



نهمین کنگره ملی مهندسی شیمی ایران

دانشگاه علم و صنعت ایران
۳-۵ آذر ماه ۱۳۸۳

بررسی هیدروژل های حساس به دمای زیست تخریب پذیر با پایه کیتوسان

فریبا گنجی^{۱*}, دکتر محمدجعفر عبدخدایی^۱, دکتر احمد رمضان^۱

۱. دانشگاه صنعتی شریف, دانشکده مهندسی شیمی, صندوق پستی ۹۴۶۵-۱۱۳۶۵

fganji@mehr.sharif.edu

چکیده

یکی از جدیدترین مباحث مطرح در زمینه طراحی سیستم های آهسته رهش دارو، استفاده از محلول پلیمری کیتوسان - گلیسرول فسفات بعنوان یک سیستم زیست تخریب پذیر حساس به دما با قابلیت تزریق زیر پوستی است. این پلیمر بدلیل حساسیت دمایی دارای خاصیت ژله ای شدن خودبخود بوده، لذا هنگامیکه سوسپانسیون حامل دارو که در دمای محیط مایع است از طریق تزریق با سرنگ وارد بدن می شود، در دمای 37°C به صورت یک ژل نامحلول در آب درآمده و ذرات دارو در بین زنجیره های آن گرفتار می شود. در این تحقیق اثر عوامل متفاوتی همچون دما، PH محلول، PH محیط خارجی، غلظت محلول پلیمری و DDA بر سینتیک ژله ای شدن محلول های کیتوسان - گلیسرول فسفات مورد بررسی قرار گرفته و مشخص شد که افزایش دما، PH و DDA موجب کاهش زمان انعقاد شده، هر چه غلظت محلول کیتوسان بیشتر باشد، تأثیر این عوامل نیز بیشتر خواهد بود.

کلمات کلیدی: ۱- کیتوسان، ۲- هیدروژل، ۳- حساس به دما، ۴- قابل تزریق

مقدمه

اساس طراحی سیستم‌های رهایش تدریجی دارو بر مبنای کنترل سینتیک آزاد شدن دارو از حامل پلیمری و در نتیجه ثابت نگه‌داشتن غلظت دارو در خون قرار دارد. یک سیستم هوشمند رهایش دارو^۱ به‌گونه‌ای طراحی می‌شود که داروی خود را درست در محل مورد نیاز بدن (بافت آسیب دیده) و مطابق با نیاز بدن (شدت آسیب) آزاد سازد. این سیستم‌های هوشمند نه تنها در رهایش کنترلی دارو بلکه در فرایندهایی همچون جداسازی، تغلیظ محلول‌های ماکرومولکول، سیستم‌های کنترلی فعالیت آنزیم‌ها، بیوسنسورها و... نیز دارای کاربردهای فراوانی خواهند بود. [۱-۳]

از جدیدترین مباحث مطرح در زمینه سیستم‌های آهسته‌رهش، می‌توان به استفاده از پلیمرهای حساس به دما^۲ در طراحی هیدروژل‌های هوشمند اشاره کرد. یک هیدروژل حساس به دما به‌گونه‌ای طراحی می‌شود که مکانیسم ژله‌ای شدن آن تحت کنترل فرایندهای فیزیکی وابسته به حرارت (و نه اتصالات عرضی) انجام شود. از مهمترین و متداولترین مثالهای این دسته می‌توان به خانواده بزرگ Poloxamer ها اشاره نمود. [۴] این هیدروژل که یک بلاک کوپلیمر سه قسمتی از پلی اتیلن اکساید و پلی پروپیلن اکساید (PEO-PPO-PEO) است در دمای کمتر از ۳۰°C یک مایع روان محلول در آب و قابل تزریق با سرنگ است که در دماهای بالاتر از ۳۰°C (دمای بدن) به صورت یک ژل نامحلول در آب رسوب می‌نماید. طی این عمل ذرات دارو در بین زنجیره‌های هیدروژل گرفتار شده و بتدریج رهایش می‌شود. با توجه به اهمیت و کاربرد فراوان کوپلیمرهای Poloxamer در تهیه سیستم‌های آهسته رهش تجاری، رفتار حرارتی و خواص محلول‌های پلیمری رقیق و غلیظ آنها به طور کامل مورد مطالعه قرار گرفته است [۵-۹].

با وجود مزیت فوق Poloxamer ها زیست‌تخریب‌پذیر^۳ نبوده و زمان پایداری آنها نیز بسیار کوتاه است [۱۰] در راستای بهبود خواص Poloxamer و به خصوص اضافه کردن خاصیت زیست‌تخریب‌پذیری Jeong و همکاران کوپلیمری از پلی اتیلن گلیکول و پلی L-لاکتیک اسید را به صورت PEG-PLLA-PEG تهیه نمودند. اگرچه این کوپلیمر دارای هر دو خاصیت ژله‌ای شدن در اثر حرارت و زیست‌تخریب‌پذیری بود، لیکن بدلیل زمان ماندگاری اندک (چند روز) چندان مورد استفاده قرار نگرفت [۱۱]. لذا Bae و همکارانش با تغییر در ترکیب این کوپلیمر و تعویض بلاک PLLA با PLGA (پلی لاکتیک گلیکولیک اسید) توانستند به یک پلیمر حساس به دما و زیست‌تخریب‌پذیر قابل تزریق (PEG-PLGA-PEG) دست یابند که در درمان‌های طولانی‌مدت (یک ماه) نیز مفید باشد [۱۲].

در جدیدترین تحقیقات، (2000) Chenite و همکاران توانسته‌اند یک هیدروژل حساس به دمای زیست‌تخریب‌پذیر با پایه کیتوسان^۴ تهیه نمایند [۱۳]. کیتوسان در واقع یک آمینو پلی‌ساختار حاصله از فرایند استیل‌زدایی^۵ قلیایی کیتین است که با توجه به خواص زیست‌سازگاری و زیست‌تخریب‌پذیری بسیار مناسب خود در کاربردهای پزشکی مورد توجه زیادی قرار گرفته است [۱۴-۱۹]. کیتوسان در ساختار بلورین خود

¹ Intelligent Drug Delivery System

² Thermoreversible

³ Biodegradable

⁴ Chitosan

⁵ Deacetylation

دارای پیوندهای هیدروژنی قوی درون و برون مولکولی است و این پیوندها عامل اصلی انحلال ناپذیری کیتوسان در اکثر حلال‌های آلی و آبی شناخته شده‌اند. حلالیت کیتوسان در اسیدهای رقیق به پروتونه شدن گروه‌های آمین در محیط‌های اسیدی نسبت داده می‌شود. این خاصیت انحلال پذیری تنها تا PHهای حدود ۶/۲ وجود دارد. چنانچه محلول کیتوسان را تا PHهایی بیشتر از ۶/۲ خنثی نمائیم، به صورت یک ترکیب ژل مانند رسوب می‌ماید. Chenite و همکارانش سعی نموده‌ند تا خاصیت ژله‌ای شدن وابسته به PH در محلول‌های پلی ساخارید کاتیونیک را به خاصیت ژله‌ای شدن حساس به دمای وابسته به PH در محلول‌های آبی تبدیل نمایند، بدون آنکه از اصلاح شیمیایی و یا پیوند عرضی استفاده شود. برای این منظور از نمک‌های گلیسرول فسفات (نمک‌های پلی ال دارای یک سر واحد آنیونی) استفاده شده‌است. آنها دریافتند که این نمک‌ها برای تبدیل محلول‌های کتیوسانی که تنها وابسته به PH هستند به یک محلول وابسته به PH کنترل شونده توسط دما، بسیار ایده آل می‌باشند. این مجموعه از نمک‌های فسفاتی موجب بروز یک رفتار ویژه در محلول‌های کیتوسان می‌شوند و در نتیجه به این محلول‌ها اجازه می‌دهند تا PHهای فیزیولوژیک ($PH=7$) به صورت محلول باقی مانده و تنها زمانیکه دمای آنها به دمای بدن رسید به شکل ژل رسوب نمایند [۱۳]. به این ترتیب محلول حساس به دمای کیتوسان- گلیسرول فسفات می‌تواند بعنوان یک فرمولاسیون زیست تخریب پذیر حساس به دما با خاصیت تشکیل ژل در محل تزریق برای رهایش ماکرومولکولها و عوامل دارویی در بدن مورد استفاده قرار بگیرد. در این تحقیق سعی شده است اثر عوامل متفاوتی همچون دما، PH، غلظت محلول پلیمری، DDA^۶، و شرایط محیطی بر سینتیک ژله‌ای شدن محلول‌های کیتوسان- گلیسرول فسفات مورد بررسی قرار بگیرد.

مواد و روش‌ها

مواد

کیتوسان‌های مورد استفاده در این تحقیق یکی با وزن مولکولی متوسط و $DDA \cong 85\%$ از شرکت Aldrich و دیگری با وزن مولکولی بالا و $DDA \cong 98\%$ از پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران تهیه شدند. بتا-گلیسرول فسفات دی سدیم سالت ($b-GP$) از شرکت Sigma و اسید استیک گلاسیال از شرکت Merck خریداری شدند. برای اندازه گیری PH نمونه‌ها از دستگاه PH-meter EP-501 خریداری شده از شرکت Elmetron استفاده شده است.

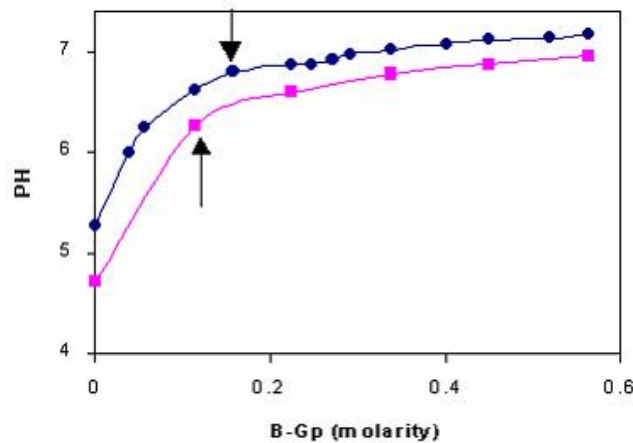
آماده سازی محلول حساس به دما

محلول‌های مادر از انحلال ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم کیتوسان در $9^{\circ}C$ محلول اسید استیک ۰/۱ مولار تهیه شدند. سپس مقادیر متفاوتی از نمک $b-GP$ (از صفر تا ۵۰۰ میلی گرم) در حدود ۱ میلی لیترا آب دیونیزه حل شده؛ محلول نهایی به تدریج و در دمای $4^{\circ}C$ همراه با اختلاط به محلول مادراضافه می‌شود. فرایند اختلاط برای مدت ۱۵ دقیقه ادامه یافته، محلول‌های شفاف حاصل در دمای $4^{\circ}C$ نگهداری می‌شوند.

نتایج و بحث

⁶ Degree of deacetylation

شکل (۱) اثر افزایش نمک $b-GP$ بر PH محلول های کیتوسان را نشان می دهد. همانطور که برای هر ۲ محلول مشاهده می شود، افزایش نمک $b-GP$ به محیط موجب افزایش PH محلول از ۴/۷ تا ۷/۲ شده است.

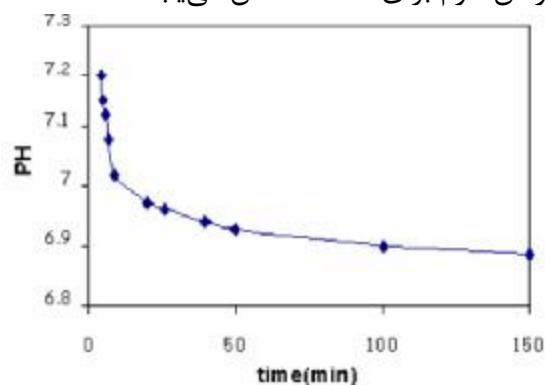


شکل ۱- تغییرات PH محلول کیتوسان (DDA=۰.۸۵٪) بر حسب غلظت $b-GP$ در دمای اتاق
(● : محلول کیتوسان ۰.۲٪؛ ■ : محلول کیتوسان ۱٪)

سرعت افزایش در PH به رقابت بین گروه های آمین موجود در محلول کیتوسان و نمک $b-GP$ در محیط وابسته است. فلش ها در شکل نشان دهنده غلظت مولی گروه های آمین در هر محلول می باشند. واضح است که با غلبه دنباله گلیسرول موجود در مولکول $b-GP$ بر گروه های آمین مولکول کیتوسان، PH نهایی به محدوده PH فیزیولوژیک نزدیک می شود. مسلماً خاصیت بازی نمک گلیسرول فسفات ($PK_a = 6.34$) و تمایل همپوشانی گروه های آمین با دنباله های گلیسرولی نمک $b-GP$ موجب بروز این رفتار یکسان در هر سه محلول کیتوسان شده است.

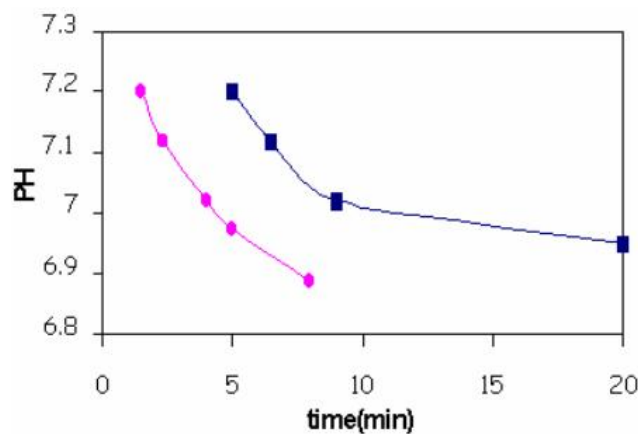
اثر pH

شکل (۲) اثر pH محلول نهایی کیتوسان بر زمان ژله ای شدن را نشان می دهد. همانطور که مشاهده می شود با افزایش در pH محلول مدت زمان لازم برای انعقاد کاهش می یابد



شکل ۲- تغییرات زمان ژله ای شدن بر حسب pH (محلول کیتوسان ۲٪) در دمای ۳۷ °C

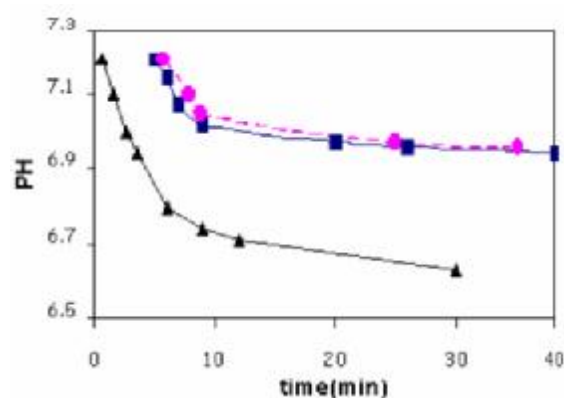
این کاهش در زمان ژله‌ای شدن با افزایش pH را می‌توان به کنترل نیروهای دافعه الکترواستاتیک مابین زنجیره‌ای (حاصل از عملکرد گروه‌های آمونیوم) در اثر خاصیت قلیایی نمک گلیسرول فسفات نسبت داد. با افزایش غلظت $b-GP$ و در نتیجه کاهش دافعه الکترواستاتیک امکان برهمکنش‌های بین زنجیره‌ای افزایش یافته و لذا فرایند انعقاد در مدت زمان کمتری رخ می‌دهد. اثر pH محیط خارجی بر زمان ژله‌ای شدن را می‌توان در شکل (۳) مشاهده نمود. در این مورد زمان ژله‌ای شدن هر نمونه با pH مشخص، در ظرفی که محتوی بافر نمکی فسفاتی با $pH = 7/4$ باشد، (75 mM NaCl ، $53 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$ ، $13 \text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$) اندازه گیری شده است. این آزمایش تا حد زیادی می‌تواند شرایط فیزیولوژیکی بدن را شبیه سازی کند. تزریق محلول کیتوسان - گلیسرول فسفات به درون بافر فسفاتی کاهش قابل ملاحظه‌ای در زمان ژله‌ای شدن به دنبال داشته است. فرضاً برای محلولی با $pH=7/2$ این زمان از ۵ دقیقه به حدود ۹۰ ثانیه تقلیل یافته است.



شکل (۳) اثر pH محیط خارجی بر زمان ژله‌ای شدن (محلول کیتوسان ۰.۲٪ ، 37°C)

اثر دما

شکل ۴- به بررسی تأثیر متقابل دما و pH بر زمان ژله‌ای شدن می‌پردازد. با افزایش دما از 37°C به 60°C یک کاهش قابل ملاحظه در زمان ژله‌ای شدن ثبت شده است. بعنوان مثال برای محلول کیتوسان ۰.۲٪ با $pH=7/2$ در حدود ۰.۸۸٪ و با $pH=6/94$ در حدود ۰.۹۱٪ کاهش در زمان ژله‌ای شدن مشاهده شده است.



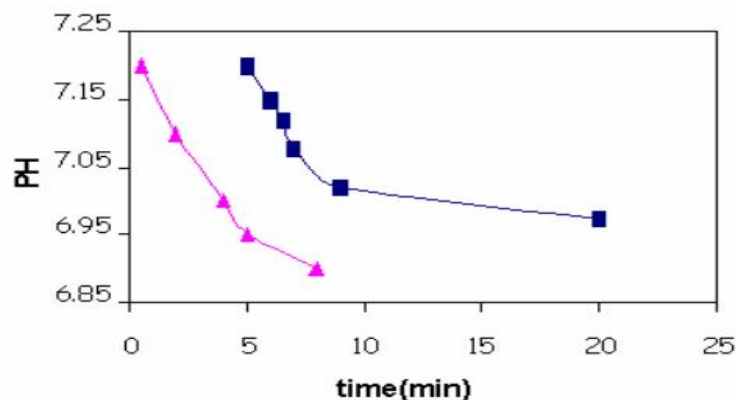
شکل ۴ - اثر دما بر زمان ژله‌ای شدن (محلول کیتوسان ۰.۲٪)

(60°C : ▲ ، 37°C : ■ ، 34°C : ●)

هر چند با کاهش pH اثر افزایش دما بیشتر می‌شود با اینحال شکل هر دو منحنی تقریباً یکسان است. این امر به این معنی است که در هر دو دما نقش PH به طور مشابهی اعمال می‌شود. با بالا رفتن سطح دما، برقراری پیوندهای هیدروژنی درون و برون مولکولی برای زنجیره های پلیمری کیتوسان با سهولت بیشتری انجام شده و در نتیجه انعقاد محلول سریعتر صورت می‌پذیرد. به منظور بررسی اثر تغییرات اندک دما در نقاط مختلف بدن (متناسب با محل تزریق) رفتار حرارتی محلول پلیمری در دمای 34°C نیز ارائه شده است. واضح است که این میزان تغییر دما، تغییر قابل ملاحظه‌ای در زمان ژله‌ای شدن به دنبال نداشته، در نتیجه استفاده از این محلول تنها به تزریقات عمیق محدود نمی‌شود، بلکه می‌توان در تزریقات زیر جلدی نیز از آن بهره برد.

اثر D.D.A

به منظور بررسی نقش D.D.A (درجه داستیله بودن کیتوسان) بر زمان ژله‌ای شدن محلول‌های کیتوسان - گلیسرول فسفات، از دو نمونه کیتوسان با درصد داستیله متفاوت (نمونه اول $D.D.A \cong 85\%$ و نمونه دوم $D.D.A \cong 98\%$) استفاده شده است.



شکل ۵ - نقش D.D.A بر رفتار حرارتی محلول کیتوسان ۲٪ (37°C)
 (DDA $\cong 98\%$: \blacktriangle ، DDA $\cong 85\%$: \blacksquare)

شکل (۵) رفتار حرارتی این دو نمونه در pHهای مختلف را نشان می‌دهد. با افزایش DDA که متناسب با افزایش در تعداد گروه های آمین موجود در زنجیره کیتوسان است، زمان ژله ای شدن محلول پلیمری تا حد قابل ملاحظه ای کاهش یافته است. افزایش در تعداد گروه های آمین متناسب با افزایش در تعداد اتصالات فیزیکی مابین گروه آمین از کیتوسان و گروه فسفات از نمک $b-GP$ بوده، در نتیجه زمان لازم برای انعقاد زنجیره های پلیمری کاهش می‌یابد.

نتیجه گیری

همانطور که تاکنون اشاره شد، کیتوسان در PH های خنثی و یا قلیایی یک ترکیب نامحلول در آب است. کیتوسانی که دارای درجه استیلزدایی ۸۵٪ باشد تنها تا PH های نزدیک به ۶/۲ در آب محلول است. در

مقادیر PH بالاتر از ۶/۲، کیتوسان به صورت یک رسوب ژل مانند هیدراته در می‌آید. Chenite و همکارانش نشان دادند که چنانچه از یک نمک Polyol که دارای یک سر با بار مخالف است برای خنثی کردن محلول کیتوسان استفاده شود، محلول حاصل می‌تواند در مدت‌های طولانی و در دماهایی نزدیک و یا کمتر از دمای اتاق به صورت مایع باقی بماند. در این سیستم P H می‌تواند تا مقادیر PH فیزیولوژیکی (۶/۸ → ۷/۲) نیز افزایش یابد [۱۳]. در این شرایط تنها دما تعیین‌کننده حالت سیستم (ژل یا محلول بودن) است، به گونه‌ایکه با افزایش دما تشکیل ژل شروع می‌شود.

این درست مشابه رفتاری است که در محلول‌های آبی پلیمرها و بلاک کوپلیمرهای غیریونی و مواد فعال سطحی شامل اتیلن اکساید (EO) نیز دیده می‌شود [۲۰]. در ارتباط با توجه این رفتار غیر معمول حرارتی، تئوری‌های متعددی با در نظر گرفتن برهمکنش‌های حلال - حلال [۲۱]، برهمکنش‌های حلال - ماده حل شده [۲۲] و یا برهمکنش‌های ماده حل شده - ماده حل شده [۲۳] ارائه شده‌اند.

تئوری حلال - حلال به بررسی ساختار منظم مولکولهای آب که در اطراف هر مولکول E O حل شده تشکیل می‌شود، می‌پردازد. در این تئوری فرض می‌شود که در دماهای پایین مولکولهای آب به صورت ساختارهای فیزیکی منظمی مولکول EO را احاطه کرده‌اند. لیکن پایداری این ساختارها به دمای سیستم وابسته است. به گونه‌ایکه با افزایش دما و در نتیجه افزایش انرژی مولکولهای حلال، آنتروپی حاصله، این ساختارهای منظم را در هم شکسته و نهایتاً یک نیروی جاذبه و اندروالسی ضعیف مابین مولکولهای E O منجر به جدایش فازی EO از آب می‌شود. طبیعتاً در دماهای بالا، مقدار $T\Delta S$ محلول از میزان ΔH حاصل از انحلال کامل EO در محلول بیشتر بوده و همین امر منجر به پایداری ترمودینامیکی دو فاز حاصل می‌شود. تئوری حلال - حل شونده، جدایی فاز را به شکست اتصالات هیدروژنی مابین مولکولهای آب و اکسیژن اتر در گروه‌های EO، در اثر افزایش دما نسبت می‌دهد. در حالیکه در دماهای کم تعداد این اتصالات هیدروژنی در سیستم غالب بوده و انحلال کامل EO در آب را به دنبال خواهد داشت. مدل سوم به منظور توجیه رفتار فازی پلی اتیلن اکساید (PEO) در آب و ترسیم دیاگرام مربوطه ارائه شده و بر روی تغییرات ساختار فیزیکی زنجیره‌های پلیمری در آب در اثر تغییر دما متمرکز شده است. برطبق این مدل، زنجیره EO می‌تواند به شکل ساختارهای متعددی با انرژی‌های مختلف که متناسب با سطح دما متغیر است وجود داشته باشد. این تغییرات ساختاری منجر می‌شود که زنجیره‌های PEO به تدریج و با افزایش دما از قطبیت کمتری برخوردار شده، لذا تمایل کمتری به آب نشان داده، بیشتر به یکدیگر می‌پیوندند و این امر منجر به بروز جدایش فازی می‌شود. ولی در مورد محلول کیتوسان/ گلیسروفسفات لازم است از دیدگاه دیگری به بررسی بپردازیم. شاید در این مورد بتوان گفت که افزودن یک نمک فسفات گلیسرول به محلول آبی کیتوسان مستقیماً بر برهمکنش‌های الکترواستاتیک و اتصالات هیدروژنی مابین زنجیره‌های کیتوسان که مهمترین عامل تشکیل ژل در محیط قلیایی می‌باشند، اثر می‌گذارد. ماهیت جالب توجه این فرایند یا همان وابستگی دمایی نیز اساساً از تشدید و تقویت برهمکنش‌های آگریزی کیتوسان با افزایش دما در اثر حضور دنباله‌های گلیسرول ریشه می‌گیرد [۲۴]. در واقع سینتیک ژله‌ای شدن این سیستم تحت کنترل همزمان دما و P H قرار دارد. در شکل ۵ نیز مشاهده شد که اثر افزایش دما بر زمان ژله‌ای شدن متناسب با افزایش P H کاهش می‌یابد. به این معنی که هر چه

PH بیشتر باشد، افزایش دما کاهش کمتری در زمان ژله ای شدن به دنبال دارد. در دماهای کم برهمکنش شدید کیتوسان - آب از اجتماع و انعقاد زنجیره های کیتوسان ممانعت می نماید. با افزایش دما، پوسته حاصل از مولکولهای آب در اطراف ماکرومولکولهای کیتوسان به دلیل حضور دنباله های گلیسرول از هم گسسته شده، امکان برقراری اتصالات هیدروژنی مابین زنجیره ای و در نتیجه انعقاد ماکرومولکولها فراهم می شود. در PH های کم، حضور مؤثر نیروهای دافعه الکترواستاتیک مابین زنجیره های کیتوسان از تشکیل اتصالات هیدروژنی ممانعت به عمل آورده، لذا به سطح دمایی بالاتری برای غلبه بر این نیروهای دافعه و تشکیل ژل نیازمندیم. با افزایش PH که متناسب با افزایش غلظت نمک $b-GP$ در محیط است (شکل ۱) این نیروهای دافعه بر اثر عملکرد قلیایی نمک خنثی شده، جاذبه الکترواستاتیک مابین گروه آمونیاک از کیتوسان و گروه فسفات از گلیسرول، سطح دمایی لازم برای تشکیل ژل را کاهش می دهد.

در نهایت می توان گفت در محلول های کیتوسان - گلیسرول فسفات، افزایش اتصالات هیدروژنی مابین زنجیره ای در نتیجه کاهش دافعه الکترواستاتیک (خنثی شدن محلول در اثر عملکرد قلیایی $b-GP$) در کنار برهمکنش های جاذبه الکترواستاتیک کیتوسان - گلیسرول فسفات (مربوط به گروه های آمونیاک و فسفات) و نیز برهمکنش های آب گریزی کیتوسان - کیتوسان از جمله عواملی هستند که موجب بروز رفتار حرارتی ویژه (انتقال Sol به ژل با افزایش دما) می شوند. مسلماً هر عاملی که در جهت این سه پدیده حرکت کند موجب تسریع در فرایند ژله ای شدن شده و بالعکس عاملی که در خلاف جهت این سه پدیده رفتار کند، موجب افزایش در زمان ژله ای شدن می شود.

منابع و مراجع

1. Chasin, R.Langer; "Biodegradable Polymers as drug delivery Systems"; 1990, Marcel Dekleer. Inc.
2. Okano; "Biorelated Polymers and Gels", 1998, Academic Press.
3. A.Chilkoti; M.R. Dreher;" Targeted delivery by thermally responsive polymers". ; Adv. Drug. Del. Rev. 54 (2002) 613-630.
4. P.Alexandridis; T.A. Hatten; "PEO-PPO-PEO block Copolymer Surfactant in aqueous Solutions". Colloids Surf. A. PHysicochem. Eng. Aspects. 96(1995), 1-46.
5. P.Linse, M. Malmsten;" Temperature-Dependent Micellization in Aqueous Block Copolymer Solutions"; Macromolecules, 25 (1992), 5434-5439.
6. N.Kumar, et all, "Biodegradable block Copolymers. "Adv. drug. deliv. Review, 53 (2001) 23-44.
7. B.C.Anderson, et all;" Understanding drug release from PEO-PPO-PEO gels", J. Contr. Rel. ; 7(2001) 157-167.
8. M.Scherlund, M.Malmsten; A.Brodin; "Stabilization of a thermosetting emulsion System using ionic and nonionic Surfactants." ; Int. J. PHarm; 173 (1998), 103-116.
9. P.Alexandridis, et all;" Micellization of PEO-PPO-PEO Triblock Copolymers in aqueous Solutions: thermodynamics".; Macromol. 27 (1994), 2414-2425.
10. Theodore Moore, Scott Croy, et all; "Experimental investigation and mathematical modeling of Pluronic F 127 gel dissolution". J. Contr . Release. 67 (2000) 191-202.
11. B. Jeong, T.K. Choi, et al; "New biodegradable Polymers for injectable drug delivery Systems"; J. Control. Releas. ; 62 (1999) 109-114.
12. B.Jeong, T.H.Bae; S.W.Kim; "Thermoreversible gelation of PEG-PLGA-PEG triblock Copolymer aqueous Solutions."; Macromol, 32 (1999) 7064-69
13. E.Ruel-Gariepy; A.Chenite; et al;" A thermosensitive chitosan-based hydrogel for local delivery of Paclitaxel." Eur. J. PHarm. & Biopharm 2003.
14. S.R.Jameela, et all; "Progesterone-loaded Chitosan microspheres".; J. Control. Rel. 52 (1998) 17-24.
15. P.Perugini; I.Genta;" Periodontal delivery of ipriflavone: new chitosan PLGA film delivery System for a lipophilic drug."; Int. J. PHarm. 252, (2003), 1-9.
16. K.L.Shantha; D.R.K.Harding; "Synthesis and characterization of chemically modified chitosan microspheres. "; Carbohydr. Polym. 48 (2002) 247-253.
17. S.S.Silva; S.Maria; et all; "Synthesis and Characterization of Polyurethane-g-Chitosan" ;Eur. Polym. J.; 39 (2003) 1515-1519.
18. M.N.V. Kumar;"A review of Chitin and Chitosan applications". Reac. Func. Polym; 46 (2000) 1-27.
19. E.Khor; L.Y. Lim, "Implantable applications of Chitin and Chitosan"; Biomat; 24 (2003) 2339-2349 .

20. Gunnar Karlstrom; "A New Model for Upper and Lower Critical Solution Temperatures in PEO Solutions". J. Phys. Chem. 89, (1985), 4962-4964 .
21. Kjellender, Florin; J.Chem. Soc. Faraday. Trans. 1; 77 (1998) 2053.
22. Goldestein, J.Chem. Phys.; 80 (1984) 5340
23. Karlstrom, J. Phys. Chem. 89 (1985) 4962.
24. K. Gekko; S.N. Timasheff; "Mechanism of Protein Stabilization by glycerol: Preferential hydration in glycerol-water mixtures". Biochem. 20 (1981) 4667-4676.