(36), 12274-12285.
- [73] Sapudom, J., Kongsema, M., Methachittipan, A., Damrongsakkul, S., Kanokpanont, S., Teo, J. C., ... & Thongnuek, P. (2023). Degradation products of crosslinked silk fibroin scaffolds modulate the immune response but not cell toxicity. *Journal of Materials Chemistry B*, 11(16), 3607-3616.
- [74] Tajvar, S., Hadjizadeh, A., & Samandari, S. S. (2023). Scaffold degradation in bone tissue engineering: An overview. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 180, 105599.
- [75] Mariggiò, M. A., Cassano, A., Vinella, A., Vincenti, A., Fumarulo, R., Muzio, L. L., ... & Favia, G. (2009). Enhancement of fibroblast Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials, 93(3), 984-993.
- [58] Thomas, B., Raj, M. C., Joy, J., Moores, A., Drisko, G. L., & Sanchez, C. (2018). Nanocellulose, a versatile green platform: from biosources to materials and their applications. *Chemical reviews*, 118(24), 11575-11625.
- [59] Tommasino, C., Auriemma, G., Sardo, C., Alvarez-Lorenzo, C., Garofalo, E., Morello, S., ... & Aquino, R. P. (2023). 3D printed macroporous scaffolds of PCL and inulin-gP (D, L) LA for bone tissue engineering applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 123093.
- [60] Bartolo, P., Domingos, M., Gloria, A., & Ciurana, J. (2011). BioCell Printing: Integrated automated assembly system for tissue engineering constructs. *CIRP annals*, 60(1), 271-274.
- [61] Resetco, C., Hendriks, B., Badi, N., & Du Prez, F. (2017). Thiol-ene chemistry for polymer coatings and surface modification-building in sustainability and performance. *Materials Horizons*, 4(6), 1041-1053.
- [62] Yang, K. Y., Wloch, D., & Lee, K. Y. (2021). TEMPO-oxidised nanocellulose hydrogels and self-standing films derived from bacterial cellulose nanopaper. *RSC advances*, 11(45), 28352-28360.
- [63] Arnsten, A. F. (2015). Stress weakens prefrontal networks: molecular insults to higher cognition. *Nature neuroscience*, 18(10), 1376-1385.
- [64] Shefa, A. A., Taz, M., Lee, S. Y., & Lee, B. T. (2019). Enhancement of hemostatic property of plant derived oxidized nanocellulose-silk fibroin based scaffolds by thrombin loading. *Carbohydrate polymers*, 208, 168-179.
- [65] Guo, Y., Bae, J., Fang, Z., Li, P., Zhao, F., & Yu, G. (2020). Hydrogels and hydrogel-derived materials for energy and water sustainability. *Chemical Reviews*, 120(15), 7642-7707.
- [66] Lee, K. Y., Rowley, J. A., Eiselt, P., Moy, E. M., Bouhadir, K. H., & Mooney, D. J. (2000). Controlling mechanical and swelling properties of alginate hydrogels independently by cross-

- [84] Attiogbe, E., Larochelle, S., Chaib, Y., Mainzer, C., Mauroux, A., Bordes, S., ... & Moulin, V. J. (2023). An in vitro autologous, vascularized, and immunocompetent Tissue Engineered Skin model obtained by the self-assembled approach. *Acta Biomaterialia*, 168, 361-371.
- [85] Nayak, P., Bentivoglio, V., Varani, M., & Signore, A. (2023). Three-Dimensional In Vitro Tumor Spheroid Models for Evaluation of Anticancer Therapy: Recent Updates. *Cancers*, 15(19), 4846.
- [86] Marijuán, P. C., del Moral, R., & Navarro, J. (2013). On eukaryotic intelligence: signaling system's guidance in the evolution of multicellular organization. *Biosystems*, 114(1), 8-24.
- [87] Karbowniczek, J. E., Berniak, K., Knapczyk-Korczak, J., Williams, G., Bryant, J. A., Nikoi, N. D., ... & Stachewicz, U. (2023). Strategies of nanoparticles integration in polymer fibers to achieve antibacterial effect and enhance cell proliferation with collagen production in tissue engineering scaffolds. *Journal of Colloid and Interface Science*, 650, 1371-1381.
- [88] Bacakova, L., Pajorova, J., Bacakova, M., Skogberg, A., Kallio, P., Kolarova, K., & Svorcik, V. (2019). Versatile application of nanocellulose: From industry to skin tissue engineering and wound healing. *Nanomaterials*, 9(2), 164.
- [89] Chutipakdeevong, J., Ruktanonchai, U. R., & Supaphol, P. (2013). Process optimization of electrospun silk fibroin fiber mat for accelerated wound healing. *Journal of Applied Polymer Science*, 130(5), 3634-3644.
- [90] Radstake, W. E., Gautam, K., Van Rompay, C., Vermeesen, R., Tabury, K., Verslegers, M., ... & Baselet, B. (2023). Comparison of in vitro scratch wound assay experimental procedures. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 33, 101423.
- [91] Venugopal, J. R., Zhang, Y., & Ramakrishna, S. (2006). In vitro culture of human dermal fibroblasts on electrospun polycaprolactone collagen nanofibrous membrane. *Artificial organs*, 30(6), 440-446.
- [92] Sergi, R., Cannillo, V., Boccaccini, A. R., & Liverani, L. (2020). Incorporation of proliferation, collagen biosynthesis and production of growth factors as a result of combining sodium hyaluronate and aminoacids. *International Journal of immunopathology and Pharmacology*, 22(2), 485-492.
- [76] Dalton, C. J., & Lemmon, C. A. (2021). Fibronectin: Molecular structure, fibrillar structure and mechanochemical signaling. *Cells*, 10(9), 2443.
- [77] Ye, Z. H., Ning, K., Ander, B. P., & Sun, X. J. (2020). Therapeutic effect of methane and its mechanism in disease treatment. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 21(8), 593.
- [78] Masle, J. (2000). The effects of elevated CO<sub>2</sub> concentrations on cell division rates, growth patterns, and blade anatomy in young wheat plants are modulated by factors related to leaf position, vernalization, and genotype. *Plant Physiology*, 122(4), 1399-1416.
- [79] Zarei, M., Sayedain, S. S., Askarinya, A., Sabbaghi, M., & Alizadeh, R. (2023). Improving physio-mechanical and biological properties of 3D-printed PLA scaffolds via in-situ argon cold plasma treatment. *Scientific Reports*, 13(1), 14120.
- [80] Barmshuri, M., Kholdebarin, B., & Sadeghi, S. (2023). Applications of comet and MTT assays in studying *Dunaliella* algae species. *Algal Research*, 70, 103018.
- [81] Madappura, A. P., & Madduri, S. (2023). A comprehensive review of silk-fibroin hydrogels for cell and drug delivery applications in tissue engineering and regenerative medicine. *Computational and Structural Biotechnology Journal*.
- [82] Singh, S., Yadav, S. K., Meena, V. K., Vashisth, P., & Kalyanasundaram, D. (2023). Orthopedic Scaffolds: Evaluation of Structural Strength and Permeability of Fluid Flow via an Open Cell Neovius Structure for Bone Tissue Engineering. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 9(10), 5900-5911.
- [83] Hasanzadeh, R., Mihankhah, P., Azdast, T., Rasouli, A., Shamkhali, M., & Park, C. B. (2023). Biocompatible tissue-engineered scaffold polymers for 3D printing and its application for 4D printing. *Chemical Engineering Journal*, 146616.

[94] Oppenheimer, S. B. (1978). Cell surface carbohydrates in adhesion and migration. *American Zoologist*, 18(1), 13-23.

[95] Evans, N. D., Oreffo, R. O., Healy, E., Thurner, P. J., & Man, Y. H. (2013). Epithelial mechanobiology, skin wound healing, and the stem cell niche. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 28, 397-409.

bioactive glasses containing Mg, Sr, and Zn in electrospun PCL fibers by using benign solvents. *Applied Sciences*, 10(16), 5530.

[93] Martinez-Mora, C., Mrowiec, A., García-Vizcaíno, E. M., Alcaraz, A., Cenis, J. L., & Nicolás, F. J. (2012). Fibroin and sericin from *Bombyx mori* silk stimulate cell migration through upregulation and phosphorylation of c-Jun.

# 3D-printed polycaprolactone scaffold coated with silk fibroin and oxidized nanocellulose for wound dressing applications

Afsaneh Ehsandoost<sup>1</sup>, Elnaz Tamjid<sup>2\*</sup>

1. PhD candidate, Department of Nanobiotechnology, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
2. Associate Professor, Department of Nanobiotechnology, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

tamjid@modares.ac.ir

Receipt: 2024/03/10

Accepted: 2023/12/23

## Abstract

In recent years, significant efforts have been focused on advancements of novel biomaterials based on natural polymers and utilization of efficient methods such as skin tissue engineering for wound treatment. In this study, a 3D printed polycaprolactone (PCL) scaffold coated via immersion in a 1:4 blend of 40% silk fibroin from *Bombyx mori* cocoons and TEMPO-oxidized nanocellulose was developed. The pore size and the porosity were 180  $\mu\text{m}$  and 85%, respectively. The results demonstrated an enhancement in exudate absorption (swelling and water uptake of 1342% and 80%, respectively), improvement in storage modulus ( $G'$ ) from 500 to 4000 Pa, as well as viscoelasticity up to 60%, which all are favorable for wound dressing applications. Moreover, the wettability and biodegradability studies revealed an overall increase in contact angle and degradation rate of  $19.9^\circ \pm 3$ , and 95%, respectively. Cell viability and migration studies on fibroblastic cells (L929) using MTT assay, DAPI/ Phalloidin staining, and scratch test showed over 90% viability up to 7 days and complete scratch repair within 24 hours. These findings show that 3D printed PCL scaffolds coated with silk fibroin and oxidized nanocellulose are promising for wound healing applications and might pave the way to natural polymer-based wound dressings.

**Keywords:** 3D printing, Polycaprolactone, Silk Fibroin, Oxidized Nanocellulose, Wound Dressing, Viscoelasticity, Cell Viability, Cell Migration