

سیستم‌های نوین دارورسانی بر پایه پلیمر فیبروئین ابریشم

حمیدرضا متصدی زاده^۱، فاطمه رضایی^۲، یوسف فتاحی^۱، وحید ملاکاظمی‌ها^۳، امیر امان‌زاده^۲، مهدی فرخی^{۳*}

۱. گروه نانوفناوری دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۲. گروه مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران، ایران

۳. بخش بانک سلولی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

چکیده

امروزه طراحی و ساخت سیستم‌های دارورسانی مناسب برای بهینه کردن کارایی درمانی داروها و کاهش عوارض جانبی آن‌ها، ضروری است. تاکنون، ساختارهای مختلفی برای دارورسانی طراحی شده‌اند که در بین آن‌ها، سیستم‌های بر پایه پلی‌مرهای طبیعی، توجه بیش‌تری را به خود جلب کرده‌اند. فیبروئین ابریشم یک پلی‌مر پروتئینی طبیعی است که به واسطه خصوصیت‌های منحصر به فردی از جمله زیست سازگاری عالی، زیست تخریب پذیری، خواص مکانیکی خوب، فرآیندپذیری آسان و نیز قابلیت تشکیل نانوذره، میکروذره، لیاف، هیدروژل، فیلم و ... گزینه مناسبی برای کاربردهای زیست پزشکی به ویژه دارورسانی است. در این مقاله مروری، ویژگی‌های مختلف پلی‌مر ابریشم و کاربردهای آن در دارورسانی مورد بررسی قرار می‌گیرد.

واژه‌های 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 سخت‌تر و استفاده از حلال‌های آلی برای تهیه نانوذره‌ها با استفاده از پلی‌مرهای سنتزی، کاربرد آن‌ها را با محدودیت مواجه کرده است. پلی‌لاکتیک اسید (PLA)، پلی‌گلیکولیک اسید (PGA)، پلی‌لاکتیک-گلیکولیک اسید (PLGA) و پلی‌آلکیل سیانوآکریلات پلی‌مرهای سنتزی نویددهنده‌ای برای کاربردهای بالینی هستند (۳۷،۳۵). با این حال، علیرغم طیف گسترده‌ای از پلی‌مرهای سنتزی موجود، اکثر سیستم‌های 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 محدودیت‌هایی از قبیل القای التهاب موضعی و محدودیت در رساندن پروتئین‌های درمانی به دلیل استفاده

یکی از مهم‌ترین چالش‌هایی که در زمینه دارورسانی مطرح است، نفوذپذیری به سلول‌های غیر هدف و اثرهای جانبی مختلف است. سیستم‌های نوین دارورسانی به منظور کاهش اثرهای جانبی داروها، بهینه‌سازی کارایی درمانی آن‌ها و افزایش رضایتمندی بیماران طراحی می‌شوند. به این منظور سیستم‌های بسیاری با ساختار و مورفولوژی‌های متفاوت نظیر فیلم‌ها، لیاف‌ها، ژل‌ها، اسفنج‌ها، میکروذره‌ها و نانوذره‌ها طراحی شده‌اند. در ساخت حامل‌های دارویی می‌توان از پلی‌مرهای زیست تخریب پذیر سنتزی و طبیعی برای کنترل رهایش داروها استفاده کرد که در این میان سیستم‌هایی 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 کرده‌اند (۳۷،۳۵، ۶). هر

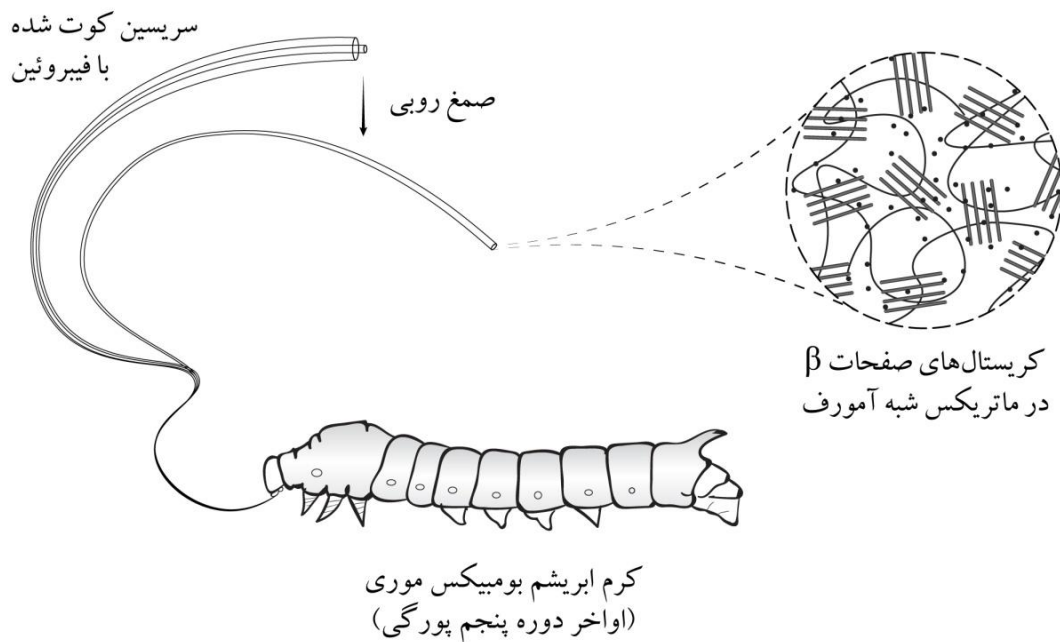
نویسنده مسئول: ایران، تهران، انستیتو پاستور ایران، بخش، بانک سلولی

پست الکترونیکی: M_farokhi@pasteur.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۶/۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۹/۱۲

¹ Food and drug administration



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 تاخوردیده 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 صمغ زدایی ابریشم خام با از بین بردن سریسین، الیاف های فیبروئین درخشان و نرم به دست می آیند (شکل ۱) الیاف های فیبروئین از ترکیب خواص جذابی از قبیل استحکام، چقرمگی^۱، 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 ۳۰۰-۱۰ 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 مواجهه است (۳۵، ۵۴، ۴۴). پلی مرهای طبیعی (مانند آلژینات، کیتوسان، کلاژن، دکستران و ژلاتین) با دارا بودن زیست سازگاری و زیست تخریب پذیری بالاتر نسبت به پلی مرهای سنتزی و شباهت 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^۱ برای غلبه بر روی 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 گسترده 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 رسیده 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 غیرکوالانت متصل و برای تجمع زنجیره‌های سبک و سنگین لازم است (۴۵). زنجیره سنگین، پروتئین تشکیل-دهنده لیف است و ساختارش خواص لیف ابریشم را تعیین می‌کند. زنجیره سنگین به‌طور معمول به‌عنوان پروتئین ابریشم شناخته می‌شود.

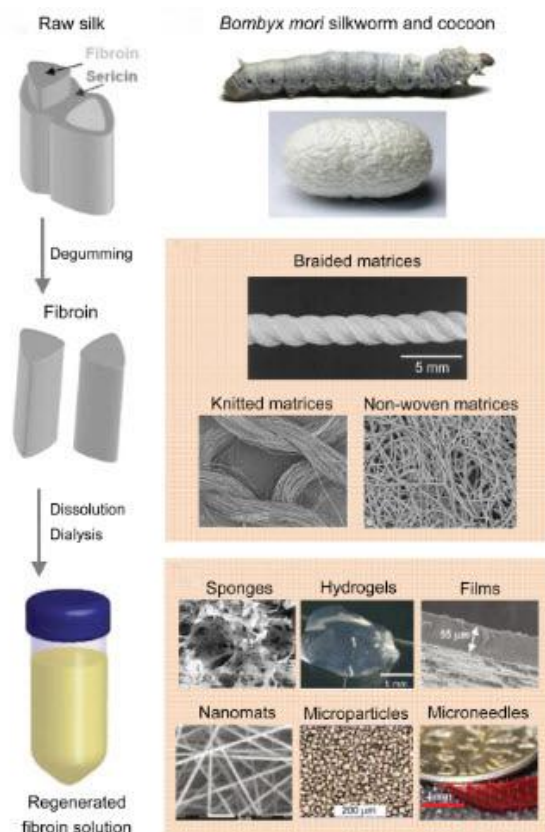
شکل ۲، ابریشم تولید شده به‌وسیله کرم ابریشم بمبیکس موری^۳ که ابریشمی با بهترین مشخصه‌ها است را نشان می‌دهد. همان‌طور که گفته شد، ابریشم خام شامل دو الیاف فیبروئین که با یک لایه سربسین در سطحشان کنار هم قرار گرفته‌اند، است. برای صمغ‌زدایی ابریشم (حذف سربسین)، از سدیم کربنات (رایج‌ترین محلول بازی) استفاده 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 به‌دست می‌آید (۵۲). در شکل ۲ کرم ابریشم بالغ و پيله تولید شده نیز نشان داده شده‌اند. با توجه به فرآیندپذیری همه جانبه فیبروئین ابریشم، سیستم‌های بسیاری با ساختار و مورفولوژی‌های متفاوت نظیر اسفنج‌ها، هیدروژل‌ها، فیلم‌ها، الیاف‌ها، میکروذره‌ها و نانوذره‌ها می‌توان از محلول فیبروئین به‌دست 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 (۹، ۱۲، ۲۳، ۳۶، ۳۷، ۴۱).

صورت‌بندی‌های^۴ 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 آبدوست فیبروئین ابریشم بمبیکس موری، که به‌عنوان ابریشم α یا ابریشم I شناخته می‌شود، می‌تواند به آسانی به

خاصیت چسبندگی به‌عنوان ماده ضدقارچ و ضدباکتری فعالیت دارد. از سایر خواص سربسین می‌توان به خاصیت آنتی‌اکسیدانی، مقاومت و محافظت در مقابل نور ماوراء بنفش و هم‌چنین قابلیت جذب و آزادسازی رطوبت اشاره نمود (۱۴، ۵۵). ابریشم خام با توجه به وجود سربسین یک ماده حساسیت‌زا بوده که منجر به ایجاد آلرژی از نوع اول می‌شود اما در صورتی که سربسین به‌طور کامل برطرف شود، پاسخی مبتنی بر حساسیت نسبت به ابریشم دریافت نخواهد شد (۵، ۴۲، ۳۵).

فیبروئین استخراج شده از ابریشم، شامل دو نوع زنجیره پلی-مری است. زنجیره سنگین^۱ (۳۹۱ KDa) و زنجیره سبک^۲ (۲۷ KDa) که توسط پیوندهای دی سولفیدی به یکدیگر متصل می‌شوند (۳). 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 ۶:۶:۱ است (۴۵). زنجیره سبک جهت ترشح پروتئین از غدد ابریشم ضروری



شکل ۲: ابریشم تولید شده به‌وسیله کرم ابریشم بمبیکس موری (۲۳).

³ *Bombyx mori*

¹ H₂ 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 پلی مر بسیار منظم است که شامل ۱۲ ناحیه آب-گریز (نواحی کریستالی) با ۱۱ ناحیه آب دوست (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 دسته ای^۱ طبیعی طبقه بندی می شود. بلوک های آب گریز شامل آمینواسیدهایی با زنجیره جانبی کوتاه مانند آلانین^۲ و گلیسین^۳ و سرین^۴ است، در حالی که بلوک های آب دوست شامل آمینواسیدهایی با زنجیره های جانبی حجیم همراه با گروه های آمینی باردار هستند. در این کوپلی مر بلوک های آب گریز از ترتیب توالی به-صورت (گلیسین-آلانین-گلیسین-آلانین-سرین GAGAS) تبعیت می کنند، ولی بلوک های آب دوست با ترتیب پیچیده تری ساخته شده اند (۵۱،۳).

ترکیب شیمیایی آمینواسیدهای تشکیل دهنده فیبروئین و سرین مربوط به پروتئین ابریشم را می توان از مراجع آن یافت. طبق این مراجع، ترکیب درصد مولی آمینواسیدها در فیبروئین ابریشم به صورت ۴۴/۱٪ گلیسین، ۲۸/۶٪ آلانین، ۱۱/۹٪ سرین، ۵/۲۱٪ تیروسین^۵، ۱/۸٪ والین^۶ و ۸/۳۹٪ دیگر آمینواسیدهای باقی مانده است. بنابراین خواص عمومی ابریشم با توجه به خواص این آمینواسیدها ارزیابی می-شود (۲۱). نواحی کریستالی، ۹۴٪ از کل رشته فیبروئین را تشکیل داده اند و این نواحی کریستالی از تکرار متناوب هگزاپتاید های GAGAGA، GAGAGY، GAGAGS، GAGYGA ساخته شده اند. GAGAGS بیشترین درصد (۷۰٪) را در رشته متناوب هگزاپتاید ها شامل می شود. هر ناحیه کریستالی به طور متوسط از ۴ زنجیره مجزا بتا تشکیل شده است و شامل ۱۱ آمینواسید است. این زنجیره ها از طریق پیچ های بتا که از آمینواسید GAAS ساخته شده است به-همدیگر مرتبط می شوند (۵۸). شکل ۳، زنجیره سنگین

ابریشم آب گریز II با استفاده از روش های مختلف تبدیل شود. ابریشم II به آرایش مولکول های فیبروئین به صورت صفحه های بتا اشاره دارد که استحکام بیش تری دارد و مسئول بلورینگی بیش تر فیبروئین است. رایج ترین روش تبدیل ساختار درهم (مارپیچ یا ابریشم نوع ۱) ابریشم به ساختار ورقه های بتا (ساختار خیلی پایدار ابریشم نوع ۲) با یک حلال آلی است. حلال های آلی شناخته شده ای از جمله متانول، اتانول، استون و... در کریستالیزاسیون فیبروئین ابریشم و تبدیل یک ساختار درهم به یک ساختار ورقه بتا، استفاده می شوند (۲۳). از دیگر روش ها برای القای ساختار ورقه ای بتا می توان به استفاده از دمای بالا، استفاده از pH نزدیک به نقطه ایزوالکتریک فیبروئین ابریشم (نزدیک ۴)، استفاده از نمک و نیروی برشی اشاره کرد (۵۲). اگرچه کریستالینیتی، اساس پایداری سیستم های بر پایه فیبروئین ابریشم است، با این حال افزایش بیش از حد کریستالینیتی منجر به کاهش انعطاف پذیری و منجر به شکننده شدن سیستم ها می شود. به علاوه، در زمان دارورسانی مولکول های حساس مانند فاکتورهای رشد به وسیله فیبروئین ابریشم، از روش های ملایم تر باید استفاده شود. استفاده از بخار آب می تواند یک جایگزین بهتر برای القاء ساختار ورقه ای بتا باشد. آنالیز کانفورماسیون ¹³C-MAS NMR فیلم ها و نانوالیاف های فیبروئین ابریشم نشان داد که درصد ابریشم II بعد از القا به وسیله بخار آب (۰.۳۰٪-۰.۴۷٪) کم تر از استفاده از متانول (۰.۷۴٪) است. تغییر در کریستالینیتی و در نتیجه آب دوستی، گزینه هایی برای تأثیر بر روی برهم کنش بین مولکول های دارو و فیبروئین ابریشم و هم چنین سرعت تخریب آن عرضه می کند که می تواند یک گزینه جذاب برای سیستم های دارورسانی با کینتیک رهایش مشخص باشد (۵۲).

ابریشم I یک محلول پایدار است که در غدد کرم ابریشم ذخیره می شود. صورت بندی ابریشم I به طور کامل شناخته شده نیست و به صورت مجموعه ای از صورت بندی ها (از میزان آرایش یافتگی خیلی پایین تا بلورهای آرایش یافته) وجود دارد. شکل های آرایش یافته تر در حالت های گذار قبل از ریسندگی ابریشم II شکل می گیرند. ابریشم II همان فیبروئین جامد است که می تواند به صورت الیاف ابریشم ریسندگی شود و صورت بندی به طور کامل شناخته شده ای دارد. خلاصه ای از خواص ساختمانی پروتئین های سرین و فیبروئین در جدول ۱ بیان شده است.

¹ Block copolymer

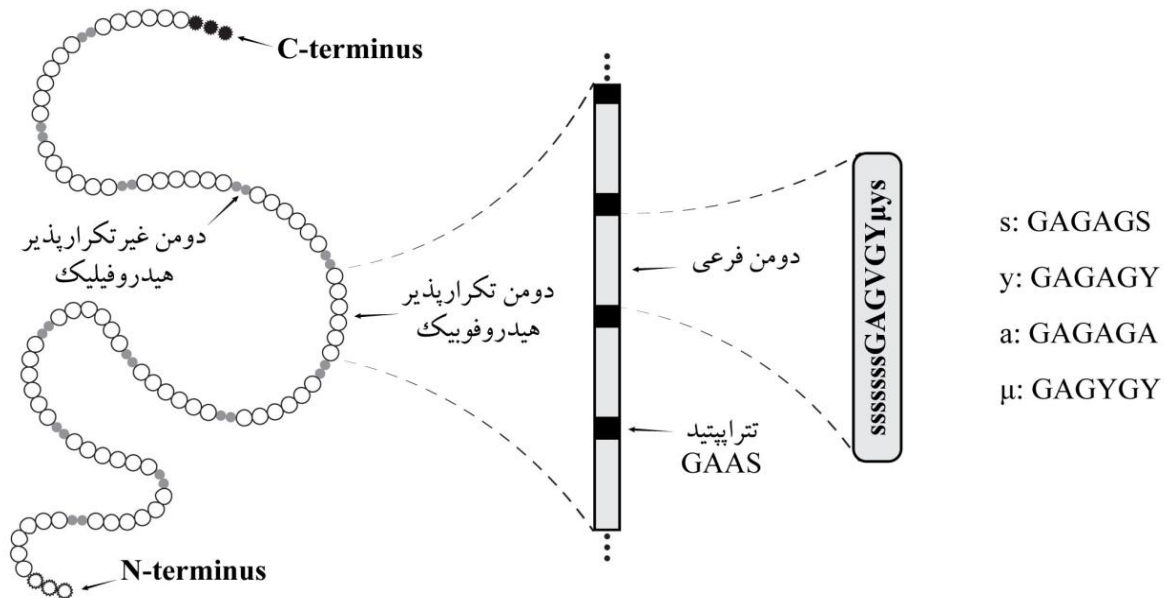
² Alanine (A)

³ Glycine (G)

⁴ Serine (S)

⁵ Tyrosin (Y)

⁶ Valine (V)



شکل ۳: شماتیک زنجیره فیبروئین ابریشم

وجود دارد، باعث تمامیت و پیوستگی در کل لیف می شود (۱۴،۵۱).

خواص زیستی پروتئین ابریشم

جدا از هندسه و خواص مکانیکی، زیست سازگاری و زیست تخریب پذیری برای کاربردهای پزشکی مسائل مهمی هستند. پلی مرهای مصنوعی مانند PLA، PLGA، پلی-کاپرولاکتان و پلی مرهای طبیعی مانند ابریشم، آلژینات، کراتین، الاستین و کلاژن به دلیل این خواص، برای کاربردهای پزشکی استفاده می شوند.

مواد طبیعی به دلیل خواص ساختاری و زیست سازگاری فوق العاده شان بسیار مورد توجه قرار گرفته اند. اگرچه نگرانی هایی در مورد زیست سازگاری ابریشم بمبیکس موری به عنوان عامل حساسیت زا 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 حساسیت زایی مشاهده نشد. بنابراین ابریشم اولیه (فیبروئین و صمغ سریسین) بالقوه آلرژی زا بوده، اما ابریشم صمغ گیری شده که سریسین از آن جدا شده است، زیست سازگار است.

تخریب زیستی پروتئین ابریشم

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

فیبروئین را نشان می دهد. این زنجیره، شامل قسمت های تکراری آب گریز که در بین دامنه های تکرارناپذیر آب دوست قرار گرفته اند، است. هر قسمت تکرار شونده شامل زیر مجموعه هایی است که توسط پپتیدهای چهارگانه جدا می شوند. هر زیر مجموعه شامل واحدهای تکرار شونده مختلف پپتیدهای شش گانه هستند و توسط پپتیدهای چهارگانه GAAS تمام می شوند (۲۳).

خواص مکانیکی پروتئین ابریشم

خواص مکانیکی ابریشم، آن را از سایر مواد طبیعی شناخته شده، متمایز می سازد. خواص ابریشم به علت باندهای هیدروژنی زیاد، طبیعت آب گریز پروتئین و بلورینگی قابل توجه آن، است. مدول الاستیک ابریشم بمبیکس موری ۱۷-۱۵ گیگاپاسکال و استحکام کششی آن ۶۹۰-۶۱۰ گیگاپاسکال است (۱). این خواص با افزایش درصد فیبروئین ابریشم، کاهش سایز و افزایش یکنواختی منافذ، افزایش می یابند. ترکیب مقاومت مکانیکی و ازدیاد طول شکست بالا در الیاف ابریشم آن را به ماده ای خاص تبدیل نموده است. ازدیاد طول تا پارگی غیرعادی در این الیاف به روشنی توضیح داده نشده است، ولی در بسیاری از تحقیق ها، آن را به قابلیت کشش نواحی آمورف و تبدیل آن ها به فرم های کشیده شده نسبت می دهند. استحکام بالا در ابریشم به وجود صفحه های بتا که در قالب نواحی بلورین گرد هم آمده اند، نسبت داده می شود. هم چنین پیوندهای آب گریز که بین نواحی بلورین

قرار گرفته‌اند. پلی‌مرهای زیست‌تخریب‌پذیر طبیعی مانند کلاژن، ژلاتین و فیبروئین ابریشم مزایای بسیار خوبی نسبت به پلی‌مرهای سنتزی دارند که دلیل آن، خواص مطلوبی از قبیل زیست‌سازگاری، زیست‌تخریب‌پذیری است. زیست‌تخریب‌پذیری، شکست مواد پلی‌مری به اجزای کوچک‌تر است. بسته به حالت تخریب، فیبروئین ابریشم می‌تواند به صورت پلی‌مرهای قابل تخریب با آنزیم‌ها طبقه‌بندی گردد (۱۰،۳). آنزیم‌ها نقش مهمی در تخریب فیبروئین بازی می‌کنند. به دلیل تخریب آنزیمی، خواص فیزیکی - شیمیایی، مکانیکی و بیولوژیکی خاص فیبروئین ابریشم به‌طور گسترده مورد بررسی قرار گرفته‌اند. تخریب آنزیمی مواد زیستی یک فرآیند دو مرحله‌ای است. مرحله اول جذب آنزیم روی سطح لایه از طریق دامنه سطح اتصال و دومین مرحله هیدرولیز پیوند استری است. به‌عنوان یک پروتئین، فیبروئین ابریشم مستعد تخریب زیستی توسط آنزیم‌های پروتئولیتیک مانند کیموتریپسین، پروتئاز XIV و کلاژناز IA است (۲۸). در ابتدا، ابریشم توسط آنزیم‌های مختلف جذب می‌شود که نیازمند این است آنزیم‌ها دامنه‌های اتصال روی سطح مواد را، پیدا کنند. بعد از آن، ابریشم به‌وسیله آنزیم‌ها هضم می‌شود. محصول‌های حاصل از تخریب فیبروئین ابریشم به‌آسانی در محیط درون‌تن جذب می‌شوند. این یکی از مزایای ابریشم است که در زمینه پزشکی کاربرد دارد (۲۸). ابریشم نسبت به آنزیم‌های مختلف نرخ زیست‌تخریب‌پذیری، متفاوتی را از خود بروز می‌دهد. برخی مقاله‌ها بر روی تخریب‌پذیری فیبروئین ابریشم در مقابل آنزیم‌های پروتئولیتیک مختلف، تحقیق کرده‌اند. کیموتریپسین برای تخریب مناطق آمورف فیبروئین مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲۸). کیموتریپسین می‌تواند پروتئین‌های فیبروئین محلول را تخریب کند و اثری بر روی صفحه‌های فیبروئینی ندارد. در مقابل، آنزیم‌های دیگر به خصوص پروتئاز XIV، به‌طور گسترده‌ای صفحه‌های فیبروئین را تخریب می‌نماید (۳). پس از تخریب زیستی، تغییرهای قابل توجهی با توجه به ساختار و وزن مولکولی فیبروئین ابریشم، گزارش شده است. در مطالعه‌های برون‌تنی، رفتار تخریب ابریشم با آنزیم‌های پروتئولیتیک، فیبروئین‌های ابریشم به مناطقی با بلورینگی کمتر تقسیم می‌شوند که قادرند برای متابولیسم بیشتر، توسط سلول‌ها فاگوسیتوز شوند. به‌طور کلی، رفتار تخریب ابریشم، با توجه به نوع آنزیم‌ها متفاوت است. برای مثال، زمانی که صفحه فیبروئین ابریشم، شامل

مقدار کمی ساختار بلوری ابریشم نوع II، در محلول آنزیم پروتئولیتیک (پروتئاز XIV) غوطه‌ور 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 می‌کند. اعتقاد بر این است که کیموتریپسین، ابریشم را تخریب می‌کند ولی اثر قابل محسوسی بر روی تخریب فیلم‌های ابریشم ندارد (۳). علاوه بر آنزیم‌های پروتئولیتیک، فیبروئین ابریشم می‌تواند توسط روش‌های دیگر، مانند تابش اشعه گاما تخریب شود. تابش گاما، به‌طور مستقیم بر روی کاهش استحکام کششی الیاف فیبروئین اثر می‌گذارد. با توجه به تضعیف پیوند پپتیدی در پلی‌پپتیدها، کاهش ساختار صفحه‌ای بتا و هم‌چنین رهایش پروتئین‌های با وزن مولکولی کم در محصول‌های تخریب، می‌توان نتیجه گرفت که تخریب زیستی فیبروئین ابریشم با افزایش شدت اشعه گاما، افزایش می‌یابد (۳).

ساختارهای مختلف فیبروئین ابریشم برای کاربرد رهایش عامل‌های درمانی

پروتئین ابریشم، یک پلی‌مر دارای مجوز FDA است که به‌طور موفقیت‌آمیز به‌عنوان نخ بخیه و سیستم‌های رهایش دارو کاربرد دارد. این پروتئین، خصوصیت‌های مکانیکی بسیار عالی، فرآیند فعال‌سازی قابل انعطاف و زیست‌سازگاری بسیار بالایی دارد (۳۵). داروها یا به‌صورت سطحی یا حجمی در حامل‌های فیبروئین بارگذاری می‌شوند. این حالت‌ها به نوع دارو، مقدار بارگذاری و کینتیک رهایش مورد نیاز بستگی دارد. در بارگذاری سطحی، عامل‌های درمانی به‌طور مستقیم بر روی حامل فیبروئین، اتصال یا جذب می‌شوند (۲۳). گروه‌های عاملی بسیاری که در سطح ابریشم وجود دارد، امکان اصلاح شیمیایی این پلی‌مر و اتصال داروهای متنوعی را فراهم می‌سازد و هم‌چنین شرایط فرآیندی ملایم این پلی‌مر امکان بارگذاری داروهای حساس را امکان‌پذیر می‌سازد (۳۵).

در بارگذاری حجمی، عامل‌های درمانی در بین رشته‌های فیبروئینی به دام می‌افتند. به‌طول معمول بارگذاری حجمی به بارگذاری سطحی ترجیح داده می‌شود، به‌این دلیل که بارگذاری حجمی، اجازه بارگذاری عامل‌های درمانی به‌میزان بیش‌تر و رهایش طولانی مدت‌تر و پیوسته‌تری را می‌دهد. در بارگذاری حجمی، عامل‌های درمانی در داخل محلول ابریشم

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

فیلم های ابریشمی

فیلم های فیبروئین ابریشم توسط فرآیند ریخته گری محلول- های ابریشمی یونی، اسیدی و آبی تولید می شوند. هم چنین تکنیک های رسوب لایه به لایه چرخشی یا دستی برای تولید فیلم های خیلی نازک، استفاده می شوند. پایداری فیلم های ریخته گری شده توسط تکنیک هایی مانند خشک کردن، بازپخت آبی^۵ و غوطه وری در الکل برای بهبود ورقه های کریستالی بتا، انجام می شود (۲۵). فیلم های ساخته شده توسط این روش ها، به طور معمول شکننده هستند. بنابراین ساخت فیلم های کامپوزیتی فیبروئین ابریشم با مخلوط پلی- مرهای طبیعی یا سنتزی می تواند راه حل خوبی باشد. این فیلم های دو بعدی ساخته شده ممکن است کینتیک رهایش متفاوتی نسبت به ماتریکس های سه بعدی از خود نشان دهند (۵۲). با اتصال گروه های فعال پپتیدی به فیلم های ابریشمی از آن ها به عنوان ایمپلنت برای تشکیل استخوان و رهایش دارو استفاده شده است. هم چنین این فیلم ها برای رهایش داروی موضعی از طریق ایمپلنت کردن مستقیم کاربرد دارند (۴۲).

الیاف ابریشمی-الکتروریسی شده

الیاف الکتروریسی شده دارای کاربردهای مختلفی از جمله غشاء های دارای چند عملکرد، فیلترها، تقویت کننده های کامپوزیتی و ... هستند که از میان کاربردهای مختلف تهیه داربست برای دارورسانی و مهندسی بافت به دلیل توانایی تقلید ماتریکس خارج سلولی^۶ به یکی از زمینه های 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 سانتی گراد و زیست سازگاری با بدن موجود زنده، نظر پژوهشگران را در زمینه الیاف و پزشکی به خود جلب کرده است (۳۱). به کارگیری نانوالیاف در سامانه های رهایش دارو به دلیل نسبت زیاد سطح به حجم و پیشرفت های حاصل در به کارگیری آن ها به عنوان داربستی برای رشد سلول ها و ترمیم زخم مورد توجه پژوهشگران است (۲۵). از میان روش های متفاوت تهیه نانوالیاف، روش

مخلوط و یا حل شده و در ادامه حامل های پایدار مکانیکی (میکرو و نانوذره ها، فیلم و ..) ساخته می شوند (۲۳).

تا به امروز، ساختارهای مختلف فیبروئین ابریشم شامل اسفنج ها (۸،۱۱)، فیلم ها (۳۲،۱۷)، الیاف ها (۱۱،۸)، هیدروژل ها (۴۶،۲۰)، میکرو (۵۰،۲) و نانوذره ها (۴۰،۳۸،۱۵) برای کاربردهای رهایش دارو و مهندسی بافت توسعه یافته اند. در جدول ۲ تعدادی از پژوهش های انجام شده بر روی ساختارهای مختلف فیبروئین ابریشم فهرست شده است. در ادامه به اختصار به توضیح موارد فوق پرداخته می شود:

اسفنج های سه بعدی متخلخل

اسفنج های متخلخل ابریشمی به دلیل ایجاد ریز محیط^۱ فیزیولوژیکی مشابه بدن گزینه مناسبی برای مهندسی بافت هستند. روش مورد استفاده برای ساخت اسفنج متخلخل، یک عامل مهم است که می تواند روی خواص آن، شامل تخلخل، زمان تخریب، خواص مکانیکی، شیمی سطح و... اثر بگذارد (۵۲،۳۷). اسفنج های متخلخل ابریشمی می توانند با استفاده از روش های از جمله فروشویی ذره ای و قالب گیری حلال^۲، اسفنج شدن گازی^۳ و یا خشک کن انجمادی^۴ بعد از شکل دادن در قالب مناسب ایجاد شوند. استفاده از روش هایی مانند حلال شویی ذره ها منجر به کنترل بهتر بر روی تشکیل حفره ها با سایز کنترل شده می شود ولی مدت طولانی حلال شویی ذره ها می تواند منجر به رهایش داروی بارگیری شده شود و هم چنین استفاده از غلظت های بالای نمکی می تواند تأثیر منفی بر روی یکنواختی و فعالیت داروهای حساس مانند فاکتورهای رشد داشته باشد. خشک کن انجمادی رایج ترین روش ایجاد ماتریکس اسفنجی متخلخل است. در این روش با کنترل دما و غلظت محلول ابریشم می توان سایز منافذ را در اسفنج متخلخل ابریشمی کنترل کرد. دمای پایین تر به دلیل کاهش زمان مورد نیاز برای رشد کریستال ها، منجر به کاهش سایز حفره ها و افزایش تخلخل می شود در حالی که دمای بالاتر منجر به افزایش سایز حفره ها و کاهش تخلخل می شود. به- علاوه افزایش غلظت محلول ابریشمی منجر به کاهش سایز حفره ها و کاهش ارتباط بین حفره ها می شود. اگرچه شکل و

¹ Microenvironment

² Solvent Casting and Particulate Leaching

³ Gas forming

⁴ Freeze drying

⁵ Water annealing

⁶ Extracellular matrix (ECM)

جدول ۱: خواص ساختمانی پروتئین های سربیسین و فیبروئین.

فیبروئین ابریشم ۷۲-۸۱٪			سربیسین ابریشم ۱۹-۲۸٪	
فیبروئین سنگین	فیبروئین سبک	P25	پروتئین چسب مانند	نوع پروتئین
۳۹۱	۲۷	۲۵	۱۰-۳۰۰	وزن مولکولی (kDa)
		آب گریز	آب دوست	قطبیت ^۱
ابریشم I (ماریچهای تصادفی و ساختار نامنظم)			ساختار غیر بلورین یا آمورف	ساختار
ابریشم II (ساختار بلورین)				
پروتئین ساختمانی لیف			چسباندن دو رشته فیبروئین به یکدیگر	وظیفه
فیلامنت پروتئینی مرکزی				

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

الکتروسیسی 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 الکتروسیسی شده توسط خصوصیت های محلول (ویسکوزیته، هدایت، دما و...)،

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

مرجع	نوع مطالعه	جزء اضافه شده به فیبروئین	پروتئین/داور	فرمولاسیون
(۴۹)	درون تن	β -TCP ^B	BMP-2 ^A	اسفنج سه بعدی
(۱۹)	برون تن	TiO ₂ nanoparticles	-	
(۲۱)	برون تن	-	Curcumin	
(۲۲)	برون تن	Gelatin	Gentamicin	فیلم
(۱۷)	برون تن	-	Diltiazem, tetrahydrozoline, ciprofloxacin, tetracycline	
(۳۲)	برون تن	Gelatin	inulin	
(۴۳)	برون تن	PEO	HPL ^C	الیاف
(۲۹)	برون تن	SF nanospheres	Curcumin, doxorubicin	
(۴۶)	برون تن	Nanohydroxyapatite	-	هیدروژل
(۷)	برون تن	-	Risperidone	
(۲۰)	برون تن	-	Curcumin	
(۲)	برون تن / درون تن	-	BMP-2	میکروذره ها
(۵۰)	برون تن	-	BMP-2, IGF-1 ^D	
(۳۰)	برون تن	-	quercetin	نانوذره ها
(۳۴)	برون تن	-	Curcumin	
(۵۳)	برون تن	-	Paclitaxel, doxorubicin	

^A Bone morphogenetic protein-2

^B β -tricalcium phosphate

^C Human platelet lysate

^D Insulin-like growth factor I

شده، در خود نگه دارد. هیدروژل 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،

هیدروژل فیبروئین ابریشم

یک هیدروژل، 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. به‌همین دلیل، پروتکل فرمولاسیون میکروذره‌ها برای حفظ داروی فعال، نیاز به بهینه‌سازی دارد. علی‌رغم مزیت‌های گفته شده برای سیستم‌های رهایش دارو بر پایه میکروذره‌های فیبروئین ابریشم، این محدودیت‌ها منجر به توسعه سیستم‌های نانوذره‌ای شد.

نانوذره‌های فیبروئین ابریشم

نانوذره‌های زیست‌تخریب‌پذیر بر پایه پلی‌مرهای زیست‌سازگار از اهمیت بسزایی برخوردار بوده‌اند. از مزایای نانوذره‌های زیست‌تخریب‌پذیر می‌توان به سهولت استفاده از آن‌ها در جهت تحریک سیستم ایمنی، امکان بارگذاری هم‌زمان داروهای متنوع بر روی آن‌ها اشاره کرد (۴۷). به‌علاوه، نانوذره‌ها 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 می‌شوند (۲۴). پلی‌مرهای طبیعی زیست‌سازگار و زیست‌تخریب‌پذیر در محدوده نانو می‌توانند برای مدت طولانی بدون ایجاد سمیت در بدن باقی بمانند (۴۸).

در میان پلی‌مرهای طبیعی کاربرد نانوذره‌های فیبروئین ابریشم، به‌خاطر مزیت‌هایی مانند زیست‌سازگاری، تخریب کنترل‌شده، شکل و اندازه ذره‌ها قابل کنترل، شرایط ملایم بارگذاری دارو، ظرفیت اتصال بالا برای داروهای مختلف و رهایش داروی پیوسته و کنترل شده، گسترش پیدا کرده‌اند. اندازه کوچک نانوذره‌های فیبروئین ابریشم باعث نفوذ آن‌ها از میان مویرگ‌های کوچک می‌شود که این باعث افزایش جذب سلولی داروهای انکپسوله شده و یا مولکول‌های درمانی می‌شود (۳۳). یکی از اصلی‌ترین مزایای استفاده از فیبروئین ابریشم به‌عنوان حامل دارویی، انجام فرآیندهای آبی برای بارگذاری داروهای حساس مانند پروتئین‌ها و نوکلئوتیک-اسیدهای درمانی است که باعث ایجاد مقاومت‌های خوب برای حل شدن و جلوگیری از تخریب‌های آنزیمی و گرمایی ناخواسته می‌شود (۳۵). این فرآیند توسط انتقال ترکیبی شکل آلفا هلیکسی، به صفحه‌های خیلی کریستالی بتا، از طریق کشش مکانیکی، اولتراسونیک، حلال و .. انجام می‌شود. انجام این فرآیند از انجام هرگونه فرایند سخت و دشوار جلوگیری می‌کند و ابریشم را به‌عنوان سیستمی برای کاربردهای رهایش دارو آماده سازی می‌کند (۲۵). روش‌های مختلفی از جمله

آب‌گریزی، شارژ و غلظت پلی‌مر بر روی نرخ رهایش مولکول‌های مختلف دارویی از هیدروژل تأثیر می‌گذارند (۳۵). فیبروئین ابریشم یک پلی‌مر طبیعی با نواحی آبدوست و آب-گریز است که قابلیت تشکیل هیدروژل را دارد. هیدروژل فیبروئین می‌تواند به‌صورت سیستم‌های دارورسانی قابل تزریق یا غیرقابل تزریق برای رساندن فاکتورهای رشد و حتی سلول‌های بنیادی مورد استفاده قرار بگیرد. با توجه به این واقعیت که فرآیند ژل شدن فیبروئین ابریشم، افزایش میزان صفحه‌های β را القاء می‌کند، بنابراین نیاز به دست‌کاری هیدروژل‌های فیبروئین ابریشم با حلال‌ها، برای ایجاد خاصیت غیرقابل حل شدن در آب، وجود ندارد. روش‌های مختلفی برای ایجاد هیدروژل ابریشم وجود دارد. از آنجایی که pH ایزوالکتریک فیبروئین ابریشم حدود ۴/۲ است، هیدروژل‌های فیبروئین ابریشم به‌راحتی با کاهش pH محلول فیبروئین به ۴ در حضور دارو با استفاده از محلول اسیدی، تهیه می‌شوند. این شرایط اسیدی می‌تواند برای بعضی از داروها مفید و برای بعضی دیگر مضر باشد. مخلوط کردن محلول فیبروئین ابریشم با پلی‌اتیلن‌اکساید^۱ یا پلاکسومر^۲ باعث القای ژل شدن به-وسیله افزایش میزان صفحه‌های بتا در pH حدود ۷ به‌دلیل دهیدراته کردن محلول فیبروئین ابریشم می‌شود که می‌تواند برای ساخت هیدروژل حاوی داروهای حساس به pH پایین، مفید باشد. از دیگر روش‌های القای هیدروژل می‌توان به افزایش Ca^{2+} و استفاده از التراسونیک اشاره کرد. خصوصیت مکانیکی ضعیف، محدودیت مهم استفاده از هیدروژل‌ها در کاربردهای پزشکی است (۲۵،۳۱،۵۲).

میکروذره‌های فیبروئین ابریشم

حامل‌های میکروذره‌ای فیبروئین ابریشم نیز به‌عنوان حامل‌های درمانی کاربرد دارند. استفاده از میکروذره‌های فیبروئین ابریشم از مزیت‌های 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 (۲۶). علی‌رغم خصوصیت‌های فراوان برای استفاده از میکروذره‌ها به‌عنوان حامل‌های دارویی، فرآیند آماده سازی سخت مانند عامل‌های کراس‌لینک کننده یا استفاده از دمای بالا، باعث ایجاد محدودیت در استفاده از

¹ Poly(ethylene) oxide

² Poloxamer

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

روش حلال - ضد حلال^۱، روش خرد کردن مکانیکی^۲، پاشش الکتریکی^۳، تکنولوژی مایع فوق بحرانی^۴ و میکرومولسیون برای آماده سازی نانوذره های ابریشم وجود دارد (۵۷).

بنابراین روش رایج و آسان برای الحاق دارو به نانوذره های فیبروئین ابریشم حل و یا مخلوط کردن دارو در محلول فیبروئین قبل از انجام فرآیند ساخت نانوذره ها، است. یکی از چالش های این روش اطمینان از عدم تأثیر منفی فرآیند ساخت نانوذره ها بر روی فعالیت بیولوژیکی و یکنواختی دارو است. نانوذره های ابریشم می توانند برای رهایش مولکول های کوچک (داروهای ضد سرطان)، پروتئین ها، فاکتورهای رشد، داروهای ژنی و .. استفاده شوند.

یکی دیگر از مزایای نانوذره های ابریشم سطح فعال آن ها است، همان طور که اشاره شد، پروتئین ابریشم شامل رنج وسیعی از آمینواسیدها با گروه های فعال شامل آمین، الکل، فنول، گروه های کربوکسیل و تیول است که اتصال که اجازه اصلاح و تغییر سطح نانوذره های پروتئینی برای پاسخ های بیولوژیکی (افزایش فراهمی زیستی و یا دارورسانی هدفمند) و هم چنین اتصال دارو به سطح نانو ذره را فراهم می نماید بنابراین نانوذره های فیبروئین توانایی اتصال و رسانش مقادیر قابل توجه دارو با مکانسیم ها مختلف مانند برهم کنش های الکترواستاتیک، برهم کنش های آب گریز و اتصال کووالانسی را دارند (۵۷). نانوذره های ابریشم با بار منفی (۲۶ - تا ۲۴-) با داروهای مختلف با شارژ مثبت پیوند الکترواستاتیکی قوی برقرار می کنند. این برهم کنش های الکترواستاتیکی قوی، رهایش اولیه خاصی را برای نانوذره های فیبروئینی ایجاد می کنند (۳۸،۳۵،۱۶،۱۵).

نتیجه گیری

فیبروئین ابریشم، یک پلی مر طبیعی دارای مجوز سازمان غذا و داروی ایالات متحده آمریکا است که به واسطه ویژگی هایی مانند زیست سازگاری، زیست تخریب پذیری، خواص مکانیکی مطلوب، گروه های عاملی بسیار، فرآیند پذیری آسان و نیز قابلیت تشکیل اسفنج سه بعدی، فیلم، ایاف، هیدروژل، میکرو و نانوذره ها به گزینه مناسبی نه تنها برای دارورسانی پروتئین -

¹ Desolvation

² Mechanical comminution

³ Electrospraying

⁴ 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, Dopler D, Meinel 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, Sadrjavadi K, Hajialyani M, Shokoohinia Y, Fattahi 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/TiO₂nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering. *Mater Sci Eng C*. 2018;82:265-76.
20. Karahaliloğlu 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, Kudithalart P, Waratrujiwong T, Suwanton 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/nanohydroxyapatite 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, Pr at 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.

