

Fabrication and Characterization of Regenerated Silk/bioglass Composites for Bone Tissue Engineering

Sahba Mobini¹, Mehran Solati-Hashjin^{2*}, Saeed Hesaraki³, Michael Gelinsky⁴

1- Assistant Professor, Reproductive Biotechnology Research Center, Avicenna Research Institute, Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Tehran, Iran

2- Associated Professor, Department of Biomaterial, Faculty of Medical Engineering, Amirkabir University of Technology, Tehran, Iran

3- Assistant Professor, Material and Energy Research Center, Karaj, Iran

4- Professor, Centre for Translational Bone, Joint and Soft Tissue Research, University Hospital Carl Gustav Carus and Medical Faculty of Technische Universität Dresden, Germany

*Corresponding Address: P.O.Code: 1591634311, Department of Biomaterial, Faculty of Medical Engineering, Amirkabir University of Technology, Tehran, Iran
Email: solati@aut.ac.ir

Received: 14/Jan/2012, Accepted: 15/Jul/2012

Abstract

Objective: One of the major issues in bone tissue engineering is the design and fabrication of bioactive, bioresorbable porous 3D scaffolds capable of maintaining their structure and integrity over a predictable period of time. One such approach is the fabrication of composite scaffolds.

Methods: In this study we present fabrication and characterization of novel silk/bioglass-composite scaffolds. Regenerated fibroin was constructed from mulberry silk cocoons and calcium silicophosphate bioactive glass was made by sol-gel processing. For fabrication of a homogenous composite, grained bioglass particles were modified with 3-aminopropyltriethoxysilane coating. Fibroin/bioglass composite scaffolds were fabricated by the freeze-dry technique at different concentrations.

Results: Silk protein extract was evaluated by FTIR and XRD methods. FTIR spectrum showed sharp amide peaks at 1655 cm^{-1} and 1530 cm^{-1} wave lengths, which confirmed the existence of fibroin. XPS analysis demonstrated that the amino groups were established on the surface of the glass powder. The fabricated 3D scaffolds were morphologically analyzed by scanning electron microscopy, which showed uniformly dispersed bioglass particles in all structures. Scaffolds were seeded with human mesenchymal stem cells for 21 days.

Conclusion: Considering the cytocompatibility of the scaffolds and osteogenic differentiation during three weeks, it could be concluded that the appropriate combination of structural and biological properties make the silk/bioglass composite scaffold a probable choice for potential use in bone tissue engineering.

Keywords: Bioactive Glass, Stem Cells, Silk

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 15, No 2, Summer 2012, Pages: 47-60

ساخت و بررسی خواص زیستی داربست‌های کامپوزیتی ابریشم بازیابی شده / شیشه زیست‌فعال برای مهندسی بافت استخوان

صهبا مبینی^۱، مهران صولتی‌هشجین^{۲*}، سعید حصارکی^۳، میثائل گلینسکی^۴

- ۱- استادیار، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی تولیدمثل، پژوهشکده فن‌آوری‌های نوین علوم پزشکی جهاددانشگاهی - ابن‌سینا، تهران، ایران
 ۲- دانشیار، گروه بیومتریال، دانشکده مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران، ایران
 ۳- استادیار، پژوهشکده فناوری نانو و مواد پیشرفته، پژوهشگاه مواد و انرژی، کرج، ایران
 ۴- استاد، مرکز تحقیقات استخوان، غضروف و بافت نرم بیمارستان کارل گوستاو کاروس، دانشکده پزشکی، دانشگاه فنی درسدن، آلمان

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۵۹۱۶۳۴۳۱۱، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، دانشکده مهندسی پزشکی، گروه بیومتریال
 Email: solati@aut.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۱/۰۴/۲۵

دریافت مقاله: ۹۰/۱۰/۲۵

چکیده

هدف: یکی از مسائل اصلی مهندسی بافت استخوان طراحی و ساخت داربست‌های سه‌بعدی زیست‌فعال و قابل جذب است که بتواند یکپارچگی ساختاری خود را در طول زمان ترمیم حفظ کند؛ یکی از رویکردهای دستیابی به این هدف ساخت داربست‌های کامپوزیتی است.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش ساخت و مشخصه‌یابی داربست کامپوزیتی متشکل از ابریشم بازیابی شده و شیشه زیست‌فعال بیان شده است. ابریشم بازیابی شده از پيله‌های کرم ابریشم و شیشه کلسیم سیلیکوفسفاتی به روش سل-ژل تهیه شد. برای ایجاد یک کامپوزیت یکنواخت، ذرات شیشه زیست‌فعال آسیاب و توسط تری آمینو پروپیل تریتوکسی سیلان پوشش داده شد. داربست‌های کامپوزیتی ابریشم/شیشه زیست‌فعال به روش خشکاندن انجام دادی و در نسبت‌های متفاوتی تهیه شد.

نتایج: شیشه زیست‌فعال و پروتئین ابریشم (فیبروئین) با استفاده از آزمون‌های FTIR و XRD بررسی شد. در طیف FTIR پروتئین ابریشم نقاط اوج به طور واضح در طول موج‌های 1655 cm^{-1} و 1530 cm^{-1} ظاهر شد که حضور فیبروئین را تأیید می‌کرد. انجام آزمون XPS روی پودر شیشه پوشش داده، حضور گروه‌های آمینو روی سطح ذرات شیشه را نشان داد. سپس ساختار داربست‌های سه‌بعدی توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی بررسی شد. تصاویر به‌دست آمده ساختار یکنواخت و متخلخل داربست‌ها را به خوبی مشخص کرد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی روی داربست‌ها کاشته شد و طی ۲۱ روز آزمون‌های زیستی، رشد و تکثیر و تمایز روی آن‌ها انجام شد.

نتیجه‌گیری: با توجه به ساختار یکپارچه، زیست‌سازگاری و تمایز استخوانی سلول‌ها پس از سه هفته، به نظر می‌رسد داربست‌های کامپوزیتی ابریشم/شیشه زیست‌فعال گزینه قابل‌طرحی در زمینه داربست‌های مهندسی بافت استخوان باشد.

کلیدواژگان: شیشه زیست‌فعال، سلول‌های بنیادی، ابریشم

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی، دوره ۱۵، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۱، صفحات: ۴۷-۶۰

مقدمه

است [۱]. اگرچه یکی از ویژگی‌های بی‌نظیر این بافت توانایی

در خودترمیمی است، در مورد آسیب‌های بزرگ نیاز به

بافت استخوان یکی از بافت‌های حیاتی و چند منظوره بدن

شکست پروتئولیتیک (Proteolytic): تخریب با آنزیم‌های سلولی موسوم به پروتئازها) روی سرعت جذب پلیمرها اثر می‌گذارد. شواهد نشان می‌دهد دو مسیر تخریب پروتئولیتیک و جذب تدریجی برای ابریشم قابل تصور است. تخریب داربست‌های سه‌بعدی به‌دست آمده از فیبروین در بدن موش در دو بازه کوتاه مدت (۲ ماه) و بلند مدت (تا ۱ سال) بررسی شده است. این بررسی‌ها نشان داد که تخریب داربست‌های فیبروینی در شرایط درون‌تنی (In Vivo) به شدت متأثر از ریخت‌شناسی (Morphology) داربست، روش و فرآیند ساخت است؛ به طوری که داربست‌های فرآوری شده بر پایه آب بین ۲ تا ۶ ماه به طور کامل تخریب شد در حالی که داربست‌های پایه آلی (Hexafluoroisopropanol: HFIP) تا بیشتر از یک سال نیز پایدار بود [۱۸]. مجموعه این خواص سبب شده که ابریشم جایگزین مناسبی برای بافت‌های سخت به حساب آید [۱۹]. یکی از مهم‌ترین راه‌کارها در مهندسی بافت استخوان تلفیق سه عنصر داربست هدایت‌کننده استخوان، فاکتورهای القاکننده استخوان و سلول‌ها است. داربست هدایت‌کننده استخوان طبق تعریف بستری است که امکان چسبیدن و تکثیر سلول‌ها را فراهم کرده و به موازات تشکیل بافت استخوان تحلیل رود [۲۰، ۲۱]. داربست‌های فیبروینی خاصیت هدایت استخوانی دارند [۲۲] اما خاصیت القاکنندگی استخوان نیازمند فاکتورهای دیگری است. این خاصیت را می‌توان با کمک مولکول‌های زیستی یا یون‌های ویژه ایجاد کرد. شیشه‌های زیست‌فعال خاصیت القاکنندگی استخوان را دارد بنابراین با کامپوزیت کردن (Composite) آن‌ها با فیبروین می‌توان این خاصیت مهم را به سامانه افزود. علاوه بر این؛ اشاره شده است که سیستم‌های کامپوزیتی پلیمر/سرامیک نوعاً خواص هدایت‌کنندگی استخوان را نیز افزایش می‌دهد [۲۳]. شیشه زیست‌فعال سه جزئی سلیکوکلسیم فسفاتی ترکیب مشخصی از سیستم سه‌تایی $\text{CaO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5$ است که می‌توان آن را به روش دما پایین سل - ژل تهیه کرد. این شیشه زیست‌فعال می‌تواند با بافت نرم و سخت پیوند

درمان‌های کمکی وجود دارد [۲-۴]. پیوند بافت استخوان که به عنوان یکی از روش‌های درمانی امروزه مورد استفاده قرار می‌گیرد با مشکلاتی نظیر کمبود بافت پیوندی و تخریب و آسیب در محل برداشت بافت همراه است [۵، ۶]. انگیزه‌های اقتصادی، فراهم کردن آسایش بیشتر بیمار و درمان آسیب دیدگی‌های کلی از مواردی است که باعث شده توجه ویژه‌ای به درمان‌های جایگزین از جمله مهندسی بافت صورت گیرد [۷]. مهندسی بافت استخوان که کمتر از سه دهه از عمر آن می‌گذرد از جمله درمان‌های بازیابنده است که بر اساس تلفیق سه جزء اساسی، داربست، سلول و مولکول‌های زیستی بنا نهاده شده است [۸]. داربست‌ها در مهندسی بافت استخوان فضای فیزیکی مناسبی را پدید می‌آورد تا سلول‌ها را در خود جای داده و با تبادل مولکول‌های زیستی سبب تشویق تشکیل بافت جدید شود. سپس داربست‌ها به تدریج از بین رفته و جای خود را به طور کامل به بافت تازه می‌دهد [۹، ۱۰]. نه تنها داربست باید با ساختار سه‌بعدی و متخلخل خود فضای رشد و تکثیر سلول‌ها را شبیه‌سازی کند، بلکه باید بتواند از نظر مکانیکی، ثبات و عملکرد نسبی بافت را تا زمان تشکیل بافت جدید تأمین کند. یکی از مهم‌ترین مسائل مربوط به داربست‌ها داشتن تخلخل مناسب و ثبات مکانیکی به طور همزمان و تخریب‌پذیری متناسب با زمان تشکیل بافت جدید است [۱۱]. از این رو طراحی ساختاری و موادی داربست‌ها یکی از اصلی‌ترین راه‌کارها برای دستیابی به یک شیوه مناسب از درمان‌های بازیابنده است.

امروزه ابریشم به عنوان یک پلیمر طبیعی در زمینه درمان‌های بازیابنده بسیار مورد توجه قرار گرفته است [۱۲-۱۴]. استحکام مکانیکی، زیست‌سازگاری و تخریب‌پذیری طولانی مدت ابریشم سبب شده تا در زمینه مهندسی بافت استخوان تحقیقات زیادی روی آن انجام شود [۱۵-۱۷]. فیبروین (Fibroin) ابریشم دارای توالی‌های آرژنین-گلیسین است که ترکیبی زیست‌سازگار به شمار می‌رود. عوامل بسیاری از قبیل میزان بلورینگی، آب‌گریزی، وزن مولکولی و وجود محل‌های

ایجاد کند بدون اینکه لایه‌های فیبروزی تشکیل شود [۲۴]. در پژوهش حاضر داربست‌های کامپوزیتی ابریشم و شیشه زیست‌فعال با نسبت‌های مختلف و به روش خشک کردن انجمادی (Freezedrying) تهیه شد. مهم‌ترین چالش پیش رو، دستیابی به کامپوزیتی یکنواخت از پلیمر طبیعی ابریشم و شیشه زیست‌فعال بود. به این منظور دو راه‌کار پیش گرفته شد؛ خرد و کوچک کردن اندازه ذرات پودر شیشه برای دستیابی به سطح ویژه بالاتر و تشکیل سوسپانسیون پایدارتر یکی از این راه‌کارها بود. از سوی دیگر؛ ذرات شیشه به منظور ایجاد پیوند بین پلیمر و شیشه با یک ماده آمینوسیلانی (Aminosilane) پوشش داده شد تا اثر آن در تشکیل سوسپانسیون پایدار و نیز تأثیر احتمالی آن بر خواص زیستی بررسی شود.

مواد و روش‌ها

مواد اولیه

برای صمغ‌زدایی و استحصال فیبروین نمک‌های کربنات سدیم (Na_2CO_3)، برمید لیتیم (LiBr) با خلوص بالای ۹۹/۹ درصد از شرکت (Merck، آلمان) تهیه شد. تیوب دیالیز با قابلیت عبور وزن مولکولی ۱۲-۱۴ کیلو دالتون از شرکت (Sigma، آلمان) خریداری شد. آب دوبار تقطیر فوق خالص حاصل از دستگاه تهیه آب فوق خالص (Ultra Pure Water: UPW) ساخت شرکت (Sartorius، آلمان) تهیه شد. پیله‌های کرم بومبیکس موری (*Bombyx mori*) از طرف مرکز تحقیقات ابریشم ایران در قالب هدیه تحقیقاتی دریافت شد. تترا اتیل اورتوسیلیکات (Tetraethyl orthosilicate: TEOS) و تری اتیل فسفات (Triethyl Phosphate: TEP) از شرکت (Merck، آلمان) برای سنتز شیشه زیست‌فعال و α -آمینو پروپیل تری‌توکسی سیلان (Aminopropyl Triethoxy Silane: APS) از شرکت (Sigma، آلمان) برای پوشش ذرات شیشه تهیه شد. برای انجام آزمون‌های زیست‌سازگاری، سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی (Human Mesenchymal Stem Cells: hMSC)

(hMSC) از Dresden University Hospital تهیه شدند. محیط کشت (Dulbecco's Modified Eagle Medium: DMEM) کم گلوکز (شرکت Biochrom، انگلستان)، سرم جنین گوساله (Fetal Calf Serum: FCS) (شرکت Lonza، سوئیس)، دکزامتازون (Dexamethasone: Dex)، اسکوربیک اسید ۲ فسفات (Ascorbic Acid 2-Phosphate: AAP)، بتا گلیسرو فسفات (β -Glycerophosphate: β -GP) (شرکت Sigma، آلمان)، کیت (Lactate Dehydrogenase: LDH) (شرکت Madison، آمریکا)، بافر ALP (Alkaline Phosphatase) (شرکت sigma، آلمان)، پایکوگرین (Picogreen: PG) (شرکت Ugene، آمریکا)، pNpp (p-Nitrophenyl Phosphate) (شرکت Sigma، آلمان) و تریتون (Teriton X-100) (شرکت Sigma، آلمان) خریداری شد.

روش تهیه فیروین از ابریشم بومبیکس موری

برای تهیه فیروین ابریشم ابتدا باید سرسین (Sericin) (صمغ ابریشم) حذف شود. به منظور صمغ‌زدایی الیاف ابریشم، سه عدد پیله کرم بومبیکس موری باز و شفیله آن خارج شد. سپس پیله‌ها در ۷۵۰ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۰/۰۲ مولار به مدت یک ساعت قرار داده شد. الیاف به‌دست آمده سه بار با یک لیتر آب دیونیزه سرد و گرم به خوبی آب‌کشی و به مدت یک شب در زیر هود خشک شد. برای تهیه فیروین محلول در آب، الیاف صمغ‌زدایی شده ابریشم به نسبت ۱۰ درصد وزنی در محلول ۹/۳ مولار لیتیم بروماید به مدت ۵ ساعت در ۵۵ درجه سانتی‌گراد حل شد. محلول غلیظ نمک و فیروین به مدت ۳۶ ساعت در غشای دیالیز با ضریب خروج ۱۲۰۰۰ دالتون در یک لیتر آب فوق خاص قرار داده شد. آب ظرفی که کیسه دیالیز در آن قرار داشت ۶ بار به طور منظم تعویض شد. محلول باقی مانده در غشای دیالیز به مدت ۱۲ ساعت در خشک کن انجمادی قرار داده شد تا فیروین خالص قابل حل در آب به‌دست آید. فیروین استحصال شده به این روش به صورت پودر سفید رنگ و

مدت ۶ ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد با سرعت متوسط مخلوط شد. سوسپانسیون حاصل ۵ بار با هگزان و آب شستشو داده شد و به مدت یک شبانه روز در زیر هود خشک شد.

روش تهیه داربست‌های کامپوزیتی فیبروین / شیشه زیست فعال

داربست‌های کامپوزیتی فیبروین / شیشه در دو گروه ساخته شد. در گروه اول از شیشه زیست فعال بدون پوشش و در گروه دوم از شیشه زیست فعال پوشش داده شده با APS استفاده شد. در هر دو گروه سه دسته نمونه با نسبت‌های وزنی شیشه به پروتئین خشک ۱:۵، ۱:۱۰ و ۱:۵۰ ساخته شد (جدول ۱). بنابر نسبت‌های موجود، میزان مشخصی از محلول فیبروین ۴ درصد وزنی با پودر شیشه به کمک قلم فراصوت روی یخ به مدت ۱۰ دقیقه مخلوط شد. لازم به ذکر است که در مورد ترکیب‌های غلیظ‌تر مدت زمان استفاده از قلم فراصوت منوط بر دستیابی به سوسپانسیون نسبتاً پایدار است. برای ساخت نمونه‌ها سوسپانسیون شیشه/ فیبروین در ظرف کشت سلولی ریخته شد. قالب‌ها به مدت ۴ ساعت در ۲۰- درجه سانتی‌گراد، ۲ ساعت در ۸۰- درجه سانتی‌گراد و سپس به مدت یک شب در خشک کن انجمادی قرار داده شد. داربست‌های به دست آمده در این مرحله به راحتی و سرعت در آب حل می‌شود زیرا طی فرآیند استحصال، پروتئین فیبروین ساختار بلورین خود را از دست داده است. برای بازیابی ساختار صفحات بتا در فیبروین از متانول ۹۹/۸ درصد (شرکت Merck، آلمان) استفاده شد. هر داربست در یک میلی‌لیتر متانول به مدت یک ساعت غوطه‌ور شد. سپس دو بار با آب یون‌زدایی شده شستشو داده شد تا متانول از محیط خارج شود. داربست‌ها بار دیگر در خشک کن انجمادی قرار داده شد و در پاکت‌های نایلونی مخصوص بسته‌بندی و با استفاده از پرتوی گاما با شدت ۳۵ کیلوگری (KGy) سترون شد.

قابل نگهداری در دمای محیط است. برای بازیابی ساختار صفحات بتا فیبروین به مدت حداقل ۳۰ دقیقه در مجاورت متانول ۹۹ درصد قرار گرفت.

روش تهیه شیشه زیست فعال سه جزئی SiO_2 - $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ و پوشش دادن آن با APS

شیشه زیست فعال سه جزئی SiO_2 - $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ با نسبت‌های (۳/۱۱-۶/۲۷-۱/۶۱ درصد) به روش سل-ژل تهیه شد. ابتدا TEOS به محلول ۱/۰ مولار اسید نیتریک اضافه و به مدت یک ساعت در دمای اتاق روی همزن قرار داده شد. سپس نیتريد کلسیم و TEP به محلول TEOS اضافه شد. این مرحله به آرامی در مدت ۴۵ دقیقه انجام شد تا واکنش به صورت کامل انجام شود. برای تکمیل واکنش هیدرولیز مخلوط به مدت یک ساعت به هم زده شد (آماده کردن سل). سپس به ظروف تفلونی منتقل شد و برای ۶ روز در ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (پیرسازی ژل). ژل به مدت ۳ روز در ۷۰ درجه سانتی‌گراد و ۲ روز در ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد خشک شد (خشک کردن). در پایان شیشه به مدت ۳ ساعت در ۸۰۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد تا نیترات‌ها و مواد آلی خارج شود. پودر شیشه سپس در دو مرحله آسیاب شد؛ مرحله اول به کمک هاون عقیق مکانیکی در ۱۰ دقیقه انجام شد و در مرحله دوم به کمک آسیاب ماهواره‌ای در ظرف زیرکونیایی (Zirconia) با گلوله‌هایی از همان جنس در حضور اتانول، خرد کردن مکانیکی به مدت دو ساعت با سرعت ۲۵۰ دور بر دقیقه صورت گرفت. به ازای هر ۵ گرم شیشه، ۵۰ میلی‌لیتر اتانول در ظرف ۲۵۰ میلی‌لیتری به همراه ۴۸۲ گرم گلوله زیرکونیایی ۵ میلی‌متری استفاده شد. پودر شیشه بعد از این مرحله از الک ۲۰ میکرومتر به کمک میز ارتعاشی فراصوت عبور داده شد تا به دانه‌بندی مطلوب برسد. برای پوشش‌دهی شیشه زیست فعال با APS محلول ۳ درصد APS در هگزان تهیه شد و به ازای هر میلی‌لیتر APS یک گرم شیشه زیست فعال به سیستم اضافه شد و در ظرف در پوشیده‌ای به

جدول ۱ شناسه نمونه‌های داربست‌های کامپوزیتی فیروئین / شیشه زیست فعال

شناسه نمونه	نسبت فیروئین:شیشه	داربست کامپوزیتی
BG2-	۱:۵۰	فیروئین/شیشه زیست فعال بدون پوشش ATPS
BG10-	۱:۱۰	فیروئین/شیشه زیست فعال بدون پوشش ATPS
BG20-	۱:۵	فیروئین/شیشه زیست فعال بدون پوشش ATPS
BG2+	۱:۵۰	فیروئین/شیشه زیست فعال با پوشش ATPS
BG10+	۱:۱۰	فیروئین/شیشه زیست فعال با پوشش ATPS
BG20+	۱:۵	فیروئین/شیشه زیست فعال با پوشش ATPS

به عنوان (V_2) در نظر گرفته شد. حجم باقی مانده هگزان در استوانه مدرج پس از خارج کردن داربست اشباع به عنوان (V_3) ثبت شد. میزان تخلخل داربست (ε) با استفاده از رابطه ۱ محاسبه شد. آزمون برای هر نوع داربست حداقل ۳ بار تکرار شد تا محاسبات آماری امکان‌پذیر باشد:

$$\text{رابطه ۱: } \varepsilon = (V_1 - V_3) / (V_2 - V_3) \times 100 \text{ درصد}$$

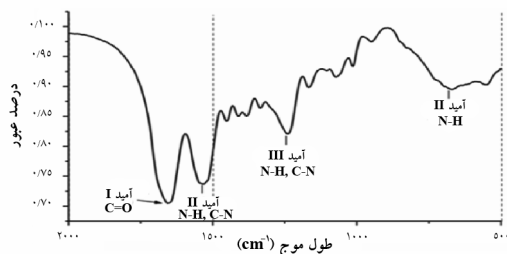
آزمون زیست‌سازگاری

آزمون‌های زیست‌سازگاری با استفاده از سلول‌های hMSC انجام شد. برای این کار سلول‌های hMSC در محیط کشت DMEM کم گلوکز، ۹ FCS در ۱۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین (Penicillin) و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین (Streptomycin)، (محیط کشت OS-) تکثیر شدند. داربست‌های سترون شده، به مدت ۲۴ ساعت قبل از کاشت در محیط کشت ساده قرار داده شد. سپس 12×10^4 سلول به صورت سوسپانسیون غلیظ به روی داربست‌ها و 5×10^4 سلول در ظرف کشت کنترل منتقل شد. نمونه‌های استاندارد نیز برای تعیین ضریب تبدیل تهیه شد. پس از برداشت نمونه‌های روز اول نیمی از نمونه‌ها در محیط کشت ساده (OS-) و نیمی دیگر در محیط کشت حاوی مواد استخوانزا (Osteogenic) (OS+)، DEX، AAP، و β -GP قرار داده شد. نمونه‌ها در مقاطع زمانی ۱، ۷، ۱۴ و ۲۱ روز به-خوبی با فسفات بافر سالین (Phosphate Buffered Saline:)

مشخصه‌یابی فیزیکی و شیمیایی

به منظور تأیید حضور پیوندهای آمینی ویژه پروتئین فیروئین و بررسی پیوندهای شیشه زیست‌فعال، آزمون طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (Fourier Transform Infrared Assay) توسط دستگاه طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (Fourier Transform Infrared Spectroscopy: FTIR) مدل EQUINOX 55 در بازه $4000-500 \text{ cm}^{-1}$ طبق استاندارد (ASTM E1252-07) انجام شد. برای بررسی میزان بلورینگی و مطالعه تغییرات قبل و بعد از تأثیر متانول بر ساختار ثانویه مولکولی و بلورینگی فیروئین و تأیید حضور فاز شیشه‌ای در ماده تهیه شده، آزمایش پراش پرتو ایکس توسط دستگاه پراش پرتو ایکس (X-Ray Diffraction: XRD) مدل D5000 SIMENS در بازه $2\theta: 5^\circ-70^\circ$ (تا ۲) درجه روی شیشه و فیروئین قبل و پس از بازیابی انجام شد. نمونه‌های تثبیت شده داربست‌ها و سلول‌های بنیادی توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی (Scanning Electron Microscope: SEM)، دستگاه SEM مدل XL 30/ESEM Philips در وضعیت فیلد امیژن (Field Emission Secondary) در حالت الکترون ثانویه (Back Scattered Electron) بررسی شدند. تعیین دانه‌بندی توسط دستگاه مالورن (Sizer Malvern) انجام شد. تخلخل سنجی به روش جابه‌جایی مایع انجام شد. هگزان به عنوان مایع جایگزین انتخاب شد. داربست استوانه‌ای ابریشمی در حجم معینی از هگزان (V_1) به مدت ۵ دقیقه غوطه‌ور شد و حجم خوانده شده

EDTA (Tris-Ethylenediaminetetraacetic Acid) رقیق شد. ۱۰ میکرولیتر از لایزیت با دو بار تکرار در ظرف ۹۶ خانه‌ای سیاه ریخته و ۱۹۶ میکرولیتر محلول PG به آن اضافه شد؛ سپس روی شیکر (Shaker) به مدت پنج دقیقه در تاریکی انکوبه شد. شدت رنگ فلورسانس با طول موج تحریک ۴۸۵ نانومتر و طول موج نشر ۵۳۵ نانومتر با کمک دستگاه اندازه‌گیری شد. برای انجام آزمون اندازه‌گیری ALP، دو سری اپندورف برای هر یک از نمونه‌ها آماده برچسب‌گذاری شد. ۲۵ میکرولیتر لایزیت و ۱۲۵ میکرولیتر محلول سوبسترای ALP (این محلول شامل ۱ میلی‌گرم pNpp در ۱ میلی‌لیتر بافر ALP است) به هر یک از اپندورف‌ها اضافه شد. پس از ورتکس کردن (Vortex)، نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و سپس واکنش با سود نرمال متوقف شد. سپس اپندورف‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۳۲۰۰ دور سانترفوژ شد. در نهایت ۲۰۰ میکرولیتر از هر نمونه به ظرف ۹۶ خانه‌ای منتقل و جذب آن با فیلتر ۴۰۵ نانومتر توسط دستگاه اندازه‌گیری شد.



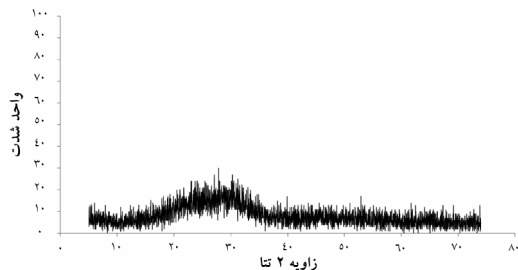
نمودار ۱ طیف FTIR فیروئین به‌دست آمده از پنبه کرم بومیبکس موری

نتایج

نمودار ۱ طیف FTIR به‌دست آمده از فیروئین را نشان می‌دهد. حضور بارز باندهای آمید I در 1655 cm^{-1} و آمید II در 1530 cm^{-1} و تأیید آن در 699 cm^{-1} و آمید III در 1339 cm^{-1} وجود پروتئین را در ساختار مارپیچی و پیچ‌های در هم کاملاً تأیید می‌کند. با مقایسه این نمودار و طیف FTIR ابریشم

(PBS) شستشو و سپس برداشت شد. در روز ۱ و ۲۱ از هر داربست یک نمونه برای تصویربرداری با میکروسکوپ الکترونی برداشت شد. به این ترتیب که نمونه‌ها به مدت ۱ ساعت در فرمالدهید ۳/۷ درصد در دمای اتاق قرار گرفت و سپس تا ۱ درصد رقیق شد. نمونه‌ها به روش خشک کردن نقطه بحرانی آب‌گیری شده و با طلا پوشش داده شد. برای تهیه لایزیت سلولی (Cell Lysates) ابتدا نمونه‌های ذخیره شده به مدت ۲۰ دقیقه روی یخ ذوب شد. ۵ عدد ساچمه فولاد زنگ نزن در اپندورف‌های (Eppendorf) شماره‌گذاری شده مخصوص دستگاه پریسل لایزر (Pre-Cellyser-24، آلمان) قرار داده شد. ۴۵۰ میکرولیتر PBS سرد به هر یک از اپندورف‌ها اضافه شد. اپندورف‌ها در دستگاه پریسل لایزر (Pre-Cellyser) با سرعت ۵۹۰۰ به مدت ۱۰ ثانیه به چرخش درآمد. این عمل با فاصله ۵ ثانیه یک بار دیگر تکرار شد. هدف از این عملیات خرد کردن داربست‌ها و خارج کردن تمام سلول‌هایی است که به داخل آن نفوذ کرده‌اند. پس از عمل خرد کردن تریتون $10\times$ اضافه شد تا مجموع حجم‌ها به ۵۰۰ میکرولیتر برسد. سپس اپندورف‌ها به مدت ۵۰ دقیقه روی یخ انکوبه شد. در این مرحله برای جدا کردن مایع رویی شفاف و تمیز، اپندورف‌ها به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰ سانترفوژ شد و مایع رویی تمیز به اپندورف‌های جدید منتقل شد. لایزیت سلولی برای ادامه آزمایش روی یخ نگهداری شد. برای انجام آزمون LDH ۵۰ میکرولیتر از لایزیت هر نمونه با دو بار تکرار به ظرف کشت ۹۶ خانه‌ای منتقل شد. سپس محلول سوبسترای LDH به هر خانه اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی به آرامی تکان داده شد. پس از طی این مدت واکنش به سرعت با Acetyl hydroxide (AcOH) یک نرمال متوقف شد. حباب‌های ایجاد شده توسط یک سشوار گرم برطرف شد و جذب رنگ آن با فیلتر ۴۹۲ نانومتری توسط دستگاه میکروپلات ریدر (Microplate Reader) (Tecan، آلمان) اندازه‌گیری شد. آزمون کمی DNA با استفاده از PG انجام شد. محلول پایکوگرین به نسبت ۱:۸۰۰ در بافر تریس-

پرتو ایکس که بیانگر بی شکل بودن ساختار شیشه است در نمودار ۴ آمده است.

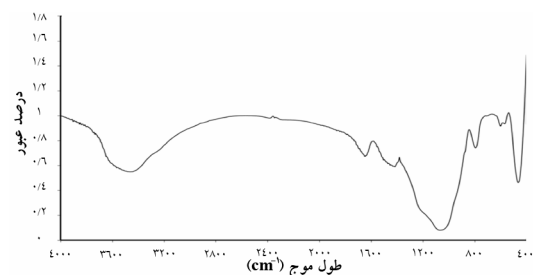


نمودار ۴ طیف پراش پرتو ایکس شیشه زیست فعال $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$

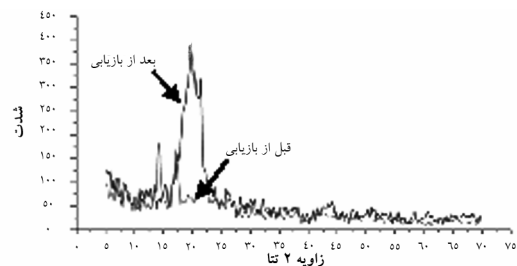
لازم بود تا شیشه زیست فعال برای به کارگیری در سامانه کامپوزیتی به پودری با اندازه ذرات بسیار ریز تبدیل شود. اندازه دانه قبل از آسیاب کردن به طور نسبی با تصویربرداری SEM مشخص شد (شکل ۱ الف). پس از آسیاب و الک کردن توزیع اندازه ذرات تعیین شد. نمودار اندازه ذرات (شکل ۱ ب) نشان می دهد ۸۰ درصد از ذرات پودر شیشه زیر ۲۰ میکرومتر است که برای تشکیل سوسپانسیون پایدار اندازه مناسبی به نظر می رسد. بخشی از پودر شیشه با هدف ایجاد پیوند با پلیمر (فیبروین) توسط APS پوشش داده شد. برای اطمینان از تشکیل این پوشش روی ذرات شیشه، پیوندهای سطحی شیشه قبل و بعد از پوشش دهی توسط طیف سنجی فوتوالکترونی پرتو ایکس (X-Ray Photoelectron Spectrometer: XPS) بررسی شد. نمودار طیف گسترده و طیف با وضوح بالای کربن و نیتروژن شیشه قبل و بعد از پوشش دادن در نمودار ۵ آمده است. برای بررسی کمی با فرض این که عنصر اصلی تشکیل دهنده شیشه سیلیسیم است، حضور باقی عناصر به صورت نسبتی از سیلیسیم از روی نقاط اوج طیف XPS محاسبه شد. این مقادیر از نرمالیزه کردن مقادیر نقاط اوج عناصر در طیف XPS با استفاده از رابطه ۲ به دست آمد که در آن RSF (Relative Strength Factor) فاکتور حساسیت نسبی طیف سنج و TX.Fanction تابع عبور طیف سنج، Norm Area شدت نرمال و Raw Area شدت خام یا داده خام است.

بویکس موری به دست آمده توسط دیگر محققان [۲۵] این اطمینان حاصل می شود که پروتئین حاضر فیبروین است.

آزمون پراش پرتو ایکس به منظور بررسی تغییر میزان بلورینگی فیبروین استحصال شده در دو مرحله قبل و بعد از بازیابی توسط متانول انجام شد. نتایج آزمون پراش پرتو ایکس در نمودار ۲ آمده است. دو نقطه اوج (Peak) قوی در طیف مربوط به فیبروین قبل از قرار گرفتن در متانول در $2\theta=14^\circ$ و $2\theta=5/6^\circ$ قابل مشاهده است. این نقاط اوج نمایانگر ساختار Silk I هستند [۲۶، ۲۷]. در طیف فیبروین بازیابی شده دو نقطه اوج شاخص در $2\theta=21^\circ$ و $2\theta=20^\circ$ دیده می شود که نشانه ساختار صفحات بتا در فیبروین بازیابی شده با متانول است [۲۸، ۲۹].



نمودار ۲ طیف پراش پرتو ایکس فیبروین قبل و بعد از بازیابی با متانول

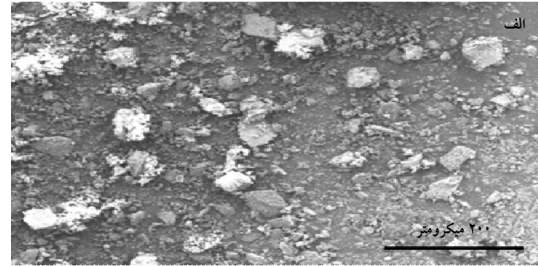
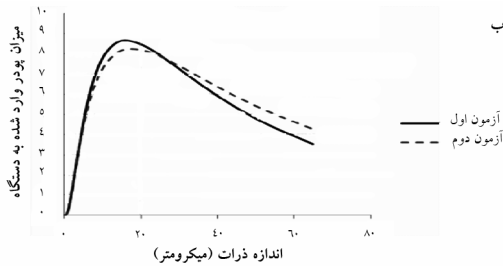


نمودار ۳ طیف FTIR شیشه زیست فعال $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$

طیف FTIR شیشه زیست فعال $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ که قبلاً توسط حصارکی و همکاران [۳۰] به طور کامل ارزیابی شده در نمودار ۳ آمده است. برای کسب اطمینان از عدم تشکیل بلور، طیف پراش پرتو ایکس آن بار دیگر بررسی شد. طیف پراش

$$\text{Norm Area} = \frac{\text{Raw Area}}{\text{RSF.TX.Function}}$$

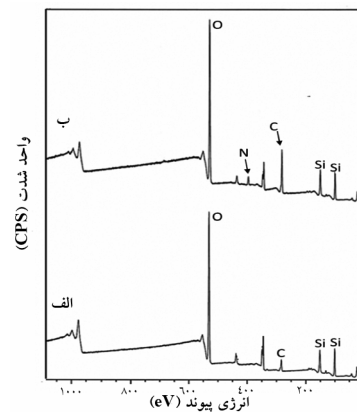
رابطه ۲:



شکل ۱ الف) تصویر SEM ذرات شیشه زیست فعال $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ قبل از خرد شدن، ب) نمودار توزیع دانه بندی شیشه زیست فعال $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ پس از خرد شدن

جدول ۲ مقادیر نسبی عناصر در شیشه زیست فعال $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ قبل و بعد از پوشش دادن با APS

عنصر	شیشه بدون پوشش	شیشه با پوشش ATPS
[C]:[Si]	۰/۶۱۴	۱/۷۸۸
[N]:[Si]	-	۰/۱۹
[O]:[Si]	۲/۴۴۵	۲/۱۹۷
[F]:[Si]	-	۰/۰۱۱
[P]:[Si]	۰/۰۶۱	۰/۰۳۴
[Cl]:[Si]	-	۰/۰۲۱
[Ca]:[Si]	۰/۲۹۸	۰/۲
[Zr]:[Si]	۰/۰۰۹	-
[N]:[C]	-	۰/۱۰۶

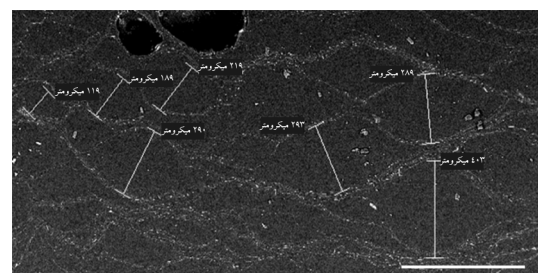


نمودار ۵ طیف XPS شیشه زیست فعال $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ قبل و بعد از پوشش دادن با APS

ساختار کامپوزیت های شیشه/ فیبروین که با هدف افزودن فاز معدنی به سیستم پلیمری فیبروین برای ارتقای خواصی نظیر القا کنندگی استخوان ساخته شد با SEM بررسی شد. شکل ۲ تصویر SEM با حالت الکترون برگشتی از سطح مقطع داربست کامپوزیتی قالب گیری شده را نشان می دهد.

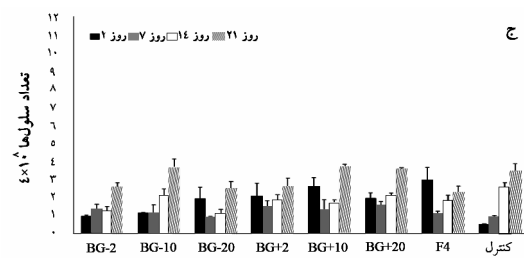
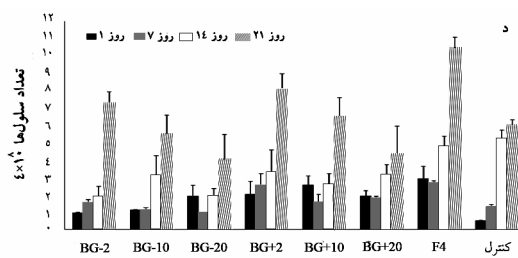
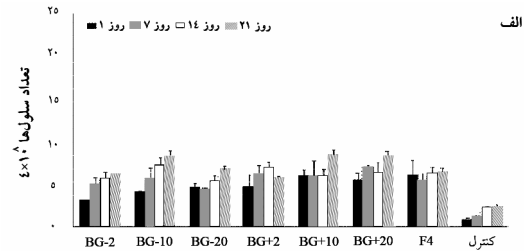
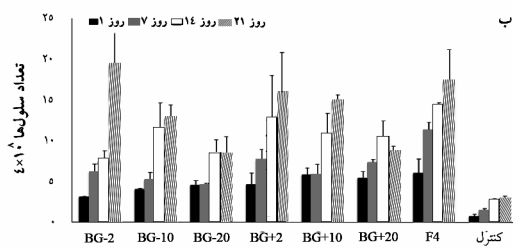
نتایج آزمون با حداقل سه بار تکرار مشخص کرد نمونه های با زمینه فیبروینی ۲ درصد دارای ۹۲/۳۰ درصد تخلخل و نمونه های با زمینه فیبروینی ۴ درصد دارای ۸۷/۴۰ درصد تخلخل است.

میزان تکثیر سلول ها به طور موازی توسط دو آزمون LDH و DNA با شش بار تکرار (n=۶) بررسی شد (نمودار ۶).



شکل ۲ تصویر SEM با بزرگنمایی $\times 100$ با حالت الکترون برگشتی از مقطع قالب گیری شده داربست کامپوزیتی شیشه زیست فعال/ ابریشم

جدول ۲ مقادیر نسبی عناصر در شیشه قبل و بعد از پوشش بر حسب عنصر سلیسیم را که بر اساس شدت نقاط اوج محاسبه شده از رابطه ۲ به دست آمده است، نشان می دهد.

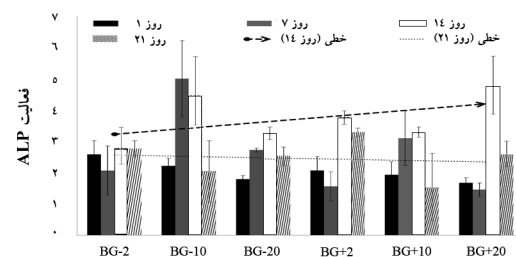


نمودار ۶ نتایج آزمون‌های LDH و DNA روی سلول‌های hMSC کاشته شده روی داربست‌های کامپوزیتی طی ۲۱ روز (میانگین \pm انحراف معیار، n=6)

ALP/تعداد سلول‌ها را برای تمام نمونه‌ها در هر دو محیط نشان می‌دهد. افزایش قابل انتظار فعالیت ALP در محیط حاوی مواد استخوانزا در نمودارها قابل مشاهده است. در تمام نمونه‌هایی که در محیط OS- قرار داشته‌اند، فعالیت ALP پس از گذشت ۲۱ روز افت کرده است.

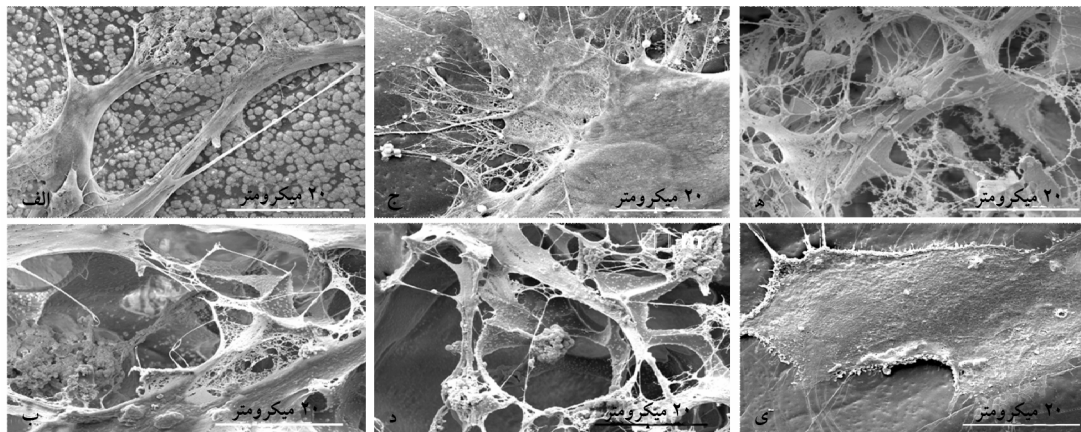
در مقابل اگرچه نمودارها با افت و خیز همراه است، این مقدار از روز ۱ تا ۲۱ در محیط کشت OS+ افزایش یافته است اما حداکثر فعالیت ALP نیز در روز آخر نیست. فعالیت ALP برای نمونه‌ها در محیط کشت OS+ در روز چهاردهم به بیشترین مقدار خود می‌رسد. با توجه به نمودارها می‌توان گفت متوسط فعالیت ALP در روز ۱۴ برای داربست‌های حاوی شیشه با پوشش APS نسبتاً بیشتر است.

سلول‌های بنیادی مزانشیمی روی نمونه‌های برداشت شده از هر نوع در محیط کشت‌های OS+ و OS- در روزهای ۱ و ۲۱ به کمک SEM بررسی شدند، شکل ۳ تصاویر این سلول‌ها را پس از ۲۱ روز در محیط کشت OS+ نشان می‌دهد. ریخت‌شناسی کشیده سلول‌ها که در سطح داربست‌ها در تمام تصاویر قابل مشاهده است، سلامت و چسبیدن سلول‌ها روی داربست‌ها را تأیید می‌کند.



نمودار ۷ نتایج آزمون ALP روی سلول‌های hMSC کاشته شده روی داربست‌های کامپوزیتی طی ۲۱ روز

تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های استئوبلاستی (Osteoblast Cells) در یک مجموعه طراحی شده برای مهندسی بافت استخوان یکی از اهداف اصلی این سیستم به شمار می‌رود. شاخصی که این رفتار به کمک آن بررسی شد، اندازه‌گیری میزان فعالیت ALP نسبت به سلول‌های موجود روی داربست بود. میزان این فعالیت بر حسب سلول محاسبه می‌شود زیرا هرچه تعداد سلول‌ها بیشتر باشد میزان فعالیت بیشتری اندازه‌گیری می‌شود و این فعالیت به ازای تعداد سلول‌ها بالا رفته است. بنابراین همواره نسبتی از فعالیت ALP به سلول مورد بحث قرار می‌گیرد. نمودار ۷ میزان فعالیت



شکل ۳ تصاویر SEM با بزرگنمایی ۳۲۰۰ برابر از hMSC کاشته شده روی داربست‌های الف) -BG2BG2-، ب) +BG2، ج) -BG10، د) +BG10، ه) -BG20، ی) +BG20. پس از ۲۱ روز در محیط کشت OS+

پخش شده و ساختار یکنواختی را تشکیل داده‌اند. روند افزایشی تعداد سلول‌ها در نتایج هر دو آزمون نه تنها نشان دهنده عدم سمیت داربست‌هاست بلکه نشان می‌دهد داربست‌ها به خوبی تکثیر و رشد سلول‌های بنیادی را پشتیبانی کرده‌است. اگرچه نتایج هر دو آزمون افزایش تعداد سلول‌ها طی ۲۱ روز را نشان می‌دهد و یکدیگر را تأیید می‌کنند، اما نتایج آزمون DNA برای داربست‌های بر پایه ابریشم روند منطقی‌تری داشته و تعداد سلول بیشتری را نسبت به آزمون LDH نشان می‌دهد. دلیل این تفاوت حساسیت روش LDH به برخی پیوندهای پپتیدی است که در داربست‌های ابریشمی نیز یافت می‌شود. بنابراین برای محاسبات کمی از تعداد سلول‌های محاسبه شده به روش DNA استفاده شد. مهم‌ترین مسئله در فرآیند ساخت این داربست‌ها ایجاد یک ساختار همگن در کامپوزیت متخلخل شیشه و پلیمر بود که با کاهش اندازه دانه و پوشش شیشه توسط یک آمینوسیلان سوسپانسیون پایدار شیشه/ پلیمر ایجاد شد. پایداری بالاتر سوسپانسیونی که با شیشه پوشش داده شده ساخته شده بود، ساخت کامپوزیت را آسان‌تر کرد. در بررسی‌های زیستی این داربست‌ها طی ۲۱ روز هیچ نشانی از سمیت سلولی در هیچ‌یک از نمونه‌ها دیده نشد. تمایز سلول‌های مزانشیمی

بحث

بررسی طیف XPS نشان می‌دهد در شیشه بدون پوشش نقطه اوج نماینده نیتروژن که خود بیانگر حضور پیوند آمینی است وجود ندارد؛ حال آن‌که طیف شیشه پوشش داده شده با APS شامل دو نقطه اوج است که بیانگر دو حالت شیمیایی متفاوت از نیتروژن است. ترکیب نقطه اوج (A) پیوندهای (N-C) آمین‌های حاصل از پوشش APS را نمایندگی می‌کند. دومین ترکیب نقطه اوج (B) نشان دهنده گروه‌های آمین پروتونیزه شده ($C-N+H_3$) است. ظهور این نوع از نیتروژن نتیجه تعادل پروتوناسون/دپروتوناسیون (Deprotonation/Protonation) آمین‌ها است. این نکته را نیز باید در نظر داشت که شاخه اسیدی گروه‌های سیلانول (Si-OH) در سطح شیشه (سیلیکا) می‌تواند با شاخه بازی گروه‌های آمین APS از طریق تشکیل حلقه برهمکنش داشته باشد و سبب تشکیل زوج یونی ($Si-O---H+NH_2-C$) شود که شامل نیتروژن پروتونیزه شده است.

با کاهش اندازه ذرات شیشه و بالابردن سطح انرژی و همچنین اعمال پوشش آمینوسیلانی، ساختار همگنی به دست آمد. با اندازه‌گذاری مناطق احاطه شده با ذرات شیشه می‌توان گفت که ذرات شیشه در جدار تخلخل‌های فیبروینی کاملاً

تشکر و قدردانی

نویسندگان بدینوسیله مراتب سپاس خود را از مسئول محترم وقت مرکز تحقیقات کرم ابریشم ایران، جناب آقای مهندس موج‌پور، برای تأمین پيله ابریشم بومبیکس موری و قدردانی ویژه خود را از مرکز تحقیقات نانوپزشکی و مهندسی بافت دانشگاه شهید بهشتی که پژوهش حاضر را مورد حمایت مالی قرار دادند، ابراز می‌دارند.

بنیادی روی این داربست‌ها به سمت استئوبلاست با بررسی میزان فعالیت ALP در سلول‌های بنیادی نشان داده شد. با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان گفت داربست‌های کامپوزیتی شیشه زیست‌فعال/ ابریشم ساخته‌شده به روش خشک کردن انجمادی جایگزین بالقوه مناسبی برای استخوان به شمار می‌رود و به نظر می‌رسد با تأمین همزمان خواص ساختاری و زیستی مناسب، آغازگر فصل جدیدی در زمینه داربست‌های مهندسی بافت استخوان باشد.

منابع

- [1] Olszta M, Cheng X, Jee SS, Kumar R, Kim YY, Kaufman MJ, Douglas EP, Gower LB. Bone structure and formation: A new perspective. *Mater Sci Eng R Rep* 2007; 58(3-5): 77-116.
- [2] Park J, Ries J, Gelse K, Kloss F, von der Mark K, Wiltfang J, Neukam FW, Schneider H. Bone regeneration in critical size defects by cell-mediated BMP-2 gene transfer: a comparison of adenoviral vectors and liposomes. *Gene Ther* 2003; 10(13):1089-98.
- [3] Drosse I, Volkmer E, Capanna R, De Biase P, Mutschler W, Schieker M. Tissue engineering for bone defect healing: an update on a multi-component approach. *Injury* 2008; 39 Suppl 2: S9-S20.
- [4] Schmidmaier G, Capanna R, Wildemann B, Beque T, Lowenberg D. Bone morphogenetic proteins in critical-size bone defects: what are the options? *Injury* 2009; 40 Suppl 3: S39-43.
- [5] Porter JR, Ruckh TT, Popat KC. Bone tissue engineering: a review in bone biomimetics and drug delivery strategies. *Biotechnol Prog* 2009; 25(6): 1539-60.
- [6] Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL. Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromol Biosci* 2004; 4(8): 743-65.
- [7] Hollinger J, Einhorn T, Doll B, Sfeir C. Bone tissue engineering. Florida: CRC press LLC 2005; p: 27-8.
- [8] Hutmacher DW, Schantz JT, Lam CX, Tan KC, Lim TC. State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective. *J Tissue Eng Regen Med* 2007; 1(4): 245-60.
- [9] Ma P, Elisseeff J. Scaffolding in Tissue Engineering. Florida: CRC Press Taylor & Francis Group 2006; p: 23-8.
- [10] Meyer U, Wiesmann H. Bone and cartilage engineering. Berlin: Springer-Verlag 2006; p: 17-9.
- [11] Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* 2005; 26(27): 5474-91.
- [12] Vepari C, Kaplan DL. Silk as a biomaterial. *Prog Polym Sci* 2007; 32(8-9): 991-1007.
- [13] Hardy JG, Römer LM, Scheibel TR. Polymeric materials based on silk proteins. *Polymer* 2008;

- 49(20): 4309-27.
- [14] Hardy JG, Scheibel TR. Composite materials based on silk proteins. *Prog Polym Sci* 2010; 35(9): 1093-115.
- [15] Hofmann S, Hagenmüller H, Koch AM, Müller R, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL, Merkle HP, Meinel L. Control of in vitro tissue-engineered bone-like structures using human mesenchymal stem cells and porous silk scaffolds. *Biomaterials* 2007; 28(6): 1152-62.
- [16] Kim HJ, Kim UJ, Kim HS, Li C, Wada M, Leisk GG, Kaplan DL. Bone tissue engineering with premineralized silk scaffolds. *Bone* 2008; 42(6): 1226-34.
- [17] Collins AM, Skaer NJV, Gheysens T, Knight D, Bertram C, Roach HI, Oreffo ROC, Von-Aulock S, Baris T, Skinner J, Mann S. Bone-like resorbable silk-based scaffolds for load-bearing osteoregenerative applications. *Adv Mater* 2009; 21: 75-8.
- [18] Wang Y, Rudym DD, Walsh A, Abrahamsen L, Kim HJ, Kim HS, Kirker-Head C, Kaplan DL. In vivo degradation of three-dimensional silk fibroin scaffolds. *Biomaterials* 2008; 29(24-25): 3415-28.
- [19] Vunjak-Novakovic G, Freshney R. *Culture of Cells for Tissue Engineering*. New Jersey: Wiley 2006; p: 323-75.
- [20] Murugan R, Ramakrishna S. Development of nanocomposites for bone grafting. *Compos Sci Technol* 2005; 65(15-16): 2385-406.
- [21] Rezwani K, Chen QZ, Blaker JJ, Boccaccini AR. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2006; 27(18): 3413-31.
- [22] Karageorgiou V, Tomkins M, Fajardo R, Meinel L, Snyder B, Wade K, Chen J, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL. Porous silk fibroin 3-D scaffolds for delivery of bone morphogenetic protein-2 in vitro and in vivo. *J Biomed Mater Res A* 2006; 78(2): 324-34.
- [23] Kim SS, Ahn KM, Park MS, Lee JH, Choi CY, Kim BS. A poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffold with enhanced osteoconductivity. *J Biomed Mater Res A* 2007; 80(1): 206-15.
- [24] Balamurugan A, Sockalingum G, Michel J, Fauré J, Banchet V, Wortham L, Bouthors S, Laurent-Maquin D, Balossier G. Synthesis and characterisation of sol gel derived bioactive glass for biomedical applications. *Mater Lett* 2006; 60(29-30): 3752-7.
- [25] Um IC, Kweon HY, Park YH, Hudson S. Structural characteristics and properties of the regenerated silk fibroin prepared from formic acid. *Int J Biol Macromol* 2001; 29(2): 91-7.
- [26] Ayutsede J, Gandhi M, Sukigara S, Micklus M, Chen HE, Ko F. Regeneration of Bombyx mori silk by electrospinning Part 3: characterization of electrospun nonwoven mat. *Polymer* 2005; 46(5): 1625-34.
- [27] Mandal BB, Kundu SC. Non-bioengineered silk gland fibroin protein: characterization and evaluation of matrices for potential tissue engineering applications. *Biotechnol Bioeng* 2008; 100(6): 1237-50.
- [28] Zhu ZH, Ohgo K, Asakura T. Preparation and characterization of regenerated Bombyx mori silk fibroin fiber with high strength. *Express Polym Lett* 2008; 12(2): 885-9.
- [29] Iridag Y, Kazanci M. Preparation and

characterization of bombyx mori silk fibroin and wool keratin. J Appl Polym Sci 2006; 100(5): 4260-4.

[30] Hesaraki S, Alizadeh M, Nazarian H, Sharifi D.

Physico-chemical and in vitro biological evaluation of strontium/calcium silicophosphate glass. J Mater Sci Mater Med 2010; 21(2): 695-705.