

In Vitro Sustained Release of Pyridostigmin Bromide from Injectable Thermosensitive Chitosan Hydrogel

F. Ganji^{1*}, F. Hoobakht², F. Ghasemi Tahrir², E. Vasheghani-Farahani³

¹Assistant Professor, Biomedical Engineering Group, Chemical Engineering Faculty, Tarbiat Modares University

²Msc Student, Biomedical Engineering Group, Chemical Engineering Faculty, Tarbiat Modares University

³Professor, Biomedical Engineering Group, Chemical Engineering Faculty, Tarbiat Modares University

Abstract

Soman is one of the strongest nerve agents and treatment of poisoning with Soman is difficult and time-critical. Pyridostigmine bromide is an inhibitor of cholinesterase used for protecting against toxicity by Soman. In this study, a new injectable thermosensitive sustained release dosage form of pyridostigmine bromide was achieved by chitosan/glycerolphosphate solution. In this study, thermosensitivity and rheological properties of chitosan solution (2% w/v) in aqueous hydrochloric acid (0.1 molar) with different percent of glycerolphosphate salt as well as the release profile of pyridostigmine bromide have been investigated. It was observed that increasing the glycerolphosphate salt concentration would increase the pH of chitosan solution, while decrease its gelation time and loss or storage modulus. It was also observed that glycerolphosphate salt concentration has direct effect on hydrogel thermoreversibility. The presented results indicated that hydrogel containing 2% w/v of chitosan and 16% w/v of glycerolphosphate salt could sustain the delivery of pyridostigmine bromide, through Fickian diffusion, up to four days.

Keywords: *Chitosan, Thermosensitive, Injectable, Sustained release, Pyridostigmine bromide*

*Corresponding author

Address: Fariba Ganji, Biomedical Engineering Group, Chemical Engineering Faculty, Tarbiat Modares University, P.O.Box: 14115-111, Tehran, Iran
Tel: +98 21 82883119
Fax: +98 21 82883119
E-mail: fganji@modares.ac.ir

رهايش آهسته‌ي پيريدوستيگمين برومايد از هيدروژل قابل تزريق و حساس به دماي کیتوسان در شرایط برون‌تنی

فريبا گنجی^{۱*}، فاطمه هوبخت^۲، فرزانه قاسمی تحریر^۲، ابراهيم واشقانی فراهانی^۳

^۱استاديار گروه مهندسی زیست پزشکی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
^۲دانشجوی کارشناسی ارشد گروه مهندسی زیست پزشکی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
^۳استاد گروه مهندسی زیست پزشکی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

چکیده

داروی پیریدوستیگمین برومايد یک عامل جلوگیری کننده از فعالیت آنزیم استیل کولین استراز به صورت برگشت‌پذیر است که در پیش‌گیری از مسمومیت با سم سومان (نوعی سلاح شیمیایی) کاربرد دارد. درین پژوهش، سعی شد با استفاده از محلول حساس به دمای کیتوسان/گلیسرول فسفات، یک سامانه‌ی آهسته‌ی رهش با قابلیت تزریق برای این دارو تهیه شود. ابتدا حساسیت دمایی و خواص رئولوژیکی محلول ۰.۲٪ وزنی/حجمی کیتوسان در محلول ۰/۱ مولار اسیدکلریدریک و درصدهای مختلف نمک گلیسرول فسفات مورد مطالعه قرار گرفت. درنهایت، رهايش داروی پیریدوستیگمین برومايد ازین سامانه‌ی حساس به دمای قابل تزریق بررسی شد. نتایج حاصل نشان داد که افزایش میزان نمک گلیسرول فسفات در محلول کیتوسان موجب افزایش آهسته‌ی pH کاهش زمان ژل شدن محلول، کاهش مدول الاستیک و استحکام ژل می‌شود. اثر غلظت نمک گلیسرول فسفات بر رفتار برگشت‌پذیری ژل نیز بررسی و مشخص شد که در غلظت‌های بالا از گلیسرول فسفات، ژل‌های حاصل غیر برگشت‌پذیر است. درمقابل، با کاهش غلظت نمک فسفاتی، خاصیت برگشت‌پذیری مشاهده شد. مطالعه‌های رهايش دارو نشان داد که هیدروژل حاوی ۰.۲٪ کیتوسان و ۰.۱۶٪ نمک گلیسرول فسفات می‌تواند رهايش آهسته‌ی دارو را برای یک دوره‌ی ۴ روزه فراهم نماید. هم‌چنین سازوکار غالب در فرایند رهايش دارو ازین هیدروژل، سازوکار نفوذ فیزیکی است.

کلیدواژه‌ها: کیتوسان، حساس به دما، قابل تزریق، رهش آهسته، پیریدوستیگمین برومايد

۱- مقدمه

در سال ۲۰۰۲ هگازی^۵ و هم‌کارانش ریزدانه‌های پیریدوستیگمین بروماید را با محلول پلیمر Eudragit RS به روش خشک‌کن پاششی^۶ تهیه کردند. بررسی رهائش دارو از ریزدانه‌ها نشان می‌دهد که میزان رهائش اولیه در حدود ۶۵٪ تا ۷۰٪ است و رهائش کامل دارو نیز حداکثر در مدت ۱۲ ساعت انجام می‌شود [۴].

در سال ۲۰۰۷ هوانگ^۷ و هم‌کارانش تحقیقاتی برای طراحی یک سامانه‌ی آهسته‌ی رهش انجام دادند. از هیدروکسی پروپیل متیل سلولز^۸ برای پوشش دهی قرص-های^۹ پیریدوستیگمین بروماید استفاده کردند. ولی با این وجود، بیش از ۵۰٪ دارو در ۵ ساعت نخست مصرف دارو آزاد شد [۵].

در سال ۲۰۱۱ بلورچیان و هم‌کارانش قرص آهسته‌ی رهش داروی پیریدوستیگمین بروماید را با استفاده از HPMC، Carnauba wax و تری‌کلسیم فسفات تهیه نمودند. منحنی رهائش دارو از قرص تهیه شده تحت شرایط بهینه، نشان داد که بعد از گذشت دو ساعت بیش از نیمی از دارو آزاد شده و کل داروی موجود در قرص نیز طی ۱۲ ساعت آزاد می‌شود [۶].

در جدیدترین تحقیق انجام شده توسط تان و هم‌کارانش در سال ۲۰۱۳، ریزکپسول‌های پلی (لاکتیک اسید) حاوی پیریدوستیگمین بروماید تهیه شده و اثر عوامل مختلف فرایندی بر خواص فیزیکی شیمیایی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. براساس آن نتایج، اندازه این ریزدانه‌ها در شرایط بهینه که حاوی ۴۰ میلی‌گرم داروی پیریدوستیگمین بروماید هستند، در حدود ۹۳۸ نانومتر است. مطالعه‌ی منحنی رهائش دارو ازین نانوذرات نشان می‌دهد که ۵۰٪ از داروی اولیه‌ی بارگذاری شده، در همان ساعات اولیه آزاد شده و مابقی دارو در نانوذرات محبوس مانده است [۷].

با توجه به آنچه بیان شد، می‌توان ادعا نمود که هنوز یک سامانه‌ی آهسته‌ی رهش تزریقی با دوره مصرف بیش‌تر از یک روز برای پیریدوستیگمین بروماید طراحی نشده و مطالعات

داروی پیریدوستیگمین بروماید (PB) در سال ۱۹۹۵ توسط سازمان غذا و داروی آمریکا^۱ برای درمان بیماری ضعیف عضلانی شدید^۲ و درمان بندآمدن ادرار پس از عمل‌های جراحی مورد تأیید قرار گرفت [۱]. این دارو معمولاً به صورت قرص مصرف می‌شود و در طول جنگ خلیج فارس نیز نیروهای نظامی آمریکایی به عنوان داروی پیش‌گیری از مرگ در هنگام روبه‌رو شدن با عامل عصبی^۳ سومان^۴ مورد استفاده قرار دادند [۲]. سم سومان به عنوان یکی از سلاح‌های شیمیایی، از لحاظ سرعت غیر فعال کردن سامانه‌ی عصبی مرکزی بسیار قوی است و فقط چند دقیقه طول می‌کشد تا واکنش تخریبی آن در بدن کامل شود. بنابراین، به علت محدودیت زمان، درمان افرادی که در معرض سومان قرار گرفته‌اند، مشکل است. عملکرد پیریدوستیگمین بروماید به صورت پیش‌گیرانه بوده و بدین سبب لازم است که این دارو قبل از روبه‌رو شدن با سومان مصرف شود. این دارو که به صورت خوراکی تجویز می‌شود، به میزان ناچیزی در دستگاه گوارش جذب می‌شود (۱۱/۵ الی ۱۸/۹ درصد)، مدت زمان اثر آن ۱ تا ۲ ساعت است و مقدار زیادی از دارو به صورت تغییر نیافته از کلیه‌ها دفع می‌شود [۳].

قرص‌های معمولی موجود، برای پیش‌گیری از مسمومیت با سم سومان، حاوی ۳۰ میلی‌گرم دارو است که باید هر ۸ ساعت مصرف شود. رهائش دارو از این قرص‌ها به صورت ناگهانی است، بدین دلیل، دوره‌ی مصرف دارو کوتاه است. قرص‌های پوششی با نام Mestinon[®] هم در بازار وجود دارند که حاوی ۱۸۰ میلی‌گرم از دارو هستند و در روز دو بار مصرف می‌شوند [۲، ۳].

تکرار مصرف زیاد این دارو در یک روز، با توجه به کاربرد آن در شرایط پرتنش و خاص حاکم بر منطقه جنگی، بیان‌گر لزوم طراحی یک سامانه‌ی آهسته‌ی رهش با دوره مصرف بیش از یک روز است.

⁵ Hegazy

⁶ Spray-drying

⁷ Huang

⁸ Hydroxypropyl Methyl Cellulose (HPMC)

⁹ Pellet

¹ U.S. Food and Drug Administration

² Myasthenia Gravis

³ Nerve Agents (NAs)

⁴ Soman

درین تحقیق، حساسیت دمایی و خواص رئولوژیک محلول ۰/۲٪ وزنی/حجمی کیتوسان در محلول ۰/۱ مولار اسیدکلریدریک و درصدهای مختلف نمک گلیسرول فسفات مورد مطالعه قرار گرفت. درنهایت رهایش داروی پیریدوستیگمین بروماید ازین سامانه‌ی حساس به دمای قابل تزریق بررسی شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

کیتوسان (با وزن مولکولی متوسط و درجه‌ی استیل زدایی بین ۷۵٪ تا ۸۵٪) از شرکت سیگما-آلدردیج^{۱۰} خریداری شد. نمک بتاگلیسرول فسفات دی سدیم (GP)، اسیدکلریدریک (w/w) ۳۷٪، دی سدیم هیدروژن فسفات دو آبه، سدیم دی هیدروژن فسفات دو آبه و اسیدسیتریک از شرکت مرک^{۱۱} تهیه شدند. داروی پیریدوستیگمین بروماید نیز از شرکت پارمیس طب خریداری شد.

۲-۲- روش‌ها

۲-۲-۱- تهیه هیدروژل حساس به دمای کیتوسان/گلیسرول

فسفات

ابتدا ۲۰۰ میلی‌گرم کیتوسان در ۹ میلی‌لیتر اسیدکلریدریک ۰/۱ مولار حل شد. سپس، این محلول تا دمای ۴°C خنک شد. آنگاه یک میلی‌لیتر محلول آبی گلیسرول فسفات با غلظت‌های ۸۰۰، ۱۰۰۰، ۱۲۰۰، ۱۶۰۰ و ۲۰۰۰ (mg/mL) به آهستگی به آن اضافه شد. در زمان اضافه کردن محلول نمک، محلول کیتوسان توسط هم‌زن به خوبی به هم زده و اختلاط آن تا حل شدن کامل نمک در محلول کیتوسان و رسیدن به یک محلول شفاف و یک‌نواخت انجام شد. محلول‌های کیتوسان/گلیسرول فسفات حاصل برای بررسی‌های بیش‌تر در دمای ۴°C نگهداری شدند.

انجام شده روی طراحی سامانه‌ی آهسته‌ی رهش خوراکی برای این دارو بوده است. با توجه به نیمه عمر کوتاه پیریدوستیگمین بروماید و میزان جذب خیلی کم آن توسط دستگاه گوارش، طراحی یک سامانه‌ی آهسته‌ی رهش غیر خوراکی و تزریقی لازم به نظر می‌رسد.

بدین منظور، درین پژوهش سعی شده است تا با استفاده از هیدروژل حساس به دمای کیتوسان/گلیسرول فسفات چنین سامانه‌ای طراحی و بررسی شود. کیتوسان پلیمری طبیعی است که در پوست خرنج و دیواره قارچ‌ها یافت می‌شود. به دلیل خواص منحصر به فردی چون زیست تخریب‌پذیری، غیر سمی بودن، آثار ضد باکتریایی، زیست سازگاری و مخاط چسبندگی، به عنوان یک زیست ماده برای کاربردهایی مانند مهندسی بافت و دارورسانی کاربردهای فراوانی دارد [۸-۱۶]. یکی از جدیدترین کاربردهای کیتوسان در زمینه‌ی طراحی سامانه‌های آهسته‌ی رهش دارو، استفاده از محلول حساس به دمای کیتوسان/گلیسرول فسفات به عنوان یک سامانه‌ی زیست تخریب‌پذیر با قابلیت تشکیل ژل در محل تزریق است. کیتوسان در محلول‌های رقیق بیش‌تر اسیده‌های آلی حل می‌شود، ولی در غلظت‌های زیاد یون هیدروژن و در $\text{pH} \geq 6.5$ انحلال ناپذیر بوده و به صورت یک ترکیب ژل مانند رسوب می‌کند. با استفاده از نمک گلیسرول فسفات (از خانواده نمک‌های پلی‌آل دارای یک سر واحد آنیونی) می‌توان خاصیت ژله‌ای شدن وابسته به pH را به خاصیت ژله‌ای شدن حساس به دما تبدیل نمود، بدون آنکه از اصلاح شیمیایی و یا پیوند عرضی استفاده شود [۱۷]. این نمک‌های فسفاتی موجب بروز یک رفتار ویژه در محلول‌های کیتوسان می‌شوند و در نتیجه به این محلول‌ها اجازه می‌دهند تا محدوده‌ی pH های فیزیولوژیک ($\text{pH} = 7$) به صورت محلول باقی مانده و تنها زمانی که دمای آن‌ها به دمای بدن رسید به شکل ژل رسوب کنند. هنگامی که محلول مایع کیتوسان/گلیسرول فسفات که حاوی داروی مورد نظر است، از طریق تزریق با سرنگ وارد بدن می‌شود، در دمای ۳۷°C به صورت یک ژل نامحلول در آب درآمده و ذرات دارو در بین زنجیره‌های آن گرفتار شده و به تدریج آزاد می‌شود [۱۸-۲۰].

¹⁰ Sigma-Aldrich

¹¹ Merck

۲-۲-۲- بررسی تیرگی

تیرگی محلول‌های کیتوسان و کیتوسان/گلیسرول فسفات ۸ درصد با استفاده از دستگاه تیرگی سنج مدل Turb 430 IR/T (ساخت کشور آلمان) تعیین شد. محلول‌ها بلافاصله پس از خروج از یخچال درون سل کوارتز ریخته شد و میزان جذب آن‌ها در دمای 37°C توسط دستگاه خوانده و نمودار تغییرات تیرگی با زمان به دست آمد. پیش از انجام آزمایش تیرگی سنجی، دستگاه تیرگی سنج با محلول‌های استاندارد فرمازین که دارای تیرگی‌های ۱۰، ۰/۰۲ و ۱۰۰۰ بودند کالیبره شد. واحد سنجش تیرگی 1°FTU است.

۲-۲-۳- اثر غلظت نمک بر خواص رئولوژیکی نمونه‌ها

بررسی خواص رئولوژی این سامانه با رئومتر مدل ARES (ساخت کشور آمریکا) انجام شد. محلول کیتوسان حاوی ۸ درصد وزنی/حجمی گلیسرول فسفات در رئومتر قرار گرفت و نمودار تغییرات مدول الاستیک و مدول ویسکوز در دمای 37°C با گذشت زمان رسم شد. مقادیر فرکانس و کرنش برای باقی ماندن در ناحیه خطی خواص ویسکوالاستیکی با مطالعه مقاله‌های مختلف به ترتیب روی ۱ هرتز و ۱ درصد انتخاب شدند. نقطه‌ی ژل شدن نقطه‌ای است که نمودار مدول الاستیک و ویسکوز به هم برخورد می‌کنند.

۲-۲-۴- اثر غلظت نمک بر pH محلول‌های حساس به دما

با توجه به خاصیت بازی نمک گلیسرول فسفات و با توجه به اینکه شرایط pH خنثا برای فعالیت اکثر عوامل دارویی مناسب است، اثر حضور نمک گلیسرول فسفات بر pH محلول‌های آبی کیتوسان بررسی شد. بدین منظور، ۵ میلی‌لیتر از محلول کیتوسان/گلیسرول فسفات به بشر ۱۰ میلی‌لیتری انتقال داده شد و با دستگاه pH متر مدل pH-220L (ساخت کشور کره)، pH تک‌تک محلول‌ها ۳ مرتبه اندازه‌گیری شد. این محلول‌ها ابتدا به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند تا از بروز هرگونه افزایش ویسکوزیته یا کداری محلول در اثر افزایش دما جلوگیری شود و زمان لازم برای تثبیت pH محلول حاصل شود.

۲-۲-۵- اثر غلظت نمک بر زمان ژل شدن

درین تحقیق، از روش لوله‌ی آزمایش وارونه^{۱۳} برای تعیین زمان ژل شدن محلول‌های کیتوسان/گلیسرول فسفات استفاده شد [۲۰]. بر مبنای این روش، وقتی که لوله‌ی آزمایش حاوی نمونه کج می‌شود، چنانچه نمونه به راحتی تا انتهای لوله جریان یابد در فاز «محلول» است و در صورتی که هیچ حرکتی در لوله نداشته باشد، در فاز «ژل»^{۱۴} قرار دارد. جریان محلول در داخل لوله، تابعی از زمان و میزان کج شدن لوله، مقدار محلول و قطر لوله‌ی آزمایش است. بنابراین، لازم است این پارامترها را قبل از انجام آزمایش ثابت نمود. بدین منظور، برای نمونه‌های حاوی درصدهای مختلف نمک گلیسرول فسفات از لوله‌های آزمایش به قطر ۱ سانتی‌متر، حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول مورد نظر استفاده شد.

لوله‌های حاوی نمونه در حمام آب با قابلیت کنترل دمای دیجیتال (Wist-F12، ساخت کشور کره) قرار داده شد و در بازه‌های زمانی ۳۰ ثانیه از حمام خارج و با زاویه ۴۵ درجه نسبت به خط افق کج شدند. بدین ترتیب، زمان ژل شدن محلول‌های کیتوسان/گلیسرول فسفات در دمای 37°C با سه بار تکرار تعیین شد.

۲-۲-۶- بررسی خاصیت برگشت‌پذیری گرمایی

به منظور مطالعه خاصیت برگشت‌پذیری گرمایی^{۱۵} برای هیدروژل‌های کیتوسان/گلیسرول فسفات، غلظت‌های متفاوتی از نمک گلیسرول فسفات به محلول کیتوسان اضافه شد و رفتار گرمایی آن‌ها به روش لوله‌ی آزمایش وارونه مورد مطالعه قرار گرفت. ابتدا هر نمونه برای مدت زمان کافی در حمام 37°C قرار داده شد تا فرایند ژل شدن آن تکمیل شود. سپس لوله‌ی حاوی ژل به حمام آب 4°C منتقل شد. چنانچه ساختار ژل در دمای 4°C پایدار بماند، آن را غیر برگشت‌پذیر گرمایی^{۱۶} نامیده و چنانچه با انتقال به دمای پایین، ژل به صورت محلول درآید، آن را برگشت‌پذیر گرمایی می‌نامیم.

¹³ Inverted Tube Test

¹⁴ Sol

¹⁵ Thermo-reversibility

¹⁶ Thermo-irreversible

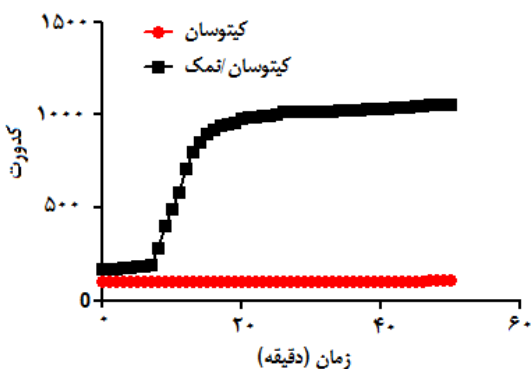
¹² Formazin Turbidity Units (FTU)

در رابطه‌ی (۲)، M_t و M_{inf} به ترتیب بیان‌گر میزان رهایش دارو در زمان t و زمان نهایی، t زمان، K ثابت سرعت رهایش دارو از سامانه و n نشان دهنده نوع سازوکار رهایش از سامانه است. برای به دست آوردن n و K از مقادیر تجربی در محدوده‌ای که درصد رهایش کم‌تر از ۶۰٪ است، استفاده شد. گاهی ممکن است دارو در هیدروژل حبس شده و آزاد نشود. مقداری از دارو در هیدروژل حاوی ۸ w/v٪ گلیسرول فسفات، باقی مانده و با گذشت زمان از ژل آزاد نشد. برای آزاد سازی داروی حبس شده، از بافر سیترات فسفات (pH=۵) به جای بافر فسفات (pH=۷/۴) استفاده شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- اثر حضور نمک بر تیرگی محلول‌های کیتوسان

از نظر شکل ظاهری با افزودن نمک گلیسرول فسفات محلول تیره‌تری نسبت به محلول کیتوسان بدون نمک مشاهده شد.



شکل (۱)- تغییرات تیرگی با زمان در دمای ۳۷°C برای

محلول‌های کیتوسان و کیتوسان/گلیسرول فسفات ۸ w/v٪

تغییرات تیرگی محلول‌های کیتوسان و کیتوسان/گلیسرول فسفات با گذشت زمان برای محلول حاوی ۸ w/v٪ نمک در شکل (۱) نشان داده شده است. در محلول کیتوسان تیرگی محلول با گذشت زمان در دمای ۳۷°C میزان زیادی تغییری نکرد؛ پس می‌توان نتیجه گرفت که محلول کیتوسان بدون نمک گلیسرول فسفات حساسیت دمایی ندارد و برای مدت زمان طولانی در دمای ۳۷°C بدون تغییر فاز باقی می‌ماند. در مقابل، در محلول کیتوسان/گلیسرول فسفات با گذشت

۲-۷- بررسی رهایش دارو از هیدروژل

کیتوسان/گلیسرول فسفات

برای تهیه هیدروژل حاوی دارو، بعد از حل کردن کامل ۲۰۰ میلی‌گرم کیتوسان در ۹ میلی‌لیتر اسیدکلریدریک و سرد کردن محلول تا دمای ۴°C، به میزان ۵۰ میلی‌گرم داروی پیریدوستیگمین بروماید به آن اضافه شد و محلول حاصل به خوبی مخلوط گردید. سپس، یک میلی‌لیتر محلول گلیسرول فسفات (۸۰۰ و ۱۶۰۰ mg/mL) به محلول اضافه شد. یک میلی‌لیتر از هیدروژل به دست آمده حاوی دارو در یک لوله‌ی آزمایش ریخته و در دمای ۳۷°C قرار داده شد تا ژل تشکیل شود. سپس، به آن ۵ میلی‌لیتر محیط رهایش اضافه شد و در حمام ۳۷°C هم‌زدن‌دار (GFL1086 ساخت کشور آلمان) که به صورت افقی با دور ۸۰ rpm تکان داده شد. در فواصل زمانی از پیش تعیین شده، ۲ میلی‌لیتر از محیط خارج شده و غلظت دارو در آن به دست آمد و به همان اندازه بافر تازه به محیط اضافه شد. محیط‌های رهایش استفاده شده درین تحقیق، شامل بافر فسفات (pH=۷/۴) و بافر سیترات فسفات (pH=۵) بود. منحنی کالیبراسیون PB در هر دو محیط، با دستگاه Cary Win 50 UV-spectroscopy (کشور اسپانیا) در طول موج ۲۶۹nm به دست آمد. درصد رهایش جمع‌ی در هر بار نمونه‌گیری از رابطه (۱) به دست آمد:

$$(1) \text{ درصد رهایش جمع‌ی} = [C_n V_t + \sum (C_i V_s)] / m_t \times 100$$

در رابطه‌ی (۱) m_t داروی بار گذاری شده در سامانه، C_i

غلظت نمونه i ، V_s حجم نمونه‌گیری، V_t حجم کل محیط رهایش و n تعداد نمونه‌گیری است. برای بررسی سازوکار رهایش PB از رابطه‌ی تجربی کرسمیر-پپاس^{۱۷} برای رهایش جزئی دارو استفاده شد (رابطه‌ی ۲):

$$(2) M_t / M_{inf} = K.t^n$$

¹⁷ Korsemeyer-Peppas

خواص ویسکوالاستیکی محلول کیتوسان/گلیسرول فسفات در حین فرایند ژل شدن سه مرحله‌ی شاخص ذیل را نشان می‌دهند:

۱- رفتار مایع گونه در زمان شروع ($G' < G''$)؛

۲- ژل شدن سریع در اطراف نقطه‌ی ژل؛

۳- ژل شدن آرام با گذشت زمان.

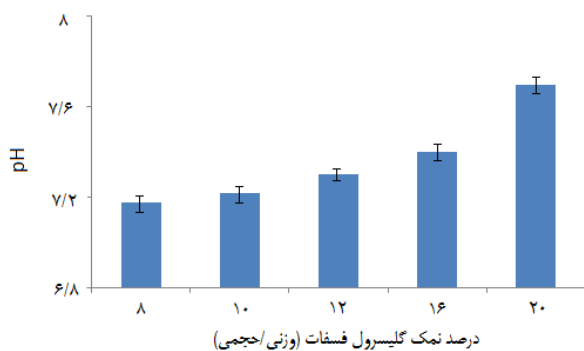
نتایج نشان می‌دهند که محلول حاوی ۸ درصد از نمک گلیسرول فسفات پس از رسیدن به دمای اتاق و قرار گرفتن در رئومتر در زمان تقریبی ۹ دقیقه در دمای 37°C ژل می‌شود.

۳-۳- اثر غلظت نمک بر pH و زمان ژل شدن

محلول‌های کیتوسان/گلیسرول فسفات

شکل (۳) تغییرات pH محلول‌های کیتوسان/گلیسرول فسفات را با تغییرات درصد نمک گلیسرول فسفات نشان می‌دهد. همان طور که از شکل مشخص است، افزودن نمک گلیسرول فسفات pH محلول‌ها را به آهستگی افزایش می‌دهد. به نظر می‌رسد غلظت ۱۶٪ (w/v) از نمک گلیسرول فسفات، برای سامانه‌های رهایش دارو غلظت مناسبی است، زیرا pH محلول کیتوسان درین غلظت از نمک در حدود ۷/۴ (pH بدن موجودات زنده) است.

شکل (۴) زمان ژل شدن محلول‌های کیتوسان/گلیسرول فسفات را برحسب درصد‌های مختلف نمک گلیسرول فسفات در دمای 37°C نشان می‌دهد.



شکل (۳) - تغییرات pH محلول کیتوسان/گلیسرول فسفات

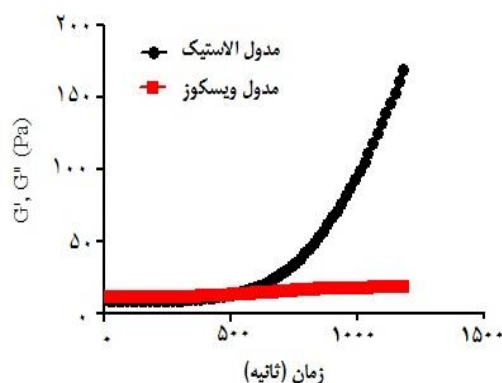
با غلظت نمک (سه بار تکرار)

زمان در دمای 37°C ابتدا افزایش کوچکی در تیرگی دیده شد. پس از ۹ دقیقه تیرگی به طور ناگهانی افزایش یافت. نقطه‌ای که در آن افزایش ناگهانی تیرگی مشاهده می‌شود، نقطه‌ی تشکیل ژل است. این آزمایش نشان می‌دهد اضافه نمودن نمک گلیسرول فسفات به محلول کیتوسان موجب شده تا پایداری این محلول در دمای 37°C کاهش یافته و در یک مدت زمان کوتاه از حالت محلول به حال ژل تغییر فاز دهد.

۲-۳- بررسی اثر نمک گلیسرول فسفات بر خواص

رئولوژیکی نمونه‌ها

تغییرات مدول الاستیک G' و ویسکوز G'' در دمای 37°C با گذشت زمان در شکل (۲) برای محلول کیتوسان/گلیسرول فسفات با ۸٪ w/v نمک نشان داده شده است.



شکل (۲) - تغییرات مدول الاستیک و مدول ویسکوز با زمان در

دمای 37°C برای نمک ۸ درصد

درین آزمایش، فرایند ژل شدن با رفتار مدول الاستیک و ویسکوز مطالعه شد. در ابتدا G' و G'' مقادیر کوچک و تقریباً ثابتی داشتند، اما با تغییر زمان در دمای 37°C مدول الاستیک بیش‌تر از مدول ویسکوز شده و در نقطه‌ی ژل شدن به طور ناگهانی افزایش زیادی پیدا می‌کند. «ژل»، نقطه‌ای است که مقدار ایندو مدول با هم برابر شده و با هم تلاقی می‌کنند. بعد از نقطه‌ی ژل شدن، میزان مدول الاستیک بسیار بیش‌تر از مدول ویسکوز می‌شود که این یک رفتار شبه جامد را نشان می‌دهد که در آن خواص الاستیکی غالب است.

هیدروژنی درون و برون زنجیره‌ای افزایش یافته و زمان لازم برای تکمیل فرایند انعقاد یا همان ژل شدن کاهش می‌یابد. با بالا رفتن سطح دما، زمان لازم برای فرایند انعقاد کاهش می‌یابد. در دمای کم، برهم‌کنش‌های قوی بین مولکول‌های آب و کیتوسان از به هم پیوستن زنجیره‌های کیتوسان ممانعت به عمل می‌آورند. لذا، با وجود اینکه در اثر افزودن نمک گلیسرول فسفات، دافعه الکترواستاتیک زنجیره‌های کیتوسان توسط گروه فسفاتی نمک خنثا شده‌است، اما هنوز انرژی لازم برای غلبه بر برهم‌کنش حلال/پلیمر و شکست ساختار منظم مولکول‌های آب در اطراف زنجیره‌های کیتوسان وجود ندارد. به خصوص که حضور نمک فسفاتی خود به تقویت برهم-کنش حلال/پلیمر کمک کرده و سطح انرژی لازم برای شکست این ساختار را افزایش می‌دهد. چنین محلولی می‌تواند ساعت‌ها در دمای محیط پایدار بماند.

با افزایش دما، برهم‌کنش‌های آب‌گریز کیتوسان-کیتوسان تقویت شده، ساختار مولکول‌های آب که هم‌چون پوسته‌ای زنجیره‌های کیتوسان را در برگرفته، شکسته می‌شود. با افزایش بیش‌تر دما، پیوندهای هیدروژنی بین زنجیره‌ای تقویت شده و در نهایت با به هم پیوستن زنجیره‌های کیتوسان فرایند ژل شدن تکمیل می‌شود. بدین ترتیب، در دماهای بالا فرایند ژل شدن آسان انجام شده و زمان لازم برای به هم پیوستن محلول کیتوسان کاهش می‌یابد.

۳-۴- اثر غلظت اولیه‌ی دارو بر زمان ژل شدن

محلول‌های کیتوسان/گلیسرول فسفات

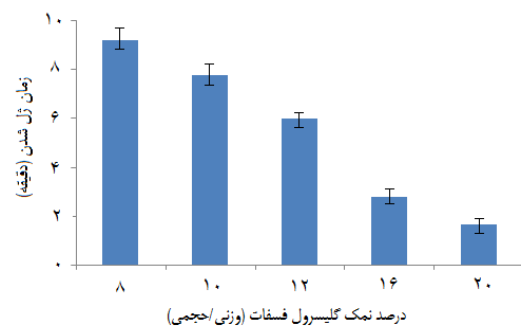
برای بررسی اثر بارگذاری دارو بر زمان ژل شدن، داروی پیریدوستیگمین بروماید در غلظت‌های مختلف با محلول کیتوسان/گلیسرول فسفات مخلوط شده، زمان ژل شدن محلول‌های حاصل تعیین شد.

همان‌طور که در جدول (۱) مشاهده می‌شود، با افزایش مقدار دارو از صفر تا ۷۰ mg، زمان ژل شدن در محلول حاوی ۸٪ وزنی/حجمی نمک گلیسرول فسفات از ۳ دقیقه به حداکثر ۳٫۵ دقیقه افزایش یافته و رابطه‌ی مستقیمی بین مقدار دارو و میزان تغییر در زمان ژل شدن نیز به چشم نمی‌خورد.

همان‌طور که مشاهده می‌شود، افزایش درصد نمک منجر به کاهش زمان ژل شدن محلول‌های کیتوسان شده است. برای مثال، محلول حاوی ۸ درصد نمک گلیسرول فسفات در دمای ۳۷°C در مدت ۹ دقیقه ژل می‌شود، در حالی که زمان لازم برای ژل شدن نمونه‌ی حاوی ۱۶ درصد نمک در حدود ۳ دقیقه است.

برای توجیه رفتارهای ثبت شده در شکل‌های ۳ و ۴ باید فرایند انحلال و انعقاد کیتوسان را با دقت مورد مطالعه قرار داد. کیتوسان پلی‌ساکاریدی است که خاصیت بازی دارد و در محیط اسیدی با گروه‌های آمینی خود تشکیل پلی‌کاتیون می‌دهد. در واقع تشکیل این گروه‌های آمینی با بار مثبت، عامل اصلی انحلال کیتوسان در محلول‌های اسیدی رقیق شناخته شده‌است. چراکه دافعه‌ی الکترواستاتیک بین زنجیره‌ای، ناشی از بار مثبت گروه‌های آمین، مانع از نزدیکی و به هم پیوستن زنجیره‌های کیتوسان شده و از تشکیل پیوندهای هیدروژنی درون مولکولی ممانعت به عمل می‌آورند.

با اضافه شدن محلول گلیسرول فسفات به محلول کیتوسان، گروه‌های فسفاتی با بار منفی، بار مثبت گروه‌های آمینی کیتوسان را خنثا کرده و موجب افزایش pH محلول می‌شود. هم‌زمان زمینه برای نزدیک شدن زنجیره‌ها و برقراری پیوندهای هیدروژنی بین گروه‌های OH-NH و O-HN از زنجیره‌های متقابل فراهم می‌شود [۲۱].



شکل (۴) - تغییرات زمان ژل شدن محلول کیتوسان با درصد نمک گلیسرول فسفات (سه بار تکرار)

می‌توان نتیجه گرفت با افزایش غلظت نمک که منجر به کاهش دافعه الکترواستاتیک بین زنجیره‌ای می‌شود، اتصال‌های

نتایج می‌توان گفت که خاصیت برگشت‌پذیری هیدروژل‌ها نیز هم‌چون مکانیسم تشکیل ژل، تحت کنترل نیروهای دافعه و جاذبه‌ی بین مولکولی قرار دارد.

در غلظت‌های کم از نمک فسفات‌ی، نیروی دافعه الکترواستاتیک بین زنجیره‌های کیتوسان هنوز در سطحی است که می‌تواند از تشکیل پیوندهای هیدروژنی بین زنجیره‌ای مانع به عمل آورد. لذا، درین محدوده، فرایند ژل شدن عمدتاً توسط برهم‌کنش‌های آب‌گریزی زنجیره‌های کیتوسان رخ می‌دهد. به هر شکل، برهم‌کنش‌های آب‌دوستی/آب‌گریزی محلول‌های پلیمری به میزان دمای محلول پلیمر وابسته است [۲۱]، لذا با کاهش دما، برهم‌کنش‌های آب‌گریزی تضعیف شده و برهم‌کنش‌های آب‌دوست کیتوسان/آب تقویت می‌شود. در نتیجه، ژل تشکیل شده در دماهای بالا، با کاهش دما به فاز محلول بر می‌گردد. در مقابل، در حضور مقادیر زیاد نمک گلیسرول فسفات که منجر به خنثا شدن دافعه‌ی الکترواستاتیک زنجیره‌های کیتوسان می‌شود، امکان برقراری پیوندهای هیدروژنی درون و برون زنجیره‌ای تقویت شده و ساختار اصلی هیدروژل را پیوندهای هیدروژنی تشکیل می‌دهند. به هر صورت، پیوندهای هیدروژنی تابعیتی از دمای محلول ندارند، لذا سرد کردن مجدد هیدروژل نمی‌تواند بر استحکام این پیوندها تأثیری داشته باشد. در نتیجه، ژل تشکیل شده، یک ژل برگشت‌ناپذیر خواهد بود.

۳-۶- رهایش PB از هیدروژل کیتوسان/گلیسرول

فسفات

درصد رهایش تجمعی دارو از هیدروژل کیتوسان/گلیسرول فسفات در محیط رهایش بافر فسفات و برای دو غلظت متفاوت نمک به دست آمد (شکل ۵).

با توجه به اینکه هیدروژل حاوی ۱۶٪ w/v نمک گلیسرول فسفات زمان ژل شدن حدود ۳ دقیقه و pH برابر ۷/۴ داشت، برای بررسی رهایش PB از هیدروژل انتخاب شد. اما برای بررسی اثر غلظت نمک بر رهایش PB، هیدروژل حاوی ۸٪ w/v نمک هم مورد مطالعه قرار گرفت. با توجه به نتایج به دست آمده، مشاهده می‌شود که رهایش دارو از

نتایج به دست آمده در مورد غلظت ۱۶٪ از نمک گلیسرول/فسفات نیز مشابه است. لذا، می‌توان نتیجه گرفت که مقدار بارگذاری داروی پیریدوستیگمین بروماید اثر قابل توجهی بر زمان و رفتار ژل شدن محلول‌های کیتوسان/گلیسرول فسفات به دنبال نخواهد داشت.

جدول (۱)- بررسی اثر غلظت اولیه‌ی دارو بر زمان ژل شدن

ردیف	نمک گلیسرول فسفات ۸٪		نمک گلیسرول فسفات ۱۶٪	
	غلظت دارو (mg)	زمان ژل شدن (min)	غلظت دارو (mg)	زمان ژل شدن (min)
۱	۰	۳،۰	۰	۹،۰
۲	۱۰	۳،۲	۱۰	۹،۰
۳	۳۰	۳،۳	۳۰	۹،۴
۴	۵۰	۳،۲	۵۰	۹،۲
۵	۷۰	۳،۵	۷۰	۹،۳

۳-۵- بررسی خاصیت برگشت‌پذیری گرمایی

نتایج مربوط به این سری از مطالعات در جدول (۲) خلاصه شده است. مشخص است که وجود خاصیت برگشت‌پذیری به غلظت نمک گلیسرول فسفات در نمونه وابسته است. به طوری که در غلظت‌های بالا از گلیسرول فسفات، ژل‌های حاصل غیر برگشت‌پذیر بوده و در مقابل با کاهش غلظت نمک فسفات، خاصیت برگشت‌پذیری مشاهده می‌شود.

جدول (۲)- بررسی خاصیت برگشت‌پذیری گرمایی

هیدروژل کیتوسان/گلیسرول فسفات

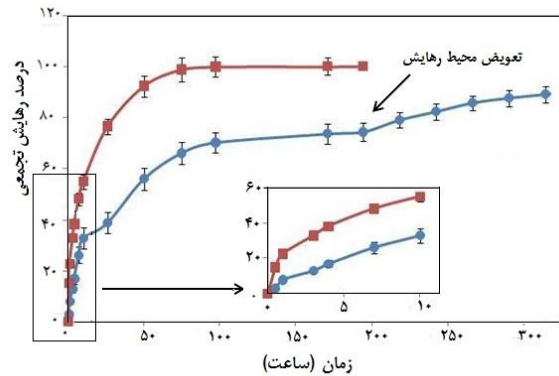
ردیف	غلظت نمک گلیسرول فسفات (%w/v)	برگشت‌پذیری (محلول/ژل/محلول)
۱	۶،۰	برگشت‌پذیر
۲	۶،۵	برگشت‌ناپذیر
۳	۷،۰	برگشت‌ناپذیر
۴	۸،۰	برگشت‌ناپذیر

نتایج مشابهی نیز توسط سایر محققان به چاپ رسیده که تایید کننده‌ی وابستگی بین رفتار برگشت‌پذیری دمایی با میزان نمک گلیسرول فسفات است [۱۷، ۲۲]. با توجه به این

بزرگ آن از مدول ویسکوز تعیین می‌شود. در محلول ۰/۴٪ وزنی/حجمی نمک در هر لحظه میزان مدول الاستیک اختلاف قابل توجهی از محلول ۰/۸٪ نمک دارد. مدول ویسکوز دو محلول تغییرات قابل توجهی نسبت به هم نداشتند [۲۸]. نتایج به دست آمده توسط چنیت و هم‌کارانش نیز در مورد کاهش مدول الاستیک و مدول ویسکوز با افزایش درصد نمک با نتایج به دست آمده توسط یان و هم‌کارانش سازگار است [۲۹].

به نظر می‌رسد که علت کم شدن سرعت رهایش با گذشت زمان، عقب نشینی جبهه‌ی دارو هم‌زمان با تخلیه‌ی ماتریس است. با گذشت زمان، لایه‌های اولیه از دارو تخلیه می‌شوند و جبهه‌ی دارو عقب نشینی می‌کند. هرچه منطقه‌ی تخلیه شده وسیع‌تر شود، گرادیان غلظتی dc/dx و سرعت رهش دارو کاهش پیدا می‌کند. داروهایی که در لایه‌های درونی هیدروژل جای گرفته‌اند برخلاف داروهای سطحی باید مسیر پریچ و خم شبکه هیدروژلی را طی کنند تا به سطح هیدروژل رسیده و آزاد شوند. برای بررسی سازوکار رهایش دارو از هیدروژل کیتوسان/گلیسرول فسفات از معادله‌ی کرمیر/پپاس (رابطه‌ی ۲) استفاده شد. درین رابطه، n تعیین کننده سازوکار رهایش در سامانه‌های مختلف است. در سامانه‌های شبکه‌ای اگر n در محدوده‌ی ۰/۴۵ باشد [۳۰]، سازوکار رهایش نفوذ است و قانون فیک حاکم است. اگر n بزرگتر از ۰/۹ باشد، سازوکار رهایش از درجه صفر بوده و منحنی رهایش به صورت خطی خواهد بود. برای به دست آوردن n و K در سامانه‌های طراحی شده در این تحقیق ابتدا مقادیر تجربی به دست آمده در محدوده‌ای که درصد رهایش کمتر از ۰/۶۰ است، در رابطه (۲) جاگذاری شد، سپس با لگاریتم گرفتن از دو طرف معادله، مقدار n و K برای هر سامانه به دست آمد. مقادیر n به دست آمده برای هردو هیدروژل مورد مطالعه در این پژوهش (جدول ۳) نشان دهنده‌ی برقراری قانون فیک یا به عبارتی نقش غالب نفوذ، در سازوکار رهایش دارو از هردو هیدروژل است. بنابراین، هرچه هیدروژل متخلخل‌تر باشد، رهایش دارو از آن سریع‌تر انجام می‌گیرد. در مطالعه‌ی رهایش انسولین [۱۹] و

هیدروژل حاوی نمک بیش‌تر، سریع‌تر است به طوری که در ۱۲ ساعت اولیه تنها ۰/۳۳٪ از داروی موجود در ژل حاوی w/v ۰/۸ نمک آزاد شده است، درحالی که در همین مدت نزدیک به ۰/۵۵٪ از داروی محبوس در ژل حاوی w/v ۰/۱۶ نمک آزاد شده است.



شکل (۵) - درصد رهایش تجمعی دارو از هیدروژل‌های حاوی:

۰/۱۶w/v (■) و ۰/۸ w/v (●) از نمک گلیسرول فسفات

(سه بار تکرار)

هم‌چنین رهایش دارو از هیدروژل حاوی نمک بیش‌تر (۰/۱۶ w/v) بعد از حدود ۷۲ ساعت کامل شده است، درحالی که رهایش دارو از ژل حاوی نمک ۰/۸ w/v کندتر بوده و در طی این مدت تنها ۰/۶۸ دارو آزاد شده است (شکل ۵).

درصد زیادی از نمک گلیسرول فسفات در ساختار هیدروژل شرکت نکرده و به محض مجاورت ژل با محیط آبی از هیدروژل خارج شده و ساختار متخلخلی را در ژل باقی می‌گذارد [۲۳-۲۷]. در نتیجه، هرچه غلظت نمک بیش‌تر باشد، ژل متخلخل‌تر بوده و استحکام کم‌تری دارد و نفوذ دارو از درون آن سریع‌تر و کامل‌تر خواهد بود. با توجه به نتایج گزارش شده توسط محققان، کاهش استحکام ژل با افزایش درصد نمک تایید می‌شود. به عنوان مثال یان^{۱۸} و هم‌کارانش نمک گلیسرول فسفات را با دو مقدار ۰/۴۰٪ و ۰/۸۰٪ به محلول کیتوسان اضافه کرده و تغییرات مدول الاستیک و مدول ویسکوز را مطالعه نمودند. قدرت ژل با توجه به بزرگی مدول الاستیک در بازه‌ی کیلوپاسکال و با توجه به اختلاف

- [3] Q. Y. Tan, M. L. Xu, J. Y. Wu, H. F. Yin, J. Q. Zhang, "Preparation and Characterization of Poly (lactic acid) Nanoparticles for Sustained Release of Pyridostigmine Bromide" *Pharmazie* 67 (4), 311-8, 2012.
- [4] N. Hegazy, M. Demirel, Y. Yazan, "Preparation and in vitro evaluation of pyridostigmine bromide microparticles" *Int J Pharm* 242, 171-174, 2002.
- [5] Y. Huang, T. Tsai, C. Cheng, T. Cham, "Formulation Design of a Highly Hygroscopic Drug (Pyridostigmine Bromide) for its Hygroscopic Character Improvement and Investigation of In vitro/In vivo Dissolution Properties" *Drug Dev Ind Pharm* 33, 403-416, 2007.
- [6] N. Bolourchian, M. Rangchian, M. Foroutan, "Prolonged Release Matrix Tablet of Pyridostigmine Bromide: Formulation and Optimization Using Statistical Methods" *Pak J Pharm Sci* 25, 607-616, 2012.
- [7] Q. Tan, R. Jiang, M. Xu, G. Liu, S. Li, J. Zhang, "Nanosized sustained-release pyridostigmine bromide microcapsules: process optimization and evaluation, of characteristics" *Int J Nanomed* 8, 737-745, 2013.
- [8] S. Bagheri-Khoulanjani, H. Mirzadeh, M. Etrati-Khosroshahi, "Chitosan and Nanohydroxyapatite Roles in Physical and Chemical Characteristics of Gelatin/Chitosan/Nanohydroxyapatite Microspheres" *Iran J Polym Sci Technol* 23 (6), 487-498, 2011.
- [9] S. Bagheri-Khoulanjani, S. M. Taghizadeh, H. Mirzadeh, "An Investigation on the Short-Term biodegradability of Chitosan with Various Moleculare Weight and Degree of Deacetylation" *Carbohyd Polym* 78, 773-778, 2009.
- [10] L. Y. Jiang, Y. B. Li, X. J. Wang, L. Zhang, J. Q. Wen, M. Gong, "Preparation and Properties of Nano-hydroxy apatite/Chitosan/Carboxymethyl Cellulose Composite Scaffoold" *Carbohyd Polym* 74, 680-684, 2008.
- [11] F. Naimian, F. Khoylo, R. Beteshobabrud, "The Role of Solvent on Radiation Degradation and Antibacterial Activity of Chitosan Against *Pectobacterium Carotovorum*" *Iran J Polym Sci Technol* 23 (4), 305-310, 2010.
- [12] H. Mirzadeh, F. Hormozi, M. A. Mohagheghi, N. Yaghobi, S. Amanpour, H. Ahmadi, "Preparation of Chitosan Derived from Shrimps Shell of Persian Gulf as a Blood Hemostasis Agent" *Iran Polym J* 11, 63-68, 2002.
- [13] S. M. Taghizadeh, G. Davari, "Study on Mucoadhesion Properties of Xhitosan" *Iran J Polym Sci Technol* 20, 515-519, 2007.
- [14] Y. Mohamadi, H. Mirzadeh, F. Moztarzadeh, M. Soleimani, E. Jabbari, "Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells on Novel Three-Dimensional Poly (L-Lactic Acid) / Chitosan / Gelatin/Beta-Tricalcium Phosphate Hybrid Scaffolds" *Iran Polym J* 16, 57-69, 2007.

دوکسوروبیسین^{۱۹} [۲۵] از هیدروژل کیتوسان نیز نتایج مشابهی به ثبت رسیده و ثابت شده که سازوکار غالب در فرایند رهایش دارو از این هیدروژل همان سازوکار نفوذ فیزیکی است.

جدول (۳) - سازوکار رهایش دارو از هیدروژل با

استفاده از معادله‌ی کرسمیر/پیاس

R ²	K	n	درصد نمک (%w/v)
۰٫۹۹۴	۱۲۸۸٫۵	۰٫۴۵	۸
۰٫۹۹۱	۲۱۰۹٫۶	۰٫۴۳	۱۶

۴- نتیجه گیری

درین پژوهش محلول حساس به دمای کیتوسان/گلیسرول فسفات به منظور رهایش آهسته‌ی داروی پیریدوستیگمین بروماید مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت. بر مبنای مطالعات انجام شده مشخص شد حضور نمک گلیسرول فسفات نقش اصلی را در ایجاد خاصیت ژل شدن وابسته به دما برعهده دارد. هم‌چنین مشخص شد افزایش میزان نمک گلیسرول فسفات در محلول کیتوسان موجب افزایش آهسته‌ی pH، کاهش زمان ژل شدن محلول و کاهش مدول الاستیک و استحکام ژل می‌شود. بررسی‌ها نشان داد که سامانه‌ی حساس به دمای کیتوسان/گلیسرول فسفات به دلیل داشتن استحکام کافی، pH در محدوده‌ی فیزیولوژیک بدن، زمان ژل شدن مناسب، قابلیت تزریق پذیری و رهایش آهسته در دوره زمانی ۴ روزه، می‌تواند به عنوان یک سامانه‌ی نویدبخش برای داروی پیریدوستیگمین بروماید مورد استفاده قرار گیرد.

۵- مراجع ها

- [1] J. P. Sieb, W. Köhler, "Benefits from Sustained-release Pyridostigmine Bromide in Myasthenia Gravis: Results of a Prospective Multicenter Open-label Trial" *Clin Neurol Neurosurg* 112, 781-784, 2010.
- [2] R. A. Maselli, J. D. Henderson, J. Ng, D. Follette, G. Graves, B. W. Wilson, "Protection of Human Muscle Acetylcholinesterase from Soman by Pyridostigmine Bromide" *Muscle Nerve* 43, 591-595, 2011.

¹⁹ Doxorubicin hydrochloride

- [23] M. Berradaa, A. Serreqia, F. Dabbarha, A. Owusub, A. Guptaa, S. Lehnert, "A Novel Non-toxic Camptothecin Formulation for Cancer Chemotherapy" *Biomaterials* 26, 2115–2120, 2005.
- [24] S. Kempe, H. Metz, M. Bastrop, A. Hvilsom, R. Contri, R. Mäder, "Characterization of Thermosensitive Chitosan-based Hydrogels by Rheology and Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy" *Eur J Pharm Biopharm* 68, 26–33, 2008.
- [25] J. Wu, Z. G. Su, G. H. Ma, "A Thermo- and pH-sensitive Hydrogel Composed of Quaternized Chitosan/glycerophosphate" *Int J Pharm* 315, 1–11, 2006.
- [26] K. E. Crompton, R.J. Pranker, D. M. Paganin, T. F. Scott, M. K. Horne, D. I. Finkelstein, K. A. Gross, J. S. Forsythe, "Morphology and gelation of thermosensitive chitosan hydrogels" *Biophysic Chemist* 117, 47–53, 2005.
- [27] E. Ruel-Garie'py, A. Chenite, C. Chaput, S. Guirguis, J. C. Leroux, "Characterization of thermosensitive chitosan gels for the sustained delivery of drugs" *Int J Pharm* 203, 89–98, 2000.
- [28] J. Yan, L. Yang, G. Wang, Y. Xiao, B. Zhang, N. Qi, "Biocompatibility Evaluation of Chitosan-based Injectable Hydrogels for the Culturing Mice Mesenchymal Stem Cells In Vitro" *J Biomater Appl* 24, 625-637, 2010.
- [29] A. Chenite, M. Buschmann, D. Wang, C. Chaput, N. Kandani, "Rheological characterization of thermogelling chitosan / glycerol-phosphate solutions" *Carbohyd Polym* 46, 39-47, 2001.
- [30] G. Arora, K. Malik, I. Singh, S. Arora, V. Rana, "Formulation and evaluation of controlled release matrix mucoadhesive tablets of domperidone using Salvia plebeian gum" *J Adv Pharm Technol Res* 2 (3), 163–169, 2011.
- [15] F. Afshar-Taromi, F. Nayeb-Habib, S. Salahshoor-Kordestani, Z. Shariatinia, "A Novel Topical Biocompatible Tissue Adhesive Based on Chitosan-modified Urethane Pre-polymer" *Iran Polym J* 20 (8), 671-680, 2011.
- [16] H. Yang, S. Hua, W. Wang, A. Wang, "Composite Hydrogel Beads Based on Chitosan and Laponite: Preparation, Swelling, and Drug Release Behaviour" *Iran Polym J* 20 (6), 479-490, 2011.
- [17] F. Ganji, M. J. Abdekhodaie, A. Ramazany, "Gelation Time and Degradation Rate of Chitosan as a Thermosensitive Injectable Hydrogel" *J Sol-Gel Sci Technol* 42, 47-53, 2007.
- [18] J. Wu, W. Wei, L. Wang, Z. Su, G. Ma, "A Thermosensitive Hydrogel Based on Quaternized Chitosan and Poly (ethylene glycol) for Nasal Drug Delivery System" *Biomaterials* 28, 2220–2232, 2007.
- [19] E. Khodaverdi, M. Tafaghodi, F. Ganji, K. Abnoos, H. Naghizadeh, "In Vitro Insulin Release from Thermosensitive Chitosan Hydrogel" *AAPS Pharm Sci Tech* 13 (2), 460-466, 2012.
- [20] H. Y. Zhou, Y. P. Zhang, W. F. Zhang, X. G. Chen, "Biocompatibility and Characteristics of Injectable Chitosan-based Thermosensitive Hydrogel for Drug Delivery" *Carbohyd Polym* 83 (4), 1643-1651, 2011.
- [21] A. Chenite, C. Chaput, D. Wang, C. Combes, M. Buschmann, C. Hoemann, J. Leroux, B. Atkinson, F. Binette, A. Selmani, "Novel Injectable Neutral Solutions of Chitosan form Biodegradable Gels In Situ" *Biomaterials* 21, 2155–2161, 2000.
- [22] A. Chenite, C. Chaput, C. H. Combes, A. Selmani, F. Jalal, "Temperature-controlled pH-Dependent Formation of Ionic Polysaccharide Gels" *US Patent* 6, 344, 488, 2002.