

Razvoj polielektrolitne nanoobloge na mikrodelcih učinkovine

Development of polyelectrolyte nanocoating on drug microparticles

Andrej Dolenc, Julijana Kristl

Povzetek: Nanooblaganje omogoča izdelavo obloge z debelino od nekaj deset do nekaj sto nanometrov. Nanooblogo na mikrodelcih ibuprofena smo izdelali z metodo nanoplastenja (plast na plast nanooblaganje), ki temelji na izmenični elektrostatski adsorpciji nasprotno nabitih polielektrolitov. Deset- do tridesetplastno nanooblogo smo izdelali z zaporedno izmenično adsorpcijo hitosana in alginata. Z merjenjem zeta potenciala delcev smo potrdili nanos posamezne polimerne plasti, obstoj izredno tanke plastne obloge pa po končanem postopku še s posnetki optičnega in vrstičnega elektronskega mikroskopa. Takšne polielektrolitne obloge lahko uporabimo za spreminjanje površinskih lastnosti snovi, kot so izboljšanje stika površine z biološkim materialom, biokompatibilnost ter kontrolirano raztapljanje.

Gljučne besede: ultratanka obloga, metoda nanoplastenja (plast na plast), nanooblaganje, polielektrolit, hitosan, alginat

Abstract: Nanolayering can be used to produce a coating with thickness in a range of few tens to hundreds nanometers. Ibuprofen microparticles were used as cores for ultrathin coating produced using a layer-by-layer nanoassembly technique based on electrostatic adsorption of oppositely charged polyelectrolytes. 10- to 30-layered nanocoatings were made by alternating adsorption of chitosan and alginate. Each addition of the oppositely charged polyelectrolyte layer was confirmed by measuring its zeta potential. Optical and scanning electron microscopy were used to ascertain the presence of polyelectrolyte nanocoating. Such coatings can be used to change surface properties to give, for example, better contact with biologic material, higher biocompatibility and controlled dissolution.

Key words: ultrathin film, layer-by-layer nanoassembly, nanocoating, polyelectrolyte, chitosan, alginate

1 Uvod

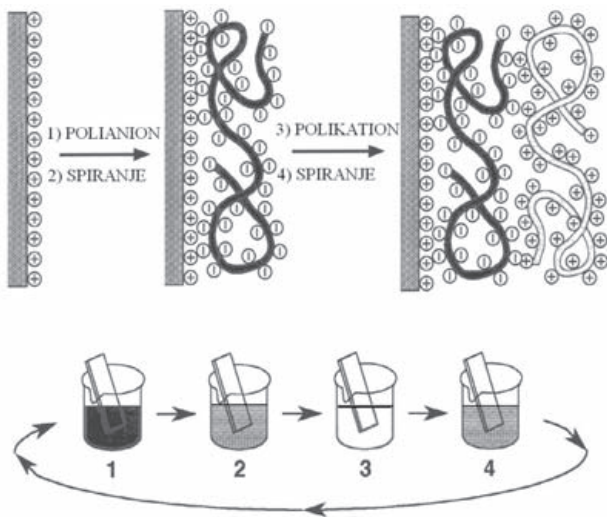
Biokompatibilni polimeri imajo veliko vlogo v sodobnem oblikovanju zdravil in številnih medicinskih pripomočkov. Dobro desetletje jih uporabljajo tudi za izdelavo nanooblog, ki so najmanj 1000-krat tanjše kot že dolgo znane filmske obloge. Novejša metoda za izdelavo nanooblog je nanoplastenje (plast na plast nanooblaganje), ki temelji na zaporedni adsorpciji nasprotno nabitih polimerov na določeno nabito površino. Metodo je leta 1991 uvedel Decher s sodelavci (1). Vsak korak vodi do tvorbe nove plasti in inverzije naboja. Rezultat je obloga, sestavljena iz več plasti, stabiliziranih z močnimi elektrostatskimi vezmi (slika 1). Debelino obloge lahko s tovrstnim oblaganjem kontroliramo v območju nekaj nanometrov (2-6).

Za tvorbo nanoobloge so najprimernejši polielektroliti, ki se elektrostatsko vežejo na oblaganec. Prvi sloj se veže neposredno na njegovo površino, zato mora le-ta imeti določen naboj. Pri oblagancu z manjšo sposobnostjo tvorjenja elektrostatskih interakcij se pri prvih nanosih ojača površinska funkcionalnost. Na površino se veže plast polielektrolita, ki ima več skupin za vezavo naslednje plasti (2-5).

Nanooblaganje izvedemo tako, da površino oblaganca izmenično izpostavimo raztopinam nasprotno nabitih polielektrolitov (slika 1). Koncentracija polielektrolitov v raztopinah običajno znaša nekaj mg/ml in je velikokrat precej večja, kot je potrebna za samo oblaganje, vendar s takšno dosežemo hitrejšo prekritje celotne površine. Po določenem času, ki je potreben, da se na površino veže polielektrolitni sloj (običajno 10 do 30 min), oblaganec dva- ali trikrat speremo s prečiščeno vodo, da odstranimo nevezane ter šibko vezane polielektrolitne molekule, ki bi bile moteče ob dodatku nasprotno nabitega polielektrolita. Očiščeno površino nato izpostavimo raztopini nasprotno nabitega polielektrolita ter jo po preteku inkubacije ravno tako speremo s prečiščeno vodo. Cikel ponavljamo tako dolgo, da dobimo oblogo z želenim številom polielektrolitnih plasti na površini, ki jo oblagamo (7, 8, 9).

V dobrem desetletju po uvedbi te metode so za oblaganje uporabljali več različnih snovi. Največ raziskav so opravili s polistirensulfonatom, polialilamin kloridom, poliakrilno kislino, polidimetildialilamonijevim kloridom ter polietileniminom. Materiali za farmacevtske namene

morajo biti biokompatibilni, poleg tega pa je zaželeno, da so tudi biorazgradljivi. Med primerne polimere za oblaganje uvrščamo kationske in anionske polielektrolite. Primeri kationskih so: hitosan, želatina in poli-D-lizin, anionskih pa: karboksimetilceluloza, dekstran sulfat in alginat (2, 5). Obstaja pa tudi možnost uporabe drugih naravnih polimerov z nabojem (npr. ksantan) (10), ter polimerov, ki jih uporabljajo za izdelavo t. i. inteligentnih hidrogelov (za pH, temperaturo, glukozo ali proteine občutljivi polimeri) (11). Spojine naravnega izvora imajo prednost pred sintezni zaradi lahke dostopnosti, nizke cene in relativno majhne toksičnosti. Poleg tega jih lahko na različne načine modificiramo, da dobimo zelene lastnosti (12).



Slika 1: Shematski prikaz nanoplastenja s polielektroliti. Površino za oblaganje izmenično izpostavimo raztopinam polianionov (1) in polikationov (3), vmes pa spiramo s prečiščeno vodo (2, 4) (prirejeno po 7)

Figure 1: Schematic illustration of layer-by-layer nanocoating with polyelectrolytes. The substrate to be coated is dipped alternately in solutions of polymers with negative (1) and positive charges (3) with intermediate washing cycles (2, 4) (edited from 7).

Nanoobloga prispeva h končni prostornini in masi oblaganca običajno le minimalno, medtem ko zaradi spremenjenih površinskih lastnosti lahko močno vpliva na obnašanje v organizmu (28). Sprva so oblagali predvsem večje in ravne površine, sčasoma pa so tovrstno oblaganje razširili tudi na površine drugačnih oblik. Z enakomerno in stabilno oblogo so obložili vsadke, delce učinkovine, celice ipd. Razvoj odpira številne možnosti za oblikovanje obloge z zelo specifičnimi lastnostmi, kar širi območje njihove uporabnosti.

Vsadke so najpogosteje oblagali, da bi izboljšali njihovo biokompatibilnost, saj so pogosto izdelani iz snovi s sicer ustreznimi mehanskimi lastnostmi (trdnostjo, elastičnostjo ipd.), toda telo jih lahko zavrne zaradi neprimernih površinskih lastnosti. Tako so obložili vsadke iz titana (13, 14, 15), silikona (2) ali polietilentereftalata (16, 17, 18, 19) in znotrajžilne žične opornice (16, 20, 21). Raziskujejo tudi nanooblaganje kostnih vsadkov z oblogo, v katero so vključili več učinkovin (protivnetne in protibolečinske učinkovine, antibiotike ter

rastne faktorje), ki se sproščajo v določenem časovnem zaporedju in tako omogočajo, da telo najbolj optimalno sprejme vsadek.

S to metodo je mogoče izdelati tudi prazne mikrokapsule z debelino ovojnice v nanometrskem območju in jih napolniti z različnimi zdravilnimi učinkovinami ter tako zagotoviti zaščito vsebine in njeno prirejeno sproščanje (6). Na ta način so izdelali bioadhezivne oblike za oko s ciprofloksacinom. Delce Ca-fosfata ter eritrocite so uporabili kot jedra, na katera so nanесли 10-plastno nanooblogo, sestavljeno iz polialilamin klorida ter alginata. Nato so obložene delce inkubirali v 10 % raztopini ciprofloksacin klorida in pod določenimi pogoji odstranili jedra. Ugotovili so, da se je učinkovina v zadostni meri zadržala v polielektrolitni oblogi oz. mikrokapsuli. Nato so z *in vivo* poskusi na zajcih dokazali, da bi jih lahko uporabili kot varen in učinkovit sistem s podaljšanim sproščanjem za dostavo učinkovine na oko (22). V drugem primeru so na jedra Zn-oksida nanесли nanooblogo, za katero so poleg anionskih polielektrolitov (dekstran sulfata, polistirensulfata) kot kationsko plast uporabili pozitivno nabit aminoglikozidni antibiotik tobraminsulfat. Tudi v tem primeru so odstranili jedra in ugotovili, da bi tudi ta sistem lahko uporabili za kontrolirano dostavo učinkovine na oko (23).

Izjemno tanke polielektrolitne nanoobloge na delcih farmacevtskih učinkovin je mogoče uporabiti podobno kot klasične obloge za uravnavanje sproščanja, zaščito učinkovine, ciljno dostavo ipd. S polielektrolitno večplastno oblogo so tako dosegli zadržano sproščanje mikrododelcev fluoresceina, ibuprofena ter furosemda. Ravnanje z učinkovinami v obliki delcev mikrometrskih velikosti je dokaj enostavno, saj jih lahko spiramo na filtru ali enostavno ločimo od disperznega medija s centrifugiranjem (2-6, 8, 22).

V primerjavi s tradicionalnimi metodami za oblaganje učinkovin, ima metoda nanoplastenja s polielektroliti naslednje prednosti:

- debelino obloge in premer mikro- oziroma nanokapsule je mogoče izdelati z natančnostjo nekaj nanometrov;
- obloga je lahko sestavljena iz več različnih snovi, vanjo pa lahko vključimo tudi polimere, lipide, encime, DNK, nanodelce idr.;
- obložiti je mogoče delce s premerom, primernim za intravensko dajanje;
- s pripenjanjem specifičnih ligandov lahko dosežemo ciljno dostavljanje obloženih delcev;
- za oblaganje uporabimo zelo malo pomožnih snovi (3, 13, 20, 24, 25).

Namen našega raziskovalnega dela je bil pridobiti izkušnje o metodi nanoplastenja (plast na plast nanooblaganja) ter po tej metodi obložiti mikrododelce ibuprofena s polielektrolitoma hitosanom in alginatom. Proces nanoplastenja smo nadzorovali z merjenjem naboja delcev, nastanek obloge pa smo dokazali tudi s posnetki optičnega ter vrstičnega elektronskega mikroskopa.

2 Materiali in metode

2.1 Materiali

Ibuprofen (Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen, Nemčija) je bel kristaliničen prašek ali v obliki brezbarvnih kristalov. V vodi je praktično netopen, dobro topen pa je v acetonu, metanolu in metilen kloridu. Topi se tudi v razredčenih raztopinah alkalijskih hidroksidov in

karbonatov. Topnost ibuprofena v vodi je 56 mg/l, v 0,1 M HCl pa približno 36 mg/l. Ibuprofen spada v razred nesteroidnih protivnetnih učinkovin, po klasifikaciji BCS pa ga uvrščamo v razred II, kamor spadajo učinkovine s slabo topnostjo in dobro permeabilnostjo (26).

Za izdelavo obloge smo uporabili natrijev alginat (Sigma, Nemčija) ter hitosan (Fluka Chemie GmbH), oba nizke viskoznosti. Hitosan je polisaharid, sestavljen iz kopolimerov glukozamina in N-acetilglukozamina, in ga pridobivajo z deacetiliranjem hitina. Je kationski poliamin z veliko gostoto naboja pri pH manj kot 6,5. Stopnja deacetilacije hitosana je večja od 80 %. Pristotnost številnih amino skupin omogoča, da se elektrostatsko poveže z anionskimi skupinami (27). Alginska kislina je linearen polimer, sestavljen iz dveh uronskih kislin: α -L-guronske (G) in β -D-manuronske kisline (M). Alginati monovalentnih kationov (Na^+ , K^+ , NH_4^+) so topni v vodi in v njej tvorijo viskozno koloidno raztopino s psevdoplastičnimi lastnostmi (28).

2.2 Postopek nanooblaganja delcev ibuprofena

Nanooblaganje smo izvedli tako, da smo 1 g delcev ibuprofena suspendirali v 40 ml raztopine polielektrolitov s koncentracijo 2 mg/ml, in sicer hitosan v 0,3 % očetni kislini, alginat pa v prečiščeni vodi. Nanooblaganje smo zaradi negativnega naboja delcev začeli z raztopino hitosana. Suspenzijo smo rahlo stresali 15 minut, da so se polielektrolitne molekule elektrostatsko vezale na površino delcev. Nato smo delce od disperznega medija ločili s 5-minutnim centrifugiranjem pri 4000 obratih/min. Disperzni medij nad usedlino smo previdno odstranili ter delce dvakrat redispergirali v prečiščeni vodi, da smo lahko odstranili nevezane ter šibko vezane polielektrolitne molekule. Po dvakratnem spiranju delcev s prečiščeno vodo smo jih redispergirali v raztopini polielektrolita z nabojem, nasprotnim od naboja zadnje plasti. Za vsak nanos plasti polielektrolita smo delce redispergirali v sveže pripravljene raztopine, saj smo tako zagotovili zadostno koncentracijo polielektrolita. Postopek smo ponavljali toliko časa, da smo dobili nanooblogo sestavljeno iz zelenega števila plasti.

2.3 Vrednotenje nanooblaganja delcev ibuprofena

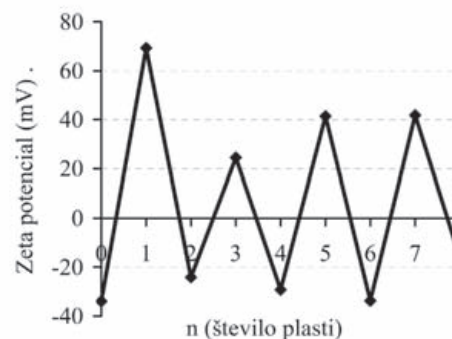
Naboj delcev ibuprofena smo določili z aparatom Zetasizer 3000 (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Naboj smo vedno določili po dvakratnem spiranju delcev s prečiščeno vodo, da nevezane oz. šibko vezane polielektrolitne molekule ne bi motile meritev.

Nanoobloge na površini delcev ibuprofena smo določili tudi s posnetki optičnega mikroskopa (Olympus BX 50F4; Olympus optical Co. Ltd, Tokyo, Japonska) in vrstičnega elektronskega mikroskopa (SEM Supra 35 VP, Carl Zeiss, Nemčija). Pred analizo z optičnim mikroskopom smo delce omočili z vodo in jih pokrili s krovnim steklom. Na zeleni povečavi smo na stik krovnege in objektnege stekla dodali kapljico 1 M raztopine natrijevega hidroksida, ki je difundiral pod krovno stekelce in povzročil raztapljanje delcev ibuprofena. Delce, ki se v alkalnem mediju raztapljajo, smo posneli pred in med raztapljanjem ter po raztopitvi, ne da bi premikali vidno polje.

3 Rezultati in razprava

Delce ibuprofena smo obložili z deset- do tridesetplastno polielektrolitno nanooblogo (HIT/ALG). Ker molekulska struktura ibuprofena vsebuje karboksilno skupino, je bila površina delcev v medijih, v katerih smo izvajali oblaganje, negativno nabita. Tako smo za tvorbo prve plasti nanoobloge uporabili hitosan, ki je pozitivno nabit. Za tvorbo druge plasti smo uporabili alginat, za tretjo zopet hitosan, za četrto alginat ter tako izmenično nadaljevali do zelenega števila plasti. Pogoj za uspešno oblaganje je tudi lastnost, da se delci v medijih z raztopljenimi polielektroliti ne raztapljajo.

Naboj neobloženih delcev ibuprofena je bil -34 mV. Naboj po nanosu prve plasti hitosana je bil 69 mV, po nanosu druge plasti (alginata) pa -24 mV (slika 2). Naboj na površini je sovpadal z nabojem zadnjega uporabljenega polielektrolita (pozitiven je bil, če je bila zadnja plast hitosanska, oz. negativen, če je bila alginatna), zato smo zeta potencial določili le po nanosu prvih osem plasti polielektrolitov (slika 2).



Slika 2: Zeta potencial obloženih mikrodelcev ibuprofena s hitosanom (1, 3, 5 in 7) oziroma alginatom (2, 4, 6 in 8) kot zadnjo plastjo polielektrolitne obloge

Figure 2: Zeta potential of nanocoated ibuprofen microparticles with chitosan (1, 3, 5 and 7) and alginate (2, 4, 6 and 8) as outstanding polyelectrolyte layers.

Naboj na površini je bil največji po nanosu prve plasti hitosana. Ker je bil naboj neobloženih delcev ibuprofena dokaj majhen (-34 mV) se je verjetno le manjši delež naboja prve plasti hitosanskih molekul porabil za nevtralizacijo naboja na površini, preostali del pa izrazil kot pozitiven naboj na površini. Ob vezavi plasti alginatnih molekul se je del naboja porabila za nevtralizacijo naboja hitosanske plasti, zato površina alginatne plasti ni bila tako negativno nabita. Po nanosu začetnih plasti pa so postala nihanja v nabojih bolj enakomerna. Dobljeni rezultati kažejo podoben trend, kot so jih objavili raziskovalci v literaturi, seveda pa so absolutne vrednosti naboja odvisne od uporabljenih materialov.

Na posnetkih obloženih delcev ibuprofena z optičnim mikroskopom nismo opazili razlik na površini delcev, saj je obloga zelo tanka, povečava pa sorazmerno majhna za ugotavljanje površinskih razlik (slika 3a). Po dodatku 1 M natrijevega hidroksida na rob krovnege stekla so se mikrodelci ibuprofena začeli raztapljati, ostala pa je polielektrolitna obloga (slika 3b, 3c). NaOH smo uporabili, ker je ibuprofen dobro topen v alkalnem, slabo pa v vodi oz. v kislem

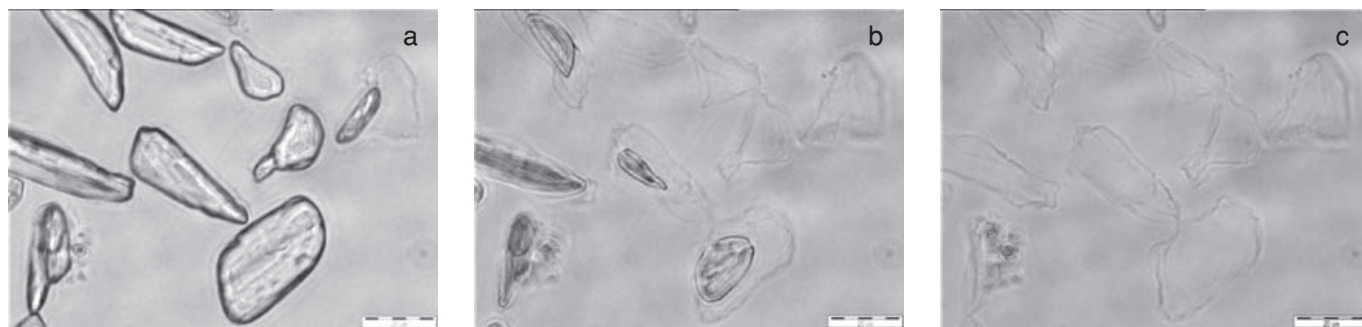
mediju. Že med samim raztapljanjem jeder (slika 3b), predvsem po njihovi popolni raztopitvi, smo opazili ovojnice oziroma obloge okrog mikrodolcev ibuprofena, ki so ostale vidne tudi po raztopitvi jedra in so zadržale obliko mikrodolcev (slika 3c). V nekaterih primerih smo opazili skrčenje obloge. Potrdili smo, da je obloga stabilna in se ne raztaplja niti v bazičnem mediju. Obloga je ravno tako stabilna v kislem kot nevtralnem mediju, saj smo v obeh izvajali oblaganje.

Posnetki neobloženih in obloženih delcev ibuprofena z vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM) so prikazani na sliki 4(a-c). Debeline obloge iz SEM posnetkov je težko natančno določiti, vidno pa je, da je obloga res izjemno tanka. Iz posnetkov smo ocenili, da je tridesetplastna nanobloga debela 100-200 nm, kar je v skladu z literaturnimi podatki, kjer avtorji navajajo, da je debelina ene plasti 2 do 6 nm, odvisna pa je od uporabljenih polimerov (3, 15, 21, 22). Na posnetkih obloženih delcev smo opazili luknjasto površino (slika 4b, 4c). Sklepamo, da pred SEM slikanjem površina ni bila poškodovana,

saj se je število poškodb večalo med daljšim opazovanjem vzorca s SEM mikroskopom. Očitno tako tanke obloge ne prenesejo dolgotrajnejše izpostavljenosti elektronom v tovrstnem mikroskopu. Opazili smo, da je poškodb pri 10-plastni oblogi več (slika 4b) ter se pojavljajo hitreje kot pri 30-plastni (slika 4c), kar je ravno tako posledica tanjše obloge.

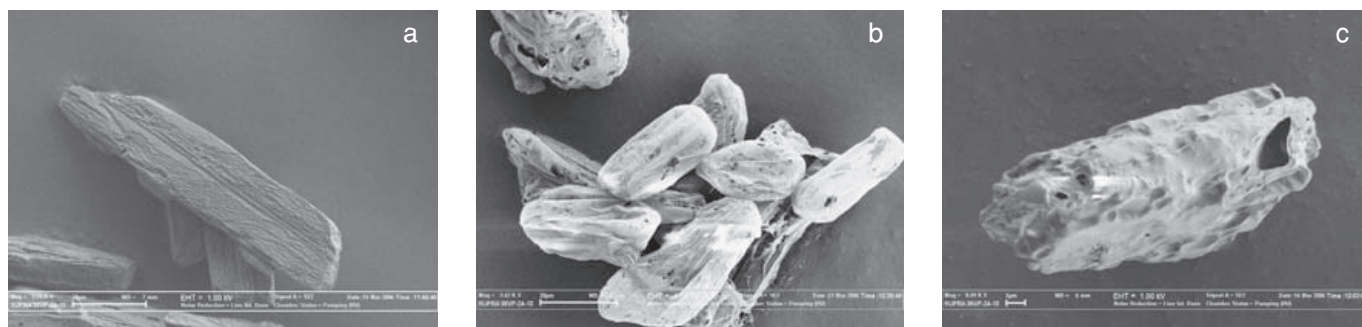
4 Sklep

Nanoplastenje (plast na plast nanooblaganje) s polielektroliti je metoda, s katero lahko izdelamo zelo tanko oblogo na površinah različnih velikosti in oblik. Za izdelavo obloge sta potrebni dve polimerni spojini z nasprotnim nabojem, ki se izmenično vežeta na površino, ki jo oblagamo. Postopek nanooblaganja lahko spremljamo z vmesnim določanjem zeta potenciala na površini delcev, po končanem oblaganju pa s posnetki optičnega in vrstičnega



Slika 3 (a-c): Posnetki obloženih delcev ibuprofena z 20-plastno polielektrolitno oblogo z optičnim mikroskopom. Na sliki **a** vidimo delce ibuprofena z 20-plastno nanooblogo pred začetkom raztapljanja v 1 M NaOH. Slika **b** prikazuje že delno raztopljene delce, kjer so že vidne tudi polielektrolitne obloge, na sliki **c** pa so delci ibuprofena že popolnoma raztopljeni in je vidna samo še polielektrolitna obloga, ki je ohranila obliko in velikost delcev. Merilo na posnetku predstavlja 20 μm .

Figure 3 (a-c): Optical microscope images of ibuprofen particles with 20 polyelectrolyte layers. **a** Ibuprofen before dissolution in 1 M sodium hydroxide solution. **b** Partially dissolved particles with a visible residue of polyelectrolyte coating. **c** Ibuprofen particles totally dissolved leaving only the polyelectrolyte multilayer. The polyelectrolyte multilayer kept the size and the shape of the particles. Size bar represents 20 μm .



Slika 4 (a-c): SEM posnetki neobloženih delcev ibuprofena (a) ter delcev, obloženih z 10 ((HIT/ALG)5) (b) oziroma 30 plastmi polielektrolitov ((HIT/ALG)15) (c). Merilo predstavlja 20 μm (a, b) oz. 2 μm (c).

Figure 4 (a-c): SEM images of (a) uncoated ibuprofen particles, (b) particles coated with 10 polyelectrolyte layers ((HIT/ALG)5), or (c) 30 polyelectrolyte layers ((HIT/ALG)15) (c). Size bars represent 20 μm (a, b) and 2 μm (c).

elektronskega mikroskopa določimo obliko, debelino, homogenost in stabilnost.

Nanooblaganje mikrodelcev ali večjih površin ni posebno zahteven postopek. Zahtevnejše je oblaganje nanodelcev, predvsem zaradi njihovega ločevanja od disperznega medija in stabilnosti tovrstnih sistemov. Oblaganje nanodelcev za parenteralno dajanje zaradi povečanja biokompatibilnosti ter za ciljano dostavo učinkovine pa pomeni poseben izziv za raziskovanje v prihodnosti.

5 Literatura

1. Decher G, Hong JD. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: I. consecutive adsorption of anionic and cationic bipolar amphiphiles. *Makromol Chem, Macromol Symp*, 1991; 46: 321-327.
2. Ai H, Meng H, Ichinose I in sod. Biocompatibility of layer-by-layer self-assembled nanofilm on silicone rubber for neurons. *J Neurosci Meth*, 2003; 128: 1-8.
3. Ai H, Jones SA, de Villiers MM in sod. Nano – encapsulation of furosemide microcrystals for controlled drug delivery. *J Contr Rel*, 2003; 86: 59-68.
4. Qiu X, Loporatti S, Donath E in sod. Studies on the drug release properties of polysaccharide multilayers encapsulated ibuprofen microparticles. *Langmuir*, 2001; 17: 5375-5380.
5. Antipov AA, Sukhorukov GB, Donath E in sod. Sustained release properties of polyelectrolyte multilayer capsules. *J Phys Chem B*, 2001; 105: 2281-2284.
6. Homar M, Kristl J. Nanooblaganje – možnosti in prednosti. V: *Nanotehnologija v farmaciji*. Ljubljana: Slovensko farmacevtsko društvo, 2004; p. 65-79.
7. Decher G. Fuzzy nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites. *Science*, 1997; 277: 1232-1237.
8. Moya S, Donath E, Sukhorukov GB in sod. Lipid coating on polyelectrolyte surface modified colloidal particles and polyelectrolyte capsules. *Macromolecules*, 2000; 33: 4538-4544.
9. Zahr AS, de Villiers M, Pishko MV. Encapsulation of drug nanoparticles in self-assembled macromolecular nanoshells. *Langmuir*, 2005; 21: 403-410.
10. Baumgartner S, Pavli M, Kristl J. Effect of calcium ions on the gelling and drug release characteristics of xanthan matrix tablets. *Eur J Pharm Biopharm*, 2008; 69 (2): 698-707.
11. Abramović Z, Kristl J. Inteligentni hidrogeli za dostavo zdravilnih učinkovin. *Farm Vestn*, 2004; 55: 555-563.
12. Bhardwaj TR, Kanwar M, Lal R in sod. Natural gums and modified natural gums as sustained – release carriers. *Drug Dev Ind Pharm*, 2000; 26 (10): 1025-1038.
13. van den Beucken JJJP, Vos MRJ, Thune PC in sod. Fabrication, characterization and biological assessment of multilayered DNA-coatings for biomaterial purposes. *Biomaterials*, 2006; 27: 691-701.
14. Cai K, Rechtenbach A, Hao J in sod. Polysaccharide-protein surface modification of titanium via a layer-by-layer technique: characterization and cell behaviour aspects. *Biomaterials*, 2005; 26: 5960-71.
15. Schultz P, Vautier D, Richert L in sod. Polyelectrolyte multilayers functionalized by a synthetic analogue of an anti-inflammatory peptide, -MSH, for coating a tracheal prosthesis. *Biomaterials*, 2005; 26: 2621-30.
16. Dolenc A, Homar M, Gašperlin M, Kristl J. Z nanooblaganjem do izboljšanja biokompatibilnosti vsadkov. *Med Razgl*, 2006; 45: 411-420.
17. Fu J, Ji J, Yuan W in sod. Construction of anti-adhesive and antibacterial multilayer films via layer-by-layer assembly of heparin and chitosan. *Biomaterials*, 2005; 26: 6684-6692.
18. Boura C, Menu P, Payan E in sod. Endothelial cells grown on thin polyelectrolyte multilayered films: an evaluation of a new versatile surface modification. *Biomaterials*, 2003; 24: 3521-30.
19. Liu Y, He T, Gao C. Surface modification of poly(ethylene terephthalate) via hydrolysis and layer-by-layer assembly of chitosan and chondroitin sulfate to construct cytocompatible layer for human endothelial cells. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2005; 46: 117-26.
20. Thierry B, Winnik F M, Merhi Y in sod. Bioactive coatings of endovascular stents based on polyelectrolyte multilayers. *Biomacromol*, 2003; 4: 1564-1571.
21. Yang SY, Seo JY. Cellular interactions on nano-structured polyelectrolyte multilayers. *Colloids and Surfaces A: Physicochem Eng Aspects*, 2008; 313-314: 526-529.
22. Bhadra D, Gupta G, Bhadra S in sod. Multicomposite ultrathin capsules for sustained ocular delivery of ciprofloxacin hydrochloride. *J Pharm Pharmaceut Sci*, 2004; 7(2): 241-251.
23. Khopade AJ, Arulsudar N, Khopade SA in sod. Ultrathin antibiotic walled microcapsules. *Biomacromolecules*, 2005; 6: 229-234.
24. Haidar ZS, Hamdy RC, Tabrizian M. Protein release kinetics for core-shell hybrid nanoparticles based on the layer-by-layer assembly of alginate and chitosan on liposomes. *Biomaterials*, 2008; Vol 29: 1207-1215.
25. Liu L, Chen Z, Yang S in sod. A novel inhibition biosensor constructed by layer-by-layer technique based on biospecific affinity for the determination of sulfide. *Sensors and Actuators B*, 2008; 129: 218-224.
26. Kocbek P, Baumgartner S, Kristl J. Preparation and evaluation of nanosuspensions for enhancing the dissolution of poorly soluble drugs. *Int J Pharm*, 2006; 312: 179-186.
27. Kristl J, Šmid-Korbar J, Štruc E in sod. Hydrocolloids and gels of chitosan as drug carriers. *Int J Pharm*, 1993; 99: 13-19.
28. Rowe RC, Sheskey JP, Weller JP in sod. *Handbook of pharmaceutical excipients*, 4th edition, 2003: 16-18, 132-135.