

دارو رسانی نانو کامپوزیت هیدروژل برای بازسازی زخم تارهای صوتی

الهام گروسی

دانشکده علوم پایه، دانشگاه علوم تحقیقات، تهران

چکیده

محدودیت هایی که درمان های متداول دارند، موجب شده است که از سیستم های کنترل دارو رسانی استفاده شود. در سال های اخیر، تکنولوژی هیدروژل و نانو ذرات هیدروژلی، بخش جدایی ناپذیر از درمان سلامت انسان شده است. بررسی حاضر، نقش نانو ذرات هیدروژل را در انتقال دارو برجسته می کند، که می تواند دارو را به زخم حاد تارهای صوتی، برساند. تزریق فاکتور رشد فیبروبلاست پایه ای (bFGF)، پتانسیل درمان زخم تارهای صوتی را دارد. اما زمان کار (bFGF) کوتاه و برای بدست آوردن تاثیر احیاء کننده، نیازمند تزریق های مکرر است. این روش تاثیرات دارو رسانی پایدار یک تزریق منفرد از bFGF هیدروژل را بر روی لایه ی زیر غشای مخاطی از تارهای صوتی زخم شده ی هشت سگ تازی بررسی می کند. بررسی ارتعاشی و بررسی بافت شناسی بهبود قابل توجهی را بر روی دامنه ارتعاش و ترمیم اسید هیالورونیک را بوسیله گروه درمانی bFGF هیدروژل نشان می دهد.

واژه های کلیدی: بیو مواد، زخم تارهای صوتی، سیستم دارو رسانی، فاکتور رشد فیبروبلاست پایه ای، نانو کامپوزیت، هیدروژل

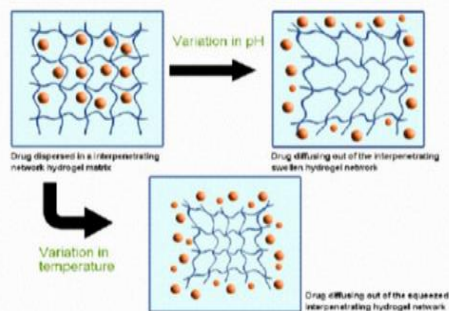
Elhamgaroosi67@gmail.com: ایمیل نویسنده مسئول

۱- مقدمه

واژه هیدروژل اولین بار به وسیله ویچتر و لیم در سال ۱۹۶۰ تعریف شد که بر روی پلیمر (پلی هیدروکسی اتیل متاکریلات) پلی (HEMA)، کار کردند [۱]. این کار، ویژگی های این پلیمر شکننده را به عنوان آب بسیار متورم، نرم و ژل الاستیک، برجسته کرد و به علاقه زیادی به هیدروژل ها به عنوان طبقه ای از بیومواد و کاربردهای آنها در سیستم دارورسانی منجر شد. اصطلاح هیدروژل، خود توضیحی بر وجود خود است، ساختار گیاهان، اجزای بافت خارجی سلول ها، بیوفیلیم میکروارگانیسم ها، وجود آنها را اثبات می کند. پلیمرهای طبیعی و سنتزی خاص مانند هیدروکسی اتیل سلولز (HEC)، پلی (لاکتیک گلیکولیک اسید) (PLGA)، نشاسته و ژلاتین برای سنتز سیستم دارورسانی مورد تقاضا هستند. هیدروژل ها به عنوان شبکه های بیوپلیمری سه بعدی که تمایل به جذب مقداری زیادی از آب دارند و خودشان در آب محلول نیستند، تعریف می شوند. تشکیل شبکه سه بعدی به وسیله پیوند عرضی از زنجیرهای پلیمری، توسط برهم کنش های فیزیکی، پیوند هیدروژنی، برهم کنش های کوالانسی و وان دروالس اتفاق می افتد [۲]. سطح نرم و الاستیک مانند، ساختار و ویژگی های شیمی فیزیک هیدروژل ها، تقلیدی از بافت انسان است. این ویژگی ها، آنها را کاندیدای بلقوه ای برای سیستم های دارورسانی کرده است. یکی از سیستم های دارو رسانی هیدروژل، درمان زخم تارهای صوتی است [۳]. این زخم ممکن است به دنبال صدمه یا التهاب اتفاق بیوفتد. زخم، ساختار لایه های زیر غشای مخاطی را مختل می کند و موجب اختلال شدید و مهار نشدنی در صوت می شود [۴]. مطالعات بافت

شناسی قبلی [۵] روی زخم تارهای صوتی، تغییرات در تشکیل و توزیع اجزا بافت خارج سلولی (ECM) مانند تراکم یا بی نظمی رسوب کلاژن نوع ۱، کاهش الاستین و دکورین، افزایش فیبرونکتین و کاهش گاه به گاه هیالورونیک اسید (HA) - که بخش عمده ی مایع فصلی را تشکیل می دهد را نشان داده اند. تلاش هایی به منظور بازسازی ویژگی های معمولی زخم تارهای صوتی، از جمله تزریق چربی/کلاژن، پیوند و شکاف و تشریح زخم انجام شده است [۹]. با این حال این روش ها، توزیع (ECM) را بازسازی نمی کنند. به دلیل مشکل بودن جایگزینی بافت زخم با (ECM)، در اینجا، فقدان استراتژی درمانی معتبر برای زخم تارهای صوتی وجود دارد. فاکتورهای رشد ایزاری قوی برای القای احیاء بافت بوسیله تحریک و کنترل رفتار سلول هستند. فاکتور رشد فیبروبلاست پایه ای (bFGF)، پتانسیل درمانی برای زخم تارهای صوتی، کاهش رسوب کلاژن و افزایش محصول هالورونیک اسید را دارد [۱۵۱۰]. با این حال چون زمان کار bFGF نسبتاً کم است و در خیلی از موارد تزریق های مکرر، برای بدست آوردن تاثیرات احیاء کننده لازم است، بنابراین بررسی روش های متعددی که تاثیرات را تقویت کند، مانند بررسی از طریق سیستم دارو رسانی (DDS)، مهم است. هیدروژل زیست تخریب پذیر، برای افزایش تاثیرات احیاء کننده ی فاکتور رشد در داخل بدن مثل bFGF، HGF، فاکتور رشد مشتقات پلاکت، توسعه یافته است. این هیدروژل از پیوند عرضی شیمیایی ژلاتین با مقادیر متنوعی از گلوکارآلدئید تهیه می شود و در کنترل رها سازی فاکتور های رشد بیولوژیک فعال در بخش های دیگر بدن، موفقیت خود را اثبات کرده است [۲۲۱۶] و همچنین به

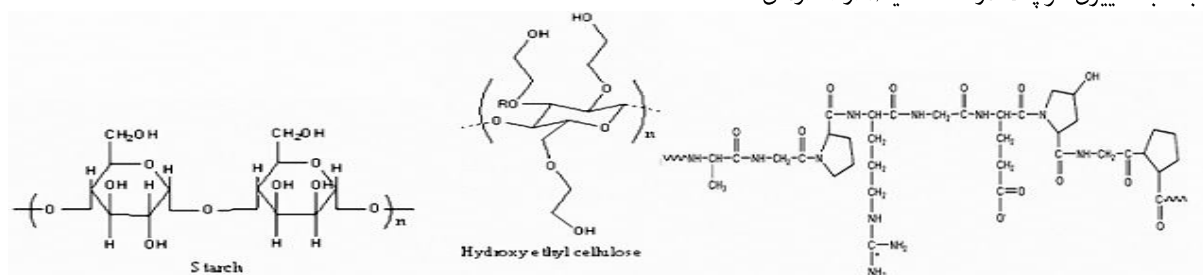
به مقداری بزرگ تغییر می‌کند [۲۵]. (شکل ۱) رفتار متورم و غیر متورم از شبکه های هیدروژل با تغییر در دما و PH را نشان می دهد. ساختار بافت پلیمری مهم ترین نقش را در تصمیم گیری مشخصات پاسخ گویی PH هیدروژل ایفا می کند. (شکل ۲) ساختار پلیمرهایی را که در سنتز هیدروژل برای سیستم دارورسانی استفاده شده‌اند را نشان می دهد [۲۶].



شکل ۱: رفتار شبکه هیدروژل در دما و PH متفاوت

۳.۱- ژلاتین پلیمر هوشمند مورد استفاده برای هیدروژل بر اساس سیستم های دارورسانی در تار صوتی

ژلاتین ماده‌ای جامد نیمه شفاف، بی‌رنگ، ترد و کمابیش بی‌مزه است که از کلاژن درون پوست و استخوان جانوران به‌دست می‌آید. ژلاتین به عنوان ماده اولیه در تهیه هیدروژل ها، کاندیدایی جذاب به حساب می‌آید. به دلیل ویژگی های زیست سازگاری، زیست تخریب پذیری و حالت ژله ایی که دارد. با این حال ژلاتین چون نقطه ذوب نسبتاً پایینی دارد، در دمای اتاق ژلی ناپایدار است. بنابراین در حضور ماده ای به عنوان پیوند عرضی مانند آکریل آمید یا گلوکار آلدهید، هیدروژل هایی با شبکه های پلیمری در هم تنیده تشکیل می‌دهد. که کاربردهای متنوعی در مواد غذایی، عکاسی، محصولات فنی دارد و در حوزه زیست پزشکی در پانسمان زخم و سیستم دارو رسانی استفاده شده است [۲۷].



شکل ۲: ساختار پلیمرهایی استفاده شده در سنتز هیدروژل برای دارورسانی

صورت تجاری هم در دسترس است و این نوع ویژه، براحتی قابل تزریق هم است. هدف این مطالعه بررسی اثرات یک تزریق منفرد از bFGF هیدروژل، بر روی زخم حاد تارهای صوتی با استفاده از مدل سگ است. علاوه بر این مقایسه ی آنالیز بین تاثیرات bFGF هیدروژل بدست آمده از این مطالعه و تزریق bFGF محلول بدست آمده از اطلاعات قبلی، انجام شد [۱۲].

۲- ظهور هیدروژل به عنوان سیستم دارو رسانی

واژه پلیمرهای هوشمند از توانایی هیدروژل‌ها به تقلید از پاسخ غیرخطی DNA و پروتئین سر چشمه گرفته است [۲۲]. برترین ویژگی هیدروژل ها، رفتار آنها برای تطابق تغییرات ساختاری در پاسخ به آغازگرهای مختلف شیمیایی یا فیزیکی است (شکل ۳) و آنها را به عنوان کاندیدایی هوشمند برای دارورسانی آماده می کند. سیستم های دارورسانی فعلی دردناک، بی اثر و مداخله گر هستند. کشف هیدروژل های میکرو نانو هوشمند، چاره ای زیرک برای سیستم دارورسانی پایدار فراهم می کند که موانع بالا را آشکار می کند. به علاوه سینتیک رهایش دارو ممکن است با اصلاح شکل، سایز و توزیع دارو در هیدروژل‌ها درطول روند مونتاژ، اصلاح شود. هیدروژل های هوشمند با داروهای سرطانی لود می‌شوند، در نتیجه رهایش پایدار دارو تا زمانی که هیدروژل‌ها به سلول های سرطانی هدف برسند، رخ می‌دهد. این نوع از سیستم‌ها پتانسیل بسیار زیادی برای حمل ایمن و تاثیر گذار داروهای آینده را با مکانیسم های بهبود یافته فراهم میکند [۲۳]. هیدروژل‌هایی از منابع طبیعی به جزیی جدایی ناپذیر و کلی از سیستم مراقب بهداشتی انسان تبدیل شده اند [۲۴]. با ارزش ترین ویژگی هیدروژل که آنها را کاندید مناسبی برای استفاده در سیستم دارورسانی کرده است توانایی آنها در پاسخ به محرک های خارجی، بخصوص تغییرات PH است. تمام مواد یونی، حساس به PH و قدرت یونی هستند در نتیجه، شبکه با تغییری کوچک در PH محیط، از اندازه ی منفذ مانند



شکل ۳: موقعیت برهم کنش های فیزیکی (a) و شیمیایی (b) بین دارو و شبکه

ی بدن مانند بازسازی زخم تارهای صوتی بررسی شده اند [۳۱].

۵- نتایج

هشت سگ از نژاد تازی پاکوتاه با وزن ۱۰۸ کیلوگرم انتخاب شده، تار صوتی سمت راست حنجره آنها خراشیده شده و سپس به دو دسته چهارتایی تقسیم شدند. به دسته اول bFGF هیدروژل تزریق شد و به دسته دوم که به عنوان شاهد شناخته می‌شوند، محلول نمک تزریق شد، و تحت بررسی ارتعاشی و بررسی بافت شناسی قرار گرفتند [۳].

۵.۱- بررسی ارتعاشی

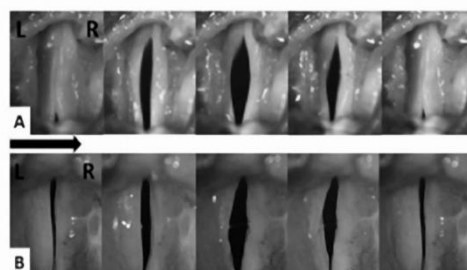
نتایج بررسی ارتعاشی بهبود ارتعاش مخاط حنجره را بوسیله bFGF هیدروژل در مقایسه با گروه شاهد نشان داد. (شکل ۴A) دسته ی اول را که با bFGF هیدروژل درمان شده اند را نشان میدهد و شکل (۴B) گروه شاهد را نشان می‌دهد. دامنه موجی مخاط نرمال شده (NMWA) در گروه bFGF هیدروژل به میزان قابل توجهی بلندتر از گروه شاهد است (شکل ۵A). فشار آستانه آواسازی (PTP) و شکاف نرمال دهانه ی حنجره (NGG) در گروه bFGF هیدروژل به میزان قابل توجهی در مقایسه با فشار آستانه آواسازی (PTP) و شکاف نرمال دهانه ی حنجره (NGG) گروه شاهد کم شدند (به ترتیب شکل ۵B و ۵C) [۳].

۵.۲- بررسی بافت شناسی

نتایج بررسی بافت شناسی نشان داد که اسید هالورونیک و الاستین به میزان قابل توجهی در تارهای صوتی گروه شاهد کم شدند و سطح اسید هالورونیک و الاستین در گروه bFGF هیدروژل مشابه با تارهی صوتی نرمال، حفظ شدند. رنگ امیزی با آلسین ابی (Alcian blue)، بازسازی بهتری را در درمان با bFGF هیدروژل در مقایسه با درمان گروه شاهد نشان داد. رنگ امیزی با الاستیکا ون گیزون (Elastica Van Gieson) توقف رسوب متراکم کلاژن و سازماندهی مجدد الاستین را در زخم تار صوتی در گروه bFGF هیدروژل در مقایسه با گروه شاهد نشان می‌دهد (شکل ۶) [۳].

۴- نانوذرات و نانوکامپوزیت هیدروژل

نانو ذرات هیدروژل به عنوان شبکه های سه بعدی آبی متورم متصل به هم، در حضور نانو ذرات تعریف می شود. تشکیل شبکه توسط هر دو برهم کنش شیمیایی و فیزیکی رخ می دهد گنجانند نانو ذرات در بافت هیدروژلها به خواص فیزیکی - شیمیایی منحصربه فرد هیدروژلها مثل خواص مکانیکی، نوری، حرارتی، بازدارندگی، شبیه سازی الکتریکی و غیره می‌افزاید. نانوذرات همچنین می‌توانند به عنوان یک عامل پیوند عرضی (فیزیکی و شیمیایی) عمل کنند ترکیب و تشکیل پلیمرهای سنتزی و طبیعی با نانوذرات و بیومولکولها به ترکیب شیمیایی، فیزیکی و بیولوژیکی مفیدی برای تولید هیدروژل های نانوکامپوزیتی که برای تعمیر و بازسازی بافت های انسان و عملکرد بدن بکار می‌روند، منجر می‌شود [۲۸]. برای تشکیل نانوکامپوزیت های هیدروژلی تثبیت شده، پراکندگی این نانوذرات باید یکنواخت باشد و شکل گیری ساختارهایی با مقیاس های بزرگ نیاز به کنترل دارد. بنابراین اضافه کردن سیلیکات به بافت پلیمر به عنوان یک عامل پیوند عرضی عمل میکند و قدرت شبکه را بهبود می‌بخشد [۳۰،۲۹]. وارد کردن نانوذرات فلزی (مثل نقره، طلا) پراکنده در هیدروژل پلیمری می‌تواند هدایت الکتریکی و خواص ضد میکروبی را بهبود بخشد. هیدروژل نانوکامپوزیتی برای کاربردهای زیست پزشکی همانند ارتوپدی، کاربردهای ریزدانه های دندانانی در فک و صورت و ترمیم بافت های آسیب دیده



شکل ۴: (A) تار صوتی درمان شده با هیدروژل bFGF،

ارتعاش مخاطی تقریباً نرمال را نشان می‌دهد،

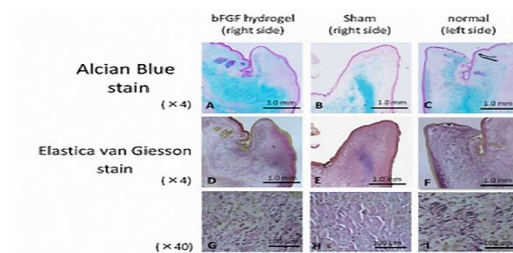
(B) تار صوتی درمان شده با گروه شاهد، ارتعاش

مخاطی محدودی را نشان می‌دهد.

تزریق شده رها می‌شود، پرور واپاشی هیدروژل هم صورت می‌گیرد. نتایج و آنالیزها بین اطلاعات موجود و قبلی [۱۲]، بهبود خواص ارتعاشی و بافت شناسی تارهای صوتی را نشان می‌دهند و پیشنهاد میکنند که bFGFDDS نسبت به محلول bFGF احتمالاً برتری دارد و هیدروژل علاوه بر قسمت‌های جانبی، داخل مخاط تارهای صوتی هم کار میکند.

۷- منابع

- [1] O. Wichterle and D. Lim (1960).
- [2] Y. Qiu and K. Park, Advanced Drug Delivery Reviews, 53: 321339 (2001).
- [3] Toshiki K, Masanobu M, Nao H, Yo K, et al. Drug delivery system of basic fibroblast growth factor using gelatin hydrogel for restoration of acute vocal fold scar, Auris Nasus Larynx 2016;41.
- [4] Hirano S. Current Treatment of vocal fold scarring. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg 2005;13:143-7.
- [5] Hirano S, Minamiguchi S, Yamashita M, Ohno T, Kanemaru S, Kitamura M. Histologic Characterization of human scarred vocal folds. J Voice 2009;23:399-407.
- [6] Rousseau B, Hirano S, Scheidt TD, Welham NV, Thibeault SL, Chan RW, et al. Characterization of vocal fold scarring in a canine model. Laryngoscope 2003;113:620-7.
- [7] Rousseau B, Hirano S, Chan RW, Welham NV, Thibeault SL, Ford CN, et al. Characterization of chronic vocal fold scarring in a rabbit model. J Voice 2004;18:116-24.
- [8] Tateya T, Tateya I, Sohn JH, Bless DM. Histologic characterization of rat vocal fold scarring. Ann Otol Rhinol Laryngol 2005;114:183-91.
- [9] Dailey SH, Ford CN. Surgical management of sulcus vocalis and vocal fold scarring. Otolaryngol Clin North Am 2006;39:23-42.
- [10] Hirano S, Bless DM, Heisey D, Ford CN. Effect of growth factors on hyaluronan production by canine vocal fold fibroblasts. Ann Otol Rhinol Laryngol 2003;112:617-24.
- [11] Suehiro A, Hirano S, Kishimoto Y, Tateya I, Rousseau B, Ito J. Effects of basic fibroblast growth factor on rat vocal fold fibroblasts. Ann Otol Rhinol Laryngol 2010;119:690-6.
- [12] Suehiro A, Hirano S, Kishimoto Y, Rousseau B, Nakamura T, Ito J. Treatment of acute vocal fold scar with local injection of basic fibroblast growth factor: a canine study. Acta Otolaryngol 2010;130:844-50.
- [13] Hong HH, Trackman PC. Cytokine regulation of gingival fibroblast lysyl oxidase, collagen, and elastin. J Periodontol 2004;73:145-52.



شکل ۶: (A-C) رنگ آمیزی با آلسین آبی- تصویر G-I رنگ آمیزی با الاستیکا ون گیزون و (ADG) تارهای درمان شده با هیدروژل-bFGF و (BEH) تارهای درمان شده با شاهد و (CFI) تارهای نرمال را نشان می‌دهد.

۶- چشم انداز آینده و بحث و نتیجه گیری

کاربرد موفق هیدروژل در سیستم دارو رسانی موجب نوآوری مواد پلیمری جدید و پیشرفت در نانو تکنولوژی شده است. کلید موفقیت تکنولوژی هیدروژل، طراحی سیستم های دارورسانی کارآمد با حداقل محدودیت و روش آسان است که هم از نظر اقتصادی بصره است و هم زمان اثربخشی دارو را تسریع کرده است [۲۶]. هیدروژل‌ها و نانو کامپوزیت های هیدروژلی برای هدف قرار دادن تومور، عکس برداری و بازسازی بافت های آسیب دیده ی بدن در حال بررسی هستند. بازسازی زخم تارهای صوتی حنجره، چالش درمانی قابل توجهی را برجای گذاشته است. اگرچه برای زخم تارهای صوتی تلاشهای فراوانی با تزریق های جراحی متنوع یا ایمپلنت‌ها مانند کاشت چربی [۳۲] و تزریق کلاژن [۳۳] صورت گرفته است، هیچ روش درمانی موثری ایجاد نشده است. در سال های اخیر روش های احیاء کننده بر پایه اصول مهندسی بافت با استفاده از فاکتورهای رشد متنوع، بررسی شده است. که در این میان فاکتور رشد فیبروبلاست پایه ای (bFGF) فاکتور رشدی موثر است که با نتیجه ای که بر روی سلول های ماهیچه ای نرم، سلول های آندوتلیال موجود در دیواره مویرگ، فیبروبلاست که سلول های موجود در بافت همبند هستند و سلول های مخاطی می‌گذارد، التهاب زخم را بهبود می‌دهد [۳۴-۳۵]. مطالعه بیان ژن نشان می‌دهد که bFGF محرکی برای فیبروبلاست تار صوتی است و سطح سنتز اسید هالورونیک (HA) نوع I-III را افزایش می‌دهد و تشکیل محصول کلاژن نوع I که نقش مثبتی در جلوگیری از تشکیل زخم دارد را متوقف می‌کند [۳۶]. در مطالعات قبلی، اثر احیاء کننده bFGF روی زخم تارهای صوتی سگ بوسیله تزریق مکرر محلول bFGF داخل تارهای صوتی آسیب دیده صورت گرفته است که این تزریق در پارامترهای ارتعاشی و بافت شناسی افزایش HA و کاهش رسوب کلاژن را نشان داده است [۱۱]. با این حال bFGF در حالت محلول توسط تزریق در محل، سریع نفوذ می‌کند [۳۷-۴۰] و علاوه بر این نیمه عمر bFGF محلول ۱۵ دقیقه گزارش شده است [۴۱]. نانو ذرات هیدروژلی ژلاتین استفاده شده در این مطالعه برای کمک به دارو رسانی bFGF، اجازه ی رهایش آرام bFGF را در بافت های مجاور می‌دهد. بتدریج که bFGF از هیدروژل در مکان

- [29] Y. Murali Mohan, K. Lee, T. Premkumar and K. E. Geckeler, *Polymer*, 48: 158164 (2007).
- [30] V. Kozlovskaya, E. Kharlampieva, B. P. Khanal, P. Manna, E. R. Zubarev and V. V. Tsukruk, *Chemistry of materials*, 20: 74747485 (2008).
- [31] A. K. Gaharwar, C. P. Rivera, C.J. Wu and G. Schmidt, *Acta Biomaterialia*, 7: 41394148 (2011).
- [32] Sataloff RT, Spiegel JR, Hawkshaw M, Rosen DC, Heuer RJ. Autologous fat implantation for vocal fold scar: a preliminary report. *J Voice* 1997;11:238-46.
- [33] Remacle M, Lawson G, Degols JC, Evrard I, Jamart J. Microsurgery of sulcus vergeture with carbon dioxide laser and injectable collagen. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2000;109:141-8.
- [34] Przybylski M. A review of the current research on the role of bFGF and VEGF in angiogenesis. *J Wound Care* 2009;18:516-9.
- [35] Nakajima H, Sakakibara Y, Tambara K, Iwakura A, Doi K, Marui A, et al. Therapeutic angiogenesis by the controlled release of basic fibroblast growth factor for ischemic limb and heart injury: toward safety and minimal invasiveness. *J Artif Organs* 2004;7:58-61.
- [36] Hirano S, Bless DM, del Rio A, Connor NP, Ford CN. Therapeutic potential of growth factors for aging voice. *Laryngoscope* 2004;114:2161-7.
- [37] Ellman MB, An HS, Muddasani P, Im HJ. Biological impact of the fibroblast growth factor family on articular cartilage and intervertebral disc homeostasis. *Gene* 2008;420:82-9.
- [38] Lazarous DF, Shou M, Stiber JA, Dadhanian DM, Thirumurti V, Hodge E, et al. Pharmacodynamics of basic fibroblast growth factor: route of administration determines myocardial and systemic distribution. *Cardiovasc Res* 1997;36:78-85.
- [40] Edelman ER, Nugent MA, Karnovsky MJ. Perivascular and intra venous administration of basic fibroblast growth factor: vascular and solid organ deposition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90: 1513-7.
- [41] Tamura E, Fukuda H, Tabata Y. Adipose tissue formation in response to basic fibroblast growth factor. *Acta Otolaryngol* 2007;127:1327-31.
- [14] Heldin P, Laurent TC, Heldin CH. Effect of growth factors on hyaluronan synthesis in cultured human fibroblasts. *Biochem J* 1989;258: 919-22.
- [15] Ozeki M, Ishii T, Hirano Y, Tabata Y. Controlled release of hepatocyte growth factor from gelatin hydrogels based on hydrogel degradation. *J Drug Target* 2001;9:461-71.
- [16] Ikada Y, Tabata Y. Protein release from gelatin matrices. *Adv Drug Deliv Rev* 1998;31:287-301.
- [17] Sakaguchi G, Tambara K, Sakakibara Y, Ozeki M, Yamamoto M, Premaratne G, et al. Control released hepatocyte growth factor prevents the progression of heart failure in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Ann Thorac Surg* 2005;79:1627-34.
- [18] Haraguchi T, Okada K, Tabata Y, Maniwa Y, Hayashi Y, Okita Y. Controlled release of basic fibroblast growth factor from gelatin hydrogel sheet improves structural and physiological properties of vein graft in rat. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:548-55.
- [19] Nakae M, Kamiya H, Naruse K, Horio N, Ito Y, Mizubayashi R, et al. Effects of basic fibroblast growth factor on experimental diabetic neuropathy in rats. *Diabetes* 2006;55:1470-7.
- [20] Hokugo A, Sawada Y, Hokugo R, Iwamura H, Kobuchi M, Kambara T, et al. Controlled release of platelet growth factors enhances bone regeneration at rabbit calvaria. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;104:44-8.
- [21] Hori K, Sotozono C, Hamuro J, Yamasaki K, Kimura Y, Ozeki M, et al. Controlled release of epidermal growth factor from cationized gelatin hydrogel enhances corneal epithelial wound healing. *J Control Release* 2007;118:169-76.
- [22] I. Y. Galaev and B. Mattiasson, *Trends in biotechnology*, 17: 335340 (1999).
- [23] H. T. Ta, C. R. Dass and D. E. Dunstan, *Journal of Controlled Release*, 126: 205216 (2008).
- [24] Y. Zhang, Y. Han, Z. Chu, S. He, J. Zhang and Y. Feng, *Journal of Colloid and Interface Science*, 394: 319328 (2013).
- [25] N. Peppas and A. R. Khare, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 11: 135 (1993).
- [26] Arti V and Sharif A, *Hydrogels: Smart Materials for Drug Delivery*, *Oriental Journal Of Chemistry* 2013;29;861-70.
- [27] Andrada S, Diana-Maria D, Livia M, et al. New Hydrogels Based On Gelatin And Acrylamid, U.P.B. Sci. Bull., Series B 2013;75.
- [28] P. Schexnailder and G. Schmidt, *Colloid and Polymer Science*, 287: 111 (2009).