



مقاله کامل پژوهشی

ساخت و بررسی خواص داربست فیبروئین ابریشم حاوی نانوذرات کیتوسان بارگذاری شده با آسکوربیک اسید به منظور کاربرد در بازسازی استخوان

پگاه سنجرنیا^۱، ژامک نورمحمدی^{۲*}، علی حسین رضایان^۲، مهرناز مؤدب^۱

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران

^۲ دانشیار، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخچه مقاله:

ثبت اولیه: ۱۳۹۹/۱۱/۲۱

دریافت نسخه اصلاح شده: ۱۴۰۰/۰۲/۱۱

پذیرش علمی: ۱۴۰۰/۰۲/۱۶

انتشار: ۱۴۰۰/۱۱/۰۴

کلیدواژه ها:

آسکوربیک اسید،

داربست استخوانی،

فیبروئین ابریشم،

نانوذرات کیتوسان

چکیده هدف از این پژوهش، ساخت و بررسی خواص داربست فیبروئینی حاوی نانوذرات کیتوسان بارگذاری شده با آسکوربیک اسید بود. برای این منظور، نانوذرات آسکوربیک اسید-کیتوسان به روش ژل شدن یونی ساخته شدند. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) و نتایج پراکندگی نور دینامیکی (DLS) نشان دادند که نانوذرات کروی شکل دارای ذراتی با اندازه میانگین ۲۰۰ نانومتر هستند. سپس، مقادیر مختلفی از نانوذرات در داخل محلول فیبروئین ابریشم قرار گرفت و داربست های موردنظر به روش خشکایش انجمادی تهیه شدند. تأثیر غلظت های مختلف نانوذرات بر ویژگی های ریخت شناسی، تغییرات ساختاری، جذب آب، رهایش دارو، سمیت، چسبندگی و فعالیت آلكالین فسفاتاز سلول های استئوسارکومای رده MG63، مطالعه و بررسی شد. نتایج به دست آمده از طیف سنجی تبدیل فوریه فروسرخ (FTIR)، وجود نانوذرات در داربست را تأیید کرد. بررسی ریخت شناسی سطح مقطع داربست ها نشان داد که همه داربست ها دارای ساختاری متخلخل با حفره های به هم متصل هستند. افزایش نانوذرات سبب کاهش اندازه قطر حفره ها و درصد تخلخل شد. رهایش آسکوربیک اسید در همه نمونه ها، با رهایش انفجاری در ۲۴ ساعت اولیه، شروع شد و سپس به صورت کنترل شده تا ۱۴ روز ادامه یافت. مقدار رهایش آسکوربیک اسید با افزایش درصد نانو ذرات در داربست افزایش یافت. بررسی های سلولی نشان داد که داربست، دارای سمیت نیست و سلول های MG63 به خوبی به سطح داربست ها و دیواره حفره ها می چسبند. همچنین تکثیر و فعالیت آلكالین فسفاتاز سلول های MG63، با افزایش مقدار آسکوربیک اسید، افزایش می یابد.



<https://doi.org/10.30501/jamt.2021.266866.1152> URL: https://www.jamt.ir/article_130851.html

Original Research Article

Journal of Advanced Materials and Technologies (JAMT): Vol. 10, No. 4, (Winter 2022), 25-36

Fabrication and Characterization of Properties of Silk Fibroin Scaffold Containing Ascorbic Acid-Loaded Chitosan Nanoparticles for Bone Regeneration Applications

*عهده دار مکاتبات

نشانی: ایران، تهران، تهران، دانشگاه تهران، دانشکده علوم و فنون نوین

تلفن: ۰۹۱۲۳۲۲۴۵۱۶، دورنگار: -، پیام نگار: J_nourmohammadi@ut.ac.ir (ژامک نورمحمدی)

تلفن: ۰۹۱۲۷۲۶۶۶۷۲، دورنگار: -، پیام نگار: ahrezayan@ut.ac.ir (علی حسین رضایان)

Please cite this article as: Sanjarnia, P., Nourmohammadi, J., Rezayan, A. H., Moaddab, M., "Fabrication and characterization of properties of silk fibroin scaffold containing ascorbic acid-loaded chitosan nanoparticles for bone regeneration applications", *Journal of Advanced Materials and Technologies (JAMT)*, Vol. 10, No. 4, (2022), 25-36. (<https://doi.org/10.30501/jamt.2021.266866.1152>).

2783-0829/© 2022 The Author(s). Published by MERC.

This is an open access article under the CC BY license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



Pegah Sanjarnia¹, Jhamak Nourmohammadi^{2*}, Ali Hossein Rezayan^{2*}, Mehrnaz Moaddab¹¹ M. Sc. Student, Faculty of New Sciences and Technologies, University of Tehran, Tehran, Tehran, Iran² Associate Professor, Faculty of New Sciences and Technologies, University of Tehran, Tehran, Tehran, Iran**Paper History:**

Received: 2021-02-09

Revised in revised form: 2021-05-01

Scientific Accepted: 2021-05-06

Published: 2022-01-24

Keywords:Ascorbic Acid,
Bone Scaffold,
Silk Fibroin,
Chitosan Nanoparticles

Abstract The aim of this study was to fabricate and characterize silk fibroin scaffold containing chitosan nanoparticle loaded with ascorbic acid. Therefore, ascorbic acid- chitosan nanoparticles were fabricated using the ionic gelation method. Scanning Electron Microscopy (SEM) images and Dynamic Light Scattering (DLS) results showed that the nanoparticles are spherical with the average size of 200 nm. Then, different amounts of nanoparticles were placed in the silk fibroin solution, and finally, the scaffolds were prepared by the freeze-drying method. The effect of nanoparticle concentrations on various properties such as morphology, structural changes, water absorption, drug release, toxicity, adhesion, and alkaline phosphatase activity of MG63 cells were studied. The results of Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) confirmed the presence of nanoparticles in the scaffold. Morphological examinations of the cross-section of the scaffold showed that all scaffolds have a porous structure with interconnected pores. The mean size of the pores and porosity percentages reduced as the nanoparticle content rose. The release of ascorbic acid in all samples started with the burst release in the first 24 hours and then continued with a controlled release for up to 14 days. Higher amounts of ascorbic acid were released from the scaffold containing more nanoparticles. Cellular studies showed that the scaffold was non-toxic and that MG63 cells adhered well onto the surface of the scaffold and the pores' wall. Also, the proliferation and alkaline phosphatase activity of MG63 cells increased with increasing ascorbic acid amounts.


<https://doi.org/10.30501/jamt.2021.266866.1152>
[URL: https://www.jamt.ir/article_130851.html](https://www.jamt.ir/article_130851.html)
۱- مقدمه

با وجود پیشرفت‌های چشمگیر در ترمیم بافت استخوان در سال‌های اخیر، روش‌های موجود، از قبیل پیوندهای استخوانی^۱، دارای محدودیت‌های بسیاری هستند. علم مواد در تهیه جایگزین‌های استخوانی، کمک قابل توجهی کرده است، اما همچنان درمان بسیاری از ضایعات استخوانی شدید، از جمله ضایعات استخوانی بزرگ، با مشکلات فراوانی همراه است و در واقع، ترمیم کامل رخ نمی‌دهد [۱]. استفاده از این روش‌ها با مشکلاتی از قبیل پاسخ نامطلوب سیستم ایمنی، تغییرات ساختاری ناخواسته در بافت بدن و نیاز به عمل‌های جراحی متعدد همراه است [۲]. به همین سبب، به مهندسی بافت استخوان^۲، به‌عنوان رشته‌ای نوظهور و در حال رشد، در سال‌های اخیر، بسیار توجه شده است. به‌این‌ترتیب، برای حفظ عملکرد بافت‌ها یا بازسازی آن‌ها، به‌کمک علم مهندسی بافت، به الگو یا داربستی^۳ نیاز است تا به‌عنوان زمینه‌ای موقت برای رشد سلول‌ها عمل کند و موجب شکل‌گیری و رشد بافت‌های استخوانی شود. پلیمرهای طبیعی و مصنوعی مختلفی در مهندسی بافت استخوان مطالعه شده‌اند که در میان آن‌ها، به پلیمرهای طبیعی، به‌دلیل شباهتشان به ماتریس خارج‌سلولی، عدم سمیت و سرعت بخشیدن به روند بازسازی استخوان، بسیار توجه شده است. فیبروئین ابریشم، به‌دلیل داشتن خواص مطلوبی نظیر قیمت ارزان، دسترسی خوب، عدم پاسخ ایمنی،

ویژگی‌های مکانیکی مناسب، تخریب قابل کنترل، چسبندگی و تکثیر سلولی مناسب، کاربرد گسترده‌ای در مهندسی بافت استخوان دارد [۳]. با این وجود، در فیبروئین ابریشم، به‌دلیل خاصیت هدایت استخوانی^۴ پایین، روند بازسازی بافت استخوان به‌کندی پیش می‌رود. از این‌رو، برای بهبود قابلیت استخوان‌زایی داربست‌های فیبروئینی، استفاده از عامل‌های القای استخوانی مطالعه و بررسی شده است [۲ و ۴]. گزارش شده است که قرارگیری نانوذرات حاوی دارو در داربست‌های زیست‌تخریب‌پذیر، راه‌حلی مناسب برای رساندن هدفمند دارو با رهایش منظم و کنترل‌شده است [۴].

کیتوسان، از انواع پلیمرهای زیستی کاتیونی است که به‌دلیل زیست‌سازگاری، زیست‌تخریب‌پذیری و در دسترس بودن به‌عنوان حامل، برای رهایش هدفمند و کنترل‌شده دارو در مهندسی بافت مورد مطالعه قرار گرفته است [۵ و ۶]. برای مثال، لینا^۵ و همکاران [۷]، داربستی کامپوزیتی بر پایه آلزینات و ژلاتین ساختند که نانوذرات کیتوسان حاوی داروی سیلیبینین^۶ در آن بارگذاری شده بود. سیلیبینین، دارویی گیاهی مشتق‌شده از فلاونوئیدها است که از گیاه خارمریم^۷ به‌دست می‌آید و دارای ویژگی‌های استخوان‌زایی است. قراردادن این دارو در نانوذرات کیتوسان، باعث رهایش کنترل‌شده و طولانی‌تر آن می‌شود. همچنین، بارگذاری دارو در داربست پلیمری، از رهایش انفجاری ابتدایی آن جلوگیری می‌کند.

⁴ Osteoconductive⁵ Leena⁶ Silibinin⁷ Milk Thistle¹ Bone Grafts² Bone Tissue Engineering³ Scaffold

ابعاد نانو، می‌تواند رویکردی مناسب برای بهبود پایداری و افزایش ماندگاری آن در کنار حفظ خواصش باشد [۱۱]. هدف این پژوهش، ساخت و مشخصه‌یابی نانوذرات کیتوسان حاوی آسکوربیک اسید و قرارگیری آن در داربست فیبروئین ابریشم، به‌منظور بهبود بازسازی بافت استخوان است. بنابراین، ابتدا، نانوذرات کیتوسان حاوی آسکوربیک اسید، به روش ژل‌شدن یونی، سنتز شد. سپس، در غلظت‌های مختلف ۱، ۳ و ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، به محلول فیبروئین ابریشم اضافه شد. در نهایت، داربست‌های سه‌بعدی، به روش خشک‌کشی انجمادی، تهیه شدند. ساختار، ریخت‌شناسی و جذب آب داربست‌ها بررسی و با داربست فیبروئین ابریشم مقایسه شدند. رهائش آسکوربیک اسید از داربست‌های موردنظر توسط طیف‌سنجی مرئی-فرابنفش اندازه‌گیری شد. در آخر، مطالعات سلولی، شامل چسبندگی، سمیت سلولی و فعالیت آلکالین فسفاتاز روی سلول‌های استئوسارکومای^۵ MG63 کشت داده‌شده روی داربست‌ها بررسی شد.

۲- مواد و روش‌ها

بیله کرم ابریشم از مرکز پژوهش‌های کرم ابریشم گیلان خریداری شد. کیتوسان، با وزن مولکولی پایین، با درصد دی‌استیله ۷۵ تا ۸۵ درصد، از شرکت بیوبیسک کانادا (CB0660) تهیه شد. سایر مواد، نظیر لیتیم بروماید (105669)، سدیم تری‌فسفات (106699)، آسکوربیک اسید (100468)، اسید استیک (100063)، سدیم هیدروکسید (106462)، متانول (106009)، کربنات سدیم (106392)، اتانول درصد (107017) و پلی‌اتیلن گلیکول (821881) از شرکت مرک آلمان خریداری شدند.

۲-۱- آماده‌سازی و مشخصه‌یابی نانوذرات کیتوسان حاوی آسکوربیک اسید

در این مطالعه، بارگذاری آسکوربیک اسید، حین سنتز نانوذرات کیتوسان، انجام شد [۱۲]. بدین منظور، ابتدا، محلول ۰/۳ درصد وزنی کیتوسان در استیک اسید ۱ درصد حجمی تهیه شد. ۰/۱ گرم آسکوربیک اسید به ۱۰ میلی‌لیتر محلول

برای تهیه نانوذرات کیتوسان می‌توان از عوامل شبکه‌ساز شیمیایی، نظیر اتیلن‌گلیکول، گلو تارآلدهید و گلی‌اکسال استفاده کرد، اما این مواد، به‌دلیل سمیت، در پزشکی قابل استفاده نیستند. کیتوسان، به‌دلیل قابلیت باردارشدن گروه‌های آمین در محیط اسیدی، پلی‌ساکارید کاتیونی به‌شمار می‌آید و می‌تواند با گروه‌های بار منفی، مثل سولفات‌ها و فسفات‌ها، اتصال یابد و ژل تولید کند. ایجاد اتصالات فیزیکی از طریق واکنش‌های الکترواستاتیک، بهترین جایگزین برای جلوگیری از اثرات نامطلوب اتصال‌دهنده‌های شیمیایی است. سدیم تری‌فسفات، با ماهیت پلی‌آنیونی، می‌تواند به‌وسیله گروه‌های فسفات خود، با گروه‌های آمین کیتوسان به‌صورت الکترواستاتیک واکنش دهد. به‌دنبال این واکنش، کیتوسان، کروی‌شکل شده و محلول کلونیدی ایجاد می‌شود [۸].

ریزمولکول‌های استخوان‌آور^۱، با قابلیت دسترسی آسان، عدم سمیت و قیمت پایین، بسیار مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته‌اند. درواقع، اندازه کوچک این مولکول‌ها، توانایی عبور از سیتوپلاسم و تحریک مستقیم سیگنال‌های استخوان‌زا را به آن‌ها می‌دهد [۹]. آسکوربیک اسید، از ریزمولکول‌های ارزان‌قیمت، در دسترس و دارای تأییدیه سازمان دارو و غذای آمریکا (FDA) است که باعث ارتقای توانایی و تمایز سلول‌های استخوان‌ساز^۲ می‌شود. این ویتامین محلول در آب، به‌عنوان هم‌عامل^۳ آنزیم، در سنتز کلاژن نوع اول عمل می‌کند و باعث تحریک تشکیل ماتریس خارج سلولی می‌شود. همچنین، از آن برای ترمیم زخم‌ها، تقویت سیستم ایمنی بدن و افزایش اثر ضدسرطانی داروهای شیمی‌درمانی و موارد دیگر استفاده می‌کنند.

با وجود این ویژگی‌ها، آسکوربیک اسید به‌شدت ناپایدار است و در معرض نور، عوامل اکسیدکننده، یون‌های فلزی مانند مس، دما، اکسیژن و رطوبت هوا، خواصش را از دست می‌دهد. این ویتامین، در اثر حرارت به‌ویژه در حضور فلزات، مانند مس، زود از بین می‌رود، اما انجماد، اثری روی آن ندارد [۱۰ و ۱۱]. بنابراین، پوشینه دارکردن^۴ آن در حاملی با

¹ Osteoinductive

² Osteoblast

³ Cofactor

⁴ Encapsulation

⁵ Osteosarcoma

شدند و سپس، پیله ها طی سه چرخه، با آب مقطر سرد و آب مقطر گرم و هربار به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه شست و شو شدند. برای این که فیبروئین حاصل خشک شود، به مدت ۲۴ ساعت، در خشک کن با دمای ۴۰ درجه سلسیوس قرار گرفت. پیله های صمغ زدایی شده در محلول ۹/۳ مولار لیتیم برماید، در دمای ۶۰ درجه سلسیوس، به مدت ۴ ساعت حل شدند. محلول به دست آمده، به مدت ۳ روز، در آب دیونیزه دیالیز شد. در مرحله آخر، دیالیز در محلول پلی اتیلن گلیکول، به مدت ۲۰ ساعت، ادامه پیدا کرد تا محلول فیبروئین غلیظ (۱۰ درصد وزنی) به دست آید [۱۳].

۲-۲-۲- ساخت و بررسی خواص داربست های کامپوزیتی

فیبروئین حاوی نانوذرات کیتوسان-آسکوربیک اسید

۱، ۳ و ۵ میلی گرم نانوذرات کیتوسان حاوی آسکوربیک اسید، به ازای هر ۱ میلی لیتر محلول فیبروئین، اضافه شدند و پس از هم زدن، تحت خشکایش انجمادی، به شکل اسفنج درآمدند. نمونه ها به ترتیب SF-Ch AA(1)، SF-Ch AA(3) و SF-Ch AA(5) نام گذاری شدند. سپس، تحت بخار گلو تار آلدئید، اتصال عرضی^۵ در نمونه ها ایجاد شد. فیبروئین بدون نانوذره، به عنوان نمونه شاهد (SF) انتخاب شد. ریخت شناسی حفره ها در داربست های مورد نظر، توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی، بررسی شد. اندازه حفره های هریک از داربست ها، توسط نرم افزار ImageJ، اندازه گیری و میانگین قطر حفره ها محاسبه شد. درصد تخلخل هر داربست، به وسیله پنج عکس میکروسکوپ الکترونی روبشی، از طریق معادله ۲ محاسبه شد:

$$\frac{A_p}{A_t} \times 100 \quad (2)$$

که A_p و A_t ، به ترتیب، مساحت کل تخلخل ها در هر مقطع عرضی و مساحت کل مقطع عرضی است.

برهم کنش بین نانوذرات با فیبروئین ابریشم، توسط دستگاه طیف سنجی تبدیل فوریه فروسرخ (FTIR)، بررسی و طیف نمونه ها در گستره عدد موج $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ ، توسط دستگاه ثبت شد. نمونه ها با وزن اولیه مشخص (W_0)، برای

کیتوسان آماده شده اضافه و وقتی محلول کاملاً هم زده شد، pH آن به وسیله محلول ۲۰ درصد وزنی NaOH، ۴/۶ تنظیم شد. محلول پلی آنیون سدیم تری فسفات (TPP) با غلظت ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر، به صورت قطره ای، به محلول فوق، تحت هم زدن مغناطیسی سریع، اضافه شد. سوسپانسیون حاصل، با سرعت ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه، به مدت ۲۰ دقیقه، سانتریفیوژ شد و مایع شناور روی ذرات (روماند)^۱، به منظور اندازه گیری ظرفیت بارگذاری داروی آسکوربیک اسید، نگهداری شد. رسوب حاصل، در دمای منفی ۸۰ درجه سلسیوس، به مدت ۷۲ ساعت، تحت خشکایش انجمادی قرار گرفت. برای تعیین درصد بارگذاری دارو، مقدار آسکوربیک اسید آزاد در مایع روماند، با استفاده از دستگاه طیف-نورسنج^۲ فرابنفش، در طول موج ۲۶۵ نانومتر، اندازه گیری شد و منحنی استاندارد محلول های مختلفی از آسکوربیک اسید، با غلظت های بین ۰/۱ تا ۰/۰۰۵ میلی گرم بر میلی لیتر، رسم شد. ظرفیت بارگذاری دارو با استفاده از معادله ۱ محاسبه شد:

$$(1) \quad \frac{\text{محتوای اسید آسکوربیک در نانوذرات}}{\text{محتوای کل اسید آسکوربیک}} \times 100$$

ریخت شناسی نانوذرات تهیه شده توسط دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی مطالعه شد. میانگین و توزیع اندازه ذرات و بار سطحی آن ها، به ترتیب، توسط دستگاه پراکندگی نور دینامیکی^۳ و پتانسیل زتا^۴ اندازه گیری شد. همچنین، از طیف سنجی فروسرخ، برای بررسی برهم کنش بین نانوذرات کیتوسان و آسکوربیک اسید، استفاده شد.

۲-۲- تهیه و بررسی خواص داربست های فیبروئینی حاوی

نانوذرات کیتوسان-آسکوربیک اسید

۱-۲-۲- تهیه محلول فیبروئین ابریشم

فیبروئین ابریشم، از پیله کرم ابریشم، تلخیص شد. برای این کار، پیله ها به قطعات کوچک تری بریده شدند و در محلول آبی سدیم کربنات (۰/۰۲ مولار)، به مدت ۱ ساعت صمغ زدایی

¹ Supernatant

² Spectrophotometer

³ Dynamic Light Scattering (DLS)

⁴ Zeta Potential

⁵ Cross-Link

بررسی جذب آب تعادلی داربست‌ها، به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در بافر فسفات‌سالین (PBS) قرار گرفتند و بعد از حذف آب اضافی، توزین شدند (W_w) [۱۴] و نسبت جذب آب تعادلی نمونه‌ها توسط معادله ۳ محاسبه شد:

$$\frac{W_w - W_0}{W_0} \times 100 \quad (۳)$$

۳-۲- بررسی رهایش آسکوربیک اسید از داربست‌ها

ابتدا، داربست‌ها در ۱۰ میلی‌لیتر محلول فسفات بافر سالین (PBS) غوطه‌ور و سپس، در گرم‌خانه لرزشی^۱ با دمای ۳۷ درجه سلسیوس و سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. چگالی اپتیکی^۲ آسکوربیک‌اسید آزادشده از هر نمونه، توسط دستگاه طیف‌نورسنج فرابنفش، در طول موج ۲۶۵ نانومتر، اندازه‌گیری و درنهایت، به کمک منحنی استاندارد، غلظت آسکوربیک‌اسید آزادشده در زمان‌های موردنظر محاسبه شد. افزون بر این، با تطبیق داده‌های رهایش آسکوربیک‌اسید با مدل ریاضی مطابق معادله ۴، سینتیک رهایش آن از هر داربست مشخص شد [۱۵].

$$\frac{M_t}{M_\infty} = Kt^n \quad (۴)$$

که M_∞ مقدار دارویی است که در زمانی نامحدود آزاد می‌شود، K ، ثابت سرعت رهایش، t ، زمان رهایش و n ، ثابتی است که نشان‌دهنده سازوکار رهایش دارو است.

۴-۲- ارزیابی سلولی برون‌تنی در مجاورت سلول‌های

MG63

۴-۲-۱- آزمون چسبندگی سلولی و بقای سلولی

برای بررسی بقای سلولی و قابلیت چسبندگی سلولی داربست‌های ساخته‌شده، از سلول‌های استئوسارکومای رده MG63 استفاده شد. به‌منظور کشت سلولی، نمونه‌های آماده‌سازی‌شده، با استفاده از اتانول ۷۰ درصد استریل شده و سپس، به‌دقت درون ظرف کشت با محلول PBS شست‌وشو داده شدند. برای کشت سلول‌های استئوسارکومای رده MG63، از محیط کشت DMEM، حاوی سرم جنین گاوی (FBS) ۱۰

و ۱ درصد پن استرپ^۳ استفاده شد. سوسپانسیون سلولی با تعداد ۱۰۰۰۰ در هر خانه از ظرف‌های کشت سلول پلی‌استایرنی، روی نمونه‌های داربستی ریخته شد و سپس، این ظرف‌ها در گرم‌خانه ۳۷ درجه سلسیوس در شرایط ۹۵ درصد رطوبت و ۵ درصد دی‌اکسید کربن قرار داده شدند. پس از گذشت ۷ روز، نمونه‌ها از محیط کشت خارج شده و سلول‌های چسبیده به هر نمونه، توسط گلو تارآلدئید ۴ درصد تثبیت شدند. سپس نمونه‌ها در محلول اتانول با غلظت‌های صعودی ۵۰، ۷۰، ۹۰ و ۱۰۰ درصد و در شرایط حدود ۱۵ دقیقه در هر غلظت اتانول، آب‌زدوده شدند. در آخر، نمونه‌ها در دمای محیط قرار گرفتند تا کاملاً خشک شوند. بعد از خشک‌شدن کامل، نمونه‌ها برای بررسی با میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، با طلا پوشش داده شدند. به‌منظور بررسی سمیت نمونه‌ها و تأثیر آن‌ها بر رشد و تکثیر سلول‌ها، فرایند عصاره‌گیری براساس استاندارد ایزو ۱۰۹۹۳-۵ انجام شد. شرایط محیط کشت در بازه‌های زمانی ۳ و ۷ روز، تا حد امکان مشابه بدن انسان (دمای ۳۷ درجه سلسیوس)، حفظ شد. بدین ترتیب، ابتدا، ۱۰۰۰۰ سلول، در هر خانه از ظرف کشت سلولی ۹۶ چاهکی ریخته شد و در گرم‌خانه با دمای ۳۷ درجه سلسیوس و رطوبت ۹۵ درصد و دی‌اکسید کربن ۵ درصد قرار گرفت تا سلول‌ها به کف ظرف بچسبند. پس از گذشت ۲۴ ساعت، محیط کشت، در هر خانه ظرف، با عصاره گرفته‌شده از هر نمونه در روزهای ۳ و ۷، جایگزین شد و سپس، مجدداً ظرف‌ها، به مدت ۲۴ ساعت دیگر، به گرم‌خانه منتقل شدند. پس‌از آن، محیط کشت خارج شد و ۱۰۰ میکرولیتر MTT، با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، به هر چاهک اضافه شد. پس از گذشت ۴ ساعت، محلول روی سلول‌ها خارج شد و ایزوپروپانول، برای حل‌شدن بلوره‌های فرامازن تشکیل شده درون سلول‌ها، به هر چاهک وارد شد. پس از ۱۰ دقیقه، شدت رنگ ایجادشده در طول موج ۵۴۵ نانومتر، توسط دستگاه الایزا خوانده شد.

۴-۲-۲- اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز و مقدار

رسوب کلسیم

^۳ Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)

^۱ Shaker Incubator

^۲ Optical Density

۲-۵- تحلیل آماری

هریک از تحلیل‌ها برای سه نمونه از هر ترکیب تکرار شد و نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف از استاندارد گزارش شد. به کمک تحلیل واریانس یک طرفه^۴، معنی‌دار بودن داده‌ها محاسبه شد و * برابر $p < 0/05$ و *** برابر $p < 0/001$ در نظر گرفته شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- مطالعات میکروسکوپی

شکل ۱، تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی نانوذرات کیتوسان حاوی آسکوربیک اسید را به همراه نمودار توزیع اندازه نانوذرات و پتانسیل زتا نشان می‌دهد. با توجه به شکل ۱، ساختار کروی نانوذرات به خوبی مشهود است. میانگین قطر نانوذرات، از روش پراکندگی نور دینامیکی، ۲۰۰ نانومتر با شاخص پراکندگی $0/38$ به دست آمد. این پارامتر، عددی بدون بُعد است. در صورتی که این عدد بزرگتر از $0/1$ باشد، توزیع اندازه نانوذرات همگن نیست و اگر شاخص پراکندگی از $0/1$ کوچک‌تر باشد، توزیع اندازه آن‌ها همگن است. به طور کلی، هرچه این شاخص به صفر نزدیک‌تر باشد، نتایج قابل استنادتر است [۱۸]. همچنین، بار سطحی ذرات مثبت است.

شکل ۲، تصاویر میکروسکوپ الکترونی داربست‌های فیبروئینی حاوی مقادیر مختلف نانوذرات کیتوسان-آسکوربیک اسید را نشان می‌دهد. همان‌طور که در این شکل دیده می‌شود، همه نمونه‌ها ساختاری متخلخل با حفره‌های متصل دارند. نتایج و اندازه‌گیری‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار ImageJ، نشان می‌دهند که در داربستی که فقط حاوی فیبروئین SF است، میانگین قطر حفره‌ها برابر 11 ± 125 میکرومتر است. با اضافه شدن و افزایش درصد نانوذرات در ساختار داربست، میانگین اندازه قطر حفره‌ها تا حدودی کاهش می‌یابد. میانگین اندازه قطر حفره‌ها در داربست SF-Ch AA(1)، SF-Ch AA(3) و Ch AA(5)، به ترتیب، برابر 9 ± 100 ، 88 ± 10 و 81 ± 10 میکرومتر است (جدول ۱). همچنین، درصد تخلخل داربست‌های مختلف در جدول آورده شده

مقدار فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در روزهای ۳، ۷ و ۱۴ کشت سلولی روی داربست‌ها اندازه‌گیری شد. ابتدا، ۱۰۰۰۰ سلول در هر خانه ظرف کشت سلولی حاوی داربست، در زمان‌های مختلف ۳، ۷ و ۱۴ روز، کشت داده شدند. پس از گذشت زمان‌های موردنظر، سلول‌ها از محیط کشت خارج و سپس با محلول رپا^۱ لیز^۲ شدند. در مرحله بعد، به ازای ۲۰ میکرولیتر رومانند سلولی، ۱ میلی‌لیتر معرف شماره ۱ کیت تجاری آلکالین فسفاتاز (پارس آزمون، ایران) به نمونه‌ها اضافه شد و به مدت ۱ دقیقه، در گرم‌خانه با دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شدند. سپس، ۲۵۰ میکرولیتر محلول شماره ۲ موجود در کیت، به نمونه‌ها اضافه شد و مجدداً به مدت ۱ دقیقه در گرم‌خانه قرار گرفتند. پس از گذشت ۱، ۲ و ۳ دقیقه، جذب نوری در طول موج ۴۰۵ نانومتر خوانده و پس از آن، اختلاف جذب نوری با دقیقه قبل، محاسبه شد. این سه اختلاف نیز با یکدیگر جمع و میانگین آن‌ها محاسبه شد. در نهایت، نتایج به دست آمده با مقدار کل پروتئین استانداردسازی شد. مقدار کل پروتئین نیز از طریق روش برادفورد محاسبه شد [۱۶].

مقدار رسوب کلسیم سلول‌ها، به روش نورسنجی^۳، با استفاده از ARSENAZO III و به کمک کیت کلسیم (شرکت پارس آزمون، ایران) اندازه‌گیری شد [۱۷]. برای بررسی میزان رسوب کلسیم سلول، میزان $10^4 \times 2$ سلول، داخل هر چاهک حاوی داربست ریخته و سپس، محیط کشت کامل، شامل FBS و DMEM، به هر چاهک اضافه شد. چاهک‌های بدون نمونه، کنترل در نظر گرفته شدند. نمونه‌ها، به مدت ۳، ۷ و ۱۴ روز، داخل گرم‌خانه با دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفتند. در نهایت، پس از روزهای مشخص، ظرف‌ها از گرم‌خانه خارج شده و پس از این که محیط کشت هر چاهک به آهستگی و به طور کامل خارج شد، ۵۰۰ میکرولیتر اسید کلریدریک $0/6$ به هر چاهک اضافه شد. پس از گذشت ۴ ساعت، محتوای هر چاهک، با استفاده از مواد موجود در کیت، با هم مخلوط شدند و سپس میزان جذب، در طول موج ۶۳۰ نانومتر، خوانده شد.

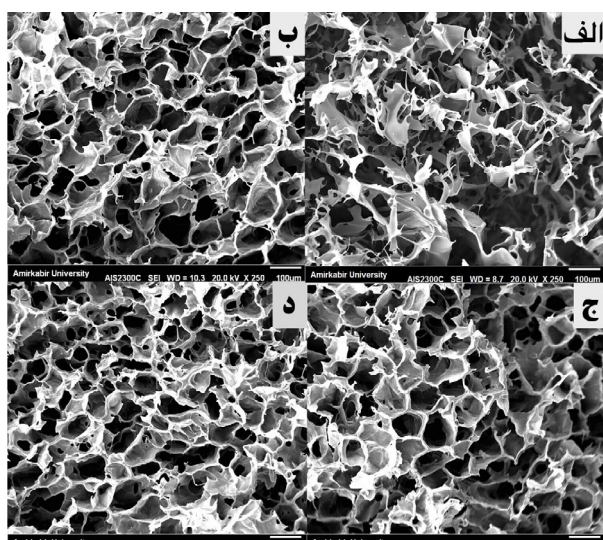
^۱ Radioimmunoprecipitation Solution (RIPA)

^۲ Lysis

^۳ Photometric

^۴ One-Way ANAOVA

مطابق با نتایج پتانسیل زتا، نانوذرات کیتوسان-آسکوربیک اسید دارای بار مثبت و فیبروئین ابریشم، در pH برابر ۷/۴، دارای بار منفی است؛ زیرا نقطه ایزوالکتریک فیبروئین ابریشم حدود ۴/۹ است. بنابراین، جاذبه الکترواستاتیک بین نانوذرات با فیبروئین، سبب نزدیک‌تر شدن زنجیره‌های فیبروئین و در نهایت، کاهش جزئی اندازه حفره‌ها و تخلخل خواهد شد. پیش‌تر، غائی^۱ و همکارانش [۱۹] نیز گزارش کرده بودند که افزودن کیتوسان سولفونه، با بار منفی، به فیبروئین ابریشم، به دلیل دافعه الکترواستاتیکی، سبب افزایش اندازه حفره‌ها و تخلخل داربست می‌شود.



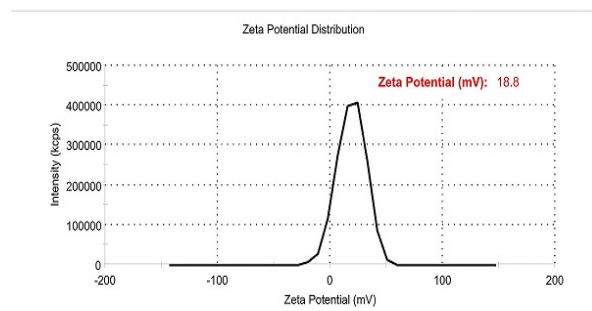
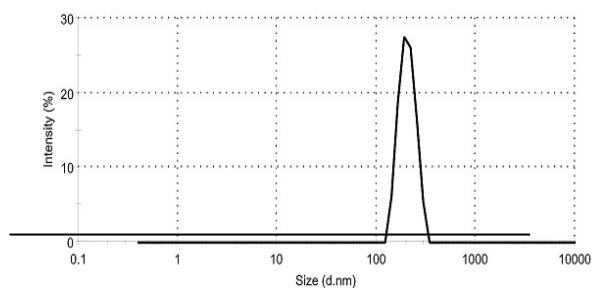
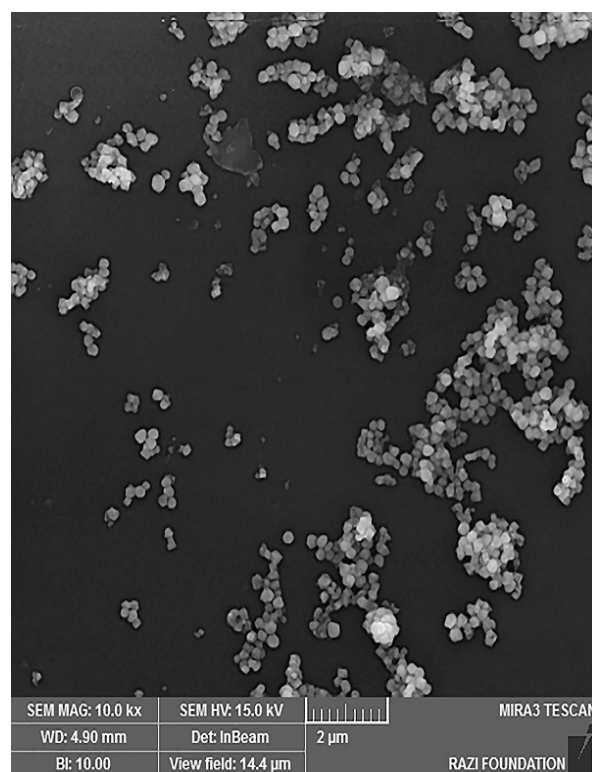
شکل ۲. تصاویر میکروسکوپ الکترونی داربست‌های الف) SF، ب) SF-Ch AA(1)، ج) SF-Ch AA(2) و د) SF-Ch AA(3)

جدول ۱. میانگین قطر حفره‌ها و تخلخل نمونه‌ها

نمونه	میانگین قطر حفره‌ها (میکرومتر)	تخلخل (درصد)
SF	۱۲۵ ± ۱۱	۷۱
SF-Ch AA(1)	۱۰۰ ± ۹	۶۸
SF-Ch AA(3)	۸۸ ± ۹	۶۵
SF-Ch AA(5)	۸۱ ± ۱۰	۶۱

۳-۲- نتایج آزمون جذب آب تعادلی

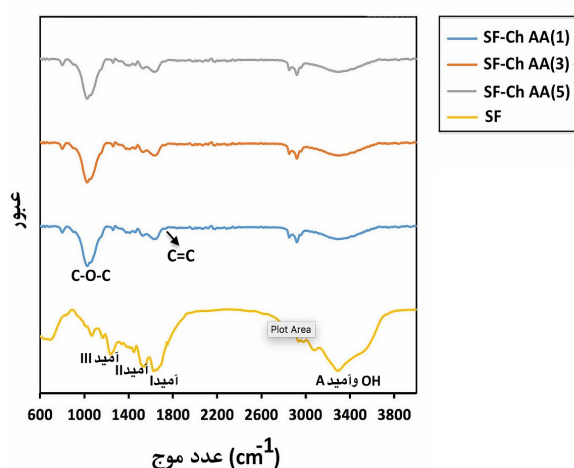
است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود، با حضور و افزایش درصد نانوذرات، درصد تخلخل از ۷۱ درصد در نمونه SF به ۶۸ درصد در SF-Ch AA(1)، ۶۵ درصد در SF-Ch AA(3) و ۶۱ درصد در SF-Ch AA(5) کاهش می‌یابد. این کاهش اندازه حفره‌ها و درصد تخلخل با افزودن نانوذرات، می‌تواند به دلیل تفاوت بارهای سطحی نانوذره و بار فیبروئین ابریشم باشد.



شکل ۱. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی نانوذرات کیتوسان حاوی آسکوربیک اسید همراه با نمودار توزیع پراکندگی نانوذرات و پتانسیل زتا

¹ Ghace

محدوده، مربوط به ارتعاشات کششی C-O-C پیوند گلیکوزیدیک^۳ در کیتوسان هستند [۲۳]. همچنین، شانه‌ای جدید در عدد موج 1675 cm^{-1} در داربست‌های کامپوزیتی به وجود آمده که به پیوندهای C=C در آسکوربیک اسید مربوط است [۲۴]. طیف‌سنجی فروسرخ بیانگر این واقعیت است که نانوذرات کیتوسان حاوی آسکوربیک اسید با موفقیت در داربست فیروئینی قرار گرفته‌اند.

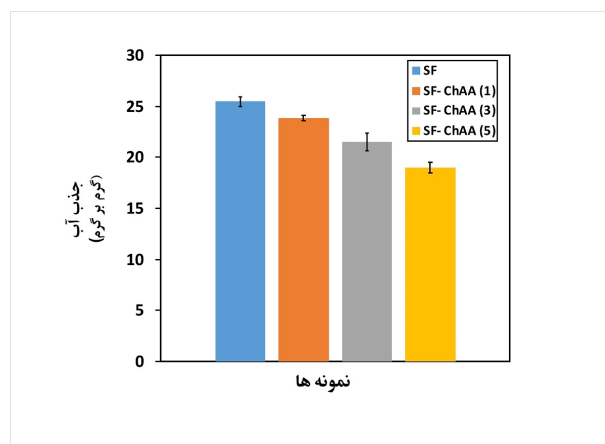


شکل ۴. طیف‌سنجی تبدیل فروسرخ داربست‌های مختلف

۳-۴- نتایج رهایش آسکوربیک اسید از داربست

شکل ۵، الگوی رهایش آسکوربیک اسید از داربست کامپوزیتی مختلف را نشان می‌دهد. همان‌طور که دیده می‌شود، در هر سه نمونه، رهایش انفجاری در ۲۴ ساعت اولیه رخ داده است. این رهایش انفجاری ابتدایی را می‌توان به مقدار دارویی که در سطح داربست وجود دارد، نسبت داد. با گذشت زمان تا ۱۴ روز، رهایش به صورت کنترل‌شده ادامه یافت و مشخص شد که نمونه SF-Ch AA(5)، بیشترین مقدار رهایش را در محلول داشته است. به عبارت دیگر، با افزودن مقدار بیشتر آسکوربیک اسید به داربست‌ها، رهایش آسکوربیک اسید نیز افزایش یافته است. این امر را می‌توان به آب‌دوستی و محلول‌بودن آسکوربیک اسید در آب نسبت داد. بنابراین، هرچه غلظت این دارو در داربست فیروئینی بیشتر شود، رهایش آن نیز بیشتر خواهد شد. زادگان^۴ و همکارانش [۲۵] نیز پیش‌تر

با توجه به شکل ۳، نمونه SF، در مقایسه با سایر نمونه‌ها، بالاترین جذب آب را نشان می‌دهد. جذب آب به‌دست‌آمده در نمونه SF، با مقدار جذب آب هیدروژل فیروئینی، در مطالعات ریو^۱ و همکارانش [۲۰]، مطابقت دارد. همچنین، با افزایش درصد نانوذرات کیتوسان در ساختار داربست، جذب آب کاهش می‌یابد. علت این امر را می‌توان کاهش اندازه حفره‌ها و تخلخل با افزایش درصد نانوذرات دانست. در مطالعات پیشین نیز گزارش شده است که اندازه حفره‌ها و تخلخل در جذب آب داربست‌ها تأثیر می‌گذارد، به‌طوری که هرچه حفره‌ها درشت‌تر باشند، مقدار جذب آب آن داربست نیز بیشتر می‌شود [۲۱].



شکل ۳. جذب آب تعادلی داربست‌های مختلف

۳-۳- طیف‌سنجی تبدیل فروسرخ

در شکل ۴، نتایج طیف‌سنجی تبدیل فروسرخ^۲ داربست‌های آماده‌سازی‌شده نشان داده شده است. با توجه به نمودار، در همه نمونه‌ها، پیک‌های مربوط به ارتعاشات آمید A، آمید I، آمید II و آمید III، به ترتیب، در عدد موج‌های 3340 cm^{-1} ، 1625 cm^{-1} ، 1527 cm^{-1} و 1240 cm^{-1} دیده می‌شوند. این پیک‌ها متعلق به ساختار صفحات غیرموازی بتا در فیروئین ابریشم هستند [۲۲]. افزون بر این، افزودن نانوذرات کیتوسان حاوی آسکوربیک اسید موجب ایجاد پیک‌هایی در محدوده عدد موج 1025 cm^{-1} تا 1080 cm^{-1} شده است، به‌طوری که با توجه به شکل، این پیک در فیروئین ابریشم خالص وجود ندارد. پیک‌های مشاهده‌شده، در این

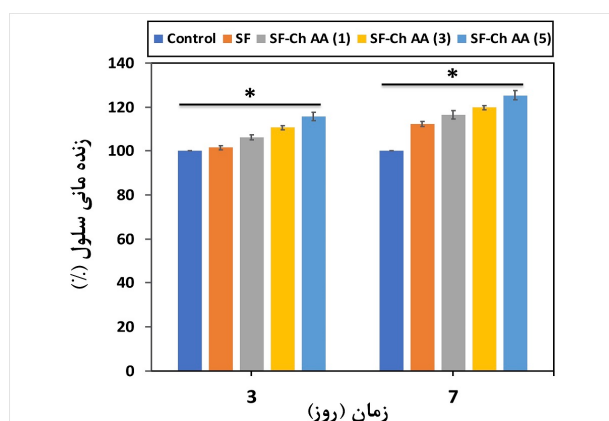
³ Glycosidic Bond

⁴ Zadegan

¹ Ryu

² Fourier-Transform Infrared Spectroscopy

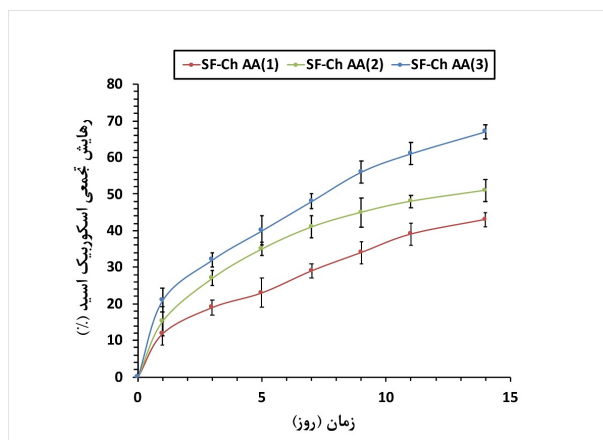
سمیت سلولی در حضور داربست‌ها مشاهده نشده و زیست‌سازگاری داربست‌ها، در مقایسه با نمونه کنترل، تأیید شده است. زنده‌مانی سلول‌ها، با افزایش مقدار آسکوربیک اسید و گذشت زمان، افزایش یافته است. افزایش درصد زنده‌مانی سلول‌ها در داربست‌ها، در مقایسه با نمونه کنترل، بیانگر تأثیر مثبت آسکوربیک اسید در افزایش رشد و تکثیر سلولی است. ریخت‌شناسی و چسبندگی سلول‌های MG63، پس از ۷ روز کشت‌دادن روی داربست‌ها، در شکل ۷ نشان داده شده است. همان‌گونه که در تمامی نمونه‌ها دیده می‌شود، سلول‌ها به‌وسیله پیک‌های کاذب به درون تخلخل‌ها نفوذ کرده و به‌خوبی به سطح داربست و به‌همدیگر چسبیده‌اند. با افزایش مقدار آسکوربیک اسید، پهن‌شدگی سلولی بهتر انجام شده، تاجایی‌که دیواره حفره‌ها در نمونه SF-Ch AA(5)، تقریباً به‌طور کامل با لایه‌ای از سلول پوشانیده شده است. این نتیجه با داده‌های پژوهش انجام‌شده توسط تاکامیزاوا^۳ و همکارانش [۲۶] منطبق است که براساس آن، افزودن آسکوربیک اسید به محیط کشت سلولی سبب افزایش رشد و تکثیر سلول‌های MG63 شد. در شکل ۷ نشان داده شده که داربست‌های تهیه‌شده با سلول‌ها سازگارند و می‌توانند پایه مناسبی برای رشد و تکثیر سلول‌ها باشند.



شکل ۶. نتایج آزمون MTT روی نمونه‌های مختلف

۳-۶- فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز و رسوب کلسیم سلول
شکل ۸، نتایج فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز سلول‌های MG 63 را در روزهای ۳، ۷ و ۱۴ روز، پس از کشت، روی سطح داربست‌ها نشان می‌دهد. آلکالین فسفاتاز، یکی از

گزارش کرده بودند که رهایش عصاره گزنه از داربست‌های لیفی شکل فیبروئینی با افزایش غلظت آن افزایش می‌یابد.



شکل ۵. الگوی رهایش آسکوربیک اسید از داربست‌های مختلف

نتایج تجزیه و تحلیل سینتیک رهایش آسکوربیک اسید از نمونه‌های مختلف در جدول ۲ آمده است. همان‌طور که دیده می‌شود، در همه نمونه‌ها، سینتیک رهایش آسکوربیک اسید با مدل کورسمایر-پیپاس^۱ مطابقت خوبی داشته است. افزون بر این، همان‌طور که در جدول ۲ نشان داده شده است، مقادیر تمام نمونه‌ها کمتر از ۰/۵ بود که یک سامانه رهایش دارو توسط قانون فیک^۲ را نشان می‌دهد.

جدول ۲. نتایج تجزیه و تحلیل سینتیک رهایش آسکوربیک اسید

نمونه	R ²	n
SF	۰/۹۷۸۹	۰/۴۵
SF-Ch AA(1)	۰/۹۶۷۴	۰/۳۵
SF-Ch AA(2)	۰/۹۸۷۱	۰/۴۳
SF-Ch AA(3)	۰/۹۸۶۵	۰/۳۷

۳-۵- بررسی چسبندگی و زنده‌مانی سلولی

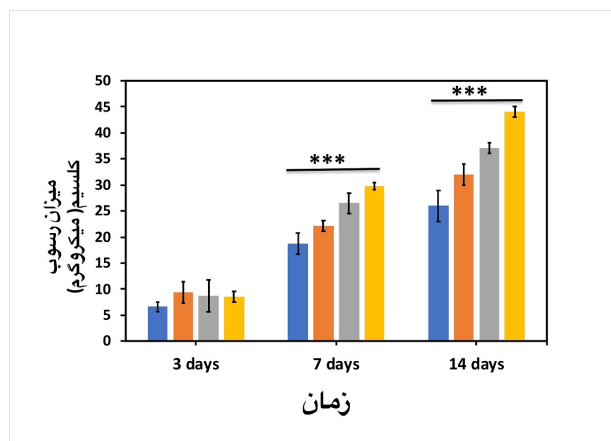
شکل ۶، زنده‌مانی سلولی روی داربست‌ها را در روزهای ۳ و ۷ کشت سلولی، براساس آزمون MTT نشان می‌دهد. براساس نتایج به‌دست‌آمده از این آزمون، هیچ‌گونه

^۱ Korsmeyer-Peppas Model

^۲ Fake Law

^۳ Takamizawa

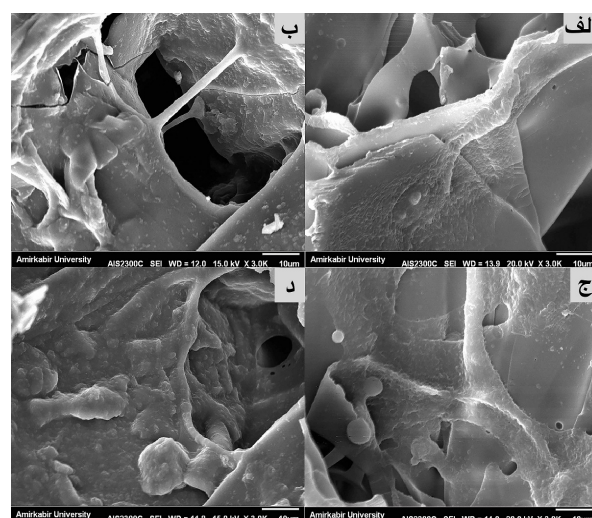
ارزیابی کمی میزان رسوب کلسیم آورده شده است. میزان یون کلسیم رسوب کرده توسط سلول‌ها، در روز ۱۴، افزایش چشمگیری داشته و با افزایش غلظت آسکوربیک اسید، افزایش قابل توجهی یافته و بیشترین میزان رسوب کلسیم در داربست SF-Ch AA (۳) دیده شده است. این نتایج را می‌توان به رهش آسکوربیک اسید از داربست و تأثیر مثبت آن بر القای استخوانی نسبت داد [۲۸].



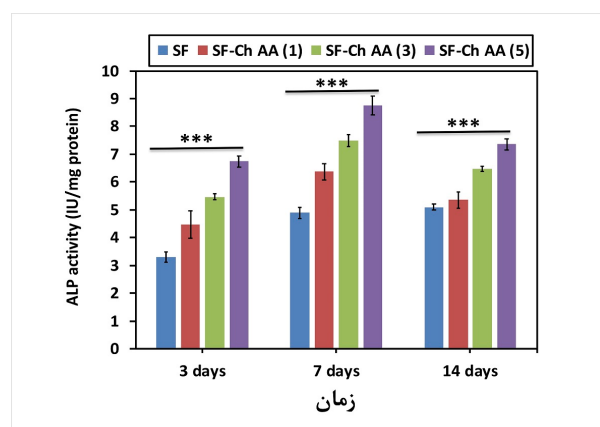
شکل ۹. مقدار رسوب کلسیم سلولی

مطالعات نشان داده است که آسکوربیک اسید در تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی^۱ (MSC) تأثیر دارد [۲۹]. عوامل متفاوتی در این مسیر مؤثرند. این ماده، جدا از خاصیت آنتی‌اکسیدانی، به عنوان هم‌عامل^۲، در واکنش‌های آنزیمی مشارکت دارد. آسکوربیک اسید، به ویژه هنگام استخراج سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان، باعث افزایش تکثیر تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌شود. بررسی‌های انجام شده توسط بیان ژن^۳ و تحلیل‌های متابولیکی نشان می‌دهد که آسکوربیک اسید، تجزیه HIF1 α را تقویت کرده، میتوکندری را فعال می‌کند و در تکثیر سلول و متابولیسم تأثیر می‌گذارد [۳۰]. این ماده، فعالیت آلکالین فسفاتاز را افزایش می‌دهد و باعث تحریک بیان مارکرهای^۴ تمایزدهنده استخوان مثل سنتز کلاژن می‌شود. به این صورت که افزودن آسکوربیک اسید، با افزایش ترشح کلاژن نوع I، تمایز استخوانی را تسهیل می‌کند و در نتیجه، باعث افزایش اتصال ایتگرین‌های^۵ $\alpha 2\beta 1$ به

شاخص‌های اولیه تمایز استخوانی است. درواقع، آلکالین فسفاتاز، آنزیمی غشایی است که با هیدرولیز یون‌های فسفات، سبب شکل‌گیری بلورهای هیدروکسی آپاتیت و مینرالی شدن می‌شود. همان‌گونه که در شکل ۸ مشاهده می‌شود، فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز، تا روز ۷، در داربست‌های کامپوزیتی حاوی آسکوربیک اسید روند افزایشی دارد و پس از آن کم می‌شود. مطابق شکل ۸، در داربست‌های کامپوزیتی حاوی بیشترین نانوذرات کیتوسان، فعالیت این آنزیم بیشتر بوده است.



شکل ۷. ریخت‌شناسی سلول‌های کشت داده شده روی داربست‌های SF (الف)، SF-Ch AA (۱) (ب)، SF-Ch AA (۲) (ج) و SF-Ch AA (۳) (د)



شکل ۸. فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز سلول‌های استخوانی کشت داده شده روی داربست‌های کامپوزیتی در شرایط برون تن در روزهای ۳، ۷ و ۱۴

رسوب کلسیم سلول، یکی از شاخصه‌های تمایز استخوانی است که با کم شدن فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز و در نتیجه، مینرالی شدن افزایش می‌یابد [۲۷]. در شکل ۹، نتایج

¹ Mesenchymal Stem Cells

² Co-Factor

³ Gene Expression

⁴ Marker Expression

⁵ Integrins

- (JAMT), Vol. 2, No. 4, (2014), 10-18. <https://dx.doi.org/10.30501/jamt.2010.70229>
4. Naskar, D., Ghosh, A. K., Mandal, M., Das, P., Nandi, S. K., Kundu, S. C., "Dual growth factor loaded nonmulberry silk fibroin/carbon nanofiber composite 3D scaffolds for in vitro and in vivo bone regeneration", *Biomaterials*, Vol. 136, (2017), 67-85. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.05.014>
 5. Dash, M., Chiellini, F., Ottenbrite, R. M., Chiellini, E., "Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications", *Progress in Polymer Science*, Vol. 36, No. 8, (2011), 981-1014. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.02.001>
 6. Inamdar, N. N., Mourya, V., "Chitosan and low molecular weight chitosan: Biological and biomedical applications", *Advanced Biomaterials and Biodevices*, 1st Ed., Tiwari, A., Nordin, A. Edition, Elsevier, Wiley Blackwell, (2014), 1-554. <https://doi.org/10.1002/9781118774052.ch6>
 7. Leena, R. S., Vairamani, M., Selvamurugan, N., "Alginate/gelatin scaffolds incorporated with silibinin-loaded chitosan nanoparticles for bone formation in vitro", *Colloids and Surfaces, B: Biointerfaces*, Vol. 158, (2017), 308-318. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.06.048>
 8. Berger, J., Reist, M., Mayer, J. M., Felt, O., Peppas, N. A., Gurny, R., "Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications", *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, Vol. 57, No. 1, (2004), 19-34. [https://doi.org/10.1016/s0939-6411\(03\)00161-9](https://doi.org/10.1016/s0939-6411(03)00161-9)
 9. Zhou, X., Liu, P., Nie, W., Peng, C., Li, T., Qiang, L., He, C., Wang, J., "Incorporation of dexamethasone-loaded mesoporous silica nanoparticles into mineralized porous biocomposite scaffolds for improving osteogenic activity", *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 149, (2020), 116-126. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.237>
 10. Jang, K. I., Lee, H. G., "Stability of chitosan nanoparticles for l-ascorbic acid during heat treatment in aqueous solution", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 56, No. 6, (2008), 1936-1941. <https://doi.org/10.1021/jf073385e>
 11. Bazelli, F., Attar, H., Amoabedini, G., Iman, M., "Encapsulated of ascorbic acid in the nanomicelle", *New Cellular and Molecular Biotechnology Journal*, Vol. 5, No. 20, (2015), 89-96. <http://ncmbjpiu.ir/article-1-703-en.html>
 12. Moaddab, M., Nourmohammadi, J., Rezayan, A. H., "Bioactive composite scaffolds of carboxymethyl chitosan-silk fibroin containing chitosan nanoparticles for sustained release of ascorbic acid", *European Polymer Journal*, Vol. 103, (2018), 40-50. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2018.03.032>
 13. Melke, J., Midha, S., Ghosh, S., Ito, K., Hofmann, S., "Silk fibroin as biomaterial for bone tissue engineering", *Acta Biomaterialia*, Vol. 31, (2016), 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.09.005>
 14. Sultana, N., Hassan, M. I., Ridzuan, N., Ibrahim, Z., Soon, C. F., "Fabrication of gelatin scaffolds using thermally induced phase separation technique", *International Journal of Engineering*, Vol. 31, No. 8, (2018), 1302-1307. <http://dx.doi.org/10.5829/ije.2018.31.08b.19>
 15. Ghalei, S., Nourmohammadi, J., Solouk, A., Mirzadeh, H., "Enhanced cellular response elicited by addition of amniotic fluid to alginate hydrogel-electrospun silk fibroin fibers for potential wound dressing application", *Colloids and Surfaces, B: Biointerfaces*, Vol. 172, (2018), 82-89. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.08.028>
 16. Mirhadi, S. M., Hassanzadeh Nemati, N., "Synthesis and characterization of highly porous TiO₂ scaffolds for bone defects", *International Journal of Engineering*, Vol. 33, No. 2, (2020), 134-140. <https://dx.doi.org/10.5829/ije.2020.33.01a.15>
 17. Abbasizadeh, N., Rezayan, A. H., Nourmohammadi, J., Kazemzadeh-Narbat, M., "HHC-36 antimicrobial peptide loading on silk fibroin (SF)/hydroxyapatite (HA) nanofibrous-coated titanium for the enhancement of osteoblast and bactericidal functions", *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, Vol. 69, No. 10, (2020), 629-639. <https://doi.org/10.1080/00914037.2019.1596913>
 18. Abul Kalam, M., Khan, A. A., Khan, S., Almalik, A., Alshamsan, A., "Optimizing indomethacin-loaded chitosan nanoparticle size,

Col1 می‌شود. این عمل به فسفریله کردن ERK1/2 در مسیر علامت‌دهی^۱ MAPK و انتقال بعدی P-ERK1/2 به هسته منجر می‌شود که Runx2 را با فسفریله کردن فعال می‌کند [۳۱] و [۲۶].

۴- نتیجه‌گیری

در این پژوهش، سعی شد داربستی سه‌بعدی از فیبروئین ابریشم با قابلیت رهایش داروی آسکوربیک اسید، به‌منظور بازسازی استخوان، ساخته و خواص آن بررسی شود. نتایج طیف‌سنجی تبدیل فوریه فروسرخ بیانگر قرارگیری موفقیت‌آمیز نانوذرات در داربست فیبروئینی بود. تصاویر میکروسکوپ الکترونی از داربست‌ها، ساختار متخلخل را به‌خوبی نشان داد. همچنین، رهایش آسکوربیک اسید نیز با افزایش غلظت نانوذرات افزایش یافت. افزون بر این، با افزایش غلظت آسکوربیک اسید، زنده‌مانی، تکثیر و فعالیت آلکالین فسفاتاز سلول‌های MG63 افزایش یافت. سلول‌ها نیز به‌خوبی به سطح داربست‌ها چسبیدند و پهن‌شدگی آن‌ها با افزودن نانوذرات بهبود یافت. به‌طورکلی، نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش نشان داد که داربست کامپوزیتی فیبروئین ابریشم-آسکوربیک اسید می‌تواند داربستی مناسب برای اهداف مهندسی بافت استخوان باشد.

۵- سپاسگزاری

نویسندگان لازم می‌دانند بدینوسیله از همکاری و حمایت مسئولین و همکاران در دانشکده علوم و فنون نوین دانشگاه تهران قدردانی و تشکر نمایند.

مراجع

1. Chocholata, P., Kulda, V., Babuska, V., "Fabrication of scaffolds for bone-tissue regeneration", *Materials*, Vol. 12, No. 4, (2019), 568. <https://doi.org/10.3390/ma12040568h>
2. Sommer, M. R., Vetsch, J. R., Leemann, J., Müller, R., Studart, A. R., Hofmann, S., "Silk fibroin scaffolds with inverse opal structure for bone tissue engineering", *Journal of Biomedical Materials Research, Part B: Applied Biomaterials*, Vol. 105, No. 7, (2017), 2074-2084. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33737>
3. Montazeri, M., Karbasi, S., Monshi, A., Ebrahimi Kahrizsangi, R., "Evaluation of bioactivity poly-3-hydroxybutyrate coated nano-bioglass 45S5 composite scaffolds for bone tissue engineering", *Journal of Advanced Materials and Technologies*

¹ Signaling

- Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 133, (2019), 795-803. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomac.2019.04.165>
26. Takamizawa, S., Maehata, Y., Imai, K., Senoo, H., Sato, S., Hata, R. I., "Effects of ascorbic acid and ascorbic acid 2-phosphate, a long-acting vitamin C derivative, on the proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells", *Cell Biology International*, Vol. 28, No. 4, (2004), 255-265. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2004.01.010>
 27. Santo, V. E., Duarte, A. R. C., Popa, E. G., Gomes, M. E., Mano, J. F., Reis, R. L., "Enhancement of osteogenic differentiation of human adipose derived stem cells by the controlled release of platelet lysates from hybrid scaffolds produced by supercritical fluid foaming", *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, Vol. 162, No. 1, (2012), 19-27. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.06.001>
 28. Choi, H. K., Kim, G. J., Yoo, H. S., Song, D. H., Chung, K. H., Lee, K. J., Koo, Y., An, J. H., "Vitamin C activates osteoblastogenesis and inhibits osteoclastogenesis via Wnt/ β -catenin/ATF4 signaling pathways", *Nutrients*, Vol. 11, No. 3, (2019), 506. <https://doi.org/10.3390/nu11030506>
 29. Lin, H. Y., Lai, R. H., Lin, S. T., Lin, R. C., Wang, M. J., Lin, C. C., Lee, H., Wang, F., Chen, J. Y., "Suppressor of cytokine signaling 6 (SOCS6) promotes mitochondrial fission via regulating DRP1 translocation", *Cell Death and Differentiation*, Vol. 20, No. 1, (2013), 139-153. <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.106>
 30. Fujisawa, K., Hara, K., Takami, T., Okada, S., Matsumoto, T., Yamamoto, N., Sakaida, I., "Evaluation of the effects of ascorbic acid on metabolism of human mesenchymal stem cells", *Stem Cell Research & Therapy*, Vol. 9, No. 1, (2018), 93. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0825-1>
 31. Ishikawa, S., Iwasaki, K., Komaki, M., Ishikawa, I., "Role of ascorbic acid in periodontal ligament cell differentiation", *Journal of Periodontology*, Vol. 75, No. 5, (2004), 709-716. <https://doi.org/10.1902/jop.2004.75.5.709>
 - encapsulation, and release using Box-Behnken experimental design", *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 87, (2016), 329-340. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomac.2016.02.033>
 19. Ghaee, A., Nourmohammadi, J., Danesh, P., "Novel chitosan-sulfonated chitosan-polycaprolactone-calcium phosphate nanocomposite scaffold", *Carbohydrate Polymers*, Vol. 157, (2017), 695-703. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.10.023>
 20. Ryu, S., Kim, H. H., Park, Y. H., Lin, C. C., Um, I. C., Ki, C. S., "Dual mode gelation behavior of silk fibroin microgel embedded poly (ethylene glycol) hydrogels", *Journal of Materials Chemistry B*, Vol. 4, No. 26, (2016), 4574-4584. <https://doi.org/10.1039/C6TB00896H>
 21. Nourmohammadi, J., Roshanfar, F., Farokhi, M., Haghighi Nazarpak, M., "Silk fibroin/kappa-carrageenan composite scaffolds with enhanced biomimetic mineralization for bone regeneration applications", *Materials Science and Engineering: C*, Vol. 76, (2017), 951-958. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.166>
 22. Shao, J., Zheng, J., Liu, J., Carr, C. M., "Fourier transform raman and fourier transform infrared spectroscopy studies of silk fibroin", *Journal of Applied Polymer Science*, Vol. 96, No. 6, (2005), 1999-2004. <https://doi.org/10.1002/app.21346>
 23. Budiraharjo, R., Neoh, K. G., Kang, E. T., "Hydroxyapatite-coated carboxymethyl chitosan scaffolds for promoting osteoblast and stem cell differentiation", *Journal of Colloid and Interface Science*, Vol. 366, No. 1, (2012), 224-232. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.09.072>
 24. Bunaciu, A. A., Bacalum, E., Aboul-Enein, H. Y., Elena Udristioiu, G., Fleschin, S., "FT-IR spectrophotometric analysis of ascorbic acid and biotin and their pharmaceutical formulations", *Analytical Letters*, Vol. 42, No. 10, (2009), 1321-1327. <https://doi.org/10.1080/00032710902954490>
 25. Zadegan, S., Nourmohammadi, J., Vahidi, B., Haghighipour, N., "An investigation into osteogenic differentiation effects of silk fibroin-nettle (*Urtica dioica* L.) nanofibers", *International*