

## سیستم های نوین دارورسانی بر پایه پلیمر فیبروئین ابریشم

حمیدرضا متصلی زاده<sup>۱</sup>، فاطمه رضایی<sup>۲</sup>، یوسف فتاحی<sup>۱</sup>، حمید ملاکاظمی ها<sup>۱</sup>، امیر امانزاده<sup>۳</sup>، مهدی فرخی<sup>۳\*</sup>

۱. گروه نانوفناوری دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۲. گروه مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران، ایران
۳. بخش بانک سلولی، انتیتو پاستور ایران، تهران، ایران

### چکیده

امروزه طراحی و ساخت سیستم های دارورسانی مناسب برای بهینه کردن کارایی درمانی داروها و کاهش عوارض جانبی آنها، ضروری است. تاکنون، ساختارهای مختلفی برای دارورسانی طراحی شده اند که در بین آنها، سیستم های بر پایه پلیمرهای طبیعی، توجه بیشتری را به خود جلب کرده اند. فیبروئین ابریشم یک پلیمر پروتئینی طبیعی است که به واسطه خصوصیت های منحصر به فردی از جمله زیست سازگاری عالی، زیست تخریب پذیری، خواص مکانیکی خوب، فرآیند پذیری آسان و نیز قابلیت تشکیل نانوذره، میکروژره، الیاف، هیدروژل، فیلم و ... گزینه مناسبی برای کاربردهای زیست پزشکی به ویژه دارورسانی است. در این مقاله مرواری، ویژگی های مختلف پلیمر ابریشم و کاربردهای آن در دارورسانی مورد بررسی قرار می گیرد.

### واژه های کلیدی:

فیبروئین ابریشم، دارورسانی، زیست پزشکی

### مقدمه

دو گروه پلیمرهای طبیعی و سنتزی دارای مزایا و معایبی هستند. پلیمرهای سنتزی در مقایسه با پلیمرهای طبیعی، دارای یکنواختی ساختاری، خلوص بیشتر و توانایی کنترل رهایش داروی بیشتر هستند. شرایط واکنش سخت تر و استفاده از حللاهای آلی برای تهیه نانوذره ها با استفاده از پلیمرهای سنتزی، کاربرد آنها را با محدودیت مواجه کرده است. پلی لاتکیک اسید (PLA)، پلی گلیکولیک اسید (PGA)، پلی لاتکیک- گلیکولیک اسید (PLGA) و پلی آکیل سیانوکریلات پلیمرهای سنتزی نویددهنده ای برای کاربردهای بالینی هستند<sup>(۳۷,۳۵)</sup>. با این حال، علیرغم طیف گسترده ای از پلیمرهای سنتزی موجود، اکثر سیستم های دارویی مجاز (دارای مجوز سازمان غذا و داروی ایالات متحده آمریکا (FDA)) به دلیل خواصی از جمله توانایی تخریب در محیط درون تن، فارماکوکینتیک مناسب و میزان تخریب قابل کنترل بر پایه PLGA، هستند. با این حال کاربردهای PLGA با برخی محدودیت هایی از قبیل القای التهاب موضعی و محدودیت در رساندن پروتئین های درمانی به دلیل استفاده

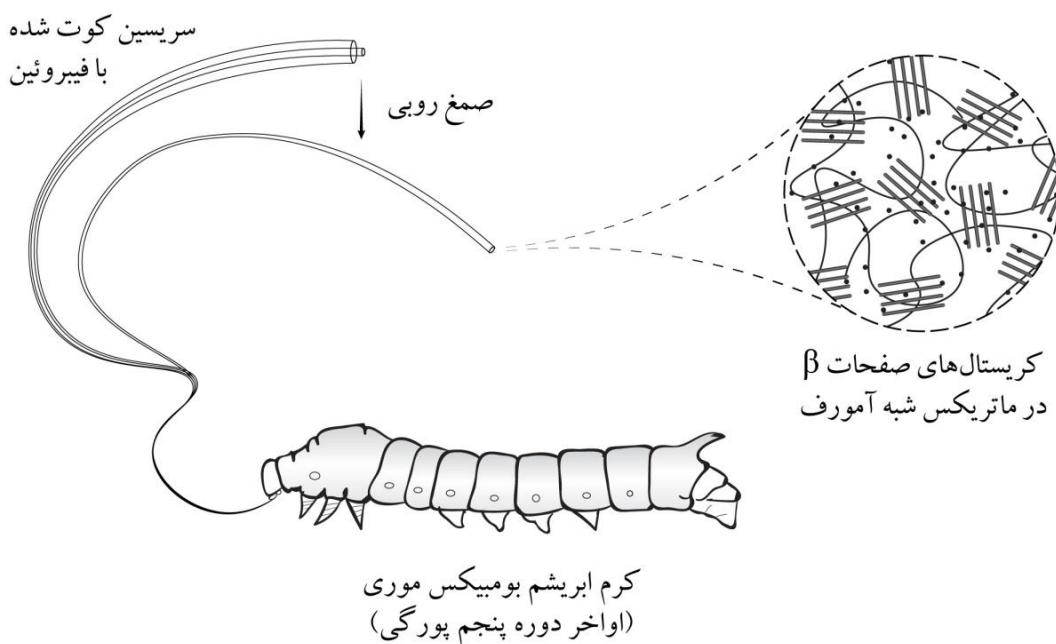
یکی از مهم ترین چالش هایی که در زمینه دارورسانی مطرح است، نفوذ پذیری به سلول های غیر هدف و اثرهای جانبی مختلف است. سیستم های نوین دارورسانی به منظور کاهش اثرهای جانبی داروها، بهینه سازی کارایی درمانی آنها و افزایش رضایتمندی بیماران طراحی می شوند. به این منظور سیستم های بسیاری با ساختار و مورفولوژی های متفاوت نظری فیلم ها، الیاف ها، ژل ها، اسفنجه ها، میکروژره ها و نانوذره ها طراحی شده اند. در ساخت حامل های دارویی می توان از پلی مرهای زیست تخریب پذیر سنتزی و طبیعی برای کنترل رهایش داروها استفاده کرد که در این میان سیستم هایی که بر پایه پلیمرهای طبیعی هستند به دلیل مزایایی از جمله زیست سازگاری، زیست تخریب پذیری، قیمت مناسب و در دسترس بودن، توجه زیادی را به خود جلب کرده اند<sup>(۶, ۳۷, ۳۵)</sup>.

نویسنده مسئول: ایران، تهران، انتیتو پاستور ایران، بخش، بانک سلولی

پست الکترونیکی: M\_farokhi@pasteur.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۶/۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۹/۱۲



شکل ۱: چرخش طبیعی کرم های ابریشم برای تولید الیاف فیبروئین با ویژگی های خاص

رسید (۱۸). در چند دهه اخیر استفاده از ابریشم به عنوان ساختارهای زیست پزشکی رو به افزایش است. ابریشم به علت استحکام و سختی زیاد که به طور کلی به علت دارا بودن ساختارهای تاخورده ناهم سو بتا است، گزینه مناسبی برای کاربردهای زیستی به شمار می رود. پروتئین ابریشم شامل رشته مرکزی از نوع پلی مرهای پروتئینی (فیبروئین)، یک پوسته چسبنده پروتئینی (سریسین) و همچنین نوعی پوشش از جنس پروتئین است. به بیان دیگر، ابریشم خام شامل دو الیاف موازی فیبروئین است که به وسیله یک لایه سریسین روی سطحشان، کنار هم قرار می گیرند. بعد از صمعنگ زدایی ابریشم خام با از بین بردن سریسین، الیاف های فیبروئین درخشن و نرم به دست می آیند (شکل ۱) الیاف های فیبروئین از ترکیب خواص جذابی از قبیل استحکام، چقرمگی<sup>۲</sup>، زیست- سازگاری، زیست تخریب پذیری و پایداری حرارتی برخوردار هستند که نماینده یکی از تأثیرگذارترین الیاف های پروتئینی طبیعی است که با این خواص بر بسیاری الیاف های سنتزی و طبیعی پیشی می گیرد (۳۵، ۲۳).

سریسین یک پلی مر محلول در آب است و وزن مولکولی آن در محدوده وسیع ۱۰-۳۰۰ کیلو دالتون است. به طور معمول از این پوشش خارجی به عنوان چسب یاد می شود ولی شواهدی موجود است که نشان می دهد این ماده علاوه بر

از حلال های آلی مواجه است (۳۵، ۴۴، ۵۴). پلی مرهای طبیعی (مانند آرژینات، کیتوسان، کلاژن، دکستران و ژلاتین) با دارا بودن زیست سازگاری و زیست تخریب پذیری بالاتر نسبت به پلی مرهای سنتزی و شباht به ماکرومولکول های زیستی می توانند جایگزین مناسبی برای پلی مرهای سنتزی باشند. اما عدم توانایی دست یابی به نرخ رهایش قابل کنترل و رهایش پیوسته طولانی مدت، از محدودیت های پلی مرهای طبیعی به شمار می روند (۵۲). در نتیجه تحقیق هایی بر روی سیستم های دارورسانی کنترل شده بر پایه فیبروئین ابریشم<sup>۱</sup> برای غلبه بر رهایش محدودیت های سایر پلی مرهای طبیعی گسترش یافته است. پروتئین ابریشم یک پلی مر دارای مجوز FDA با خصوصیت های منحصر به فرد از جمله سرعت تخریب پایین، خواص مکانیکی فوق العاده، فرآیند پذیری آسان در ترکیب با زیست سازگاری عالی است که به طور موفقیت آمیزی در کاربردهای گستردۀ از صنعت نساجی تا پزشکی و دارورسانی استفاده شده است.

### ویژگی های فیبروئین ابریشم

ابریشم به طور عمومی به عنوان یک پلی مر پروتئینی شناخته می شود که توسط کرم ابریشم، عنکبوت و یا حشره ها ریسیده می شود. ابریشم در حدود ۲۷۰۰ سال قبل از میلاد مسیح، در چین کشف شد و در قرن ششم از طریق جاده ابریشم به اروپا

است. P25 به هر دو زنجیره سبک و سنگین توسط پیوندهای داخلی غیرکوالنت متصل و برای تجمع زنجیره‌های سبک و سنگین لازم است (۴۵). زنجیره سنگین، پروتئین تشکیل-دهنده لیف است و ساختارش خواص خواص لیف ابریشم را تعیین می‌کند. زنجیره سنگین به طور معمول به عنوان پروتئین ابریشم شناخته می‌شود.

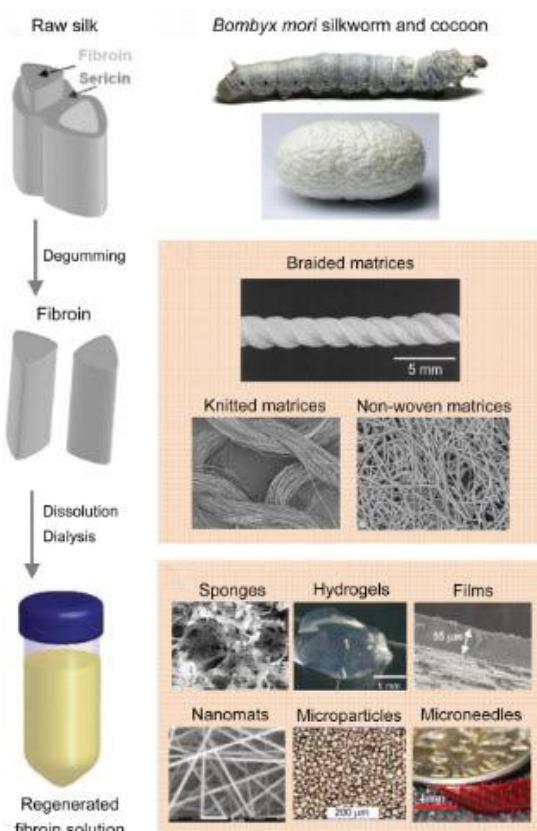
شکل ۲، ابریشم تولید شده به وسیله کرم ابریشم بمبیکس موری<sup>۳</sup> که ابریشمی با بهترین مشخصه‌ها است را نشان می-دهد. همان‌طور که گفته شد، ابریشم خام شامل دو الیاف فیبروئین که با یک لایه سریسین در سطحشان کنار هم قرار گرفته‌اند، است. برای صمع‌زدایی ابریشم (حذف سریسین)، از سدیم کربنات (رایج‌ترین محلول بازی) استفاده می‌شود تا رشته‌های فیبروئین بازسازی شده، حاصل گردد و سپس به دنبال آن با استفاده از غلظت بالای محلول‌های نمکی از قبیل لیتیم بروماید (رایج‌ترین نمک)، لیتیم تیوسیانات، کلسیم تیوسیانات و کلسیم کلراید برای از بین بردن پیوند هیدروژنی پایدارکننده صفحه‌های بتا و سپس دیالیز در آب خالص، محلول فیبروئین به دست می‌آید (۴۶). در شکل ۲ کرم ابریشم بالغ و پیله تولید شده نیز نشان داده شده‌اند. با توجه به فرآیند پذیری همه جانبه فیبروئین ابریشم، سیستم‌های بسیاری با ساختار و مورفولوژی‌های متفاوت نظیر اسفنج‌ها، هیدروژل‌ها، فیلم‌ها، الیاف‌ها، میکروژرهای نانوذرهای می‌توان از محلول فیبروئین به دست آورد، اما فقط به این سیستم‌ها محدود نمی‌شود (شکل ۲). از مهم‌ترین این سیستم‌ها برای کاربردهای زیست پزشکی می‌توان به تهیه نخ‌های بخیه، حامل‌های دارویی برای رهایش کنترل شده و هم‌چنین داربست برای مهندسی بافت قرنیه، عصب، استخوان و ... اشاره کرد (۴۷،۴۶،۴۳،۱۲،۹).

#### صورت‌بندی‌های<sup>۴</sup> مختلف ابریشم

فیبروئین ابریشم می‌تواند در صورت‌بندی‌های مختلفی شامل ابریشم نوع ۱ (ابریشم I) و ابریشم نوع ۲ (ابریشم II) و ابریشم نوع ۳ (ابریشم III) وجود داشته باشد. ساختار نیمه پایدار و آب‌دست فیبروئین ابریشم بمبیکس موری، که به عنوان ابریشم  $\alpha$  یا ابریشم I شناخته می‌شود، می‌تواند به آسانی به

خاصیت چسبندگی به عنوان ماده ضدقارچ و ضدباکتری فعالیت دارد. از سایر خواص سریسین می‌توان به خاصیت آنتی‌اکسیدانی، مقاومت و محافظت در مقابل نور ماوراء بنسخ و هم‌چنین قابلیت جذب و آزادسازی رطوبت اشاره نمود (۴۸،۴۹). ابریشم خام با توجه به وجود سریسین یک ماده حساسیت‌زا بوده که منجر به ایجاد آلرژی از نوع اول می‌شود اما در صورتی که سریسین به طور کامل برطرف شود، پاسخی مبتنی بر حساسیت نسبت به ابریشم دریافت نخواهد شد (۴۰،۴۲،۳۵).

فیبروئین استخراج شده از ابریشم، شامل دو نوع زنجیره پلی-مری است. زنجیره سنگین<sup>۱</sup> (۳۹۱ KDa) و زنجیره سبک<sup>۲</sup> (۲۷ KDa) که توسط پیوندهای دی‌سولفیدی به یکدیگر متصل می‌شوند (۴۰). ماده دیگر موجود در فیبروئین، گلیکوپروتئین P25 است که برای کمک به تغییر و ترشح زنجیره سنگین فیبروئین مورد استفاده قرار می‌گیرد. نسبت زنجیره سنگین: زنجیره سبک: P25 برابر ۱:۶ است (۴۵). زنجیره سبک جهت ترشح پروتئین از غدد ابریشم ضروری



شکل ۲: ابریشم تولید شده به وسیله کرم ابریشم بمبیکس موری (۴۰).

<sup>3</sup> Bombyx mori

<sup>4</sup> H-chain

### ساختارهای مختلف پروتئین ابریشم

فیبروئین ابریشم بمبیکس موری، از بیش از ۵۰۰۰ آمینواسید تشکیل شده است. از نظر سازمانی، زنجیره سنگین فیبروئین ابریشم یک پلیمر بسیار منظم است که شامل ۱۲ ناحیه آب-گریز (نواحی کریستالی) با ۱۱ ناحیه آبدوست (نواحی آمورف) پراکنده، است (۵۲). فیبروئین یک ماکرومولکول عظیم شامل نواحی کریستالی به میزان دو سوم و نواحی آمورف به میزان یک سوم کل ماده، است. از نظر ساختاری فیبروئین ابریشم به عنوان یک کوپلیمر دسته‌ای<sup>۱</sup> طبیعی طبقه‌بندی می‌شود. بلوك‌های آب‌گریز شامل آمینواسیدهایی با زنجیره جانبی کوتاه مانند آلانین<sup>۲</sup> و گلایسین<sup>۳</sup> و سرین<sup>۴</sup> است، در حالی که بلوك‌های آب‌دوست شامل آمینواسیدهایی با زنجیره‌های جانبی حجمی همراه با گروه‌های آمینی باردار هستند. در این کوپلیمر بلوك‌های آب‌گریز از ترتیب توالی به صورت (گلایسین-آلانین-گلایسین-آلانین-سرین (GAGAS) تبعیت می‌کنند، ولی بلوك‌های آب‌دوست با ترتیب پیچیده‌تری ساخته شده‌اند (۵۱,۳).

ترکیب شیمیایی آمینواسیدهای تشکیل‌دهنده فیبروئین و سریسین مربوط به پروتئین ابریشم را می‌توان از مراجع آن یافت. طبق این مراجع، ترکیب درصد مولی آمینواسیدها در فیبروئین ابریشم به صورت ۴۶٪ / گلایسین، ۲۸٪ / آلانین، ۱۱٪ / سرین، ۵٪ / تیروسین<sup>۵</sup>، ۱٪ / والین<sup>۶</sup> و ۸٪ / دیگر آمینواسیدهای باقی‌مانده است. بنابراین خواص عمومی ابریشم با توجه به خواص این آمینواسیدها ارزیابی می‌شود (۲۱). نواحی کریستالی، ۹۴٪ از کل رشته فیبروئین را تشکیل داده‌اند و این نواحی کریستالی از تکرار متناوب هگزاپیتايدهای GAGAGA، GAGAGS، GAGAGY، GAGAGYG ساخته شده‌اند. GAGAGS بیشترین درصد (۷۰٪) را در رشته متناوب هگزاپیتايدها شامل می‌شود. هر ناحیه کریستالی به طور متوسط از ۴ زنجیره مجرماً بنا شکل شده است و شامل ۱۱ آمینواسید است. این زنجیرها از طریق پیچ‌های بنا که از آمینواسید GAAS ساخته شده است به‌هم‌دیگر مرتبط می‌شوند (۵۸). شکل ۳، زنجیره سنگین

<sup>1</sup> Block copolymer

<sup>2</sup> Alanine (A)

<sup>3</sup> Glycine (G)

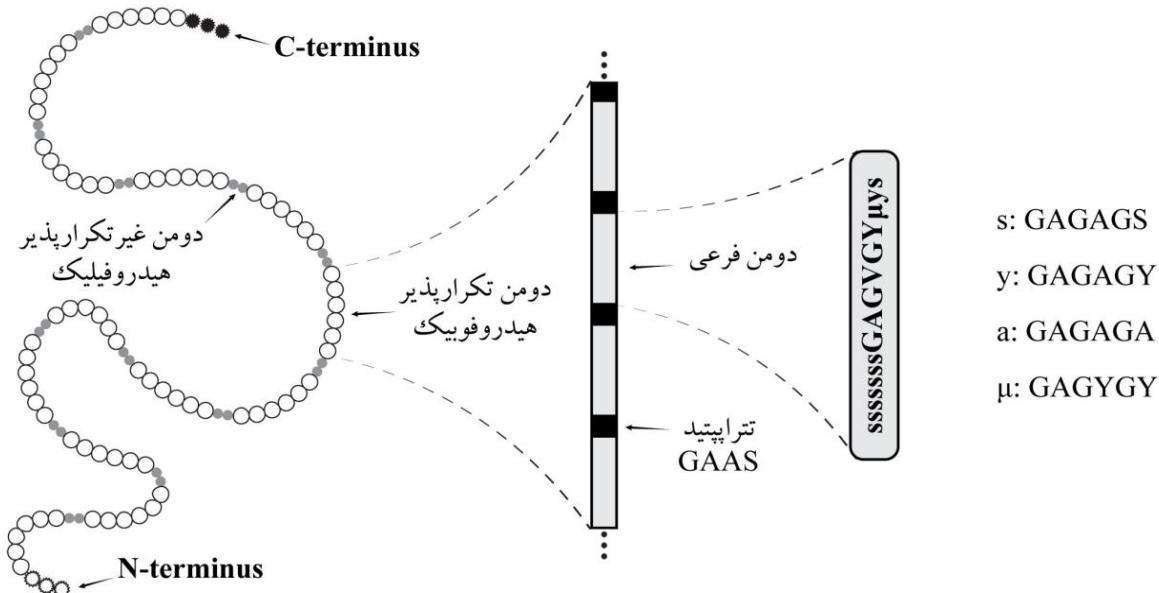
<sup>4</sup> Serine (S)

<sup>5</sup> Tyrosin (Y)

<sup>6</sup> Valine (V)

ابریشم آب‌گریز II با استفاده از روش‌های مختلف تبدیل شود. ابریشم II به آرایش مولکول‌های فیبروئین به صورت صفحه‌های بتا اشاره دارد که استحکام بیشتری دارد و مسئول بلورینگی بیش‌تر فیبروئین است. رایج‌ترین روش تبدیل ساختار درهم (مارپیچ یا ابریشم نوع ۱) ابریشم به ساختار ورقه‌های بتا (ساختار خیلی پایدار ابریشم نوع ۲) با یک حلal آلی است. حلal‌های آلی شناخته شده‌ای از جمله متانول، اتانول، استون و... در کریستالیزاسیون فیبروئین ابریشم و تبدیل یک ساختار درهم به یک ساختار ورقه‌ای بتا می‌تواند (۲۳). از دیگر روش‌ها برای القای ساختار ورقه‌ای بتا می‌توان به استفاده از دمای بالا، استفاده از pH نزدیک به نقطه ایزوکتریک فیبروئین ابریشم (نزدیک ۴)، استفاده از نمک و نیتروی برشی اشاره کرد (۵۲). اگرچه کریستالینیتی، اساس پایداری سیستم‌های بر پایه فیبروئین ابریشم است، با این حال افزایش بیش از حد کریستالینیتی منجر به کاهش انعطاف‌پذیری و منجر به شکننده شدن سیستم‌ها می‌شود. به علاوه، در زمان دارورسانی مولکول‌های حساس مانند فاکتورهای رشد به وسیله فیبروئین ابریشم، از روش‌های ملایم‌تر باید استفاده شود. استفاده از بخار آب می‌تواند یک جایگزین بهتر برای القاء ساختار ورقه‌ای بتا باشد. آنالیز کانفورماتیون <sup>13</sup>C-MAS NMR فیلم‌ها و نانولیاف‌های فیبروئین ابریشم نشان داد که درصد ابریشم II بعد از القا به وسیله بخار آب (۴٪ / ۳۰٪) کم-تر از استفاده از متانول (۷۴٪) است. تغییر در کریستالینیتی و در نتیجه آب‌دوستی، گزینه‌هایی برای تأثیر بر روی برهمنکش بین مولکول‌های دارو و فیبروئین ابریشم و هم‌چنین سرعت تخریب آن عرضه می‌کند که می‌تواند یک گزینه جذاب برای سیستم‌های دارورسانی با کینتیک رهایش مشخص باشد (۵۲).

ابریشم I یک محلول پایدار است که در غدد کرم ابریشم ذخیره می‌شود. صورت‌بندی ابریشم I به طور کامل شناخته شده نیست و به صورت مجموعه‌ای از صورت‌بندی‌ها (از میزان آرایش یافتنگی خیلی پایین تا بلورهای آرایش یافته) وجود دارد. شکل‌های آرایش یافته‌تر در حالت‌های گذار قبل از رسندگی ابریشم II شکل می‌گیرند. ابریشم II همان فیبروئین جامد است که می‌تواند به صورت الیاف ابریشم رسندگی شود و صورت‌بندی به طور کامل شناخته شده‌ای دارد. خلاصه‌ای از خواص ساختمانی پروتئین‌های سریسین و فیبروئین در جدول ۱ بیان شده است.



شکل ۳: شماتیک زنجیره فیروئین ابریشم

وجود دارد، باعث تمامیت و پیوستگی در کل لیف می‌شود (۱۴,۵۱).

#### خواص زیستی پروتئین ابریشم

جدا از هندسه و خواص مکانیکی، زیست سازگاری و زیست تخریب پذیری برای کاربردهای پزشکی مسائل مهمی هستند. پلیمرهای مصنوعی مانند PLA، PLGA، پلی-کاپرولاکتان و پلیمرهای طبیعی مانند ابریشم، آلتینات، کراتین، الاستین و کلائز به دلیل این خواص، برای کاربردهای پزشکی استفاده می‌شوند.

مواد طبیعی به دلیل خواص ساختاری و زیست سازگاری فوق العاده شان بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. اگرچه نگرانی‌هایی در مورد زیست سازگاری ابریشم بمبیکس موری به عنوان عامل حساسیت‌زا نوع اول مطرح است و کاربردهای پزشکی ابریشم به این دلیل کاهش پیدا کرد، اما مشخص شد که سریسین مسبب ایجاد این حساسیت بوده است (۱۳). با جداسازی سریسین و یا پوشش سیلیکون یا واکس در ساختار تجاری، واکنش حساسیت‌زا مشاهده نشد. بنابراین ابریشم اولیه (فیبروئین و صمغ سریسین) بالقوه آلرژی‌زا بوده، اما ابریشم صمغ‌گیری شده که سریسین از آن جدا شده است، زیست‌سازگار است.

#### تخریب زیستی پروتئین ابریشم

در دهه اخیر، تنوع وسیع پلیمرهای زیست تخریب پذیر سنتری و طبیعی برای کاربردهای پزشکی و داروسازی مورد بررسی

فیروئین را نشان می‌دهد. این زنجیره، شامل قسمت‌های تکراری آب‌گریز که در بین دامنه‌های تکرارناپذیر آب‌دوست قرار گرفته‌اند، است. هر قسمت تکرار شونده شامل زیر مجموعه‌هایی است که توسط پپتیدهای چهارگانه جدا می‌شوند. هر زیر مجموعه شامل واحدهای تکرار شونده مختلف پپتیدهای شش‌گانه هستند و توسط پپتیدهای چهارگانه GAAS تمام می‌شوند (۲۳).

#### خواص مکانیکی پروتئین ابریشم

خواص مکانیکی ابریشم، آن را از سایر مواد طبیعی شناخته شده، متمایز می‌سازد. خواص ابریشم به علت باندهای هیدروژنی زیاد، طبیعت آب‌گریز پروتئین و بلورینگی قابل توجه آن، است. مدول الاستیک ابریشم بمبیکس موری ۱۷-۶۱۰ گیگاپاسکال و استحکام کششی آن ۶۹۰-۱۵ گیگاپاسکال است (۱). این خواص با افزایش درصد فیبروئین ابریشم، کاهش سایز و افزایش یکنواختی منافذ، افزایش می‌یابند. ترکیب مقاومت مکانیکی و ازدیاد طول شکست بالا در لیاف ابریشم آن را به ماده‌ای خاص تبدیل نموده است. ازدیاد طول تا پارگی غیرعادی در این لیاف به روشنی توضیح داده نشده است، ولی در بسیاری از تحقیق‌ها، آن را به قابلیت کشش نواحی آمورف و تبدیل آن‌ها به فرم‌های کشیده شده نسبت می‌دهند. استحکام بالا در ابریشم به وجود صفحه‌های بتا که در قالب نواحی بلورین گرد هم آمده‌اند، نسبت داده می‌شود. هم‌چنین پیوندهای آب‌گریز که بین نواحی بلورین

مقدار کمی ساختار بلوری ابریشم نوع II، در محلول آنزیم پروتئولیتیک (پروتئاز XIV) غوطه ور شد، ساختار بلوری ابریشم نوع II ناپدید شد و ساختار ابریشم نوع I تشکیل شد (۲۸). کلاژناز IA، ابریشم نوع II را بهمیزان کم، تخریب می کند. اعتقاد بر این است که کیموتربیپسین، ابریشم را تخریب می کند ولی اثر قابل محسوسی بر روی تخریب فیلم های ابریشم ندارد (۳). علاوه بر آنزیم های پروتئولیتیک، فیبروئین ابریشم می تواند توسط روش های دیگر، مانند تابش اشعه گاما تخریب شود. تابش گاما، به طور مستقیم بر روی کاهش استحکام کششی الیاف فیبروئین اثر می گذارد. با توجه به تضعیف پیوند پپتیدی در پلی پپتیدها، کاهش ساختار صفحه ای بتا و همچنین رهایش پروتئین های با وزن مولکولی کم در محصول های تخریب، می توان نتیجه گرفت که تخریب زیستی فیبروئین ابریشم با افزایش شدت اشعه گاما، افزایش می یابد (۳).

### ساختارهای مختلف فیبروئین ابریشم برای کاربرد رهایش عامل های درمانی

پروتئین ابریشم، یک پلی مر دارای مجوز FDA است که به طور موفقیت آمیز به عنوان نخ بخیه و سیستم های رهایش دارو کاربرد دارد. این پروتئین، خصوصیت های مکانیکی بسیار عالی، فرآیند فعال سازی قابل انعطاف و زیست سازگاری بسیار بالایی دارد (۳۵). داروها یا به صورت سطحی یا حجمی در حامل های فیبروئین بارگذاری می شوند. این حالت ها به نوع دارو، مقدار بارگذاری و کینتیک رهایش مورد نیاز بستگی دارد. در بارگذاری سطحی، عامل های درمانی به طور مستقیم بر روی حامل فیبروئین، اتصال یا جذب می شوند (۲۳). گروه های عاملی بسیاری که در سطح ابریشم وجود دارد، امکان اصلاح شیمیایی این پلی مر و اتصال داروهای متنوعی را فراهم می سازد و همچنین شرایط فرآیندی ملایم این پلی مر امکان بارگذاری داروهای حساس را امکان پذیر می سازد (۳۵).

در بارگذاری حجمی، عامل های درمانی در بین رشته های فیبروئینی به دام می افتدند. به طول معمول بارگذاری حجمی به بارگذاری سطحی ترجیح داده می شود، به این دلیل که بارگذاری حجمی، اجازه بارگذاری عامل های درمانی بهمیزان بیشتر و رهایش طولانی مدت تر و پیوسته تری را می دهد. در بارگذاری حجمی، عامل های درمانی در داخل محلول ابریشم

قرار گرفته اند. پلی مرهای زیست تخریب پذیر طبیعی مانند کلاژن، ژلاتین و فیبروئین ابریشم مزایای بسیار خوبی نسبت به پلی مرهای سنتزی دارند که دلیل آن، خواص مطلوبی از قبیل زیست سازگاری، زیست تخریب پذیری است. زیست تخریب پذیری، شکست مواد پلی مرهی به اجزای کوچک تر است. بسته به حالت تخریب، فیبروئین ابریشم می تواند به صورت پلی مرهای قابل تخریب با آنزیم ها طبقه بندی گردد (۱۰، ۳). آنزیم ها نقش مهمی در تخریب فیبروئین بازی می کنند. به دلیل تخریب آنزیمی، خواص فیزیکی - شیمیایی، مکانیکی و بیولوژیکی خاص فیبروئین ابریشم به طور گسترده مورد بررسی قرار گرفته اند. تخریب آنزیمی مواد زیستی یک فرآیند دو مرحله ای است. مرحله اول جذب آنزیم روی سطح لایه از طریق دامنه سطح اتصال و دومین مرحله هیدرولیز پیوند استری است. به عنوان یک پروتئین، فیبروئین ابریشم مستعد تخریب زیستی توسط آنزیم های پروتئولیتیک مانند کیموتربیپسین، پروتئاز XIV و کلاژناز IA است (۲۸). در ابتدا، ابریشم توسط آنزیم های مختلف جذب می شود که نیازمند این است آنزیم ها دامنه های اتصال روی سطح مواد را، پیدا کنند. بعد از آن، ابریشم به وسیله آنزیم ها هضم می شود. محصول های حاصل از تخریب فیبروئین ابریشم به آسانی در محیط درون تن جذب می شوند. این یکی از مزایای ابریشم است که در زمینه پزشکی کاربرد دارد (۲۸). ابریشم نسبت به آنزیم های مختلف نرخ زیست تخریب پذیری، متفاوتی را از خود بروز می دهد. برخی مقاله ها بر روی تخریب پذیری فیبروئین ابریشم در مقابل آنزیم های پروتئولیتیک مختلف، تحقیق کرده اند. کیموتربیپسین برای تخریب مناطق آمورف فیبروئین مورد استفاده قرار می گیرد (۲۸). کیموتربیپسین می تواند پروتئین های فیبروئین محلول را تخریب کند و اثری بر روی صفحه های فیبروئینی ندارد. در مقابل، آنزیم های دیگر به خصوص پروتئاز XIV، به طور گسترده ای صفحه های فیبروئین را تخریب می نماید (۳). پس از تخریب زیستی، تغییر های قابل توجهی با توجه به ساختار و وزن مولکولی فیبروئین ابریشم، گزارش شده است. در مطالعه های برون تنی، رفتار تخریب ابریشم با آنزیم های پروتئولیتیک، فیبروئین های ابریشم به مناطقی با بلورینگی کمتر تقسیم می شوند که قادرند برای متabolیسم بیشتر، توسط سلول ها فاگوسیتوز شوند. به طور کلی، رفتار تخریب ابریشم، با توجه به نوع آنزیم ها متفاوت است. برای مثال، زمانی که صفحه فیبروئین ابریشم، شامل

اندازه منافذ می‌تواند با تغییر پارامترهای این تکنیک تغییر کند، اما منافذ به دست آمده تصادفی هستند (۵۲).

### فیلم‌های ابریشمی

فیلم‌های فیبروئین ابریشم توسط فرآیند ریخته‌گری محلول-های ابریشمی یونی، اسیدی و آبی تولید می‌شوند. هم‌چنین تکنیک‌های رسوب لایه به لایه چرخشی یا دستی برای تولید فیلم‌های خیلی نازک، استفاده می‌شوند. پایداری فیلم‌های ریخته‌گری شده توسط تکنیک‌هایی مانند خشک کردن، بازپخت آبی<sup>۵</sup> و غوطه‌وری در الكل برای بهبود ورقه‌های کریستالی بتا، انجام می‌شود (۲۵). فیلم‌های ساخته شده توسط این روش‌ها، به طور معمول شکننده هستند. بنابراین ساخت فیلم‌های کامپوزیتی فیبروئین ابریشم با مخلوط پلی-مرهای طبیعی یا سنتزی می‌تواند راه حل خوبی باشد. این فیلم‌های دو بعدی ساخته شده ممکن است کینتیک رهایش متفاوتی نسبت به ماتریکس‌های سه بعدی از خود نشان دهند (۵۲). با اتصال گروه‌های فعال پیتیدی به فیلم‌های ابریشمی از آن‌ها به عنوان ایمپلنت برای تشکیل استخوان و رهایش دارو استفاده شده است. هم‌چنین این فیلم‌ها برای رهایش داروی موضعی از طریق ایمپلنت کردن مستقیم کاربرد دارند (۴۲).

### الیاف ابریشمی-الکتروریسی شده

الیاف الکتروریسی شده دارای کاربردهای مختلفی از جمله غشاء‌های دارای چند عملکرد، فیلترها، تقویت‌کننده‌های کامپوزیتی و ... هستند که از میان کاربردهای مختلف تهیه داربست برای دارو رسانی و مهندسی بافت به دلیل توانایی تقلید ماتریکس خارج سلولی<sup>۶</sup> به یکی از زمینه‌های جذاب الکتروریسی تبدیل شده است (۴). الیاف ابریشم به دلیل خواص خوبی مانند جرم ویژه کم، استحکام زیاد، مقاومت گرمایی زیاد تا حدود ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد و زیست‌سازگاری با بدن موجود زنده، نظر پژوهشگران را در زمینه الیاف و پژوهشکی به خود جلب کرده است (۳۱). به کارگیری نانوالیاف در سامانه‌های رهایش دارو به دلیل نسبت زیاد سطح به حجم و پیشرفت‌های حاصل در به کارگیری آن‌ها به عنوان داربستی برای رشد سلول‌ها و ترمیم زخم مورد توجه پژوهشگران است (۲۵). از میان روش‌های متفاوت تهیه نانوالیاف، روش

مخلوط و یا حل شده و در ادامه حامل‌های پایدار مکانیکی (میکرو و نانوذره‌ها، فیلم و ...) ساخته می‌شوند (۲۳).

تا به امروز، ساختارهای مختلف فیبروئین ابریشم شامل اسفنج‌ها (۱۱،۸)، فیلم‌ها (۳۲،۱۷)، الیاف‌ها (۱۱،۸)، هیدروژل‌ها (۴۶،۲۰)، میکرو (۵۰،۲) و نانوذره‌ها (۴۰،۳۸،۱۵) برای کاربردهای رهایش دارو و مهندسی بافت توسعه یافته‌اند. در جدول ۲ تعدادی از پژوهش‌های انجام شده بر روی ساختارهای مختلف فیبروئین ابریشم فهرست شده است. در ادامه به اختصار به توضیح موارد فوق پرداخته می‌شود:

### اسفنج‌های سه بعدی متخلخل

اسفنج‌های متخلخل ابریشمی به دلیل ایجاد ریز محیط<sup>۱</sup> فیزیولوژیکی مشابه بدن گزینه مناسبی برای مهندسی بافت هستند. روش مورد استفاده برای ساخت اسفنج متخلخل، یک عامل مهم است که می‌تواند روی خواص آن، شامل تخلخل، زمان تخریب، خواص مکانیکی، شیمی سطح و... اثر بگذارد (۵۲،۳۷). اسفنج‌های متخلخل ابریشمی می‌توانند با استفاده از روش‌های از جمله فروشویی ذره‌ای و قالب‌گیری حلال<sup>۲</sup>، اسفنج شدن گازی<sup>۳</sup> و یا خشک کن انجام‌داد<sup>۴</sup> بعد از شکل دادن در قالب مناسب ایجاد شوند. استفاده از روش‌هایی مانند حلال شویی ذره‌ها منجر به کنترل بهتر بر روی تشکیل حفرها با سایز کنترل شده می‌شود ولی مدت طولانی حلال شویی ذره‌ها می‌تواند منجر به رهایش داروی بارگیری شده شود و هم‌چنین استفاده از غلظت‌های بالای نمکی می‌تواند تأثیر منفی بر روی یکنواختی و فعالیت داروهای حساس مانند فاکتورهای رشد داشته باشد. خشک کن انجام‌داد رایج‌ترین روش ایجاد ماتریکس اسفنجی متخلخل است. در این روش با کنترل دما و غلظت محلول ابریشم می‌توان سایز منافذ را در اسفنج متخلخل ابریشمی کنترل کرد. دمای پایین‌تر به دلیل کاهش زمان نیاز برای رشد کریستال‌ها، منجر به کاهش سایز حفره‌ها و افزایش تخلخل می‌شود در حالی که دمای بالاتر منجر به افزایش سایز حفره‌ها و کاهش تخلخل می‌شود. به علاوه افزایش غلظت محلول ابریشمی منجر به کاهش سایز حفره‌ها و کاهش ارتباط بین حفره‌ها می‌شود. اگرچه شکل و

<sup>5</sup> Water annealing

<sup>6</sup> Extracellular matrix (ECM)

<sup>1</sup> Microenvironment

<sup>2</sup> Solvent Casting and Particulate Leaching

<sup>3</sup> Gas forming

<sup>4</sup> Freeze drying

جدول ۱: خواص ساختمانی پروتئین های سریسین و فیبروئین.

فیبروئین ابریشم فیبروئین سنتگین	فیبروئین سبک گلیکوپروتئین P25	سریسین ابریشم ۱۹-۲۸٪	الیاف ابریشم
۳۹۱	۲۷	۲۵	پروتئین چسب مانند وزن مولکولی (KDa)
	آب گریز	آب دوست	قطبیت <sup>۱</sup>
ابریشم I (ماریچ های تصادفی و ساختار نامنظم)		ساختار غیربلورین یا آمورف	ساختار
ابریشم II (ساختار بلورین)			
پروتئین ساختمانی لیف		چسباندن در رشته فیبروئین به یکدیگر	وظیفه
فیلامت پروتئینی مرکزی		پروتئین پوشش دهنده	

فاصله بین نوک سرنگ و صفحه جمع آوری می تواند تغییر کند (۴۲). امروزه همه نوع دارو از قبیل آنتی بیوتیک ها، عوامل ضد سلطان، پروتئین ها می توانند در داخل داربست های الکترورسی شده جای داده شوند. مزیت اصلی حامل های لیفی رهایش موضعی کنترل شده داروها است.

الکترورسی انعطاف پذیری زیادی در انتخاب مواد برای کاربردهای رهایش دارو در اختیار می گذارد، به طوری که هم مواد زیست تخریب پذیر و هم مواد تخریب ناپذیر برای رهایش کنترل شده استفاده می شوند. قطر الیاف الکترورسی شده توسط خصوصیت های محلول (ویسکوزیته، هدایت، دما و ..)،

جدول ۲: برخی مطالعه های انجام شده بر روی ساختار های مختلف فیبروئین ابریشم

مرجع	نوع مطالعه	جزء اضافه شده به فیبروئین	پروتئین / دارو	فرمولاسیون
(۴۹)	برون تن	$\beta$ -TCP <sup>B</sup>	BMP-2 <sup>A</sup>	اسفنج سه بعدی
(۱۹)	برون تن	TiO <sub>2</sub> nanoparticles	-	
(۲۱)	برون تن	-	Curcumin	
(۲۲)	برون تن	Gelatin	Gentamicin	
(۱۷)	برون تن	-	Diltiazem, tetrahydrozoline, ciprofloxacin, tetracycline	فیلم
(۳۲)	برون تن	Gelatin	inulin	
(۴۳)	برون تن	PEO	HPL <sup>C</sup>	
(۲۹)	برون تن	SF nanospheres	Curcumin, doxorubicin	
(۴۶)	برون تن	Nanohydroxyapatite	-	هیدروزل
(۷)	برون تن	-	Risperidone	
(۲۰)	برون تن	-	Curcumin	
(۲)	برون تن / درون تن	-	BMP-2	
(۵۰)	برون تن	-	BMP-2, IGF-I <sup>D</sup>	میکرو ذره ها
(۳۰)	برون تن	-	quercetin	
(۳۴)	برون تن	-	Curcumin	
(۵۳)	برون تن	-	Paclitaxel, doxorubicin	

<sup>A</sup> Bone morphogenetic protein-2<sup>B</sup>  $\beta$ -tricalcium phosphate<sup>C</sup> Human platelet lysate<sup>D</sup> Insulin-like growth factor I

شده، در خود نگه دارد. هیدروزل ها در زمینه دارورسانی، توجه بسیاری را به خود جلب کرده اند (۲۷). به طور کلی، فاکتورهای بسیاری مانند کراس لینک شدن، اندازه تخلخل، تخریب پذیری،

هیدروزل فیبروئین ابریشم یک هیدروزل، شبکه ای از پلی مرهای آب دوست است که می تواند در آب متورم شده و مقدار زیادی آب را با ساختار حفظ

آنها شده است. به همین دلیل، پروتکل فرمولاسیون میکروذرها برای حفظ دارویی فعال، نیاز به بهینه سازی دارد. علی رغم مزیت های گفته شده برای سیستم های رهایش دارو بر پایه میکروذرها فیبروئین ابریشم، این محدودیت ها منجر به توسعه سیستم های نانوذره ای شد.

### نانوذره های فیبروئین ابریشم

نانوذره های زیست تخریب پذیر بر پایه پلی مرهای زیست ساز گار از اهمیت بسزایی برخوردار بوده اند. از مزایای نانوذره های زیست تخریب پذیر می توان به سهولت استفاده از آنها در جهت تحریک سیستم ایمنی، امکان بارگذاری هم زمان داروهای متنوع بر روی آنها اشاره کرد (۴۷). به علاوه، نانوذره ها با جلوگیری از تخریب دارو و افزایش پایداری بیولوژیکی منجر به افزایش فراهمی زیستی دارو، افزایش جذب بافتی و نفوذ سلولی در نتیجه کاهش هزینه بیمار و ریسک سمیت می شوند (۴۸). پلی مرهای طبیعی زیست ساز گار و زیست تخریب پذیر در محدوده نانو می توانند برای مدت طولانی بدون ایجاد سمیت در بدن باقی بمانند (۴۹).

در میان پلی مرهای طبیعی کاربرد نانوذره های فیبروئین ابریشم، به خاطر مزیت هایی مانند زیست ساز گاری، تخریب کنترل شده، شکل و اندازه ذره ها قابل کنترل، شرایط ملایم بارگذاری دارو، ظرفیت اتصال بالا برای داروهای مختلف و رهایش داروی پیوسته و کنترل شده، گسترش پیدا کرده اند. اندازه کوچک نانوذره های فیبروئین ابریشم باعث نفوذ آنها از میان مویرگ های کوچک می شود که این باعث افزایش جذب سلولی داروهای انکیپسوله شده و یا مولکول های درمانی می شود (۳۳). یکی از اصلی ترین مزایای استفاده از فیبروئین ابریشم به عنوان حامل دارویی، انجام فرآیندهای آبی برای بارگذاری داروهای حساس مانند پروتئین ها و نوکلئوئیک اسیدهای درمانی است که باعث ایجاد مقاومت های خوب برای حل شدن و جلوگیری از تخریب های آنزیمی و گرمایی ناخواسته می شود (۳۵). این فرآیند توسط انتقال ترکیبی شکل آلفا هلیکسی، به صفحه های خیلی کریستالی بتا، از طریق کشش مکانیکی، اولتراسونیک، حلال و .. انجام می شود. انجام این فرآیند از انجام هرگونه فرایند سخت و دشوار جلوگیری می کند و ابریشم را به عنوان سیستمی برای کاربردهای رهایش دارو آمده سازی می کند (۳۵). روش های مختلفی از جمله

آب گریزی، شارژ و غلظت پلی مر بر روی نرخ رهایش مولکول های مختلف دارویی از هیدروژل تأثیر می گذارند (۳۵). فیبروئین ابریشم یک پلی مر طبیعی با نواحی آبدوست و آب گریز است که قابلیت تشکیل هیدروژل را دارد. هیدروژل فیبروئین می تواند به صورت سیستم های داروسانی قبل تزریق یا غیرقابل تزریق برای رساندن فاکتورهای رشد و حتی سلول های بنیادی مورد استفاده قرار بگیرد. با توجه به این واقعیت که فرآیند ژل شدن فیبروئین ابریشم، افزایش میزان صفحه های  $\beta$  را القاء می کند، بنابراین نیاز به دست کاری هیدروژل های فیبروئین ابریشم با حلال ها، برای ایجاد خاصیت غیرقابل حل شدن در آب، وجود ندارد. روش های مختلفی برای ایجاد هیدروژل ابریشم وجود دارد. از آنجایی که pH ایزو الکتریک فیبروئین ابریشم حدود ۴/۲ است، هیدروژل های فیبروئین ابریشم به راحتی با کاهش pH محلول فیبروئین به ۴ در حضور دارو با استفاده از محلول اسیدی، تهیه می شوند. این شرایط اسیدی می تواند برای بعضی از داروهای مفید و برای بعضی دیگر مضر باشد. مخلوط کردن محلول فیبروئین ابریشم با پلی اتیلن اکساید<sup>۱</sup> یا پلاکسومر<sup>۲</sup> باعث القای ژل شدن به وسیله افزایش میزان صفحه های بتا در pH حدود ۷ به دلیل دهیدراته کردن محلول فیبروئین ابریشم می شود که می تواند برای ساخت هیدروژل حاوی داروهای حساس به pH پایین، مفید باشد. از دیگر روش های القای هیدروژل می توان به افزایش  $Ca^{2+}$  و استفاده از التراسونیک اشاره کرد. خصوصیت مکانیکی ضعیف، محدودیت مهم استفاده از هیدروژل ها در کاربردهای پزشکی است (۳۱، ۳۲).

### میکروذرها فیبروئین ابریشم

حاملهای میکروذرها فیبروئین ابریشم نیز به عنوان حامل های درمانی کاربرد دارند. استفاده از میکروذرها فیبروئین ابریشم از مزیت های زیادی از جمله جلوگیری از تخریب و شکست دارو، کنترل کردن نرخ رهایش دارو و پتانسیل زیاد برای رهایش داروی هدفمند، در مقایسه با ساختارهای دیگر برخوردار است (۳۶). علی رغم خصوصیت های فراوان برای استفاده از میکروذرها به عنوان حامل های دارویی، فرآیند آمده سازی سخت مانند عامل های کراس لینک کننده یا استفاده از دمای بالا، باعث ایجاد محدودیت در استفاده از

<sup>1</sup> Poly(ethylene) oxide

<sup>2</sup> Poloxamer

ها، ژن‌ها و مولکول‌های کوچک بلکه برای سایر کاربردهای پزشکی از قبیل مهندسی بافت، پوشش ایمپلنت و عکس- برداری تشخیصی تبدیل شده است.

روش حلال- ضد حلال<sup>۱</sup>، روش خرد کردن مکانیکی<sup>۲</sup>، پاشش الکتریکی<sup>۳</sup>، تکنولوژی مایع فوق بحرانی<sup>۴</sup> و میکرومولسیون برای آماده سازی نانوذره‌های ابریشم وجود دارد (۵۷).

بنابراین روش رایج و آسان برای الحاق دارو به نانوذره‌های فیبروئین ابریشم حل و یا مخلوط کردن دارو در محلول فیبروئین قبل از انجام فرآیند ساخت نانوذره‌ها، است. یکی از چالش‌های این روش اطمینان از عدم تأثیر منفی فرآیند ساخت نانوذره‌ها بر روی فعالیت بیولوژیکی و یکنواختی دارو است. نانوذره‌های ابریشم می‌توانند برای رهایش مولکول‌های کوچک (داروهای ضد سرطان)، پروتئین‌ها، فاکتورهای رشد، داروهای ژنی و .. استفاده شوند.

یکی دیگر از مزایای نانوذره‌های ابریشم سطح فعال آن‌ها است، همان‌طور که اشاره شد، پروتئین ابریشم شامل رنج وسیعی از آمینواسیدها با گروه‌های فعال شامل آمین، الكل، فنول، گروه-های کربوکسیل و تیول است که اتصال که اجازه اصلاح و تغییر سطح نانوذره‌های پروتئینی برای پاسخ‌های بیولوژیکی (افزایش فراهمی زیستی و یا دارورسانی هدفمند) و هم‌چنین اتصال دارو به سطح نانو ذره را فراهم می‌نماید بنابراین نانوذره‌های فیبروئین توانایی اتصال و رسانش مقادیر قابل توجه دارو با مکانسیم‌ها مختلف مانند برهم‌کنش‌های الکترواستاتیک، برهم‌کنش‌های آب‌گریز و اتصال کووالانسی را دارند (۵۷). نانوذره‌های ابریشم با بار منفی (۲۶ mV- تا -۲۶) با داروهای مختلف با شارژ مثبت پیوند الکترواستاتیکی قوی برقرار می-کنند. این برهم‌کنش‌های الکترواستاتیکی قوی، رهایش اولیه خاصی را برای نانوذره‌های فیبروئینی ایجاد می‌کنند (۱۵، ۳۵، ۳۸).

## نتیجه‌گیری

فیبروئین ابریشم، یک پلی‌مر طبیعی دارای مجوز سازمان غذا و داروی ایالات متحده آمریکا است که به‌واسطه ویژگی‌هایی مانند زیست سازگاری، زیست‌تخربی‌پذیری، خواص مکانیکی مطلوب، گروه‌های عاملی بسیار، فرآیند‌پذیری آسان و نیز قابلیت تشكیل اسفنج سه بعدی، فیلم، الیاف، هیدروژل، میکرو و نانوذره‌ها به گزینه مناسبی نه تنها برای دارورسانی پروتئین-

<sup>1</sup> Desolvation

<sup>2</sup> Mechanical comminution

<sup>3</sup> Electrospraying

<sup>4</sup> Supercritical fluid technology

## منابع

1. Altman GH, Diaz F, Jakuba C, Calabro T, Horan RL, Chen J, et al. Silk-based biomaterials. *Biomaterials*. 2003;24(3):401–16.
2. Bessa PC, Balmayor ER, Hartinger J, Zanoni G, Doppler D, Meinl A, et al. Silk Fibroin Microparticles as Carriers for Delivery. *Tissue Eng Part C*. 2010;16(5):937–45.
3. Cao Y, Wang B. Biodegradation of Silk Biomaterials. *Int J Mol Sci*. 2009;1514–24.
4. Cui W, Zhou Y, Chang J. Electrospun nanofibrous materials for tissue engineering and drug delivery. *Sci Technol Adv Mater*. 2010;11(1):14108.
5. Dash BC, Mandal BB, Kundu SC. Silk gland sericin protein membranes : Fabrication and characterization for potential biotechnological applications. *J Biotech*. 2009;144:321–9.
6. Doroud D, Rafati S. Leishmaniasis. Focus on the design of nanoparticulate vaccine delivery systems. *Expert Rev Vaccines*. 2012;11(1):69–86.
7. Ebrahimi A, Sadrvandi K, Hajialyani M, Shokoohinia Y, Fattah A. Preparation and characterization of silk fibroin hydrogel as injectable implants for sustained release of Risperidone. *Drug Dev Ind Pharm*. 2018;44(2):199–205.
8. Farokhi M, Mottaghitalab F, Ai J, Shokrgozar MA. Sustained release of platelet-derived growth factor and vascular endothelial growth factor from silk/calcium phosphate/PLGA based nanocomposite scaffold. *Int J Pharm*. 2013;454(1):216–25.
9. Farokhi M, Mottaghitalab F, Fatahi Y, Khademhosseini A, Kaplan DL. Overview of Silk Fibroin Use in Wound Dressings. *Trends Biotechnol*. 2018;
10. Farokhi M, Mottaghitalab F, Hadjati J, Omidvar R, Majidi M, Amanzadeh A, et al. Structural and functional changes of silk fibroin scaffold due to hydrolytic degradation. *J Appl Polym Sci*. 2014;131(6):1–8.
11. Farokhi M, Mottaghitalab F, Shokrgozar MA, Ai J, Hadjati J, Azami M. Bio-hybrid silk fibroin/calcium phosphate/PLGA nanocomposite scaffold to control the delivery of vascular endothelial growth factor. *Mater Sci Eng C*. 2014;35(1):401–10.
12. Farokhi M, Mottaghitalab F, Shokrgozar MA, Kaplan DL, Kim HW, Kundu SC. Prospects of peripheral nerve tissue engineering using nerve guide conduits based on silk fibroin protein and other biopolymers. *Int Mater Rev*. 2017;62(7):367–91.
13. Inohara HS. Glycopeptides isolated from sericin of the silkworm, Bombyx mori. *Comp Biochem Physiol A Physiol*. 1979;63(1):87–91.
14. Hakimi O, Knight DP, Vollrath F, Vadgama P. Spider and mulberry silkworm silks as compatible biomaterials. *COMPOS PT B ENG*. 2007;38:324–37.
15. Hassani Besheli N, Damoogh S, Zafar B, Mottaghitalab F, Motasadizadeh H, Rezaei F, et al. Preparation of a Codelivery System Based on Vancomycin/Silk Scaffold Containing Silk Nanoparticle Loaded VEGF. *ACS Biomater Sci Eng*. 2018.
16. Hassani Besheli N, Mottaghitalab F, Eslami M, Gholami M, Kundu SC, Kaplan DL, et al. Sustainable Release of Vancomycin from Silk Fibroin Nanoparticles for Treating Severe Bone Infection in Rat Tibia Osteomyelitis Model. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2017;9(6):5128–38.
17. Huang Y, Bailey K, Wang S, Feng X. Silk fibroin films for potential applications in controlled release. *React Funct Polym*. 2017;116:57–68.
18. Hyde N. The queen of textiles. *Natl Geogr Mag*. 1984;165(1):2–48.
19. Johari N, Madaah Hosseini HR, Samadikuchaksaraei A. Novel fluoridated silk fibroin/TiO<sub>2</sub>nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering. *Mater Sci Eng C*. 2018;82:265–76.
20. Karahaliloglu Z. Curcumin-loaded silk fibroin e-gel scaffolds for wound healing applications. *Mater Technol*. 2018;33(4):276–87.
21. Kim DK, In Kim J, Sim BR, Khang G. Bioengineered porous composite curcumin/silk scaffolds for cartilage regeneration. *Mater Sci Eng C*. 2017;78:571–8.
22. Kiti K, Kudithalert P, Waratrujiwong T, Suwantong O. The potential use of gentamicin sulfate-loaded silk fibroin/gelatin blend scaffolds for wound dressing materials. *Polym Bull*. 2018;75(6):2543–58.
23. Koh L, Cheng Y, Teng C, Khin Y, Loh X, Tee S, et al. Progress in Polymer Science Structures , mechanical properties and applications of silk fibroin materials. *Prog Polym Sci*. 2015;46:86–

- 110.
24. Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2010;75(1):1–18.
  25. Kundu B, Rajkhowa R, Kundu SC, Wang X. Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013;65(4):457–70.
  26. Lammel AS, Hu X, Park SH, Kaplan DL, Scheibel TR. Controlling silk fibroin particle features for drug delivery. *Biomaterials*. 2010;31(16):4583–91.
  27. Li J, Mooney DJ. Designing hydrogels for controlled drug delivery. *Nat Rev Mater*. 2016;1(12):1–18.
  28. Li M, Ogiso M, Minoura N. Enzymatic degradation behavior of porous silk fibroin sheets. *Biomaterials*. 2003;24(2):357–65.
  29. Li H, Zhu J, Chen S, Jia L, Ma Y. Fabrication of aqueous-based dual drug loaded silk fibroin electrospun nanofibers embedded with curcumin-loaded RSF nanospheres for drugs controlled release. *RSC Adv*. 2017;7(89):56550–8.
  30. Lozano-Pérez AA, Rivero HC, Pérez Hernández M del C, Pagán A, Montalbán MG, Villora G, et al. Silk fibroin nanoparticles: Efficient vehicles for the natural antioxidant quercetin. *Int J Pharm*. 2017;518(1–2):11–9.
  31. Ma D, Wang Y, Dai W. Silk fibroin-based biomaterials for musculoskeletal tissue engineering. *Mater Sci Eng C*. 2018;89(23):456–69.
  32. Mandal BB, Mann JK, Kundu SC. Silk fibroin/gelatin multilayered films as a model system for controlled drug release. *Eur J Pharm Sci*. 2009;37(2):160–71.
  33. Mathur AB, Gupta V. Silk fibroin-derived nanoparticles for biomedical applications. *Nanomedicine*. 2010;5(5):807–20.
  34. Montalbán M, Coburn J, Lozano-Pérez A, Cenis J, Villora G, Kaplan D. Production of Curcumin-Loaded Silk Fibroin Nanoparticles for Cancer Therapy. *Nanomaterials*. 2018;8(3):126.
  35. Mottaghitalab F, Farokhi M, Shokrgozar MA, Atyabi F, Hosseinkhani H. Silk fibroin nanoparticle as a novel drug delivery system. *J Control Release*. 2015;206:161–76.
  36. Mottaghitalab F, Farokhi M, Zaminy A, Kokabi M, Soleimani M, Mirahmadi F, et al. A Biosynthetic Nerve Guide Conduit Based on Silk/SWNT/Fibronectin Nanocomposite for Peripheral Nerve Regeneration. *PLoS One*. 2013;8(9):6–17.
  37. Mottaghitalab F, Hosseinkhani H, Shokrgozar MA, Mao C, Yang M, Farokhi M. Silk as a potential candidate for bone tissue engineering. *J Control Release*. 2015;215:112–28.
  38. Mottaghitalab F, Kiani M, Farokhi M, Kundu SC, Reis RL, Gholami M, et al. Targeted Delivery System Based on Gemcitabine-Loaded Silk Fibroin Nanoparticles for Lung Cancer Therapy. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2017;9(37):31600–11.
  39. Murphy AR, Kaplan DL. Biomedical applications of chemically-modified silk fibroin. *J Mater Chem*. 2009; 19(36):6443–50.
  40. Naserzadeh P, Mortazavi SA, Ashtari K, Salimi A, Farokhi M, Pourahmad J. Evaluation of the toxicity effects of silk fibroin on human lymphocytes and monocytes. *J Biochem Mol Toxicol*. 2018;1–8.
  41. Nourmohammadi J, Roshanfar F, Farokhi M, Haghbin Nazarpak M. Silk fibroin/kappa-carrageenan composite scaffolds with enhanced biomimetic mineralization for bone regeneration applications. *Mater Sci Eng C*. 2017;76:951–8.
  42. Numata K, Kaplan DL. Silk-based delivery systems of bioactive molecules ☆. *Adv Drug Deliv Rev*. 2010;62(15):1497–508.
  43. Pignatelli C, Perotto G, Nardini M, Cancedda R, Mastrogiacomo M, Athanassiou A. Electrospun silk fibroin fibers for storage and controlled release of human platelet lysate. *Acta Biomater*. 2018;73:365–76.
  44. Pritchard EM, Kaplan DL. Silk fibroin biomaterials for controlled release drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv*. 2011;8(6):797–811.
  45. Ratio M, Inoue S, Tanaka K, Mizuno S, Chem JB. PROTEIN STRUCTURE AND FOLDING : Silk Fibroin of Bombyx mori Is Secreted , Assembling a High Molecular Mass Elementary Unit Consisting of H-chain , Silk Fibroin of Bombyx mori Is Secreted , Assembling a High Molecular Mass Elementary Unit Consisting of H-c. *J Biol Chem*. 2000;

- 275(51): 40517-28.
46. Ribeiro M, Fernandes MH, Beppu MM, Monteiro FJ, Ferraz MP. Silk fibroin/nanoxyapatite hydrogels for promoted bioactivity and osteoblastic proliferation and differentiation of human bone marrow stromal cells. *Mater Sci Eng C*. 2018;89:336–45.
47. Silva JM, Videira M, Gaspar R, Préat V, Florindo HF. Immune system targeting by biodegradable nanoparticles for cancer vaccines. *J Control Release*. 2013;168(2):179–99.
48. Shakya AK, Nandakumar KS. Applications of polymeric adjuvants in studying autoimmune responses and vaccination against infectious diseases. *J R Soc Interface*. 2013;10(79).
49. Song J, Kim J, Woo HM, Yoon B, Park H, Park C, et al. Repair of rabbit radial bone defects using bone morphogenetic protein-2 combined with 3D porous silk fibroin/β-tricalcium phosphate hybrid scaffolds. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2018;29(6):716–29.
50. Wang X, Wenk E, Zhang X, Meinel L, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL. Growth factor gradients via microsphere delivery in biopolymer scaffolds for osteochondral tissue engineering. *J Control Release*. 2009;134(2):81–90.
51. Wang Y, Kim H, Vunjak-novakovic G, Kaplan DL. Stem cell-based tissue engineering with silk biomaterials. *Biomaterials*. 2006;27:6064–82.
52. Wenk E, Merkle HP, Meinel L. Silk fibroin as a vehicle for drug delivery applications. *J Control Release*. 2011;150(2):128–41.
53. Wu M, Yang W, Chen S, Yao J, Shao Z, Chen X. Size-controllable dual drug-loaded silk fibroin nanospheres through a facile formation process. *J Mater Chem B*. 2018;6(8):1179–86.
54. Yucel T, Lovett ML, Kaplan DL. Silk-based biomaterials for sustained drug delivery. *J Control Release*. 2014;190:381–97.
55. Zhang Y. Applications of natural silk protein sericin in biomaterials. *Biotechnol Adv*. 2002;20:91–100.
56. Zhao C, Asakura T. Structure of Silk studied with NMR. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc*. 2001; 4(39):301-52.
57. Zhao Z, Li Y, Xie M Bin. Silk fibroin-based nanoparticles for drug delivery. *Int J Mol Sci*. 2015;16(3):4880–903.
58. Zhou C, Confalonieri F, Jacquet M, Perasso R, Li Z, Janin J. Silk Fibroin: Structural Implications of a Remarkable Amino Acid Sequence. *Proteins: Struct., Funct., Bioinf*. 2001;122:119–22.

