



## Silk Fibroin-Lignin Nanofiber Dressing for the Treatment of Diabetic Wounds

Amirhosein Mohammadifard<sup>1\*</sup>, Mahshid Kharaziha<sup>1</sup> and Masoud Atapour<sup>1</sup>

Department of Materials Engineering, Isfahan University of Technology, Isfahan 84156-83111, Iran

\* Corresponding author, Email: [a.mohammadifard@alumni.iut.ac.ir](mailto:a.mohammadifard@alumni.iut.ac.ir)

(Received: 9 April 2025; Revised: 31 July 2025; Accepted: 4 August 2025; Available online: \*\* 2025)

### ABSTRACT

**Introduction and Objectives:** As the largest organ exposed to the external environment, the skin is highly susceptible to disruption due to trauma, burns, wounds, surgical interventions, chronic diseases (e.g., diabetes), or inflammatory dermatological reactions. The aim of this study was to fabricate and characterize silk fibroin-lignin nanofiber dressings for the treatment of diabetic wounds.

**Materials and Methods:** Initially, silk fibroin was extracted from silkworm cocoons and nanofibers were fabricated at a voltage of 20 kV using lignin at ratios ranging from 1:5 and 1:6 and 1:7. Subsequently, the nanofibers were immersed in 96% ethanol for 30 minutes to carry out the crosslinking process. In the first step, scanning electron microscopy (SEM) was employed to investigate the morphological features. Then, mechanical, physical, antioxidant, cellular, and antibacterial evaluations were performed to assess the properties of an ideal wound dressing.

**Results:** The results revealed that the composite fibers were uniform in structure across different ratios and possessed nanometer-scale diameters. The swelling rate of the composite samples increased from  $359.99 \pm 37.53\%$  in pure silk fibroin samples to  $468.37 \pm 63.47\%$ , indicating favorable stability. Antioxidant and antibacterial assays demonstrated that the addition of lignin enhanced both antioxidant and antibacterial activities. Furthermore, cell viability assessments showed that the presence of lignin did not exert any detrimental effects on the cells, and cell proliferation and growth were observed on the surface of the samples.

**Conclusion:** Since achieving an ideal wound dressing requires critical biological properties, these nanofibers due to their hydroxyl and methoxy phenolic groups in lignin exhibit unique advantages in physical properties, antioxidant activity, antibacterial effects, and cell adhesion. These characteristics make them a promising candidate for biomedical applications, particularly wound healing, and tissue regeneration.

**Keywords:** Diabetic wound dressing, Lignin, Silk Fibroin, Electrospinning, Antibacterial, Antioxidant.

How to Cite: Mohammadifard A, Kharaziha M, Atapour M. Silk fibroin-lignin nanofiber dressing for the treatment of diabetic wounds. J Adv Mater Eng. 2026;45(3):1-19. <https://doi.org/10.47176/jame.45.3.1122>

Copyright © 2026 Isfahan University of Technology, Published by IUT press.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Noncommercial 4.0 International license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.



## پانسمان نانولیفی فیبروئین ابریشم-لیگنین جهت درمان زخم‌های دیابتی

امیرحسین محمدی فرد\*<sup>ID</sup>، مهشید خرازیها<sup>ID</sup> و مسعود عطاپور<sup>ID</sup>

دانشکده مهندسی مواد، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان ۸۳۱۱۱-۸۴۱۵۶، ایران

\* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: [a.mohammadifard@alumni.iut.ac.ir](mailto:a.mohammadifard@alumni.iut.ac.ir)

(دریافت: ۱۴۰۴/۱/۲۰، بازنگری: ۱۴۰۴/۵/۹، پذیرش: ۱۴۰۴/۵/۱۳، انتشار: ۱۴۰۴/۴/۱۳)

### چکیده

**مقدمه و اهداف:** پوست به‌عنوان بیشترین عضو که در معرض محیط بیرونی قرار دارد می‌تواند به راحتی به دلیل تروما، سوختگی، زخم، جراحی و بیماری‌های مزمن یا واکنش‌های پوستی التهابی مختل شود. هدف از انجام این پژوهش، ساخت و مشخصه‌یابی پانسمان نانوالیاف فیبروئین ابریشم-لیگنین جهت درمان زخم‌های دیابتی می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** در ابتدا فیبروئین ابریشم از پيله‌های کرم ابریشم استخراج شد و با نسبت‌های ۱:۵، ۱:۶ و ۱:۷ لیگنین، در ولتاژ ۲۰ کیلوولت، نانوالیاف تولید گردید. سپس، نانوالیاف به مدت ۳۰ دقیقه جهت انجام فرایند اتصال عرضی در اتانول ۹۶ درصد غوطه‌ور شد. در گام نخست، به منظور بررسی ویژگی‌های مورفولوژی، از میکروسکوپ الکترونی روبشی استفاده گردید. سپس، جهت دستیابی به خواص یک پانسمان ایده‌آل، ارزیابی‌های مکانیکی، فیزیکی، آنتی‌اکسیدان، سلولی و ضدباکتریایی صورت گرفت.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد که الیاف کامپوزیتی در نسبت‌های مختلف یکنواخت بوده و دارای ابعاد نانومتری است. میزان تورم در نمونه‌های کامپوزیتی نسبت به نمونه فیبروئین ابریشم خالص از  $37/53 \pm 359/99$  درصد به  $63/47 \pm 468/37$  درصد رسید و پایداری مناسبی ارائه نمود. خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی نشان داد، با اضافه شدن لیگنین، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی افزایش یافت. همچنین در بررسی زنده‌مانی سلولی پانسمان مورد نظر مشاهده شد که وجود لیگنین اثر نامطلوبی بر سلول‌ها نداشته و تکثیر و رشد سلول روی سطح نمونه‌ها مشاهده شد.

**نتیجه‌گیری:** از آنجایی که جهت دستیابی به یک پانسمان ایده‌آل خواص زیستی حائز اهمیت است، این نانوالیاف به دلیل گروه‌های فنولی هیدروکسیل و متوکسی موجود در لیگنین، خواص منحصر به فردی را بر خواص فیزیکی، آنتی‌اکسیدان، ضدباکتریایی و چسبندگی سلولی ارائه می‌دهد که می‌تواند آن را گزینه مناسبی جهت کاربردهای زیست پزشکی از جمله بهبود و ترمیم زخم نماید.

**واژه‌های کلیدی:** پانسمان زخم دیابتی، لیگنین، فیبروئین ابریشم، الکتروریسی، ضدباکتری، آنتی‌اکسیدان.



## ۱- مقدمه

پوست، بزرگ‌ترین عضو بدن است که تقریباً ۱۶ درصد وزنی آن را تشکیل داده و سطح خارجی را در بر می‌گیرد (۱). قسمت بیرونی پوست، به وزن و قد بستگی دارد و ضخامت آن بین ۱/۵ تا ۴ میلی‌متر است. پوست انسان به‌عنوان یک مانع فیزیکی/شیمیایی در برابر عوامل بیماری‌زا و کم‌آبی بدن در برابر تهاجمات محیطی، از اندام‌های داخلی محافظت می‌کند. در زندگی روزمره به‌طور طبیعی پوست ممکن است آسیب بیند که منجر به رنج جسمی و روحی شده و بار اقتصادی زیادی برای جامعه ایجاد می‌کند (۲). از نظر آناتومی و ساختاری، پوست از سه لایه حیاتی شامل اپیدرم، بیرونی‌ترین لایه پوست و درم، لایه تحتانی است که روی یک لایه بنام هیپودرم که متشکل از چربی و سلول‌های همبند می‌باشد تشکیل شده است (۳). پوست به‌عنوان بیشترین عضوی که در معرض محیط بیرونی قرار دارد می‌تواند به راحتی به دلیل تروما، آسیب، سوختگی، زخم، جراحی و بیماری‌های مزمن یا واکنش‌های پوستی التهابی مختل شود. زخم‌ها زمانی ایجاد می‌شوند که پیوستگی و یکپارچگی پوست از بین برود و در نتیجه عملکرد و ساختار بافت‌های زیرین آن مختل شود. ضعف سیستم ایمنی و عفونت باکتریایی، بهبود زخم را طولانی می‌کند و منجر به ایجاد زخم‌های مزمن می‌شود. **دیابت شیرین**<sup>۱</sup> یک بیماری مزمن و شایع است که با سطوح بالای قند خون مداوم مشخص می‌شود. در بین بیماران دیابتی، حدود ۱۹ تا ۳۴ درصد پیش‌بینی می‌شود که زخم مزمن دیابتی که یک عارضه شایع، پیچیده و پرهزینه است، دچار شوند. تخمین زده می‌شود که ۳۶۶ میلیون نفر در سراسر جهان در سال ۲۰۱۱ به دیابت مبتلا بوده و انتظار می‌رود این رقم تا سال ۲۰۳۰ به ۵۵۲ میلیون نفر افزایش یابد (۴)؛ بنابراین، زخم‌های مزمن، از جمله دیابت، به‌عنوان یک نگرانی بهداشت جهانی در نظر گرفته می‌شوند؛ زیرا میلیون‌ها نفر را تحت تاثیر قرار می‌دهند. آن‌ها نه تنها یک چالش برای متخصصان مراقبت از زخم هستند، بلکه مقدار قابل توجهی از منابع مراقبت‌های بهداشتی را در سراسر جهان مصرف می‌کنند. همچنین، آمارها نشان می‌دهد که در سال

۲۰۱۷، ۴۲۵ میلیون نفر مبتلا به دیابت بوده‌اند که ۱۵ درصد آن‌ها زخم مزمن دیابتی داشته و ۸۴ درصد افراد دارای زخم دیابتی در خطر قطع عضو هستند. هر ۳۰ ثانیه در جایی از دنیا، بخشی یا به طور کامل یک قطع عضو به دلیل عواقب بیماری دیابت رخ می‌دهد. به گفته مؤسسه ملی بهداشت ایالات متحده، تأخیر در بهبود زخم‌های مزمن پوستی یک بیماری همه‌گیر خاموش است که ۶/۵ میلیون نفر را در ایالات متحده تحت تاثیر قرار می‌دهد. تنها در ایالات متحده، سالانه بیش از ۳۰۰ میلیارد دلار برای هزینه‌های پزشکی به دلیل **زخم پای دیابتی**<sup>۲</sup> هزینه می‌شود. تخمین زده می‌شود که هزینه درمان و مراقبت زخم پای دیابتی به تنهایی از ۷/۰۳ میلیارد دلار در سال ۲۰۱۹ به ۱۱/۰۵ میلیارد دلار تا سال ۲۰۲۷ افزایش یابد که توسعه استراتژی‌های تشخیصی و درمانی مؤثرتر برای مبارزه با این بیماری ناتوان‌کننده را ضروری می‌سازد. اگرچه تلاش‌های زیادی برای درمان زخم‌های دیابتی انجام شده است، اما همچنان ایجاد رویکردهای کارآمد در این زمینه چالش مهمی است (۵).

امروزه به‌طور گسترده از مواد پلیمری برای پانسمان زخم مزمن استفاده می‌شود که دارای مزایای بی‌شماری در مقایسه با پانسمان‌های سنتی مانند حفظ رطوبت محیط زخم، محافظت در برابر عوامل میکروبی، ترمیم سریع زخم و حداکثر تماس با سطح زخم برای کاهش درد و بهبود کارآمدی می‌باشد. نقش پلیمرها در هموستاز و به‌عنوان یک عامل مناسب التیام زخم، عمدتاً به زیست‌تخریب‌پذیری، زیست‌سازگاری و خواص مکانیکی آن بستگی دارد. آن‌ها به شکل فیلم، فوم، هیدروکلوئید، هیدروژل، داربست و اخیراً به‌عنوان نانوالیاف الکترورسی استفاده می‌شوند (۶).

در دهه‌های اخیر، پروتئین‌هایی مانند **فیبروئین ابریشم**<sup>۳</sup> به کانون توجه تحقیقات در مهندسی پزشکی تبدیل شده‌اند و به دلیل فراوانی منابع، زیست‌سازگاری و عملکرد زیستی مناسب، به‌طور گسترده در زمینه‌هایی همچون مهندسی بافت استخوان، ترمیم زخم و دارورسانی به کار گرفته می‌شوند. نکته حائز اهمیت این است که این پروتئین‌ها قادرند **ماتریکس خارج سلولی**<sup>۴</sup> را از

که از طریق اتصالات اتری و کربنی به یکدیگر متصل شده‌اند. بعلاوه، لیگنین به دلیل تنوع زیاد از لحاظ اندازه مولکول، گروه‌های عاملی، ترکیب شیمیایی، تعداد و نوع اتصالات در گونه‌های مختلف چوبی، پلیمری ناهمگن محسوب می‌شود. لیگنین از منابع متنوعی از جمله چوب، پوست درختان و گیاهان غیرچوبی استخراج می‌شود (۱۲). از ویژگی‌های لیگنین، وجود تعداد زیادی گروه فعال، از جمله گروه‌های هیدروکسیل فنولی، گروه‌های هیدروکسیل و گروه‌های سولفونیک است. فعالیت آنتی‌اکسیدانی عالی، مقاومت در برابر ضربه و فشار، خواص کششی، ضدباکتریایی و چسبندگی لیگنین به دلیل وجود این ساختارها و گروه‌های عاملی می‌باشد که آن را برای درمان زخم مؤثر می‌کند (۱۳). رئیسی و همکاران (۱۴)، یک پانسما هیدروکلونیدی از نانوالیاف لیگنین حاوی داروی آرژنین تهیه کردند. لیگنین به علت وجود تعداد زیادی گروه‌های هیدروکسیل و فنول در طول زنجیره خود قادر است که با ایجاد پیوندهای یونی با داروهای مختلف و عناصر شفادهنده زخم ارتباط برقرار کند. براساس این تحقیق، نانوالیاف لیگنین سطح آبدوست و ظرفیت جذب آب بالایی دارد و می‌تواند محیطی مرطوب را برای تسهیل درمان فراهم کند. علاوه بر این، شباهت ساختاری نانوالیاف لیگنین به ماتریکس خارج سلولی، می‌تواند تکثیر سلول‌های اپیتلیال را افزایش داده و بسته‌شدن زخم را تسریع بخشد. در پژوهشی دیگر، دای و همکاران (۱۵)، غشا دکستران/گلیکول حاوی لیگنین ساختند. نتایج مدل حیوانی در فواصل مختلف زمانی (۷ و ۱۴ روز)، بهبودی بهتری در غشا دکستران/گلیکول حاوی لیگنین را نسبت به غشا بدون لیگنین نشان داد. در روز هفتم، زخم‌های درمان‌شده غشا حاوی لیگنین، ۸۰ درصد بهبود یافته و روز چهاردهم زخم تقریباً به‌طور کامل بسته شد که علت سریع بسته‌شدن زخم، به دلیل وجود لیگنین و دکستران/گلیکول می‌باشد.

اگرچه مطالعاتی به بررسی استفاده از این دو پلیمر پرداخته اند، پژوهش‌های نویدبخشی نشان داده‌اند که ترکیب فیروئین ابریشم و لیگنین می‌تواند اثر هم افزایی قابل توجهی، از جمله خواص ضدباکتریایی، آنتی‌اکسیدان و سلولی مطلوبی در بهبود

لحاظ ساختار، ترکیبات و تأثیرات بیولوژیکی تقلید کنند (۷). ابریشم که عموماً به‌عنوان "ملکه الیاف" شناخته می‌شود، نه تنها در زمینه نساجی بلکه در زمینه زیست‌پزشکی نیز مورد استفاده قرار گرفته است. ابریشم را می‌توان از منابع مختلفی از جمله کرم ابریشم، عنکبوت و کته تولید کرد (۸). با توجه به زیست‌سازگاری خوب، تخریب‌پذیری، نفوذپذیری اکسیژن و آب، توانایی التیام زخم، خواص مکانیکی عالی و صرفه اقتصادی مناسب، فیروئین ابریشم کاربردهای زیادی در مهندسی پزشکی دارد. براین اساس، به‌عنوان داربست برای بازسازی بافت‌های آسیب دیده مانند پوست، استخوان، غضروف، رگ‌های خونی و تاندون‌ها استفاده می‌شود (۹). مطالعات نشان می‌دهد که فیروئین ابریشم در اشکال مختلف مانند محلول، هیدروژل، اسفنج، فیلم، پانسما هیدروکلونیدی و نانوالیاف فیروئین ابریشم الکترورسی شده در کاربردهای مختلف التیام زخم مورد استفاده قرار می‌گیرد. به‌عنوان مثال، جراحات ناشی از سوختگی مقادیر بالایی از ترشحات تولید می‌کند که در این صورت، هیدروژل‌های فیروئین ابریشم به دلیل توانایی در جذب ترشحات در محل‌های آسیب، گزینه‌های مناسبی هستند. همچنین، فیلم‌های فیروئین ابریشم به دلیل توانایی جهت جلوگیری از آلودگی میکروبی، الیاف الکترورسی شده فیروئین ابریشم به علت نفوذپذیری مناسب اکسیژن، ساختارهای خوبی برای بهبود زخم در نظر گرفته می‌شوند. بعلاوه، عملکرد پانسماها با فاکتورهای مختلف رشد و مولکول‌های سیگنال‌دهنده با توجه به نوع زخم مفید است. به‌عنوان مثال، مشکل اصلی در زخم‌های دیابتی عدم رگ‌زایی مناسب است؛ بنابراین، تشکیل عروق خونی را می‌توان با ادغام عوامل رگ‌زایی در پانسما فیروئین ابریشم تحریک نمود (۱۰). علی‌رغم ویژگی‌های مناسب ابریشم جهت کاربرد در درمان زخم، به دلیل نداشتن خواص ضدباکتری، استحکام چسبندگی و برهمکنش سلولی نامطلوب و حلالیت پایین، توسعه آن به صورت خالص و تنهایی امکان‌پذیر نیست (۱۱). پلیمر دیگری که پتانسیل بالایی برای کاربرد در زمینه پانسما زخم دارد، لیگنین<sup>۵</sup> می‌باشد. لیگنین، از بخش‌های فنیل پروپان تشکیل شده

برای غلظت وجود دارد که در آن الیاف به شکلی مناسب و بدون عیب تشکیل می‌شوند. غلظت بهینه فیروئین ابریشم بر اساس پژوهش عطریان و همکاران (۱۷)، ۱۷ درصد وزنی و غلظت بهینه لیگنین از طریق سعی و خطا، ارزیابی و پژوهش سینترا و همکاران (۱۸)، ۲۲/۲ درصد وزنی انتخاب شد. برای تهیه محلول پلیمری مورد نیاز الکتروریسی، نسبت‌های ۱:۵، ۱:۶ و ۱:۷ (نسبت لیگنین به فیروئین ابریشم، درصد وزنی/حجمی)، فرمیک اسید<sup>۶</sup> به فیروئین خشک‌شده و لیگنین به صورت جداگانه اضافه و در دمای اتاق روی همزن مغناطیسی قرار داده شد تا به طور کامل حل شود. سپس، مطابق با نسبت‌های گزارش‌شده، محلول‌ها ساخته و داخل سرنگ یک میلی‌لیتری تزریق و با گیج ثابت ۲۳، ولتاژ ۲۰ کیلوولت، فاصله سرسوزن تا جمع‌کننده ۱۲ سانتی‌متری و نرخ تغذیه ۵ میلی‌متر بر ساعت، الیاف الکتروریسی شدند.

### فرایند اتصال عرضی غشا لیفی فیروئین ابریشم-لیگنین

فیروئین در محیط‌های آبی به سرعت تخریب می‌شود؛ بنابراین، برای افزایش پایداری مکانیکی، فرایند اتصال عرضی انجام گرفت. در این پژوهش، از اتانول با خلوص ۹۶ درصد، به عنوان عامل اتصال عرضی استفاده شد. بدین منظور، نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق در معرض محلول اتصال عرضی قرار گرفتند. سپس، برای حذف کامل اتانول، غشاهای تهیه‌شده در هوای آزاد خشک شدند. در نهایت، غشاهای اتصال عرضی‌شده تا زمان انجام مشخصه‌یابی در داخل دسیکاتور و در محیط آزمایشگاه نگهداری شدند (۱۹).

### ۲-۳- آزمون‌های مشخصه‌یابی

#### بررسی مورفولوژی و ساختار الیاف

برای بررسی شکل و قطر الیاف، از میکروسکوپ الکترونی روبشی<sup>۷</sup> مدل Philips, XL30 استفاده شد. نمونه‌های الکتروریسی شده در ابعاد ۱×۱ سانتی‌متر مربع برش و سپس با روکش طلا پوشش داده شدند.

ویژگی‌های زخم‌پوش‌ها ایجاد نماید. یافته‌های این تحقیق می‌تواند بستری مناسب برای توسعه پانسمان‌های الکتروریسی‌شده جهت کاربرد در درمان زخم‌های مزمن، به‌ویژه زخم‌های دیابتی، فراهم سازد. در مطالعه حاضر، ساخت و بررسی خواص نانوالیاف فیروئین ابریشم-لیگنین جهت درمان زخم دیابت مورد ارزیابی قرار گرفت.

## ۲- مواد و روش تحقیق

### ۲-۱- مواد اولیه

در مراحل مختلف این پروژه، پیله کرم ابریشم با کیفیت عالی تهیه‌شده از نوغان نطنز، فرمیک اسید با خلوص ۹۹ درصد از شرکت مرک، آب دیونیزه، لیگنوسولفونات تهیه‌شده از شرکت سیگما با وزن مولکولی ۸۶ کیلودالتون، اتانول ۹۶ درصد از شرکت مرک، سدیم کربنات از شرکت مرک، لیتیم برماید تهیه‌شده از شرکت سیگما، محلول بافر فسفات و MTT از شرکت سیگما، استفاده شدند.

### ۲-۲- مراحل ساخت

#### غشالیفی فیروئین ابریشم-لیگنین

فیروئین ابریشم، به روش راکوود و همکارانش (۱۶) استخراج شد. به طور خلاصه، پیله‌ها به قسمت‌های کوچک تقسیم و پس از شستشو، در آب دیونیزه در حال جوش ۰/۰۲ مولار سدیم کربنات به مدت ۳۰ دقیقه جوشانده شد. سپس، سه مرتبه شستشو با آب دیونیزه انجام و به مدت ۲۴ ساعت زیر هود خشک شد. فیروئین به دست‌آمده در محلول ۹/۳ مولار لیتیم برماید ریخته شد و به مدت چهار ساعت و در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد داخل آون قرار گرفت تا یک محلول یکنواخت به دست آید. سپس، محلول دو مرتبه با سرعت ۶۰۰۰ دور بر دقیقه و به مدت ۲۰ دقیقه تحت سانتریفیوژ قرار گرفت. محلول به مدت ۷۲ ساعت داخل کیسه دیالیز و درون آب دیونیزه تحت دیالیز قرار گرفت. در نهایت، محلول داخل فریزر قرار گرفته و پس از آن به وسیله دستگاه خشک‌کن انجمادی خشک شد. یک محدوده بهینه

## بررسی خواص مکانیکی

برای ارزیابی رفتار مکانیکی غشاهای لیفی، آزمون تعیین استحکام کششی تک‌محوره براساس استاندارد ASTM D882 انجام شد. بدین منظور، نمونه‌هایی با ابعاد  $10 \times 5$  میلی‌متر مربع از غشاها تهیه شده و آزمون کشش با استفاده از دستگاه اینسترون اجرا گردید تا نمودار تنش-کرنش آن‌ها ثبت شود.

آزمون کشش تحت نیروی  $10$  نیوتن (Load cell) و با نرخ حرکت  $2$  میلی‌متر بر دقیقه در فک دستگاه انجام شد. برای هر گروه از غشاها، این آزمون روی سه نمونه مشابه تکرار شد. پس از ثبت نمودار تنش-کرنش، استحکام کششی، ضریب کشسانی، درصد کرنش تا پیش از شکست و چقرمگی با استفاده از داده‌های استخراج شده محاسبه گردید. میانگین نتایج به دست آمده از حداقل سه نمونه به همراه انحراف معیار آن‌ها گزارش شد.

## ارزیابی فیزیکی

خواص زیست‌تخریب‌پذیری و جذب آب غشاهای لیفی براساس استاندارد ASTM-F1635 ارزیابی شد. برای این منظور، ابتدا سه نمونه از غشاهای تهیه شده با وزن اولیه  $6$  (W) میلی‌گرم بریده شده و در  $3$  میلی‌لیتر محلول بافر فسفات<sup>۸</sup> در ظروف جداگانه قرار گرفتند. سپس، این ظروف در دمای  $37$  درجه سانتی‌گراد داخل حمام بن‌ماری نگهداری شدند. در بازه‌های زمانی  $1$ ،  $7$  و  $14$  روز، نمونه‌ها از حمام خارج شده و وزن تر آن‌ها ( $W_0$ ) اندازه‌گیری شد. پس از آن، نمونه‌ها به مدت  $24$  ساعت در هوای آزاد خشک شدند و وزن خشک ( $W_t$ ) آن‌ها ثبت گردید. در نهایت، درصد تخریب و درصد جذب آب غشاهای لیفی بر اساس روابط (۱) و (۲) از استاندارد ASTM D570 محاسبه شد.

$$\text{Mass Loss \%} = [(W - W_t) / W] \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Swelling \%} = [(W - W_0) / W_0] \times 100 \quad (2)$$

به منظور ساخت محلول بافر فسفات، ابتدا در یک بشر، یک لیتر آب دیوار تقطیر ریخته شد و در دمای اتاق، روی همزن مغناطیسی قرار گرفت و نمک‌های ارائه شده در جدول (۱)، با رعایت فاصله زمانی به آن اضافه شد و pH محلول در حدود  $7/4$  به دست آمد.

## جدول ۱- نمک‌های اضافه شده برای ساخت محلول بافر فسفات

مقادیر توزین شده	نمک‌ها
۸ گرم	NaCl
۰/۲ گرم	KCl
۱/۷۸ گرم	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O
۰/۲۷ گرم	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

## ارزیابی خاصیت آنتی‌اکسیدان غشا لیفی فیبروئین ابریشم-لیگنین

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی، از طریق ارزیابی میزان جذب باقی‌مانده  $1,1$ -دی فنیل- $2$ -پیکریل هیدرازیل<sup>۹</sup> در محلول، پس از تعامل با الیاف انجام گرفت. به طور خلاصه، محلولی از DPPH با غلظت  $0/2$  میلی‌مولار در اتانول تهیه شد. سپس،  $140$  میلی‌گرم الیاف با  $3$  میلی‌لیتر از محلول DPPH مخلوط گردید. پس از همگن‌سازی کامل با سرعت ثابت  $200$  دور در دقیقه به مدت  $10$  دقیقه، نمونه‌ها در شرایط تاریک به مدت  $8$ ،  $24$  و  $48$  ساعت انکوبه شدند. در نهایت، میزان جذب مخلوط‌ها در طول موج  $517$  نانومتر، به کمک یک اسپکتروفتومتر مرئی UV اندازه‌گیری شد و درصد مهار رادیکال DPPH بر اساس رابطه (۳) محاسبه گردید (۲۰).

DPPH radical scavenging activity (%) =

$$[(A_0 - A_1) / A_0] \times 100 \quad (3)$$

$A_1$  و  $A_0$  به ترتیب جذب محلول DPPH قبل و بعد از واکنش با نمونه‌های الکترورسی شده است.

## بررسی سمیت سلولی

به منظور ارزیابی میزان زنده‌مانی سلول‌ها در نمونه‌های الکترورسی شده حاوی لیگنین و فاقد لیگنین (فیبروئین ابریشم خالص)، از آزمون MTT مطابق با پروتکل شرکت سیگما استفاده شد. ابتدا، محلول MTT با غلظت  $0/5$  میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در محلول بافر فسفات استریل تهیه گردید. سپس، در زمان‌های مشخص پس از کشت، محلول کشت از نمونه‌های حاوی سلول

### بررسی خواص ضدباکتریایی

برای ارزیابی ویژگی ضدباکتریایی نانوالیاف کامپوزیتی فیروئین ابریشم-لیگنین، از آزمون اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد به روش انتشار در پلیت‌های آگار انجام شد.

در این بررسی، باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 6538) به‌عنوان نمونه گرم مثبت و *اشریشیا کلای* (ATCC 10536) به‌عنوان نمونه گرم منفی انتخاب شدند. این انتخاب مبتنی بر پراکندگی بالای این دو میکروارگانیسم در محیط‌های زخم، به‌ویژه زخم‌های مزمن و دیابتی است. *استافیلوکوکوس اورئوس* یکی از شایع‌ترین پاتوژن‌های مسئول عفونت زخم‌های دیابتی بوده و تهدیدی جدی برای بیماران محسوب می‌شود. از سوی دیگر، *اشریشیا کلای* نیز به‌عنوان عامل عفونت‌های متنوع پوستی و با منشأ روده‌ای مطرح است که در بیماران بستری و دارای زخم باز، احتمال آلودگی با آن افزایش می‌یابد.

این باکتری‌ها تحت شرایط استاندارد کشت، در دمای  $2 \pm 35$  درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۴ ساعت در محیط کشت مایع (شامل پیتون، عصاره گوشت گاو و آب مقطر) رشد داده شدند. سپس، مقدار مشخصی از کشت مایع هر باکتری برداشته شده و برای ایزوله‌سازی کلنی‌ها، روی محیط کشت جامد کشت داده شد. پس از جداسازی کلنی‌های باکتریایی، مقداری از کلنی‌ها در سرم استریل حل شده و محلول حاصل همگن‌سازی شد. غلظت نهایی باکتری در هر لوله آزمون برابر با  $5 \times 10^8$  م‌ک‌فارلند تنظیم گردید.

در مرحله بعد، محلول باکتریایی همگن‌شده با استفاده از سواب استریل مخلوط شده و به‌صورت کشت چمنی روی محیط کشت جامد میکروبی پخش شد. سپس، در روش انتشار در پلیت‌های آگار، نمونه‌های با قطر  $5 \times 10^8$  سانتی‌متر از نانوالیاف کامپوزیتی روی پلیت‌های آگار با قطر ۸ سانتی‌متر قرار داده شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت، پلیت‌ها مورد بررسی قرار گرفته و قطر هاله عدم رشد اندازه‌گیری و گزارش شد.

و کنترل (چاهک‌های فاقد نمونه) حذف شده و ۵۰۰ میکرولیتر از محلول MTT به نمونه‌ها اضافه شد.

در ادامه، نمونه‌ها به مدت چهار ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در حضور ۵ درصد دی‌اکسید کربن داخل انکوباتور قرار گرفتند تا تشکیل کریستال‌های فورمازان صورت گیرد. پس از این مرحله، محلول MTT جدا شده و محلول دی‌متیل سولفوکسید استریل به نمونه‌ها افزوده شد. پس از گذشت ۳۰ دقیقه، کریستال‌های فورمازان در محلول حل شده و رنگ محلول به بنفش تغییر یافت. در نهایت، میزان جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه الیزا ریدر در طول موج ۴۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و درصد زنده‌مانی سلولی براساس رابطه (۴) محاسبه گردید (۲۱).

Relative cell viability (%) =

$$[(A_{\text{sample}} - A_{\text{b}}) / A_{\text{c}}] \times 100 \quad (4)$$

که در آن  $A_{\text{sample}}$ ،  $A_{\text{b}}$  و  $A_{\text{c}}$ ، به ترتیب جذب مورد نظر، جذب محلول دی‌متیل سولفوکسید و جذب نمونه کنترل معرفی می‌شود.

### آزمون چسبندگی سلولی

مورفولوژی و چسبندگی سلول‌های فیروبلاست کشت‌شده روی سطح غشاهای کامپوزیتی با غلظت‌های مختلف از ذرات، به کمک میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) مورد بررسی قرار گرفت. در مرحله اولیه، محلولی با غلظت ۲/۵ درصد وزنی از گلو تار آلدئید در بافر فسفات استریل تهیه شد.

سپس، پس از ۱ و ۷ روز از کشت سلولی، محیط کشت خارج شده و ۵۰۰ میکرولیتر از محلول ۲/۵ درصد وزنی گلو تار آلدئید به نمونه‌ها افزوده شد. این نمونه‌ها به مدت سه ساعت در یخچال انکوبه گردیدند.

برای هیدراته کردن نمونه‌ها، پس از حذف محلول گلو تار آلدئید، آن‌ها به ترتیب در محلول‌های اتانول با غلظت‌های ۳۰، ۷۰، ۹۰، ۹۶ و ۱۰۰ درصد حجمی قرار داده شدند. در نهایت، نمونه‌ها تحت خشک‌کن انجمادی به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفته و سطح آن‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی تصویربرداری شد (۲۱).

## ۲-۴- تحلیل آماری

کلیه نتایج در این پژوهش به صورت انحراف از معیار  $\pm$  میانگین گزارش شد. همچنین برای مقایسه نتایج گروه‌های مختلف از آنالیز یک طرفه ANOVA در نرم افزار GraphPad, Prism (V.9) استفاده شد و مقادیر  $P < 0/05$  به صورت معنادار گزارش شد.

## ۳- نتایج و بحث

### ۳-۱- بررسی مورفولوژی و ساختار الیاف

فرمیک اسید، به‌عنوان یکی از حلال‌های پرکاربرد جهت فرایند الکترورسی شناخته می‌شود؛ زیرا دارای نقطه‌جوش پایین (۸۱ تا ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد)، سرعت تبخیر بالا، هزینه کم، عدم سمیت، دسترسی آسان و قابلیت ایجاد نظم کوتاه‌برد در زنجیره‌های پلیمری است (۲۲). بر همین اساس، در این مطالعه نیز از این حلال کارآمد استفاده شده است. یکی از پارامترهای کلیدی در ریسندگی محلول‌های پلیمری و دستیابی به مورفولوژی مطلوب، غلظت محلول پلیمری است. این پارامتر تأثیر مستقیمی بر ویسکوزیته و کشش سطحی محلول دارد که هر دو در فرآیند الکترورسی نقش اساسی ایفا می‌کنند. در محلول‌هایی با غلظت پایین، به دلیل ویسکوزیته کم، الیاف پلیمری قبل از رسیدن به جمع‌کننده شکسته شده و به قطرات کوچک تبدیل می‌شوند. در مقابل، در محلول‌های با غلظت بالا، ویسکوزیته زیاد باعث می‌شود نیروهای ویسکوالاستیک اعمال‌شده بر قطره، از کشیده‌شدن آن تحت میدان الکتریکی خارجی جلوگیری کنند. همچنین، مقدار جامد موجود در محلول تأثیر مستقیمی بر ویسکوزیته دارد. از آنجایی که غلظت‌های اولیه فیبروئین ابریشم و لیگنین یکسان نیستند، ترکیب آن‌ها در درصد‌های مختلف منجر به مقدار جامد متفاوتی در محلول نهایی خواهد شد (۲۳)؛ بنابراین، برای دستیابی به الیاف یکنواخت و بدون نقص، باید یک محدوده بهینه از غلظت محلول در نظر گرفته شود، به طوری که فرآیند الکترورسی بدون ایجاد نواقص در ساختار الیاف انجام شود. در غلظت‌های خارج از محدوده بهینه، ایجاد گره یا الیاف گره‌دار، نانوالیاف، و در نهایت الیاف

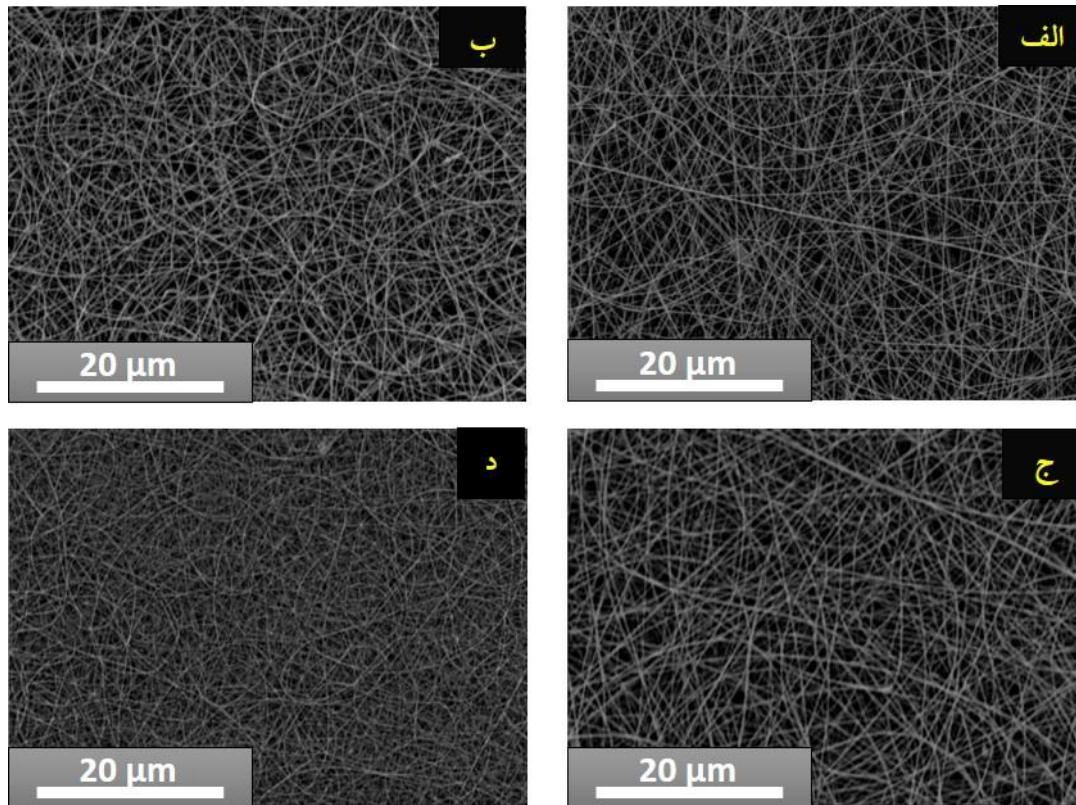
کروی یا میکروگره می‌باشد. در مرحله آخر، به دلیل شدت بالای برهم‌کنش میان زنجیره‌های پلیمری، زنجیره‌ها نمی‌توانند در برخی نقاط به اندازه کافی لغزیده و به الیاف تبدیل شوند (۲۴). بنابراین و با استناد به مراجع علمی و بررسی گسترده محدوده‌های مختلف غلظت لیگنین، سه نسبت وزنی/حجمی ۱:۵، ۱:۶ و ۱:۷ انتخاب شدند، به گونه‌ای که تمامی محلول‌های حاصل در محدوده بهینه قرار داشته و از قابلیت تشکیل الیاف برخوردار بودند. تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی (SEM) از الیاف فیبروئین ابریشم خالص و فیبروئین ابریشم-لیگنین در نسبت‌های ۱:۵، ۱:۶ و ۱:۷ و در ولتاژ کاری ۲۰ کیلوولت ثبت شده‌اند که در شکل (۱) نمایش داده شده است.

همچنین، نتایج اندازه‌گیری قطر متوسط الیاف در نسبت‌های مختلف فیبروئین ابریشم-لیگنین در جدول (۲) گزارش شده است.

بر اساس گزارش‌ها، قطر الیاف ماتریکس خارج سلولی طبیعی بدن در محدوده‌ای بین ۵۰ تا ۵۰۰ نانومتر قرار دارد. الیاف تولیدشده از طریق روش الکترورسی، قادر به شبیه‌سازی ماتریکس خارج سلولی هستند و چنانچه قطر آن‌ها در این بازه قرار گیرد، شباهت بیشتری به عملکرد ماتریکس خارج سلولی طبیعی خواهند داشت. در نتیجه، این الیاف توانایی بالاتری برای برهم‌کنش مؤثر با سلول‌ها داشته و رشد سلولی بهتری را امکان‌پذیر می‌سازند (۲۵).

### ۳-۲- ارزیابی خواص مکانیکی پانسمان کامپوزیتی فیبروئین ابریشم-لیگنین

یکی از شرایط اساسی برای اطمینان از عملکرد مطلوب جایگزین‌های زیستی، تطابق ویژگی‌های مکانیکی آن‌ها با بافت هدف است. یک جایگزین پوستی مناسب باید علاوه بر دارا بودن ویژگی‌های زیستی مطلوب، از استحکام ساختاری و حمایت فیزیکی کافی برای رشد و تکثیر سلول‌ها برخوردار باشد (۲۶). عواملی مانند ویژگی‌های شیمیایی، میانگین قطر الیاف، مورفولوژی و یکنواختی الیاف تأثیر بسزایی بر خواص مکانیکی



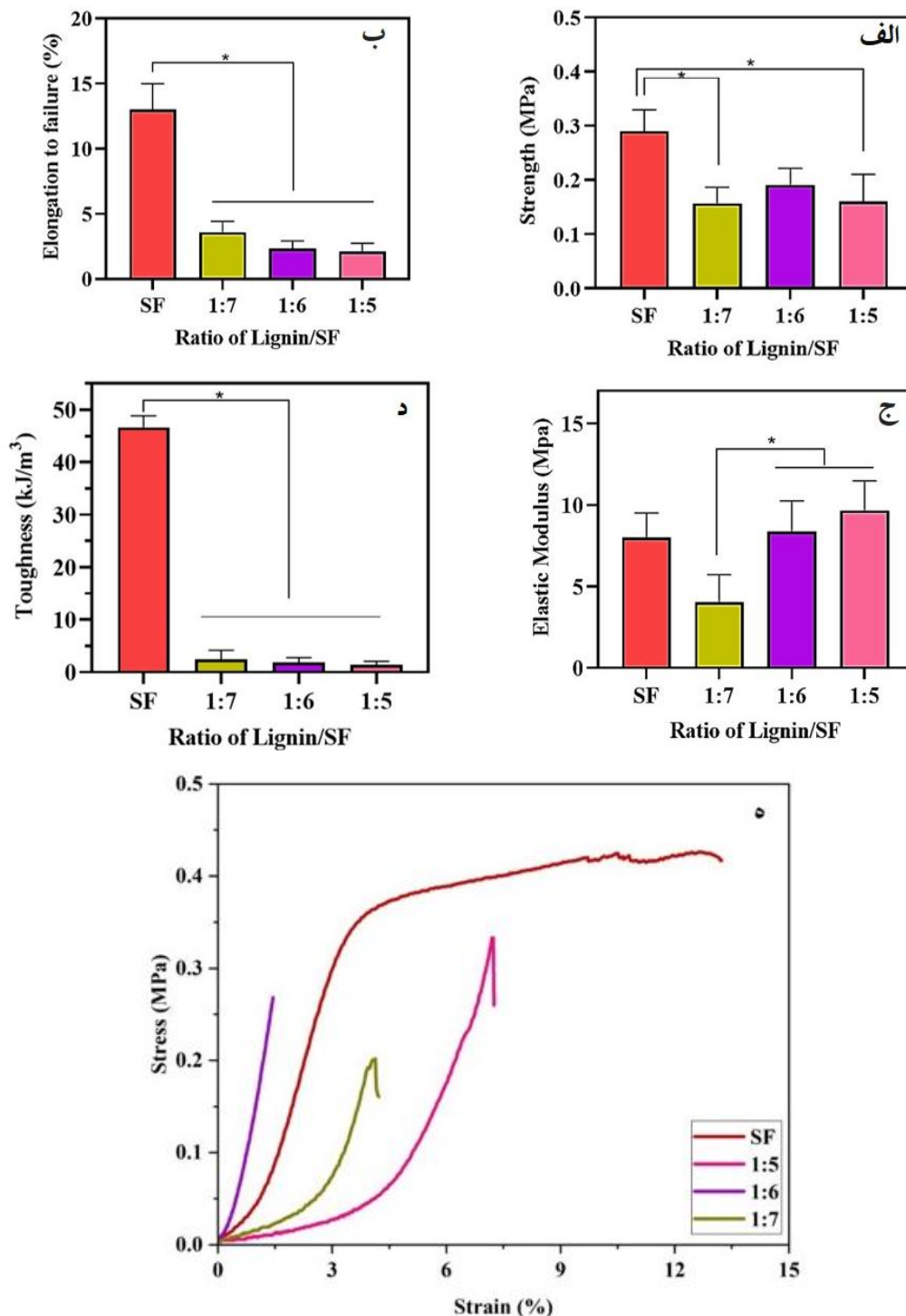
شکل ۱- تصاویر میکروسکوپی الکترونی روشی از نانوالیاف (الف) فیبروئین ابریشم خالص، (ب) فیبروئین ابریشم-لیگنین با نسبت ۱:۵، (ج) فیبروئین ابریشم-لیگنین با نسبت ۱:۶ و (د) فیبروئین ابریشم-لیگنین با نسبت ۱:۷ در ولتاژ کاری ۲۰ کیلوولت

جدول ۲- قطر متوسط الیاف ساخته شده در ولتاژ کاری ۲۰ کیلوولت

نام نمونه	قطر متوسط الیاف (نانومتر)
فیبروئین ابریشم خالص	$241 \pm 37$
فیبروئین ابریشم-لیگنین با نسبت ۱:۵	$309 \pm 11$
فیبروئین ابریشم-لیگنین با نسبت ۱:۶	$164 \pm 74$
فیبروئین ابریشم-لیگنین با نسبت ۱:۷	$181 \pm 58$

قابلیت ارتجاعی بالای فیبروئین ابریشم نسبت داد که امکان تغییر شکل بیشتری پیش از شکست فراهم می‌کند. درحالی‌که نانوالیاف کامپوزیتی فیبروئین ابریشم-لیگنین در نسبت‌های مختلف استحکام کششی، چقرمگی و ازدیاد طول تا نقطه شکست کمتری را از خود نشان دادند. این کاهش احتمالاً به دلیل ساختار آمورف لیگنین، توزیع نامناسب آن در ماتریس فیبروئین و تداخل در برهم‌کنش‌های بین‌مولکولی مؤثر در انتقال تنش می‌باشد.

این جایگزین‌ها دارند (۲۷). شکل (۲)، خواص مکانیکی را برای نمونه‌های فیبروئین ابریشم خالص و فیبروئین ابریشم-لیگنین در نسبت‌های مختلف نشان می‌دهد. باتوجه به نتایج، نانوالیاف فیبروئین ابریشم خالص با استحکام کششی  $0/11 \pm 0/29$  MPa، چقرمگی  $2/19 \pm 46/63$  kJ/m<sup>3</sup> و ازدیاد طول تا نقطه شکست  $13 \pm 2$  درصد، بالاترین خواص مکانیکی را نشان داد. این رفتار را می‌توان به ساختار منظم، پیوندهای بین زنجیره‌ای قوی و



شکل ۲- نتایج آزمون مکانیکی: (الف) استحکام کششی، (ب) ازدیاد طول در نقطه شکست، (ج) مدول یانگ، (د) چقرمگی و (ه) نمودار تنش-کرنش (\*\*: اختلاف معنی دار بین گروه‌ها) ( $P < 0/05$ ).

این کاهش بیانگر شکننده‌تر شدن ساختار نمونه‌ها در اثر حضور لیگنین و کاهش انعطاف‌پذیری کلی ماتریس است. همچنین،

چقرمگی نمونه‌ها که نشان‌دهنده توانایی جذب انرژی تا لحظه شکست است، با افزایش درصد لیگنین روندی کاهشی داشت.

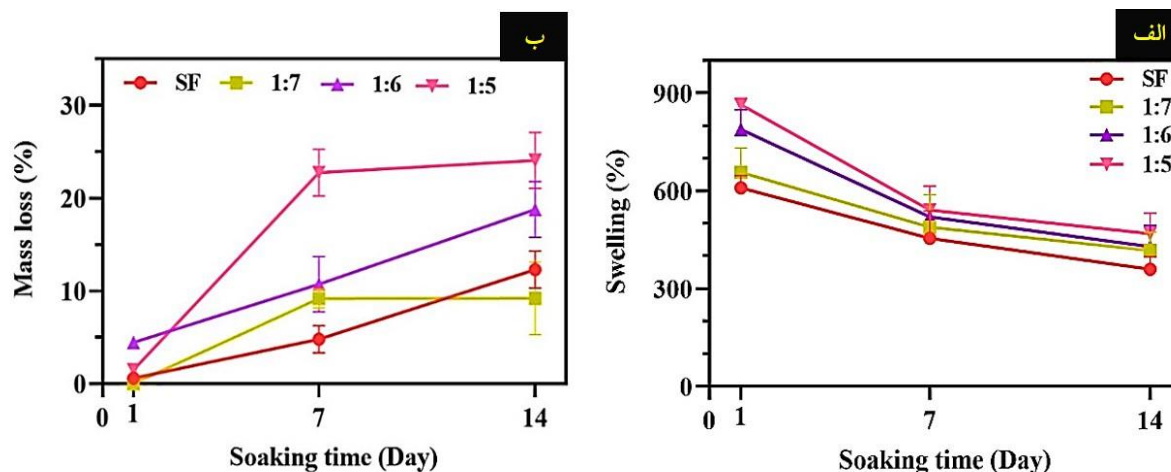
### ۳-۳- بررسی خواص فیزیکی پانسمان کامپوزیتی فیبروئین ابریشم-لیگنین

یکی از ویژگی‌های یک پانسمان ایده‌آل برای زخم، قابلیت جذب ترشحات اضافی آن است. به‌طور کلی، جذب آب نقش مهمی در حفظ رطوبت مناسب در محیط زخم ایفا می‌کند که این امر به تسریع فرآیند بهبود زخم و جلوگیری از تشکیل اسکار کمک می‌کند. علاوه بر این، تأثیر این عامل در جذب سلول‌ها و افزایش چسبندگی و تکثیر آن‌ها نیز به اثبات رسیده است (۳۰). همچنین از دیگر خصوصیات مهمی که در یک زخم‌پوش ایده‌آل باید ارزیابی شود، سرعت تخریب آن است. این ویژگی نقش مهمی در آزادسازی داروها، حفظ یکپارچگی و استحکام پانسمان و در نهایت، تسریع روند ترمیم زخم ایفا می‌کند (۲۷). برای بررسی جذب آب (درصد تورم) و میزان تخریب نمونه‌ها، غشاها در بازه زمانی ۱۴ روز درون محلول بافر فسفات در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. همان‌طور که در شکل (۳-الف) مشاهده می‌شود، میزان جذب آب تمامی نمونه‌ها روند یکسانی را نشان داده‌اند. در ابتدا (روز اول)، به دلیل افزایش گروه‌های آبدوست در ساختار لیگنین در غشاهای کامپوزیتی نسبت به فیبروئین ابریشم خالص، میزان جذب آب از  $37/40 \pm 609/35$  درصد (نمونه فیبروئین ابریشم خالص) به  $20/15 \pm 864/59$  درصد (نمونه با بیشترین میزان لیگنین، نسبت ۱:۵)، افزایش یافته است. اگرچه با افزایش مقدار لیگنین گروه‌های آبدوست در ساختار افزایش می‌یابد اما فرایند اتصال عرضی انجام‌شده روی غشاها، باعث تشکیل پیوند هیدروژنی و ساختار شبکه دوگانه متقابل کووالانسی می‌شود که منجر به متراکم‌تر شدن ساختار و افزایش چگالی اتصالات عرضی شده و مانع از افزایش بیشتر جذب آب و تورم می‌گردد (۳۱). اتصال عرضی، یکی از استراتژی‌های کلیدی برای بهبود خواص فیزیکی و شیمیایی مواد زیست‌پایه، به‌ویژه در سیستم‌های پلیمری مورد استفاده در مهندسی بافت و ترمیم زخم، به‌شمار می‌رود. در این میان، استفاده از اتانول به‌عنوان عامل القاکننده ساختارهای صفحات بتا<sup>۱۴</sup> در فیبروئین ابریشم، می‌تواند موجب بهبود چشمگیر خواص ساختاری و پایداری

کاهش انعطاف‌پذیری نمونه‌ها احتمالاً ناشی از برهم‌کنش ضعیف بین لیگنین و فیبروئین و ایجاد نقاط تمرکز تنش در محل حضور لیگنین می‌باشد. در میان تمامی نانوالیاف کامپوزیتی، نمونه با نسبت ۱:۶، بیشترین میزان استحکام کششی و برابر با  $0/08 \text{ MPa}$   $\pm 0/19$ ، نمونه ۱:۵ بالاترین مدول یانگ و برابر  $3/28 \text{ MPa}$   $\pm 9/66$  و نمونه ۱:۷ بیشترین ازدیاد طول تا نقطه شکست با  $0/84 \pm 3/6$  درصد نشان دادند. دان کای و همکاران (۲۸)، مشاهده کردند افزودن لیگنین به پلی (ال-لاکتیک اسید)<sup>۳</sup>، باعث کاهش استحکام کششی می‌شود به گونه‌ای که نانوالیاف PLLA با استحکام کششی  $0/20 \pm 3/49 \text{ MPa}$  در نمونه با بیشترین مقدار لیگنین به  $0/07 \pm 2/56 \text{ MPa}$  می‌رسد اما مدول یانگ را از  $1/6 \text{ MPa}$   $\pm 56/8$  به  $2/8 \text{ MPa}$   $\pm 66/8$  رساند. همچنین، افزودن لیگنین به PLLA، باعث کاهش ازدیاد طول در نقطه شکست نانوالیاف شد؛ بنابراین می‌توان نتیجه گرفت تغییر قطر الیاف و مورفولوژی ساختار داربست‌های کامپوزیتی می‌تواند منجر به تشکیل مراکز تنش و کاهش استحکام کششی نهایی و میزان کشیدگی در ساختار نسبت به نانوالیاف فیبروئین ابریشم خالص شود.

از طرف دیگر، نتایج مطالعات بر روی پانسمان‌های ایده‌آل پوستی به منظور ترمیم زخم‌های مزمنی مانند زخم‌های دیابتی نشان می‌دهد که استحکام کششی بالای ۵۰ کیلوپاسکال، مدول یانگ بیشتر از ۶۰ کیلوپاسکال و میزان کشیدگی بیشتر از ۵ درصد برای بهبود ترمیم این گونه زخم‌ها مناسب است (۲۹).

در مجموع، می‌توان نتیجه گرفت که اگرچه افزودن لیگنین سبب کاهش کلی خواص مکانیکی به‌ویژه در استحکام و چقرمگی می‌شود، اما در نسبت ۱:۶، مدول یانگ قابل توجهی حاصل شده است که نشان‌دهنده مقاومت مناسب در برابر تغییر شکل الاستیک اولیه است؛ بنابراین، این نسبت می‌تواند گزینه مناسبی برای کاربردهایی باشد که پایداری ساختاری اولیه اهمیت دارد، مشروط بر آنکه خواص زیستی نیز در سطح مطلوب حفظ شوند.



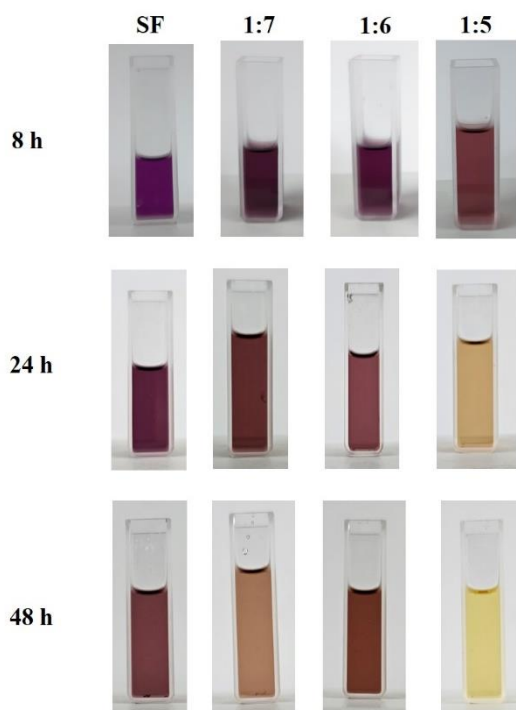
شکل ۳- (الف) بررسی میزان جذب آب و (ب) بررسی میزان تخریب نمونه‌ها در بازه زمانی ۱۴ روز.

درصد رسیده و در نمونه غشا کامپوزیتی فیبروئین ابریشم-لیگنین (بیشترین میزان لیگنین، نسبت ۱:۵) به  $۶۳/۴۷ \pm ۴۶۸/۳۷$  درصد می‌رسد. براساس مطالعات شیعه و همکارانش (۳۲)، تورم بالای ۱۰۰ درصد مقدار جذب آب برای یک پانسمان پوستی جهت ترمیم زخم‌های مزمن ایده‌آل بوده و میزان جذب آب به وسیله غشا لیفی فیبروئین ابریشم-لیگنین در محدوده مناسبی برای ترمیم زخم قرار گرفته‌اند.

در پلیمرهای نیمه‌بلوری مانند فیبروئین ابریشم، پس از غوطه‌وری در محلول‌های آبی، ابتدا آب به ناحیه آمورف پلیمر نفوذ کرده و این امر، منجر به گسست تصادفی زنجیره‌های پلیمری از طریق هیدرولیز می‌شود. در این مرحله، کاهش وزنی قابل توجهی در پلیمر مشاهده نمی‌شود. با گذر زمان و افزایش مدت غوطه‌وری، فرآیند هیدرولیز به سمت ناحیه بلوری پیش می‌رود، درحالی‌که زنجیره‌های موجود در ناحیه آمورف تحت هیدرولیز، به قطعات کوچک‌تری تجزیه می‌شوند که از ساختار خارج می‌شوند. در این مرحله، کاهش وزن به‌صورت جزئی رخ می‌دهد (۳۳). همان‌طور که در شکل (۳-ب) مشاهده می‌شود، میزان تخریب نمونه فیبروئین ابریشم خالص پس از ۱۴ روز به  $۱۲/۲۹ \pm ۳$  درصد و در نمونه فیبروئین ابریشم-لیگنین با نسبت ۱:۵ به  $۲۴/۰۴ \pm ۳$  درصد رسید که می‌تواند به‌علت افزایش گروه‌های آلدوست در غشاهای کامپوزیتی باشد اما به‌علت

شبكة غشای لیفی شود. اتانول از طریق دهیدراته‌سازی انتخابی و تأثیر بر برهم‌کنش‌های بین‌مولکولی، باعث افزایش ساختارهای بلورین صفحات بتا در فیبروئین شده و در نتیجه، به‌صورت غیرمستقیم موجب ایجاد اتصالات عرضی فیزیکی در ماتریس الیاف می‌شود.

از منظر ویژگی‌های جذب آب، افزایش میزان اتصال عرضی ناشی از تیمار با اتانول، منجر به کاهش قابلیت تورم غشا می‌گردد. علت این امر، کاهش تعداد گروه‌های عاملی آزاد (مانند گروه‌های آمینی و هیدروکسیل) و کاهش فضای آزاد درون‌ساختاری برای جذب مولکول‌های آب است. به بیان دیگر، افزایش نظم ساختاری در نتیجه اتصال عرضی، مانع از نفوذ آزادانه آب به درون ماتریس پلیمری شده و میزان تورم غشا را محدود می‌کند. از سوی دیگر، اتصال عرضی همچنین مقاومت غشا در برابر تخریب زیستی را بهبود می‌بخشد. تشکیل ساختارهای صفحات بتا و فشرده‌شدن شبکه پلیمری، تجزیه‌پذیری غشا توسط آنزیم‌های پروتئولیتیک یا شرایط محیطی را کاهش می‌دهد. این ویژگی در کاربردهای زخم‌پوش، به‌ویژه در درمان زخم‌های مزمن نظیر زخم دیابتی، حائز اهمیت است؛ زیرا پایداری کنترل‌شده غشا می‌تواند حضور طولانی‌تر زخم‌پوش را بدون تخریب ناخواسته در محل زخم تضمین نماید (۳۱). اما با این وجود، میزان جذب آب در نمونه فیبروئین ابریشم خالص پس از ۱۴ روز به  $۳۷/۵۳ \pm ۳۵۹/۹۹$



شکل ۴- تغییر رنگ محلول ۱،۱-دی فنیل-۲-پیکریل هیدرازیل در معرض غشاهای لیفی فیبروئین ابریشم خالص و غشا کامپوزیتی فیبروئین ابریشم-لیگنین با نسبت‌های مختلف در فواصل زمانی ۲۴، ۴۸ و ۸ ساعت.

دارای تعداد زیادی گروه‌های عاملی هیدروکسیل و متوکسی می‌باشد که این گروه‌ها می‌توانند از طریق انتقال هیدروژن، به منظور توقف واکنش زنجیره‌ای اکسیداسیون کمک کنند (۳۴). این گروه‌های فنولی، به عنوان مراکز فعال در واکنش‌های آنتی‌اکسیدانی شناخته شده‌اند و پتانسیل لیگنین در مهار رادیکال‌های آزاد را افزایش می‌دهند؛ بنابراین، با افزایش نسبت لیگنین به فیبروئین ابریشم در نمونه‌ها (از ۱:۷ به ۱:۵)، درصد مهار رادیکال DPPH به طور قابل توجهی افزایش یافت.

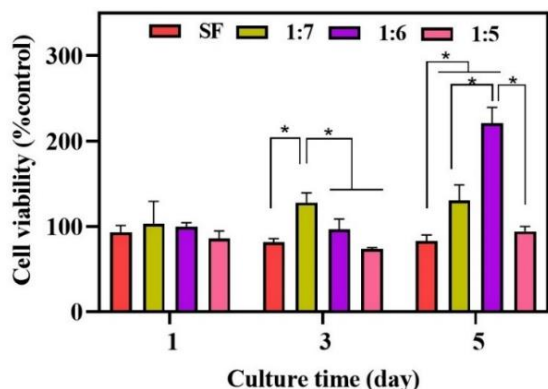
برای ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی غشاهای لیفی، تغییرات رنگ محلول ۱،۱-دی فنیل-۲-پیکریل هیدرازیل در معرض نمونه‌های غشای لیفی فیبروئین ابریشم خالص و غشای لیفی کامپوزیتی فیبروئین ابریشم-لیگنین با نسبت‌های مختلف در فواصل زمانی ۲۴، ۴۸ و ۸ ساعت مشاهده شد. همان‌طور که در شکل (۴) نشان داده شده است، رنگ محلول ۱،۱-دی فنیل-۲-پیکریل هیدرازیل در

اتصالات عرضی موجود در ساختار مانع از تخریب ناگهانی و سریع می‌شود؛ بنابراین با افزایش لیگنین و اتصال عرضی می‌توان منجر به کاهش سرعت تخریب و بهبود پایداری فیزیولوژیکی غشاها شد.

### ۳-۴- بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی غشا لیفی

تنش اکسیداتیو نقش بسیار مخربی در روند بهبود زخم دارد. گونه‌های فعال اکسیژن مانند هیدروژن پراکسید ( $H_2O_2$ )، سوپراکسید ( $O_2^-$ )، رادیکال هیدروکسیل ( $OH^\cdot$ ) و اکسیژن تک‌مولکولی<sup>۱۵</sup> ( $^1O_2$ ) علاوه بر اینکه اکسیدان‌های قوی به شمار می‌روند، به عنوان مولکول‌های کلیدی تنظیم‌کننده فرآیند ترمیم زخم نیز عمل می‌کنند. این گونه‌ها، در فرآیندهای سلولی طبیعی و بازسازی بافت‌ها حضور دارند، اما تولید بیش از حد آن‌ها می‌تواند به سلول‌ها آسیب وارد کرده، روند بازسازی بافت را مختل سازد و به تأخیر در بهبود زخم منجر شود؛ بنابراین، حفظ تعادل دقیق بین این مولکول‌ها برای ایجاد محیطی مناسب جهت ترمیم بهینه زخم حیاتی است.

آنتی‌اکسیدان‌ها، گروهی از عوامل کاهنده هستند که قادر به خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد می‌باشند و از طریق اهدای الکترون، واکنش زنجیره‌ای اکسیداسیون را متوقف می‌کنند. سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی، با خنثی‌سازی اثرات مخرب گونه‌های فعال اکسیژن<sup>۱۶</sup> مقابله می‌کند. این گونه‌ها شامل گروهی از ترکیبات اکسیژن‌دار و مواد فعال هستند که در نتیجه تجمع رادیکال‌های آزاد و پراکسیدها تولید می‌شوند. فنول‌ها و پلی فنول‌ها، به عنوان عوامل بالقوه خنثی‌کننده رادیکال‌های آزاد عمل می‌کنند و با به دام انداختن و خنثی‌سازی این رادیکال‌ها، به حذف آن کمک کرده و در نتیجه موجب بهبود روند بیماری‌های انسانی می‌شوند. مطالعات متعددی فعالیت آنتی‌اکسیدانی برجسته لیگنین را مورد تایید قرار داده‌اند. ترکیب ۱،۱-دی فنیل-۲-پیکریل هیدرازیل (DPPH)، به طور گسترده به عنوان یک رادیکال آزاد استاندارد برای ارزیابی توانایی آنتی‌اکسیدانی لیگنین مورد استفاده قرار گرفته است. لیگنین، یک ترکیب آروماتیک است که

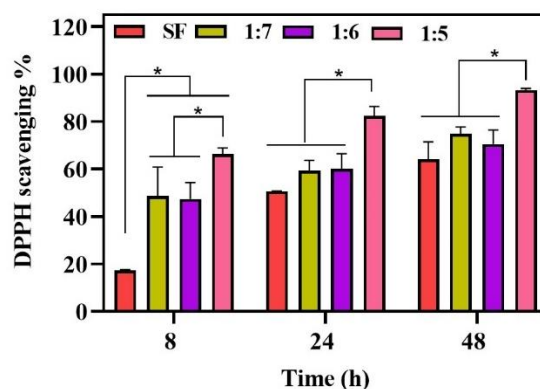


شکل ۶- زنده‌مانی سلول‌های فیروبلاست در تماس با غشاهای لیفی فیروئین ابریشم خالص و فیروئین ابریشم-لیگنین در نسبت‌های مختلف (\*\*: اختلاف معنی دار بین گروه‌ها) ( $P < 0/05$ ).

با افزایش زمان کشت افزایش یافته است. بیشترین میزان زنده‌مانی سلول برای غشا لیفی فیروئین ابریشم-لیگنین با نسبت ۱:۶ در روز پنجم و به  $18/26 \pm 221/06$  درصد می‌رسد. این میزان بالای رشد سلولی، نشان‌دهنده ویژگی‌های زیست‌سازگاری فوق‌العاده این ترکیب است و می‌تواند به عوامل متعددی نسبت داده شود، از جمله رهایش مداوم آنتی‌اکسیدان‌ها، مورفولوژی سطح مناسب و ایجاد تعادل بین خواص مکانیکی، ساختار فیبری و ترکیبات فعال زیستی. میزان بقای سلول‌های فیروبلاست در طول مدت کشت بیش از ۸۰ درصد در تمامی نمونه‌ها است. این نتیجه تأیید می‌کند که این غشاهای کامپوزیتی از سازگاری بالایی برخوردار هستند (۳۵). مطالعات نشان می‌دهد، افزودن لیگنین به غشاهای لیفی منجر به افزایش زنده‌مانی سلولی می‌شود که پژوهش‌های بیشتر را در کاربردهای زیست‌پزشکی تضمین می‌کند (۳۶).

### ۳-۶- بررسی چسبندگی سلولی

چسبندگی سلول‌ها می‌تواند موجب افزایش تکثیر و تمایز آن‌ها شود. در این مطالعه، اتصال و چسبندگی سلول‌ها بر سطح نانوالیاف فیروئین ابریشم و نانوالیاف کامپوزیتی فیروئین ابریشم-لیگنین با نسبت‌های مختلف، پس از ۱ و ۷ روز انکوباسیون سلول‌های L929، با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی مورد بررسی قرار گرفت. مطابق شکل (۷)، پس

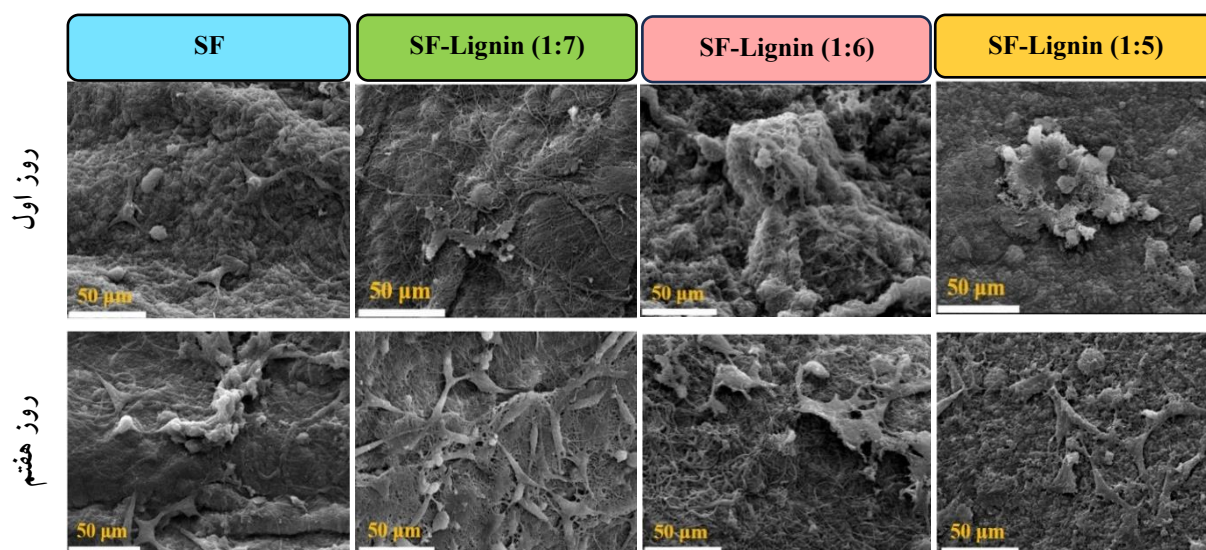


شکل ۵- فعالیت غشاهای لیفی فیروئین ابریشم خالص و غشا کامپوزیتی فیروئین ابریشم-لیگنین با نسبت‌های مختلف در مهار رادیکال‌های ۱،۱-دی‌فنیل-۲-پیکریل‌هیدرازیل در فواصل زمانی ۸، ۲۴ و ۴۸ ساعت (\*\*: اختلاف معنی دار بین گروه‌ها) ( $P < 0/05$ ).

تماس با غشاهای لیفی فیروئین ابریشم-لیگنین از بنفش تیره به زرد روشن تغییر می‌کند. غشا لیفی فیروئین ابریشم-لیگنین با نسبت ۱:۵ در مقایسه با غشا لیفی فیروئین ابریشم خالص، قابلیت آنتی‌اکسیدانی قوی را نسبت به سایر نمونه‌ها به میزان  $0/69 \pm 93/27$  درصد نشان داد که به علت حضور لیگنین می‌باشد (شکل ۵). این عدد نشان‌دهنده عملکرد بسیار بالا و مداوم لیگنین در آزادسازی ترکیبات فعال آنتی‌اکسیدانی طی زمان است. افزون‌براین، روند افزایشی مهار رادیکال DPPH در گذر زمان، نشان می‌دهد که ترکیبات فعال لیگنین به صورت کنترل‌شده و تدریجی از ماتریس نانوالیاف آزاد می‌شوند که این ویژگی برای کاربردهای درمانی مانند پانسمان زخم‌های دیابتی که نیازمند محافظت طولانی‌مدت در برابر استرس اکسیداتیو هستند، بسیار مهم و حیاتی است.

### ۳-۵- بررسی زنده‌مانی، رشد و تکثیر سلولی

برای ارزیابی فعالیت متابولیکی سلول‌های رشدیافته بر سطح غشاهای کامپوزیتی فیروئین ابریشم-لیگنین با نسبت‌های مختلف، نتایج این آزمون پس از ۱، ۳ و ۵ روز در شکل (۶) ارائه شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، فعالیت متابولیکی سلول‌ها بر سطح غشاهایی که حاوی نسبت‌های متفاوتی از لیگنین هستند، به تدریج



شکل ۷- تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی سلول‌های کشته‌شده روی سطح نانوالیاف فیبروئین ابریشم خالص و نانوالیاف کامپوزیتی فیبروئین ابریشم-لیگنین در نسبت‌های مختلف.

از ۲۴ ساعت کشت، سلول‌هایی با مورفولوژی کروی روی نمونه‌ها مشاهده شدند. علاوه بر این، پس از هفت روز، سلول‌ها به خوبی در سطح نانوالیاف پخش شده و به آن‌ها چسبیده بودند. همچنین، سلول‌ها توانستند به درون منافذ مهاجرت کرده و برجستگی‌های سلولی (پای کاذب) خود را روی سطح نانوالیاف گسترش دهند. این پدیده احتمالاً به دلیل افزایش سختی نانوالیاف کامپوزیتی رخ داده است؛ زیرا ویژگی‌های توپوگرافی سطح می‌تواند موجب افزایش چسبندگی سلولی شوند (۳۷). میزان گسترش سلول‌ها در نانوالیاف کامپوزیتی در مقایسه با نانوالیاف فیبروئین ابریشم خالص بیشتر بوده که نشان‌دهنده برتری این ساختارها در القای تمایز و گسترش سلولی نسبت به نانوالیاف فیبروئین ابریشم خالص است.

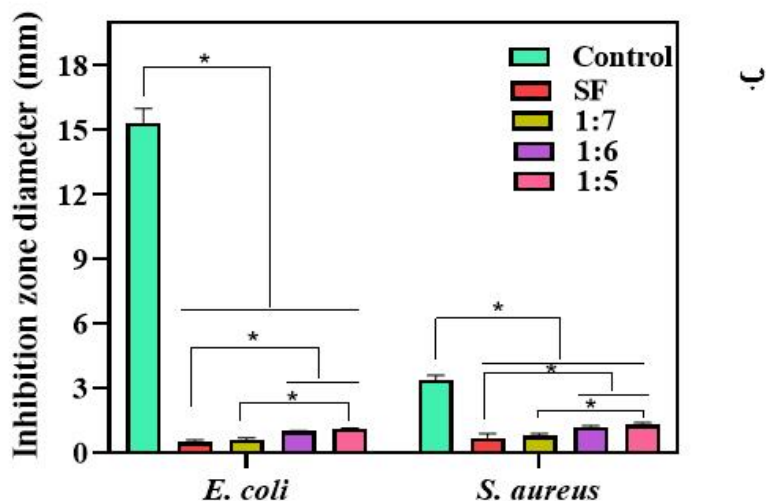
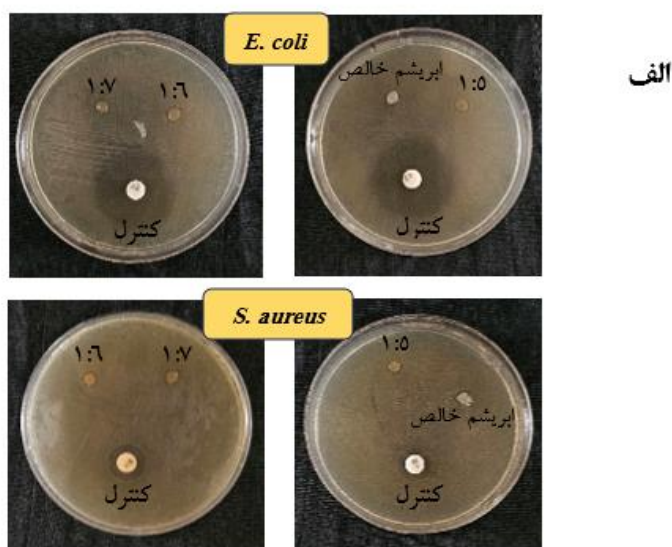
حضور گروه‌های فنولی هیدروکسیل و متوکسی افزایش می‌یابد (۳۸). مطابق شکل (۸-ب)، میانگین قطر هاله عدم رشد نمونه‌های فیبروئین ابریشم خالص، فیبروئین ابریشم-لیگنین با نسبت ۱:۷، فیبروئین ابریشم-لیگنین با نسبت ۱:۶ و فیبروئین ابریشم-لیگنین با نسبت ۱:۵ در برابر باکتری *اشریشیا کلای*، به ترتیب برابر با  $0.1 \pm 0.5$ ،  $0.1 \pm 0.6$  و  $0 \pm 0.1$  میلی‌متر است. همچنین، قطر هاله عدم رشد نمونه‌ها در برابر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*، به ترتیب برابر با  $0.2 \pm 0.7$ ،  $0.1 \pm 0.8$  و  $0.1 \pm 0.3$  میلی‌متر اندازه‌گیری شد. قابل ذکر است که به دلیل ساختار پوشش سلولی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*، تمامی نمونه‌ها فعالیت ضدباکتریایی بالاتری در برابر این باکتری نسبت به *اشریشیا کلای* نشان دادند.

#### ۴- نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر، پانسمان نوین فیبروئین ابریشم-لیگنین با نسبت‌های مختلف به روش الکترونیسی ساخته شد. پانسمان ساخته‌شده، دارای الیاف یکنواخت و مناسبی بوده و علی‌رغم وجود تخلخل، سطح مناسبی را برای رشد و تکثیر سلول‌های پوستی فراهم می‌نماید. بررسی خواص فیزیکی، کنترل تخریب

#### ۳-۷- بررسی خواص ضدباکتریایی

فعالیت ضد باکتریایی نمونه‌ها، با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد باکتری برای هر دو باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (گرم مثبت) و *اشریشیا کلای* (گرم منفی)، با استفاده از روش انتشار در پلیت‌های آگار ارزیابی شده است. با توجه به شکل (۸-الف)، با افزایش لیگنین در نانوالیاف کامپوزیتی اثرات ضدباکتریایی به‌علت



شکل ۸- فعالیت ضدباکتریایی نانوالیاف فیروئین ابریشم خالص و نانوالیاف کامپوزیتی فیروئین ابریشم-لیگنین در حضور باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و اشیریشیا کلای: (الف) تصاویر پلیت‌های کشت، (ب) نتایج حاصل از اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد (\*\*: اختلاف معنی دار بین گروه‌ها) ( $P < 0/05$ ).

موجب بهبود روند بیماری‌های انسانی شوند. همچنین، بررسی آزمون سلولی نشان می‌دهد میزان زنده‌مانی سلولی بر سطح غشاها با افزودن لیگنین، حاکی از عدم آسیب به سلول‌ها در پانسما ساخته‌شده بوده و علاوه بر این، سلول‌ها به خوبی در سطح نانوالیاف پخش شده و به آن‌ها چسبیده بودند. همچنین، سلول‌ها توانستند به درون منافذ مهاجرت کرده و برجستگی‌های سلولی

پلیمرها و پایداری مناسب، غشایی ساخته‌شده را کاندید مناسبی جهت درمان زخم‌های مزمن قرار می‌دهد. نتایج فعالیت آنتی‌اکسیدان نشان داد که با افزایش مقدار لیگنین در ساختار و به دنبال آن افزایش گروه‌های فنولی و هیدروکسیل، می‌تواند به عنوان عوامل بالقوه خنثی‌کننده رادیکال‌های آزاد عمل کنند و با خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد، به حذف آن کمک کرده و در نتیجه

## تشکر و سپاسگزاری

از دانشگاه صنعتی اصفهان بابت انجام این تحقیق سپاسگزاری می‌گردد.

## تضاد منافع

نویسندگان مقاله اذعان دارند هیچ نوع تضاد منافی با شخص، شرکت یا سازمانی برای این پژوهش ندارند.

## سهم نویسندگان

امیرحسین محمدی فرد: جمع آوری داده‌ها، تحلیل و تفسیر داده‌ها، نوشتن مقاله، مدیریت منابع. مهشید خرازیها: طراحی و ایده پردازی مطالعه، راهنمایی پروژه، اعتبار سنجی نتایج. مسعود عطاپور: راهنمایی پروژه، اعتبار سنجی نتایج.

خود را روی سطح نانوالیاف گسترش دهند. از آنجایی که فعالیت ضدباکتریایی نمونه‌ها در زخم‌های مزمن از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است، با افزایش لیگنین و به‌همراه آن افزایش گروه‌های فنولی هیدروکسیل و متوکسی، نانوالیاف لیفی پاسخ مناسبی در برابر باکتری‌ها نشان دادند. براساس نتایج به‌دست‌آمده، ترکیب ۱:۶ لیگنین به فیبروئین ابریشم به‌عنوان نمونه بهینه انتخاب شد؛ چراکه مطابق با نتایج گزارش‌شده برای یک پانسمان ایده‌آل پوستی، در اغلب آزمون‌های زیستی و فیزیکی (قطر لیاف، خواص مکانیکی، میزان جذب آب و سازگاری سلولی)، عملکرد مطلوبی ارائه داد که می‌تواند گزینه ایده‌آلی جهت کاربرد در درمان زخم‌های دیابتی باشد.

## واژه‌نامه

1. diabetes mellitus
2. diabetic foot ulcer
3. silk fibroin (SF)
4. extra cellular matrix (ECM)
5. lignin (Li)
6. formic acid
7. scanning electron microscope (SEM)
8. phosphate buffer solution (PBS)
9. 1,1-diphenyl- 2-picrylhydrazyl (DPPH)
10. formazan
11. *Staphylococcus aureus*
12. *Escherichia coli*
13. poly (L-lactic acid) (PLLA)
14.  $\beta$ -sheet
15. singlet oxygen
16. reactive oxygen species (ROS)

## مراجع

1. Limbert G. Skin biophysics: from experimental characterisation to advanced modelling. Vol. 22. Springer; 2019.
2. Mirhaj M, Tavakoli M, Varshosaz J, Labbaf S, Jafarpour F, Ahmaditabar P, et al. Platelet rich fibrin containing nanofibrous dressing for wound healing application: Fabrication, characterization and biological evaluations. *Biomater Adv.* 2022;134:112541. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112541>
3. Metcalfe AD, Ferguson MWJ. Bioengineering skin using mechanisms of regeneration and repair. *Biomaterials.* 2007;28(34):5100–13. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.07.031>
4. Shah SA, Sohail M, Khan S, Minhas MU, De Matas M, Sikstone V, et al. Biopolymer-based biomaterials for accelerated diabetic wound healing: A critical review. *Int J Biol Macromol.* 2019;139:975–93. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.007>
5. Burgess JL, Wyant WA, Abdo Abujamra B, Kirsner RS, Jozic I. Diabetic wound-healing science. *Medicina (B Aires).* 2021;57(10):1072.
6. Arif MM, Khan SM, Gull N, Tabish TA, Zia S, Khan RU, et al. Polymer-based biomaterials for chronic wound management: Promises and challenges. *Int J Pharm.* 2021;598:120270. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120270>
7. Xing X, Han Y, Cheng H. Biomedical applications of chitosan/silk fibroin composites: A review. *Int J Biol Macromol.* 2023;124407. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124407>
8. Zhu L, Lin J, Pei L, Luo Y, Li D, Huang Z. Recent advances in environmentally friendly and green degumming processes of silk for textile and non-textile applications. *Polymers (Basel).* 2022;14(4):659.
9. Bae S Bin, Kim MH, Park WH. Electrospinning and

- dual crosslinking of water-soluble silk fibroin modified with glycidyl methacrylate. *Polym Degrad Stab.* 2020;179:109304.  
<https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2020.109304>
10. Sultan MT, Lee OJ, Kim SH, Ju HW, Park CH. Silk fibroin in wound healing process. *Nov Biomater Regen Med.* 2018;115–26.  
[https://doi.org/10.1007/978-981-13-0947-2\\_7](https://doi.org/10.1007/978-981-13-0947-2_7)
  11. Selvaraj S, Inbasekar C, Pandurangan S, Nishter NF. Collagen-coated silk fibroin nanofibers with antioxidants for enhanced wound healing. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2023;34(1):35–52.  
<https://doi.org/10.1080/09205063.2022.2106707>
  12. Nan N, Hu W, Wang J. Lignin-Based Porous Biomaterials for Medical and Pharmaceutical Applications. Vol. 10, *Biomedicines.* 2022.
  13. Lee E-S, Kim Y-O, Ha Y-M, Lim D, Hwang JY, Kim J, et al. Antimicrobial properties of lignin-decorated thin multi-walled carbon nanotubes in poly (vinyl alcohol) nanocomposites. *Eur Polym J.* 2018;105:79–84. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2018.05.014>
  14. Reesi F, Minaiyan M, Taheri A. A novel lignin-based nanofibrous dressing containing arginine for wound-healing applications. *Drug Deliv Transl Res.* 2018;8: 111–22. <https://doi.org/10.1007/s13346-017-0441-0>
  15. Dai M, Zhang J, Liu N, Zhang X-H. Precise engineering of lignin incorporated dextran/glycol nanomaterials for wound dressings for the care of anorectal surgery. *J Polym Environ.* 2022;30(1):206–16. <https://doi.org/10.1007/s10924-021-02175-6>
  16. Rockwood DN, Preda RC, Yücel T, Wang X, Lovett ML, Kaplan DL. Materials fabrication from Bombyx mori silk fibroin. *Nat Protoc.* 2011;6(10):1612–31. <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.379>
  17. Atrian M, Kharaziha M, Emadi R, Alihosseini F. Silk-Laponite® fibrous membranes for bone tissue engineering. *Appl Clay Sci.* 2019;174:90–9. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2019.03.038>
  18. Cintra ILR, Rezende MC, Guerrini LM, Nahra LR, Lucas RR, Montagna LS, et al. Electrospinning of PAN/lignin blends aiming the production of carbon nanofibers. *MRS Commun.* 2024;14(1):82–9. <https://doi.org/10.1557/s43579-023-00504-5>
  19. Amiraliyan N, Nouri M, Haghighat Kish M. Structural characterization and mechanical properties of electrospun silk fibroin nanofiber mats. *Polym Sci Ser A.* 2010;52:407–12.  
<https://doi.org/10.1134/S0965545X10040097>
  20. Khosravi Z, Kharaziha M, Goli R, Karimzadeh F. Antibacterial adhesive based on oxidized tannic acid-chitosan for rapid hemostasis. *Carbohydr Polym.* 2024;333:121973.  
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2024.121973>
  21. Liu Y, Li T, Sun M, Cheng Z, Jia W, Jiao K, et al. ZIF-8 modified multifunctional injectable photopolymerizable GelMA hydrogel for the treatment of periodontitis. *Acta Biomater.* 2022;146:37–48.  
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2022.03.046>
  22. Um IC, Kweon H, 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.  
[https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(01\)00159-3](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(01)00159-3)
  23. Hohman MM, Shin M, Rutledge G, Brenner MP. Electrospinning and electrically forced jets. I. Stability theory. *Phys fluids.* 2001;13(8):2201–20.  
<https://doi.org/10.1063/1.1383791>
  24. Beachley V, Wen X. Effect of electrospinning parameters on the nanofiber diameter and length. *Mater Sci Eng C.* 2009;29(3):663–8.
  25. Sell S, Barnes C, Smith M, McClure M, Madurantakam P, Grant J, et al. Extracellular matrix regenerated: tissue engineering via electrospun biomimetic nanofibers. *Polym Int.* 2007;56(11):1349–60.
  26. Figueira DR, Miguel SP, de Sa KD, Correia IJ. Production and characterization of polycaprolactone-hyaluronic acid/chitosan-zein electrospun bilayer nanofibrous membrane for tissue regeneration. *Int J Biol Macromol.* 2016;93:1100–10.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.09.080>
  27. Salehi M, Niyakan M, Ehterami A, Haghi-Daredeh S, Nazarnezhad S, Abbaszadeh-Goudarzi G, et al. Porous electrospun poly ( $\epsilon$ -caprolactone)/gelatin nanofibrous mat containing cinnamon for wound healing application: In vitro and in vivo study. *Biomed Eng Lett.* 2020;10:149–61.  
<https://doi.org/10.1007/s13534-019-00138-4>
  28. Kai D, Ren W, Tian L, Chee PL, Liu Y, Ramakrishna S, et al. Engineering poly (lactide)–lignin nanofibers with antioxidant activity for biomedical application. *ACS Sustain Chem Eng.* 2016;4(10):5268–76.  
<https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b00478>
  29. Jin X, Jiang H, Li G, Fu B, Bao X, Wang Z, et al. Stretchable, conductive PAni-PAAm-GOCS hydrogels with excellent mechanical strength, strain sensitivity and skin affinity. *Chem Eng J.* 2020;394:124901.
  30. Elsayed RE, Madkour TM, Azzam RA. Tailored-design of electrospun nanofiber cellulose acetate/poly (lactic acid) dressing mats loaded with a newly synthesized sulfonamide analog exhibiting superior wound healing. *Int J Biol Macromol.* 2020;164:1984–99. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.316>
  31. Meng D, Zhao Q, Cheng X, Ma J, Kong L, He X, et al. Water-induced shape memory cellulose nanofiber-based nanocomposite membrane containing lignin with quick water response and excellent wet mechanical property. *Eur Polym J.* 2022;171:111204.  
<https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2022.111204>
  32. Karizmeh MS, Poursamar SA, Kefayat A, Farahbakhsh Z, Rafienia M. An in vitro and in vivo study of PCL/chitosan electrospun mat on polyurethane/propolis foam as a bilayer wound dressing. *Biomater Adv.* 2022;135:112667.
  33. Rehman IU, Khan AS. Dental regeneration. In:

- Electrospinning for Tissue Regeneration. Elsevier; 2011. p. 280–97.  
<https://doi.org/10.1533/9780857092915.2.280>
34. Liu Y, Wang X, Wu Q, Pei W, Teo MJ, Chen ZS, et al. Application of lignin and lignin-based composites in different tissue engineering fields. *Int J Biol Macromol.* 2022;222:994–1006.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.09.267>
35. Melo NFS de, Campos EVR, Franz-Montan M, Paula E de, Silva CMG da, Maruyama CR, et al. Characterization of articaine-loaded poly ( $\epsilon$ -caprolactone) nanocapsules and solid lipid nanoparticles in hydrogels for topical formulations. *J Nanosci Nanotechnol.* 2018;18(6):4428–38.
36. Liang R, Zhao J, Li B, Cai P, Loh XJ, Xu C, et al. Implantable and degradable antioxidant poly ( $\epsilon$ -caprolactone)-lignin nanofiber membrane for effective osteoarthritis treatment. *Biomaterials.* 2020;230:119601.  
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119601>
37. Zarei Z, Kharaziha M, Karimzadeh F, Khadem E. Synthesis and biological applications of nanocomposite hydrogels based on the methacrylation of hydroxypropyl methylcellulose and lignin loaded with alpha-pinene. *Carbohydr Polym.* 2024;346:122642.  
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2024.122642>
38. Shu F, Jiang B, Yuan Y, Li M, Wu W, Jin Y, et al. Biological activities and emerging roles of lignin and lignin-based products—A review. *Biomacromolecules.* 2021;22(12):4905–18.