

VĚDECKÉ SPISY VYSOKÉHO UČENÍ TECHNICKÉHO V BRNĚ

Edice Habilitační a inaugurační spisy, sv. 754

ISSN 1213-418X

Marián Lehocký

BIOFUNKCIONALIZACE POVRCHŮ POLYMERŮ

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
Fakulta chemická

doc. Ing. Marián Lehocký, Ph.D.

BIOFUNKCIONALIZACE POVRCHŮ POLYMERŮ

POLYMER SURFACE BIOFUNCTIONALIZATION

TEZE PŘEDNÁŠKY
K PROFESORSKÉMU JMENOVACÍMU ŘÍZENÍ
V OBORU FYZIKÁLNÍ CHEMIE



BRNO 2023

KLÍČOVÁ SLOVA

depozice, mezifázové rozhraní, povrch, povrchová modifikace, tenké vrstvy

KEYWORDS

deposition, interface, surface, surface modification, thin films

© Marián Lehocký, 2023

ISBN 978-80-214-6157-4

ISSN 1213-418X

OBSAH

PŘEDSTAVENÍ AUTORA.....	4
1 ÚVOD	6
2 BIOFUNKCIONALIZAČNÍ POSTUPY	7
2.1 Metoda zdrsňování povrchů.....	7
2.2 Tvorba vrstev	9
2.3 Povrchové roubování	12
2.4 Tvorba vícevrstevných systémů.....	13
3 PŘÍNOS PRO VĚDNÍ OBLAST BIOFUNKCIONALIZACE	14
3.1 Druhy aktivních látek pro biofunkcionalizace	14
3.2 Kovalentní a nekovalentní způsob imobilizace	16
3.3 Fyzikálně-chemický víceetapový proces depozice bioaktivních molekul	17
4 PERSPEKTIVY A VÝHLEDY	20
5 POUŽITÁ LITERATURA	21
ANOTACE.....	25
ABSTRACT	25

PŘEDSTAVENÍ AUTORA



Europass Curriculum Vitae

Personal information

Surname(s) / First name(s)	Lehocký, Marián, Assoc. Prof. Ing. Ph.D. (Mr.)		
Address(es)	Budovatelská 4798, 760 05 Zlín, Czech Republic		
Telephone(s)	+420 608 616 048	Mobile:	+420 608 616 048
E-mail	lehocky@post.cz		
Nationality	Czech		
Date of birth	26 th March 1977		

Work experience

Dates	2008–
Occupation or position held	Associate Professor (0,5)
Name of employer	Tomas Bata University in Zlín, Czech Republic
Dates	2012–
Occupation or position held	Senior researcher (0,5)
Name of employer	Tomas Bata University in Zlín, Centre of Polymer System, Czech Republic
Dates	2008–2012
Occupation or position held	Senior researcher
Name of employer	Tomas Bata University in Zlín, University Institute, Medical Materials Research Centre, Czech Republic
Dates	2003–2007
Occupation or position held	Research Assistant
Name of employer	Tomas Bata University in Zlín, Faculty of Technology, Institute of Physics and Materials Engineering, Czech Republic

Education and training	
Dates	2008
Title of qualification awarded	Associate Professor
Principal branch	Physical Chemistry
Name and type of organisation providing education and training	Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, Czech Republic
Dates	2000–2004
Title of qualification awarded	PhD
Principal branch	Chemistry and Technology of Materials
Name and type of organisation providing education and training	Tomas Bata University in Zlín, Faculty of Technology, Czech Republic
Dates	1995–2000
Title of qualification awarded	Ing.
Principal branch	Physical and Applied Chemistry
Name and type of organisation providing education and training	Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, Institute of Physical and Applied Chemistry, Czech Republic
Expertise	Surface treatment by various techniques, surface biocompatibilization, surface biofunctionalization, surface and interface science, antibacterial and antithrombotic surfaces, surface modification and interaction of materials with cell systems and tissues, including STEM cells.
Mother tongue(s)	Czech
Other language(s)	Level of linguistry:
English	C1
Portuguese	B1
Additional information	<ul style="list-style-type: none"> - Invited researcher, IJS Ljubljana, Slovenia 2010/2011 (12 months) - Post-doc, University of Aveiro, Portugal, 2005 (12 months) - EC Marie Curie Fellowship, University of Aveiro, Portugal, 2002 (6 months)

Supervisor in doctoral degree programmes:

Chemistry and Materials Technology, Technology of Macromolecular Substances, Faculty of Technology, Tomas Bata University in Zlín
 Bimaterials and Biocomposites, Centre of Polymer Systems, Tomas Bata University in Zlín

Membership in national and international scientific or technical organizations:

- (2009-) Member of the International Editorial Board, Materials and Design, Elsevier, ISSN: 0261-3069.
- (2013-) Member of the International Editorial Board, Materials Science in Semiconductor Processing, Elsevier ISSN: 1369-8001.
- (2019-) Member of the International Editorial Board, Polymers, MDPI, ISSN: 2073-4360.

Publication and patent activities:

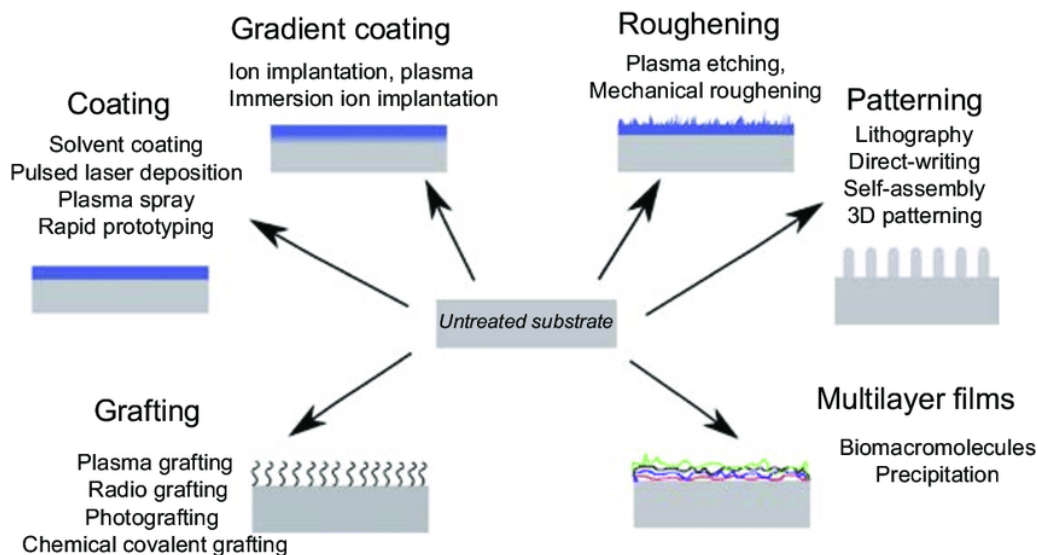
Published scientific manuscripts in ISI Wos Core Collection: 88
 Number of citations according to ISI Wos: 2443
 Number of citations without autocitations according to ISI Wos: 2105
 H-index according to ISI Wos: 27
 Number of patents: 8

1 ÚVOD

Současný výzkum v oblasti biomateriálů se soustřeďuje do dvou hlavních směrů, které jsou do značné míry vzájemně nezastupitelné. První přístup je založen především na tvorbě nových, dosud nepoznaných materiálů, které svými vlastnostmi předčí ty stávající. Tyto vlastnosti mohou být velmi různorodé. Zejména jde o vlastnosti mechanické, které v sobě subsumují parametry pevnosti nebo kupř. hustotní, ale i chemické, které mají určující vliv na následnou kompatibilitu s materiálem biologického původu, který může mít mnoho podob, a to od tkání, buněk, tělních tekutin, proteinů, až po mnohé další. Takto lze připravit biomateriály především tvorbou nových slitin, novou syntézou anorganických či polymerních materiálů, tvorbou nových keramických směsí, či modifikací a optimalizací metod jejich přípravy. Druhý přístup presumuje vhodnost kupříkladu mechanických vlastností již známých materiálů, jako pružnost, únavová odolnost a podobně, přičemž klade důraz na zušlechtnění povrchových vlastností, které nejsou adekvátní s ohledem na kompatibilitu s materiálem biologického původu. Tedy, jde zejména o materiály, které jsou poměrně levné, snadno zpracovatelné a jednoduše povrchově upravitelné. Přestože lze, a v praxi je často nutno, povrchově upravovat nejružnější biomateriály, prim v této kategorii bude patřit syntetickým polymerním materiálům, které si vydobily náležitou pozornost právě nízkou cenou a snadným způsobem zpracování. Nelze však současně odhlédnout od faktu, že nejružnějších možných interakcí biomateriálů s nepřehlednými typy biologických prostředí je tolik, že žádný materiál není sto plnit svou adekvátní funkci ve všech případech. Je tedy třeba vždy pro každou danou aplikaci v konkrétním biologickém prostředí důkladně zjistit a optimalizovat parametry použitých materiálů, aby byl co možná nejlépe zajištěn komfort a vitalita biologického prostředí při současně zachované funkci, která se co nejvíce přibližuje původnímu prosperujícímu stavu biologického systému. Z výše uvedeného plyne, že komplexnost studované problematiky již překračuje jednotlivé vědní obory a stává se studiem interdisciplinárním, které se nachází zejména na pomezí fyzikální chemie povrchů a mezifázových rozhraní, materiálového inženýrství, molekulární biologie, tkáňového inženýrství, fyziologie a dalších. Jak už plyne z názvu, autor se zabývá druhou z výše uvedených možností, kterou dále rozvede přiměřeně poskytnutému prostoru pro práce tohoto typu.

2 BIOFUNKCIONALIZAČNÍ POSTUPY

Na úvod je třeba zmínit, že metod pro biofunkcionalizaci povrchů je poměrně velké množství. Tyto metody se mohou často i vzájemně prolínat. Z praktického pohledu se ale jeví vhodné je rozdělit do několika základních kategorií, a to podle převažující strategie povrchové úpravy. Jednotlivé postupy jsou znázorněny na obrázku 1. Tyto povrchové úpravy mají za následek překonání neadekvátních vlastností původního substrátu ve vztahu k okolnímu biologickému prostředí.



Obr. 1.: Schematické znázornění možností technik pro biofunkcionalizaci [1]

Obecně lze techniky povrchové úpravy klasifikovat jako fyzikální nebo chemické postupy, u nichž je aktivní složka na povrch připojena kovalentně nebo pomocí mezimolekulárních interakcí. Námi používané postupy uvedené v obrázku 1. budou dále rozebrány v následujícím textu za použití získaných dat během našeho výzkumu.

2.1 METODA ZDRSŇOVÁNÍ POVRCHŮ

Tato metoda, která je v cizojazyčné literatuře označovaná jako „roughening“ slouží především ke změně povrchové topografie materiálů. Jak známo, jsou určité typy buněčných systémů, které mnohem lépe prosperují na površích, které jsou relativně drsné. Tyto systémy označujeme jako rugofilní. Opakem jsou systémy, které lépe proliferují na hladkých površích. Tyto systémy jsou známy jako rugofobní.

První možností zdrsnění povrchu je mechanický postup. Mechanický postup se vyznačuje tím, že na povrch působíme pomocí smykových sil a samotné zdrsnění je provedeno brusnými částicemi, které nazýváme abraziva. Takto získaný povrch má poměrně mnoho výhodných, ale i nevýhodných parametrů. Mezi hlavní výhody patří zejména fakt, že při změně povrchové

topografie nedošlo ke změně chemické struktury na povrchu, což je mezi metodami biofunkcionalizace unikátní. Hlavní nevýhody lze spatřit v kontaminaci povrchu abrazivem a dále neuniformitě provedené povrchové úpravy. Tyto nevýhody lze překonat kupříkladu pískováním, kde coby abrazivo je použit písek, který je spolu s pracovním plynem unášen ze zásobníku a jeho mechanické nárazy na povrch mají za následek poměrně uniformní povrchovou strukturu. Podobného výsledku lze dosáhnout v případě syntetických polymerních materiálů i vstřikováním, kdy dojde k přenosu topografie povrchu z formy na zpracovávaný polymer. Tímto způsobem se kupříkladu připravují vzorky HD 6 Helioplate, které slouží jako model lidské kůže pro stanovení účinnosti ochrany kosmetických přípravků před UV zářením [2].

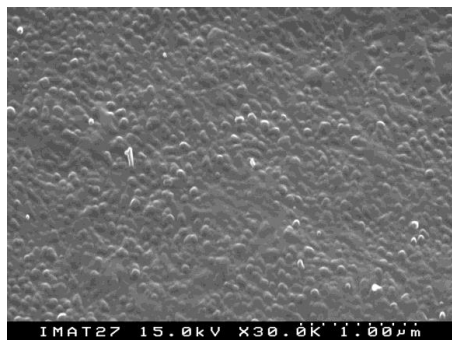


Obr. 2 Deska Helioplate HD 6

Další možností zdrsňování povrchů představuje plazmové leptání. Plazmové leptání je velmi účinným nástrojem pro modifikaci povrchové topografie. Vyznačuje se však i tím, že dochází ke změně chemické struktury substrátu. Tyto výsledky může teoreticky poskytovat i ozařování UV zářením, avšak účinnost tohoto postupu je výrazně nižší. Další metodou může být leptání pomocí koncentrovaných anorganických kyselin. Ovšem ani zde nelze docílit významné účinnosti. Navíc, do jisté míry dochází i ke kontaminaci povrchu. Proto se plazmové leptání považuje za nejefektivnější a ekologicky šetrný nástroj pro modifikaci povrchů [3-7]. Výsledek je však velmi závislý na parametrech výboje. Zejména pak na výkonu budícího zdroje, dále na čase úpravy a též i na druhu pracovního plynu a jeho průtoku. Topografie původního a povrchově modifikovaného vzorku je znázorněna na následujících obrázcích 3 a 4.

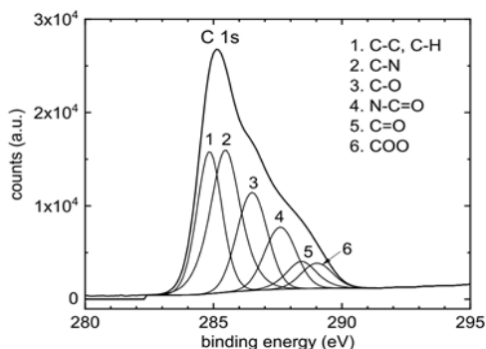


Obr. 3 Původní vzorek polyetylenu



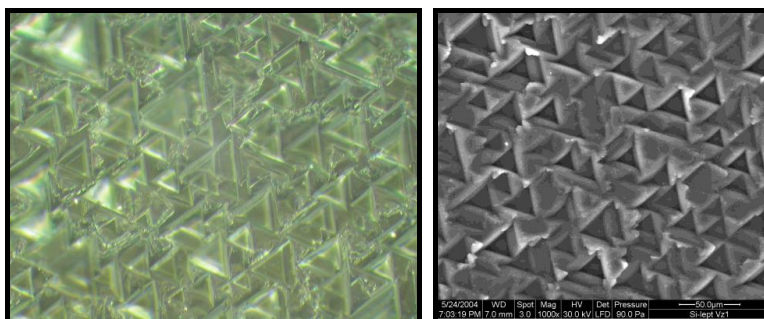
Obr. 4 Polyetylen po plazmovém leptání

Jak bylo zmíněno výše, leptání pomocí plazmatu má často za následek i změnu chemického složení na povrchu. Tu je možno charakterizovat například pomocí Rentgenové fotoelektronové spektroskopie, viz Obr. 5.



Obr. 5 XPS spektrum povrchově upraveného polymeru [8]

Jak již zmíněno výše, poslední možností je leptání v silně kyselém nebo alkalickém prostředí. Ukázkou takto připraveného substrátu může být leptání Si desek v alkalickém prostředí v přítomnosti alifatických alkoholů.



Obr. 5 a 6 Snímek z optického a elektronového mikroskopu leptaných Si desek [9]

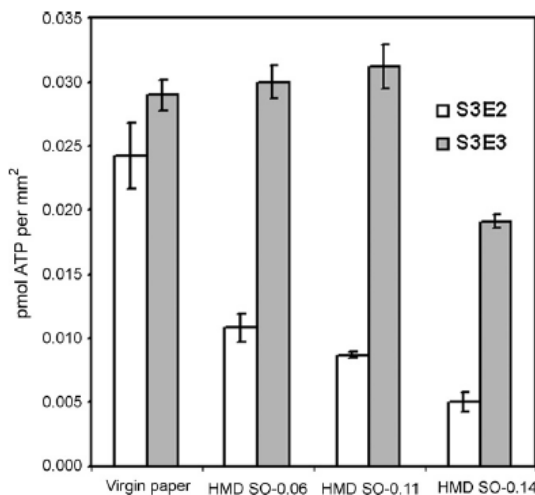
2.2 TVORBA VRSTEV

Příprava vrstev a tenkých filmů na površích materiálů představuje jednu z průmyslově nejužívanějších technik. Tenké vrstvy lze připravit velmi jednoduše, a to odléváním. Modifikací odlévání je spin-coating. Další metodou pro přípravu tenkých filmů je tzv dip-coating. Tyto metody spočívají v nanášení kapaliny na rotující vzorek, případně ulpíváním tenké vrstvy na vzorek ponořený do kapaliny, který je následně z kapaliny definovaným způsobem vyjmut. Tvorba vrstev může být provedena ale i poměrně pokročilými technikami. Chemická depozice v plynné fázi (CVD), je důležitá technika povrchových modifikací syntetických polymerních materiálů, kde se plazmatu účinně využívá pro tvorbu aktivního a reaktivního meziproductu pro konstrukci tenkých tvrdých vrstev. Plazmatem indukovaná chemická depozice v plynné fázi (PECVD) umožňuje, aby proces mohl probíhat při relativně nižších teplotách než ve srovnání s jinými typy

tepelného CVD, které používají například, termický reaktor nebo laser. Tyto vrstvy mohou být připraveny pomocí mnoha druhů výbojů. Tedy, uplatňují se techniky za nízkého tlaku, stejně tak jako za tlaku atmosférického.

Příprava vrstev pomocí plazmatu má obvykle několik společných rysů. Výboj je iniciován v pracovním plynu, kupříkladu dusíku nebo argonu, do něhož je přidáváno pomocí průtokoměru malé množství monomeru. Tento monomer je často poměrně stabilní, ale po srážkách s metastabilní pracovním plynu nebo jeho ionty získáme reaktivní částice, které již s povrchem interagují za vzniku stabilních vrstev. V následující části bude uvedeno několik takových případů, které mají následně též dopad na interakci se živými systémy.

Prvním příkladem může být povrch na bázi organokřemičitých vrstev pro selektivní interakci s buněčnými systémy [10]. V uvedeném případě byl nosným pracovním plynem dusík a jako monomer byl použit hexamethylsiloxan (HMDSO) případně dimethylsiloxan (DMSO). Na takto připravených substrátech, které se vzájemně lišily pouze průtokem monomeru, byla deponována směs bakterií *Rhodococcus* SP. S2E3 a *Rhodococcus* SP. S3E3. Tyto bakterie, které se běžně vyskytují v půdě jsou si vzájemně velmi podobné, liší se však pouze v jednom parametru, a to schopnosti depolymerovat syntetické polymerní materiály. Zatím co *Rhodococcus* SP. S3E3 je v tomto smyslu účinný, tak *Rhodococcus* SP. S2E3 nikoliv. Na následujícím obrázku 7 je zřejmé, že pro organokřemičité vrstvy z monomeru HMDSO se podařilo připravit povrch, který vázal výrazně více kmene *Rhodococcus* SP. S3E3 než kmene *Rhodococcus* SP. S2E3, přičemž jejich deponice na nepracovaný povrch byla podobná.

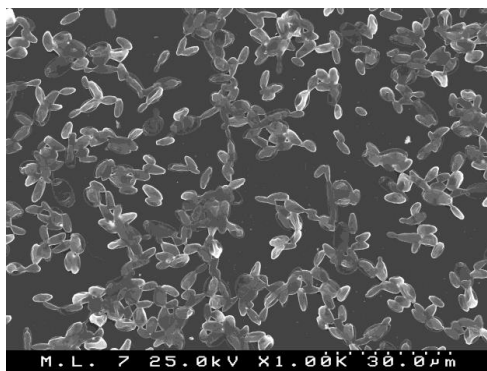


Obr. 7 Porovnání deponice bakterií *Rhodococcus* SP. S2E3 a *Rhodococcus* SP. S3E3 na organokřemičitých vrstvách z monomeru HMDSO

Tyto buňky byly deponovány též na povrchové vrstvy tzv. teflonu-podobné. V praxi jde o fluorokarbonové povlaky, které mohou být připraveny v plazmatu dusíku nebo argonu. Jako monomer bývá použit zpravidla oktafluorocyklobutan. V tomto případě ale nebyly pozorovány výrazné rozdíly v chování jednotlivých bakterií.

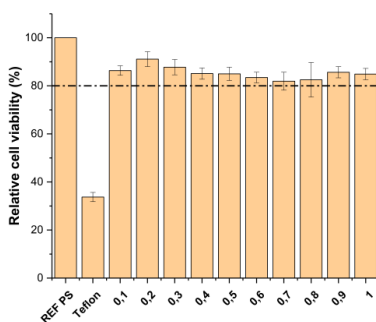
Dalším deponovaným systémem byla kvasinka *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 [11]. Tato kvasinka se vyznačuje několika výjimečnými parametry. Jednak je poměrně hydrofobní [12], dále je velmi odolná v konkurenci jiných mikroorganismů a dovede produkovat bioemulsifikátor

Yansan [13]. Další výjimečnou vlastností je schopnost dekompozice ropných reziduí v přírodních systémech. Tato kvasinka byla též deponována ve směsi s jinými kvasinkami na organokřemičité a teflonu podobné povrchy [14-15]. Zde byly kvasinky pozorovány obrazovou analýzou. Různé kvasinky ve směsi měly obdobný elektrochemický profil v širokém rozmezí pH, tak jako i jiné vlastnosti. Lišily se však tvarem. Zatímco konkurenční kvasinky *Saccharomaces cerevisiae* mají tvar sférický, *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 má tvar eliptický. Výsledné deponované kvasinky jsou vyobrazeny na následujícím obrázku 8., ze kterého je patrné, že uvedený povrch váže selektivně jen kvasinky *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 [14].

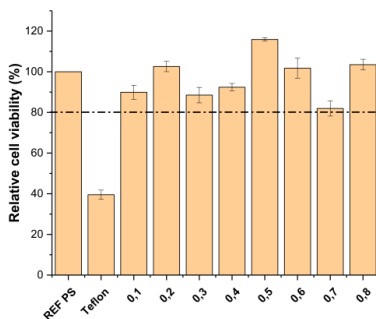


Obr. 8 Kvasinky *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 deponované na organokřemičitý povrch.

Dalšími vrstvami, které se dají připravit podobným způsobem jsou tzv. vrstvy oxazolinové, které bývají považovány za náhradu polyetylen glykolu. V tomto případě jde o aplikaci výboje v atmosféře dusíku, kdy jako monomer jsou použity kupříkladu 2-ethyl-2-oxazolin nebo 2-methyl-2-oxazolin. Tyto jsou deponovány na povrch skla, případně teflonu. Jak plyne z následujících obrázků, takto připravené vrstvy jsou velmi šetrné k prostředí organismu, což je dáno jejich nízkou cytotoxicitou. Cytotoxicita je stanovena pomocí MTT testu, ve kterém jsou pozorovány interakce testovaných povrchů k fibroblastům. Jako srovnávací povrch je použit polystyren pro tkáňové kultury, který by měl být k fibroblastům šetrný. Výsledek pro polystyren znamená 100 % cytocompatibilitu, proti níž jsou porovnávány všechny vzorky. Pokud výsledek dosahuje alespoň 80 %, je považován za necytototoxický, tedy cytocompatibilní. Na následujících grafech (Obr. 9 a 10) pro 2-ethyl-2-oxazolin a 2-methyl-2-oxazolin je zřejmé, že připravené vrstvy tyto parametry na rozdíl od teflonového substrátu spňují.



Obr. 9 Výsledky cytotoxicity pro 2-ethyl-2-oxazolin



Obr. 10 Výsledky cytotoxicity pro 2-methyl-2-oxazolin

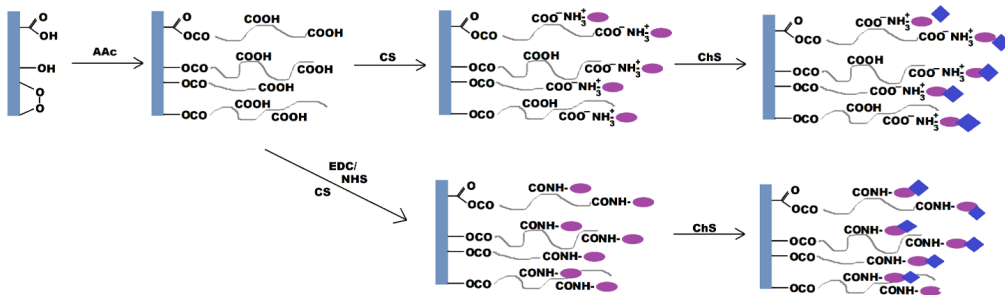
Na uvedených grafech je vždy prvním vzorkem referenční hodnota získaná na polystyrenu pro tkáňové inženýrství, druhým vzorkem je použitý substrát, což byl v našem případě teflon. Další vzorky se liší jen průtokem monomeru. Pozoruhodné je, že na obrázku 10 jsou připraveny vzorky, u nichž relativní viabilita fibroblastů přesáhla 100 %. Tento výsledek není příliš častý, nikoli však nemožný. Znamená, že daný povrch je k fibroblastům ještě šetrnější než polystyren pro aplikace ve tkáňovém inženýrství.

V uvedeném výčtu technik pro tvorbu vrstev by se dalo pokračovat. Progresivní se jeví též vrstvy na bázi propan-butanu, které jsou poměrně snadno připravitelné a vynikají zajímavými antibakteriálními vlastnostmi [16] a mnohé další.

2.3 POVRCHOVÉ ROUBOVÁNÍ

Povrchové roubování, případně očkování, které se v zahraniční literatuře objevuje pod pojmem grafting, případně surface grafting, představuje velmi širokou škálu metod, které jsou způsobily navázat na původní substrát nejčastěji vícefunkční molekuly. Tyto molekuly potom mají vliv na lepší interakci s buňkami nebo jsou způsobily vázat aktivní molekuly, a to jak kovalentně, tak i nekovalentně.

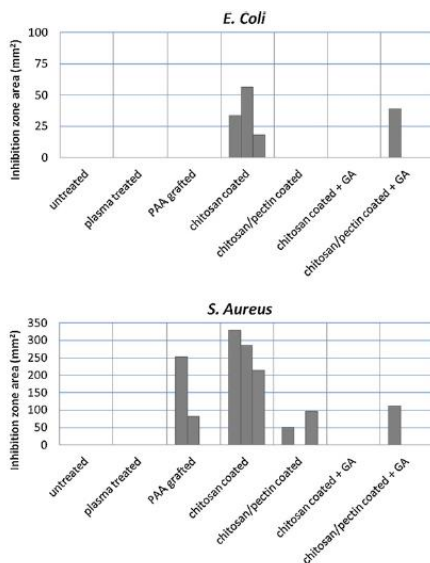
V minulosti jsme studovali systém na bázi PLA, který byl předupraven ve výboji a poté byl roubován pomocí kyseliny akrylové. Na takto přepravený roubo byl nýváán chitosan jak kovalentně, tak nekovalentně a na tyto vzorky byl následně navázán chondroitin sulfát. Výše popsané je schematicky znázorněno na následujícím obrázku 11. [17]. Na takto připravených vrstvách byly pochopitelně zkoumány i další parametry. V první řadě cytotoxicita a dále též antibakteriální vlastnosti, kdy jednotlivé postupy jsou uvedeny přehledně v publikaci. Z naměřených výsledků vyplynulo, že cytotoxicita vzorků je na vynikající úrovni. Rovněž, vzorky vykazovaly poměrně zajímavé výsledky v případě antibakteriálních vlastností.



Obr. 11 Schéma roubování kyseliny akrylové (AAc) na výnojem předupravený PLA následovaný imobilizací chitosanu (CS) buď přímo nebo pomocí karbodiimidového vázání a imobilizace chondroitin sulfátu (ChS).

2.4 TVORBA VÍCEVRSTVÝCH SYSTÉMŮ

Tvorba vícevrstevných systémů si dosud nevydobyла dostatečné pozornosti. V literatuře bývá obvykle kometována jen velmi spore. V případě našich experimentů jsme se s danou problematikou potýkali pouze jednou, a to ještě okrajově. V rámci studia depozice chitosanu na povrch polyetylenu [18] byla zkoumána možnost tvorby vícevrstevných systémů na bázi chitosan-pektin. Takto bylo postupně připraveno v návaznosti na literaturu celkově 10 vrstev, u nichž byly následně krom jiného testovány antibakteriální vlastnosti. Získané výsledky jsou uvedeny níže na obrázcích 12 a 13.



Obr. 12 a 13 Výsledky měření inhibičních zón pro *E. Coli* a *S. Aureus* [18]

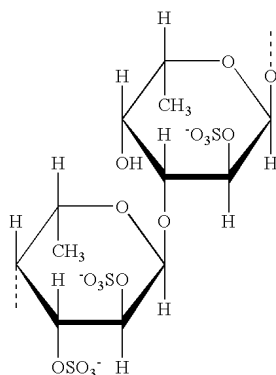
Z uvedených výsledků je zřejmé, že vícevrstevný systém nebyl účinný podle představ.

3 PŘÍNOS PRO VĚDNÍ OBLAST BIOFUNKCIONALIZACE

Přestože dosud prezentované výsledky naší laboratoře dostatečně posloužily k popisu jednotlivých metod biofunktionalizace v předešlé kapitole, šlo zejména o využití již stávajících metod, byť provedených s našimi substráty, případně ve vztahu s námi studovanými buněčnými systémy. V této kapitole dojde k popisu metodiky, která byla rozvíjena a zdokonalována v naší laboratoři během posledních přibližně patnácti let. V literatuře je popsána jako fyzikálně-chemický vícestupňový proces depozice bioaktivních molekul na povrch syntetických polymerních materiálů. Teoreticky vzato, námi zavedený model, který je založen na principu interakce aktivních látek s roubovanými polymery, by měl být aplikovatelný na širokou škálu bioaktivních molekul, které mohou být vázány na velké množství rozdílných substrátů, přičemž právě syntéza tvorby roubu a jeho volba by měla být proměnným parametrem, který zabezpečí vhodnou vazbu s aktivní látkou.

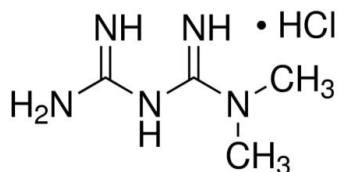
3.1 DRUHY AKTIVNÍCH LÁTEK PRO BIOFUNKCIONALIZACE

Je poměrně zajímavé, že aktivní látky používané pro depozice mohou být velmi rozdílné, zejména co do velikosti molekul. Lze mezi nimi najít mnoho malých molekul, stejně jako velmi objemných polysacharidů či proteinů. Vždy by však měly mít společné poslání, měly by svou přítomností v biologickém systému vyvolat adekvátní odezvu. Tu si lze představit v mnoha podobách. Kupříkladu, měl by se dostavit efekt antibakteriální, případně protisrážlivý, mělo by dojít k snadné proliferaci při obnově tkáně, tak jako k žádoucí proliferaci kmenových buněk, případně stimulaci tvorby důležitých látek. Vždy je tedy účinek směřován k stimulaci či usnadnění biologického děje, aditivní pomoci imunitního systému, případně, aby byly zabezpečeny funkce, které živý systém z nějakého důvodu pozbyl. Mezi ty úplně nezákladnější aktivní látky pro biofunktionalizaci patří proteiny extracelulární matrix, které tvoří strukturální součást prostředí, které obklopuje, podporuje nebo spojuje buňky. Dalším zástupcem je kolagen, laminin (součást membrán) a fibronektin, coby glykoprotein, který podporuje uchycení a proliferaci buněk, a zároveň ovlivňuje jejich morfologii a fyziologii. Dalšími jsou kupříkladu elastin, vitronektin, želatina nebo deriváty kolagenu. Velmi podstatnou skupinou jsou růstové faktory. Dále, může jít o sloučeniny zamezující srážlivosti krve, ty se uplatňují při skladování a transportu krevních derivátů. Krom látek jako warfarin to mohou být často sulfatované polysacharidy, např. heparin. Ty jsou však již vytlačovány účinnějšími typy, jako třeba fukoidan nebo deriváty furcellaranu.



Obr. 14 Fukoidan

Z výše uvedeného plyne, že výběr antibakteriálních činidel není tak široký, jak bychom si představovali. Aby tato kapitola nekončila příliš pesimisticky, dobrou zprávou je, že stále existuje naděje. V dnešní době vědeckotechnického pokroku nebude totiž vyvinout nová a jistě i lepší antibakteriální činidla. Stejně tak, stále máme k dispozici spoustu látek, které v biomedicině používat lze a krom jiného, mohou mít i antibakteriální vlastnosti, a to poměrně obtojně. Dobrým příkladem může být metformin, který je v poslední době velmi oblíbeným perorálním antidiabetikem.



Obr. 17 Metformin

Tedy, metformin le látkou, která je užívána pro absolutně odlišný účinek. Za pozornost stojí jeho struktura. Při bližším pohledu je zřejmé, že patří mezi tzv. biguanidy, mimochodem stejně tak jako výše zmíněný chlorhexidin. Lze tedy očekávat, a je to již i potvrzeno, že metformin je též antibakteriálně účinný. Další poměrně dobrou zprávou je výčet jeho nežádoucích účinků. Pokud jsme hovořili o fluorochinolonech, pak je třeba přiznat jejich vedlejší účinek vedoucí k poškození šlach. Pokud jde o chlorhexidin, potom v případě roztoků nad 1 % dochází při dlouhodobém užívání ke žloutnutí zubů, naštěstí reverzibilnímu. V případě metforminu je situace zcela odlišná. Hlavním nežádoucím účinkem při dlouhodobém užívání je hubnutí. Tedy, jak zmíněno výše, netřeba být v případě antibakteriálních činidel přílišným pesimistou.

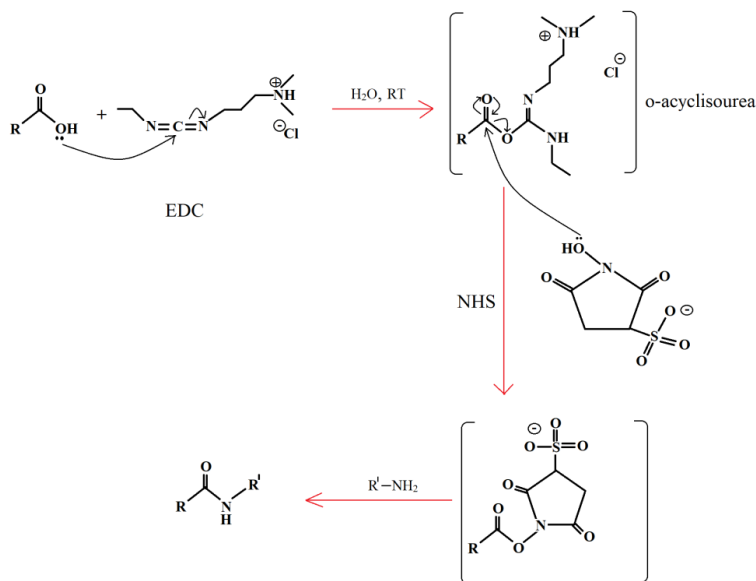
3.2 KOVALENTNÍ A NEKOVALENTNÍ ZPŮSOB IMOBILIZACE

Jak již plyne z názvu kapitoly, aktivní biomolekula může být vázána buď kovalentně, tedy prostřednictvím chemické vazby nebo nekovalentně mezimolekulárními interakcemi. Pro úplnost, existuje ještě jedna možnost, která předchází dvě navzájem kombinuje a říkáme jí tudíž kombinovaná technika imobilizace.

Nekovalentní imobilizace je založena především na fyzikální adsorpci nebo iontové interakci. Mohou se však využít i jiné jevy, např. enkapsulace biomolekuly nebo její inkorporace do skafoldu. Často se využívá toho, že k sobě mají afinitu opačně nabitě řetězce. Biomolekula ovšem může být vázána i prostřednictvím vodíkových můstků, hydrofobních interakcí anebo Van der Waalsovými silami. Nekovalentní imobilizace má hlavní výhodu v tom, že jde o procesy spíše jednodušší, které příliš nesnižují účinek bioaktivních látek a nedenaturují je. Hlavní nevýhodou je dlouhodobá nízká stabilita systému, která se s kovalentní imobilizací nemůže rovnat.

Kovalentní imobilizace jsou zajímavé všude tam, kde je třeba velmi stabilní biomolekulární vrstva. Procesy vedoucí k vytvoření kovalentní vazby jsou mnohem složitější a jsou i časově náročné. Kovalentní imobilizace též spolehlivě řeší požadavek na velmi rovnoměrnou distribuci biomolekul na povrchu. K tomu, aby kovalentní imobilizace byla účinná je zapotřebí přítomnost funkčních skupin na substrátu, které budou schopny reagovat s funkčními skupinami na biomolekule. Pro tyto účely se nejčastěji používá EDC, což je 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide jako síťovací činidlo, které spojuje karboxyly s aminy. Reakce EDC s karboxyly tvoří meziprodukt o-acylisourea, který už je schopen reagovat s aminy, které

jsou přítomny na biomolekule. Je třeba mít na paměti, že o-acylisourea je poměrně nestabilní. Z toho důvodu je třeba použít sulfo-N-hydroxysuccinimid (sulfo-NHS) nebo N-hydroxysuccinimid (NHS), který již tvoří stabilní meziprodukt a tím zvyšuje účinnost reakce. Schéma reakce je na následujícím obrázku 18.

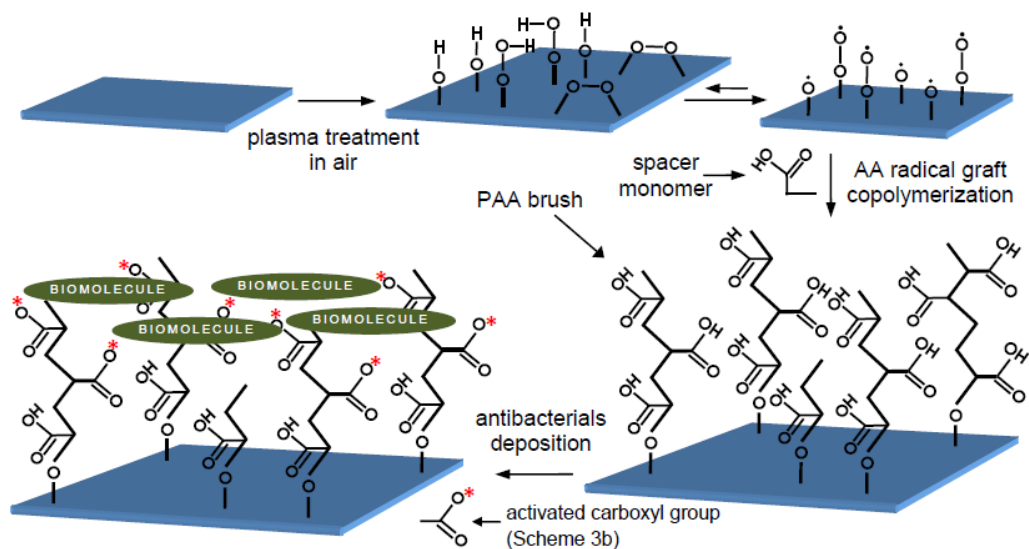


Obr. 18 Schéma karbodiimidového spojování karboxylů a aminů pomocí EDS/NHS činidel

Závěrem je třeba zmínit, že v případě některých biomolekul není příliš na výběr a je možná pouze jedna cesta imobilizace. Dále je třeba zdůraznit, že smyslem této práce není uvádět výčet všech dostupných biomolekul, způsobů jejich imobilizace a konečné zamýšlené aplikace. Daleko účelnější se jeví uvést zde odkaz, kde je všechno přehledně uvedeno, například [20] a podobně.

3.3 FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÝ VÍCESTUPŇOVÝ PROCES DEPOZICE BIOAKTIVNÍCH MOLEKUL

Metodika, kterou jsme se v naší laboratoři nejvíce zabývali a optimalizovali se nazývá fyzikálně-chemický vícešupňový proces depozice bioaktivních molekul na povrch syntetických polymerních materiálů. O této problematice pojednává celý soubor prací [21-59], které se vzájemně odlišují zejména použitým substrátem, způsobem předúpravy, různým roubováním na povrch, druhem monomeru, strategií imobilizace a následným testováním v biologickém prostředí. Je tedy zřejmé, že jde v podstatě o kombinaci všeho, co bylo zmíněno výše. Účelem této kapitoly bude nepochybně rozbor jednotlivých dílčích kroků depozice, včetně nastínění možností a limitů. Je tedy nejprve nezbytné uvést schéma fyzikálně-chemického vícešupňového procesu depozice bioaktivních molekul na povrch syntetických polymerních materiálů, který je na následujícím obrázku 19.



Obr. 19 Fyzikálně-chemický vícestupňový proces depozice bioaktivních molekul na povrch syntetických polymerních materiálů

Popis výše uvedeného schématu systematicky začne volbou vstupního materiálu, jehož povrch má být modifikován. Ten je obvykle vybrán s ohledem na konečnou zamýšlenou aplikaci. Například, pokud je zamýšlenou aplikací katétr s antibakteriální úpravou, potom by materiál měl být kupříkladu z termoplastického polyuretanu nebo z „medical grade“ polyvinylchloridu. Pro jiné aplikace by výběr probíhal obdobně.

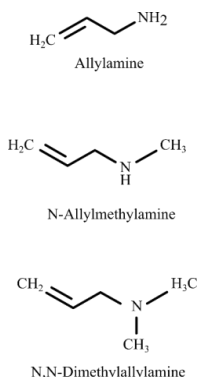
V další fázi dochází k povrchové předúpravě. Ta má jisté zákonitosti, které jsou závislé na použitém vstupním materiálu. V naší laboratoři máme k tomuto účelu tři přístroje. Vývoj prvního z nich je buzen při frekvenci 40 kHz, dále máme reaktor se zdrojem radiofrekvenčním (13,56 MHz) a dále je k dispozici reaktor mikrovlnný, který pracuje při frekvenci 2,45 GHz. Z definice plyne, že vysokofrekvenční reaktor (40 kHz) má za normální situace schopnost vytvořit co nejvíce funkčních skupin na povrchu opracovávaného polymeru. Situace se však mění s jeho nevýhodou, kdy je vzorek při delších časech úpravy zahříván. Jak známo, jsou substráty ze syntetických polymerních materiálů, které nejsou schopny tepelně odolávat v širokém rozsahu. V tomto případě bývá použit reaktor jiný, pro danou aplikaci vhodnější. Dále je třeba zmínit, že tento proces je poměrně vysokoenergetický, což je výhoda, ale i nevýhoda. Výhodné je to v tom, že jinak nereaktivní polymery na svém povrchu ochotně tvoří funkční skupiny v dostatečném množství. Nevýhodou je nízká kontrola kinetiky procesu. Ta má za následek vytvoření nikoli stejných funkcionalit, nýbrž statistického souboru mnoha různých funkčních skupin. Kinetiku lze ovlivnit volbou pracovního plynu, jeho průtokem a též výkonem budícího zdroje. Vždy je však možné kinetiku ovlivnit ve prospěch jednoho z produktů jen částečně. Tato hlavní nevýhoda ovšem nemusí být až tak podstatná. V této fázi je pro nás důležité vytvořit na povrchu reaktivní centra pro následné roubování monomerem, a ta mohou být i různá. V úvahu připadají dva hlavní zástupci. Prvním z nich jsou vytvořené radikály (jakéhokoliv původu) na opracovaném povrchu. Ty se však pro další stupně depozice nejeví jako výhodné, neboť jejich doba života je nepatrná a podléhají rekombinaci či zhášení. Druhou možností je vytvoření metastabilních funkčních skupin, ze kterých mohou následně radikály statisticky vznikat i během období několika jednotek až desítek vteřin. Takto vzniklé radikály jsou potom reaktivními centry pro další roubování. Zpravidla jde o

peroxydy či hydroperoxydy, ale i další funkcionality. Z tohoto důvodu používáme jako pracovní plyn vzduch, který je k tvorbě oxidativních funkčních skupin způsobilý. Nými používané reaktory jsou vyobrazeny na následujícím obrázku 20.



Obr. 20. Reaktor vysokofrekvenční (40 kHz), radiofrekvenční (13,56 MHz) a mikrovlnný (2,45 GHz)

V dalším kroku dochází k roubování monomeru. Možností je sice mnoho, ale naše úsilí směřuje k vytvoření roubů obsahující karboxyly nebo aminy. Tvorba karboxylů může být úspěšná, pokud se jako monomer použije kyselina akrylová, případně monomery podobné. Tvorba roubu v tomto případě probíhá v kapalném prostředí, je zdlouhavá a velmi citlivá na přítomnost dusíku. Délka řetězce je zpravidla závislá na druhu a koncentraci inhibitoru. V případě aminů je situace mnohem jednodušší. Zpravidla probíhá v plynné fázi, trvá jen několik vteřin (zpravidla 10-20) a výsledek je naprosto přesvědčivý. Zde je délka řetězce roubu dána dobou kontaktu vzorku a nasycených par monomeru. Modelově přichází v úvahu primární, sekundární a terciární aminy, jejichž nejjednodušší molekuly jsou uvedeny na následujícím obrázku.



Obr. 21 Příklad námi používaných aminů: primární, sekundární a terciární

Výsledkem je tedy roub, který obsahuje poměrně velké množství aminů, tedy bazických funkcionalit. S ohledem na teorii, ale lze to snadno doložit i experimentálně, bazicita stoupá

nahoru od primárních po terciární aminy. V úvahu je však třeba vzít i faktory sterické, které jsou dány přítomností objemných substituentů. Ve výsledku tedy sekundární a terciární aminy mají pro další interakce vlastnosti vcelku podobné, avšak daleko lepší než u aminu primárního. Závěrem je třeba zdůraznit, že volba roubu musí být provedena s ohledem na biomolekulu, která má být na tento roub vázána.

Poslední krokem je již samotná depozice aktivní látky, která byla zevrubně popsána v předešlé kapitole 3.2.

Je třeba mít na paměti, že každý krok výše nastíněného procesu lze snadno kontrolovat. Vhodnou metodou popisu chemického složení se jeví XPS, dále pak fyzikálně-chemický popis pomocí stanovení povrchové energie a dále pak i přílehlavá odezva biologických systémů. Obecně platí, že pokud dojde k popsateľnému rozdílu ve vlastnostech, daný krok vícestupňového procesu proběhl úspěšně.

4 PERSPEKTIVY A VÝHLEDY

Jak již bylo zmíněno v předešlých kapitolách, jednotlivé postupy vázání biomolekul mají své limity. Stručně řečeno, kovalentní vázání biomolekul je může často denaturovat a samotné vytvoření vazby je složité a zdlouhavé. V případě nekovalentního vázání jde sice o postupy jednoduché a rychlé. Ve výsledku je však systém poměrně nestabilní. Nevýhody jednotlivých typů lze eliminovat kombinovaným způsobem vázání biomolekul. Ten je založen na možnosti, že na substrát je navázán síťováním polyelektrolyt, který ne vazebně váže aktivní molekulu. Dále je možný i postup, kdy je k původnímu substrátu vázán ne vazebně polyelektrolyt, na nějž je kovalentně vázána biomolekula. Tyto systémy se jeví jako zajímavá možnost do budoucna. Dlužno dodat, že aktivity v tomto směru již začaly a do budoucna mají potenciál jednoduché způsoby vázání upozadit.

Další fakt, který je třeba mít na paměti je stále se prodlužující střední doba dožití. Přesto, že za posledních několik málo generací došlo ke zdvojnásobení průměrné délky života, i tento parametr jednou dojde k dosažení možného maxima. Zatím však dává velkou šanci vzniku novým a společensky potřebným biomateriálům, které se projeví nejen v terapii a diagnostice, ale i ve skladování, uchovávání, transportu a jiných mnoha dalších aspektech při zdravotní péči, za účelem zachování maximální míry komfortu pacienta.

Další budoucí možnosti tkví i v aplikacích mimo biomedicínu. Je přeci společensky velkým benefitem, pokud připravené vrstvy budou převyšovat stávající svými výsledky v oblasti ochrany proti korozi nebo vylepšené tvrdosti, případně odolnosti proti přírodním vlivům. Všechny tyto parametry by měly být i pro řadu biomateriálů dosažitelné.

Poslední velkou možností je paradoxně fakt, že nejsme schopni předjímat, co nás v budoucnu čeká a jaké požadavky na materiály budou důležité jak strukturálně, tak funkčně. Pohledem do historie víme, že není až tak dávno, kdy každá zlomenina dlouhé kosti končila amputací, což by dnes již bylo absolutně společensky nepřijatelné. Je to též vskutku nedávno, kdy proběhly první implantace srdečních chlopní, které jsou již dnes rutinním výkonem, stejně tak jako implantace kloubních náhrad, které již vnímáme tak nějak automaticky. Rovněž pak, nejsme schopni předjímat úžasný vědeckotechnický rozmach, který nám dává k dispozici dříve netušené nástroje, a ty mají na implantologii druhotný dopad. V této souvislosti je často zmiňován velkolepý rozmach implantologie a rekonstrukční pánevní chirurgie, která se rozvinula v podstatě z ničeho až s nástupem motocyklismu.

5 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Michael, F. M., Khalid, M., Walvekar, R., Siddiqui, H.; Balaji, A. B., Surface modification techniques of biodegradable and biocompatible polymers, *Biodegradable and Biocompatible Polymer Composites*, Elsevier, (2018) 33-54.
- [2] ISO 24443, Determination of sunscreen photoprotection in vitro, ISO Standard.
- [3] Lehocký M., Lapčík L., Neves M.C., Trindade T., Szyk – Warszynska L., Warszynski P. and Hui D.: Deposition/Detachment of Particles on Plasma Treated Polymer Surfaces, *Materials Science Forum*, 426-432 (2003) 2533-2538.
- [4] Lehocký M., Drnovská H., Lapčíková B., Barros – Timmons A.M., Trindade T., Zembala M. and Lapčík L.: Plasma Surface Modification of Polyethylene, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 222 (2003) 125-131.
- [5] Adamczyk Z., Warszynska-Szyk L., Zembala M. and Lehocký M.: In Situ Studies of Particle Deposition on Non-transparent Substrates, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 235 (2004) 65-72.
- [6] Lehocký M. and Mráček A.: Improvement of Dye Adsorption on Synthetic Polyester Fibers by Low Temperature Plasma Pre-Treatment, *Czechoslovak Journal of Physics*, 56 Suppl. B (2006) B1277-B1282.
- [7] Sowe M., Novák I., Vesel A., Junkar I., Lehocký M., Sába P. and Chodák I.: Analysis and Characterization of Printed Plasma-Treated Polyvinyl Chloride, *International Journal of Polymer Analysis and Characterization*, 14 (2009) 641-651.
- [8] Mazánková V., Sřahel P., Matoušková P., Brablec A., Čech J., Prokeš L., Buršíková V., Stupavská M., Lehocký M.: Atmospheric Pressure Plasma Polymerized 2-Ethyl-2-oxazoline Based Thin Films for Biomedical Purposes, *Polymers*, 12 (2020) 2679 (15pp).
- [9] Koláčková P., diplomová práce, 2004, Fakulta technologická, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 84 stran.
- [10] Lehocký M., Sřahel P., Koutný M., Čech J., Institoris J. and Mráček A.: Adhesion of *Rhodococcus* sp S3E2 and *Rhodococcus* sp S3E3 to Plasma Prepared Teflon-Like and Organosilicon Surfaces, *Journal of Materials Processing Technology*, 209 (2009) 2871-2875.
- [11] Amaral P.F.F., Lehocký M., Barros-Timmons A.M.V., Rocha-Leao M.H.M., Coelho M.A.Z. and Coutinho J.A.P.: Cell Surface Characterization of *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682, *Yeast*, 23 (2006) 867-877.
- [12] Botelho A., Penha A., Fraga J., Barros-Timmons A., Coelho M. A., Lehocký M., Štěpánková K., Amaral P.: *Yarrowia lipolytica* Adhesion and Immobilization onto Residual Plastics, *Polymers*, 12 (2020) 649 (11pp).
- [13] Amaral P.F.F., da Silva J.M., Lehocký M., Barros-Timmons A.M.V., Coelho M.A.Z., Marucho I.M. and Coutinho J.A.P.: Production and Characterization of a Bioemulsifier from *Yarrowia lipolytica*, *Process Biochemistry*, 41 (8) (2006) 1894-1898.
- [14] Lehocký M., Amaral P.F.F., Sřahel P., Coelho A.M.Z., Barros-Timmons A.M. and Coutinho J.A.P.: Preparation and Characterization of Organosilicon Thin Films for Selective Adhesion of *Yarrowia lipolytica* Yeast Cells, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 82 (2007) 360-366.
- [15] Lehocký M., Amaral P.F.F., Sřahel P., Coelho A.M.Z., Barros-Timmons A.M. and Coutinho J.A.P.: Deposition of *Yarrowia lipolytica* on Plasma Prepared Teflon-Like Thin Films, *Surface Engineering*, 24(2008) 23-27.
- [16] Sřahel P., Mazánková V., Podzemná D., Podzemná E., Pizúrová V., Jurmanová J., Prokeš L., Lehocký M., Ozaltın K., Pištěková H., Truncel D.: Antibacterial Thin-film Deposited from Propane-Butane Mixture in Atmospheric Pressure Discharge, *International Journal of Molecular Sciences*, 24 (2023) 1706 (9pp).
- [17] Karakurt I., Ozaltın K., Pistekova H., Vesela D., Michael-Lindhard J., Humpolicek P., Mozetic M., and Lehocký M.: Effect of Saccharides Coating on Antibacterial Potential and Drug Loading and Releasing Capability of Plasma Treated Polylactid Acid Films, *International Journal of Molecular Sciences*, 23 (2022) 8821 (19 pp).
- [18] Popelka A., Novák I., Lehocký M., Junkar I., Mozetič M., Kleinová A., Janigová I., Šlouf M., Bílek F. and Chodák I.: A New Route for Chitosan Immobilization onto Polyethylene Surface, *Carbohydrate Polymers* 90 (2012) 1501-1508.
- [19] Nařízení EMA, EMA/175398/2019 z 19. 3. 2019
- [20] Casanova M.R., Reis R. L., Martins A., Neves N. M., Surface biofunctionalization to improve efficacy of biomaterial substrates to be used in regenerative medicine, *Materials Horizons*, 9 (2020) 2258-2275.

- [21] Asadinezhad A., Novák I., Lehocký M., Bílek F., Vesel A., Junkar I., Sáha P. and Popelka A.: Polysaccharides Coatings on Medical-Grade PVC: A Probe into Surface Characteristics and the Extent of Bacterial Adhesion, *Molecules*, 15 (2010) 1007-1027.
- [22] Asadinezhad A., Novák I., Lehocký M., Sedlařík V., Vesel A., Junkar I., Sáha P. and Chodák I.: An in vitro Bacterial Adhesion Assessment of Surface-Modified Medical-Grade PVC, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 77 (2010) 246-256.
- [23] Asadinezhad A., Novák I., Lehocký M., Sedlařík V., Vesel A., Junkar I., Sáha P. and Chodák I.: A Physicochemical Approach to Render Antibacterial Surfaces on Plasma-Treated Medical-Grade PVC: Irganox Coating, *Plasma Processes and Polymers*, 7 (2010) 504-514.
- [24] Mráček A., Lehocký M., Smolka P., Grulich O. and Velebný V.: The Allylamine Grafting on the Pre-treated Polyester Nonwoven Fabric: Preparation, Characterization and Utilization, *Fibers and Polymers* 11 (2010) 1106-1110.
- [25] Bílek F., Křížová T. and Lehocký M.: Preparation of Active Antibacterial LDPE Surface Through Multistep Physicochemical Approach: I. Allylamine Grafting, Attachment of Antibacterial Agent and Antibacterial Activity Assessment, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 88 (2011) 440-447.
- [26] Junkar I., Cvelbar U. and Lehocký M.: Plasma Treatment of Biomedical Materials, *Materiali in Tehnologije (Materials and technologies)* 45 (2011) 221-226.
- [27] Popelka A., Novák I., Lehocký M., Chodák I., Sedliacik J., Gajtanska M., Sedliacikova M., Vesel A., Junkar I., Kleinová A., Spirkova M. and Bílek F.: Anti-Bacterial Treatment of Polyethylene by Cold Plasma for Medical Purposes, *Molecules* 17 (2012) 762-785.
- [28] Asadinezhad A., Lehocký M., Sáha P. and Mozetič M.: Recent Progress in Surface Modification of Polyvinyl Chloride, *Materials* 5 (2012) 2937-2959.
- [29] Bílek F., Sulovská K., Lehocký M., Sáha P., Humpolíček P., Mozetič M. and Junkar I.: Preparation of Active Antibacterial LDPE Surface Through Multistep Physicochemical Approach II: Graft Type Effect on Antibacterial Properties, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 102 (2013) 842-848.
- [30] Karbassi E., Asadinezhad A., Lehocký M., Humpolíček P., Vesel A., Novák I. and Sáha P.: Antibacterial Performance of Alginate Acid Coating on Polyethylene Film, *International Journal of Molecular Sciences*, 15 (2014) 14684-14696.
- [31] Lopez-Garcia J., Lehocký M., Humpolíček P. and Sáha P.: On the Correlation of Surface Charge and Energy in Non-Thermal Plasma-Treated Polyethylene, *Surface and Interface Analysis*, 46 (2014) 625-629.
- [32] Mozetič M., Ostrikov K., Ruzic D.N., Curreli D., Cvelbar U., Vesel A., Primc G., Leisch M., Jousten K., Malyshev O.B., Hendricks J.H. Kövér L., Tagliaferro A., Conde O., Silvestre J.A., Giapintzakis J., Buljan M., Radic N., Drazic G., Bernstorff S., Biederman H., Kylián O., Hanuš J., Milošević S., Galtayries A., Dietrich P., Unger W., Lehocký M., Sedlařík V., Stana-Kleinschek K., Drmota-Petrič A., Pireaux J.J., Rogers J.W., Anderle M.: Recent Advances in Vacuum Sciences and Applications, *Journal of Physics D: Applied Physics*, 47 (2014) 153001 (23pp).
- [33] Mozetič M., Primc G., Vesel A., Zaplotnik R., Modic M., Junkar I., Recek N., Klanjšek-Gunde M., Guhy L., Sunkara M.K., Assensio M.C. Milosevic S., Lehocký M., Sedlařík V., Gorjanc M., Kutasi K. and Stana-Kleinschek K.: Application of Extremely Non-Equilibrium Plasmas in the Processing of Nano and Biomedical Materials, *Plasma Sources Science and Technology*, 24 (2015) 015026 (12pp).
- [34] Sulovská K. and Lehocký M.: Terahertz Spectroscopy Characterization of Antibacterial Surfaces Prepared via Multistep Physicochemical Procedure, *Optical Engineering*, 54 (2015) 034107.
- [35] Popelka A., Novák I., Lehocký M., Bílek F., Kleinová A., Mozetič M., Špírková M. and Chodák I.: Antibacterial Treatment of LDPE with Halogen Derivatives via Cold Plasma, *Express Polymer Letters*, 9 (2015) 402-411.
- [36] Karbassi E., Asadinezhad A., Lehocký M., Humpolíček P. and Sáha P.: Bacteriostatic Activity of Fluoroquinolone Coatings on Polyethylene Films, *Polymer Bulletin*, 72 (2015) 2049-2058.
- [37] Lopez-Garcia J., Primc G., Junkar I., Lehocký M. and Mozetič M.: On the Hydrophilicity and Water Resistance Effect of Styrene-Acrylonitrile Copolymer Treated by CF₄ and O₂ Plasmas, *Plasma Processes and Polymers*, 12 (2015) 1075-1084.

- [38] Vanek P., Kolska Z., Luxbacher T., Garcia J.A.L., Lehocký M., Vandrovčova M., Bacakova L., Petzelt J.: The Electrical Activity of Ferroelectric Biomaterials and Its Effects on the Adhesion, Growth and Enzymatic Activity of Human Osteoblast-Like Cells, *Journal of Physics D-Applied Physics*, 49 (2016) 175403 (12pp).
- [39] Ozaltın K., Lehocký M., Humpolíček P., Pelkova J. and Saha P.: A New Route of Fucoidan Immobilization on Low Density Polyethylene and Its Blood Compatibility and Anticoagulation Activity, *International Journal of Molecular Sciences*, 17 (2016) 908 (12pp).
- [40] Swilem, A. E., Lehocký M., Humpolíček P., Kucekova Z., Junkar I., Mozetič M., Hamed AA. and Novak I.: Developing a biomaterial interface based on poly(lactic acid) via plasma-assisted covalent anchorage of D-glucosamine and its potential for tissue regeneration, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 148 (2016) 59-65.
- [41] Ozaltın K., Lehocký M., Kuceková Z., Humpolíček P. and Saha P.: A novel multistep method for chondroitin sulphate immobilization and its interaction with fibroblast cells, *Material Science & Engineering C: Materials for Biological Applications*, 70 (2017) 94-100.
- [42] Swilem A.E., Lehocký M., Humpolíček P., Kuceková Z., Novák I., Mičusík M., Abd El-Rehim, H.A., Hegazy EA., Hamed AA. and Kousal J.: Description of D-glucosamine immobilization kinetics onto poly(lactic acid) surface via a multistep physicochemical approach for preparation on novel active biomaterials, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 105 (2017) 3176-3188.
- [43] Stloukal P., Novák I., Mičusík M., Procházka, M., Kucharczyk P., Chodák I., Lehocký M. and Sedlařík V.: Effect of plasma treatment on the release kinetics of a chemotherapy drug from biodegradable polyester films and polyester urethane films, *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 67 (2018), 161-173.
- [44] Ozaltın, K., Lehocký M., Humpolíček P., Veselá D., Mozetič M., Novák I. and Saha P.: Preparation of active antibacterial biomaterials based on sparfloxacin, enrofloxacin, and lomefloxacin deposited on polyethylene, *Journal of Applied Polymer Science*. 135 (2018) 46174 (7pp).
- [45] Rašková Kolařová Z., Stahel P., Sedlaříková J., Musilová L., Stupavská M. and Lehocký M.: The Effect of Plasma Pretreatment and Cross-Linking Degree on the Physical and Antimicrobial Properties of Nisin-Coated PVA Films, *Materials*, 11 (2018) 1451 (14pp).
- [46] Mozetič M., Vesel, A., Prime G., Eisenmenger-Sittner C., Bauer J., Eder A., Schmid G.H.S., Ruzic D.N., Ahmed Z., Barker D., Douglass K.O., Eckel S., Fedchak J.A., Hendricks J., Klimov N., Ricker J., Scherschligt J., Stone J., Strouse G., Capan I., Buljan M., Milosevic S., Teichert C., Cohen S.R., Silva A.G., Lehocký M., Humpolíček P., Rodriguez C., Hernandez-Montelongo, J., Mercier D., Manso-Silvan M., Ceccone G., Galtayries A., Stana-Kleinschek K., Petrov I., Greene J.E., Avila J., Chen C.Y., Caja-Munoz B., Yi H., Boury A., Lorcy S., Asensio M.C., Bredin J., Gans T., O'Connell D., Brendin J., Reniers F., Vincze A., Anderle M. and Montelius L.: Recent developments in surface science and engineering, thin films, nanoscience, biomaterials, plasma science, and vacuum technology, *Thin solid Films*, 660 (2018) 120-160.
- [47] Lopez-García J., Cupessala, F., Humpolíček P. and Lehocký M.: Physical and Morphological Changes of Poly(tetrafluoroethylene) after Using Non-Thermal Plasma-Treatments, *Materials*, 11 (2018) 2013 (10pp).
- [48] Bernal-Ballen A., Lopez-Garcia J., Merchan-Merchan M. A. and Lehocký M.: Synthesis and Characterization of a Bioartificial Polymeric System with Potential Antibacterial Activity: Chitosan-Polyvinyl Alcohol-Ampicillin, *Molecules*, 23 (2018) 3109 (17pp).
- [49] Ozaltın K., Lehocký M., Humpolíček P., Pelkova J., Di Martino A., Karakurt I. and Saha P.: Anticoagulant Polyethylene Terephthalate Surface by Plasma-Mediated Fucoidan Immobilization, *Polymers*, 11 (2019) 750 (12 pp).
- [50] Zanini S., Lehocký M., Lopez-Garcia J. and Riccardi C.: Plasma polymerization of 2-isopropenyl-2-oxazoline: Improvement of the coating stability by co-polymerization with 1-octene, *Thin Solid Films*, 677 (2019) 55-61.
- [51] Karakurt I., Ozaltın K., Vesela D., Lehocký M., Humpolíček P. and Mozetic M.: Antibacterial Activity and Cytotoxicity of Immobilized Glucosamine/Chondroitin Sulfate on Polylactic Acid Films, *Polymers*, 11 (2019) 1186 (12 pp).
- [52] Habib S., Lehocký M., Vesela D., Humpolíček P., Krupa I. and Popelka A.: Preparation of Progressive Antibacterial LDPE Surface via Active Biomolecule Deposition Approach, *Polymers* 11 (2019) 1704 (15 pp).

- [53] St'ahel P., Mazánková V., Tomečková K., Matoušková P., Brablec A., Prokeš L., Jurmanová J., Buršíková V., Příbyl R., Lehocký M., Humpolíček P., Ozaltin K., Trunc D.: Atmospheric Pressure Plasma Polymerized Oxazoline-Based Thin Films-Antibacterial Properties and Cytocompatibility Performance, *Polymers*, 11 (2019) 2069 (14pp).
- [54] Kousal J., Krtouš Z., Kolářová-Rašková Z., Sedlaříková J., Schafer J., Kučerová L., Shelemin A., Solař P., Hurajová A., Biederman H., Lehocký M.: Degradable plasma polymer films with tailored hydrolysis behavior, *Vacuum*, 173 (2020) 109062.
- [55] Ozaltin K., Vargun E., Di Martino A., Capáková Z., Lehocký M., Humpolíček P., Kazantseva N., Saha P.: Cell response to PLA scaffolds functionalized with various seaweed polysaccharides, *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, (2020).
- [56] Popelka A., Abdulkareem A., Mahmoud A. A., Nassr M. G., Al-Ruweidi M. K. A. A., Mohamoud K. J., Hussein M. K., Lehocký M., Veselá D., Humpolíček P., Kasak P.: Antimicrobial modification of PLA scaffolds with ascorbic and fumaric acids via plasma treatment, *Surface & Coatings Technology*, 400 (2020) 126216.
- [57] Ozaltin K., Di Martino A., Capakova Z., Lehocký M., Humpolicek P., Saha T., Vesela D., Mozetic M. Saha P.: Plasma Mediated Chlorhexidine Immobilization onto Polylactic Acid Surface via Carbodiimide Chemistry: Antibacterial and Cytotoxicity Assesment, *Polymers*, 13 (2021) 1201.
- [58] Karakurt I., Ozaltin K., Vargun E., Kučerová L., Šuly P., Harea E., Minařík A., Štěpánková K., Lehocký M., Humpolíček P., Vesel A. Mozetič M.: Controlled Release of Enrofloxacin by Vanillin-Crosslinked chitosan-Polyvinyl Alcohol Blends, *Materials Science & Engineering C: Materials for Biological Applications*, 126 (2021) 112125.
- [59] Stepankova K., Ozaltin K., Pelkova J., Pistekova H., Karakurt I., Kacerova S., Lehocky M., Humpolicek P., Vesel A. and Mozetic M.: Furcellaran Surface Deposition and Its Potential in Biomedical Applications, *International Journal of Molecular Sciences*, 13 (2022) 7439 (15 pp).

ANOTACE

Tato práce popisuje základy technologie tvorby vrstev pro aplikace v biologii a biomedicínském inženýrství, implantologii a tkáňovém inženýrství. V práci jsou popsány nejrůznější metody biofunkcionalizace povrchů společně s jejich výhodami a limity. Pro lepší pochopení jsou použity již dříve získané výsledky, aby sloužily k popisu uvedených teoretických systémů. V práci je též zmíněna metoda fyzikálně-chemického vícestupňového procesu depozice aktivních látek na polymerní substráty.

ABSTRACT

This work describes the principles of coatings technologies for applications in biology, biomedical engineering, implantology and tissue engineering. There are described several methods for surface biofunctionalizations together with their advantages and limits. For better understanding, several obtained results are used to demonstrate mentioned theoretical systems. There is also introduced a physicochemical multistep approach for deposition of biomolecules on polymer substrates.