



Nanovláknenná vrstva z PVDF a její modifikace pro potlačení fibrotické reakce

Bakalářská práce

Studijní program:

B3107 Textil

Studijní obor:

Textilní technologie, materiály a nanomateriály

Autor práce:

Jana Vimmerová

Vedoucí práce:

Ing. Andrea Klápšťová

Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů





Zadání bakalářské práce

Nanovláknenná vrstva z PVDF a její modifikace pro potlačení fibrotické reakce

Jméno a příjmení: **Jana Vimmerová**
Osobní číslo: T17000106
Studijní program: B3107 Textil
Studijní obor: Textilní technologie, materiály a nanomateriály
Zadávající katedra: Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů
Akademický rok: **2018/2019**

Zásady pro vypracování:

1. Rešerše na téma využití PVDF v tkáňovém inženýrství
2. Výroba nanovláknenné vrstvy z PVDF a její optimalizace na zařízení Nanospider
3. Modifikace nanovláknenné vrstvy pro zajištění antifibrotizačních vlastností a základní ověření vlastností pomocí in-vitro testů
4. Zhodnocení výsledků

Rozsah grafických prací:
Rozsah pracovní zprávy:
Forma zpracování práce:
Jazyk práce:

dle potřeby dokumentace
40-60 dle potřeby
tištěná/elektronická
Čeština



Seznam odborné literatury:

1. RŮŽIČKOVÁ, E., 2016. *Glaukom – Průvodce ošetřujícího lékaře*. Praha: Maxdorf. 101 s. 2. vydání. ISBN 9788073454739.
2. WISCHKE, C. a kol., 2013. A multifunctional bilayered microstent as glaucoma drainage device. *Journal of Controlled Release*. Vol. 172, no. 3. s. 1002-1010.
3. ALBERTS, B. a kol., 2005. *Základy buněčné biologie – Úvod do molekulární biologie buňky*. Ústí nad Labem: Espero. 740 s. ISBN 8090290620.
4. BERA, B. 2016. Literature Review on Electrospinning Process. *Imperial Journal of Interdisciplinary Research (IJIR)*. Vol. 2, no. 8. s. 972-984.

Vedoucí práce:

Ing. Andrea Klápšťová
Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů

Datum zadání práce:

20. února 2019

Předpokládaný termín odevzdání:

15. května 2020

Ing. Jana Drašarová, Ph.D.
děkanka

L.S.

Ing. Jiří Chvojka, Ph.D.
vedoucí katedry

V Liberci dne 20. února 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně jako původní dílo s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím mé bakalářské práce a konzultantem.

Jsem si vědoma toho, že na mou bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci nezasahuje do mých autorských práv užitím mé bakalářské práce pro vnitřní potřebu Technické univerzity v Liberci.

Užiji-li bakalářskou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědoma povinnosti informovat o této skutečnosti Technickou univerzitu v Liberci; v tomto případě má Technická univerzita v Liberci právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Současně čestně prohlašuji, že text elektronické podoby práce vložený do IS/STAG se shoduje s textem tištěné podoby práce.

Beru na vědomí, že má bakalářská práce bude zveřejněna Technickou univerzitou v Liberci v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů.

Jsem si vědoma následků, které podle zákona o vysokých školách mohou vyplývat z porušení tohoto prohlášení.

21. května 2020

Jana Vimmerová

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat především vedoucí mé bakalářské práce Ing. Andree Klápšťové, za její čas, ochotu, cenné rady, vstřícnost a trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat mé rodině, partnerovi a kamarádům za veškerou podporu při studiu.

Anotace

Tato bakalářská práce se zabývá nanovláknennou vrstvou z polyvinylidenfluoridu a její modifikací pro potlačení fibrotické reakce. Fibrotická reakce je jednou z hlavních příčin pooperačních komplikací u onemocnění glaukomu, proto je důležité, aby tento problém nenastal, nebo byl alespoň minimalizován. Tomu by mělo zabránit antifibrotizační činidlo mitomycin C, který bude vláknenná vrstva z polyvinylidenfluoridu obsahovat už od samého začátku. V teoretické části je vysvětleno, z jakého důvodu byl vybrán tento polymer s konkrétními rozpouštědlovými systémy a jeho další využití ve tkáňovém inženýrství. Také budou blíže popsány jednotlivé části oka, které při poškození vyvolávají oční onemocnění glaukom, a to konkrétně: řasnaté tělísko, trabekulární síťovina a oční nerv. Dále bude vysvětlena problematika adheze buněk a fibróza tkáně, která je pro tuto bakalářskou práci klíčová. Experimentální část je zaměřena na optimalizaci polymerního roztoku a výrobu vláknenné vrstvy pomocí dvou způsobů elektrostatického zvlákňování, kdy je následně zkoumána jejich morfologie. Dále jsou materiály zkoumány pomocí *in vitro* testování, kdy je použito antifibrotizační činidlo, které by mělo potlačit fibrotickou reakci.

Klíčová slova:

glaukom, polyvinylidenfluorid, fibrotická reakce, tkáňové inženýrství, nitrooční tlak

Annotation

This bachelor thesis deals with polyvinylidene fluoride nanofibrous layer and its modification to prevent of fibrotic reaction. The fibrotic reaction is one of the main causes of postoperative complications in glaucoma therefore it is important to prevent or at least minimize this index. This should be prevented by the antifibrotic reagent mitomycin C, which will the fibrous layer of polyvinylidene fluoride contain from the beginning. Furthermore theoretical part explains why this polymer and its solvent systems were chosen and what are its other uses in tissue engineering. There are also more precisely explained functions of the individual parts of the eye that cause glaucoma especially the ciliary body, the trabecular meshwork and the optic nerve. There is also explained cell adhesion and tissue fibrosis which are important for this bachelor thesis. The experimental part is focused on the optimization of the solution and the production of a fibrous layer by two methods of electrostatic spinning. After that is examined their morphology. Furthermore, the materials are subjected to cytotoxicity tests, due to an antifibrotic reagent which should suppress the fibrotic response.

Key words:

glaucoma, polyvinylidene fluoride, fibrotic reaction, tissue engineering, intraocular pressure

Seznam použitých symbolů, značek a zkratek.....	10
Seznam obrázků.....	11
Seznam tabulek.....	12
Úvod.....	13
I. Teoretická část.....	14
1. Tkáňové inženýrství.....	14
1.1. Aplikace PVDF ve tkáňovém inženýrství.....	14
1.1.1. PVDF pro léčbu funkce močového měchýře.....	15
1.1.2. PVDF scaffold pro srdeční sval.....	15
1.1.3. PVDF pro léčbu periferního nervu.....	15
1.1.4. PVDF pro výrobu kýlních sítěk.....	16
2. Onemocnění glaukom.....	16
2.1. Glaukom s otevřeným úhlem.....	18
2.2. Trabekulektomie.....	19
2.2.1. Pooperační komplikace.....	21
2.2.1.1. Buněčná adheze.....	21
2.2.1.2. Fibróza tkáně.....	21
2.3. Vybrané části oka spojené s onemocněním glaukomu.....	23
2.3.1. Řasnaté tělísko.....	23
2.3.2. Trabekulární síťovina.....	24
2.3.3. Zrakový nerv.....	25
3. Elektrostatické zvlákňování.....	26
3.1. Bezjehlové elektrostatické zvlákňování.....	26
3.1.1. Nanospider TM	27
3.2. Jehlové elektrostatické zvlákňování.....	27
4. Materiály.....	28
4.1. Polymery.....	28
4.1.1. Polyvinylidenfluorid.....	28
4.2. Rozpouštědla.....	29
4.2.1. Dimetylacetamid.....	29
4.2.2. Aceton.....	30

4.3.	Antifibrotizační činidla	31
4.3.1.	Mitomycin C	31
5.	Typy chemikálií a příprava roztoků.....	32
6.	Bezjehlové elektrostatické zvlákňování.....	33
6.1.	Morfologie materiálu	35
7.	Biologické testování ideální koncentrace MMC.....	37
7.1.	Pasážování buněk.....	37
7.2.	Test cytotoxicity.....	38
8.1.	Vyhodnocení	39
9.	Příprava roztoků II.	41
9.1.	Jehlové elektrostatické zvlákňování	41
9.2.	Vyhodnocení.....	43
10.	<i>In vitro</i> testování na vlákně vrstvě	43
10.1.	Příprava vzorků.....	43
10.1.1.	Sterilizace materiálů.....	43
10.1.2.	Osázení buňkami.....	44
10.2.	Postup testování	44
10.2.1.	CCK-8 testy – 2. testovací den	44
10.2.2.	Fluorescenční mikroskopie - 2. testovací den.....	46
10.2.3.	Rastrovací elektronová mikroskopie – 2. testovací den.....	46
10.3.	Vyhodnocení <i>in vitro</i> testování.....	46
10.3.1.	Vyhodnocení CCK.....	46
10.3.2.	Vyhodnocení SEM snímků.....	48
10.3.3.	Vyhodnocení fluorescenční mikroskopie	50
11.	Shrnutí a závěr	51
12.	Literatura.....	52

Seznam použitých symbolů, značek a zkratek

Ac	- aceton
ACG	- glukom s uzavřeným úhlem
CCK	- counting cell kit
CO ₂	- oxid uhličitý
DMAC	- N,N-dimethyacetamid
DMEM	- buněčné kultivační medium
EO	- ethylen oxid
FM	- fluorescenční mikroskopie
g/mol	- gram na mol
hm%	- hmotnostní procento
IOP	- nitrooční tlak
IS 95%	- interval spolehlivosti
JZZ	- jehlové zvlákňovací zařízení
mg/ml	- miligram na mililitr
ml/h	- mililitr za hodinu
mm/min	- milimetr za minutu
MMC	- Mitomycin C
mmHg	- milimetr rtuťového sloupce
mPa.s	- milipascal za sekundu
Mw	- molekulová hmotnost
NK	- negativní kontrola
OAG	- glaukom s otevřeným úhlem
Ot/min	- počet otáček za minutu
PBS	- fosfátový pufr
PK	- pozitivní kontrola
PVDF	- Polyvinylidenfluorid
SEM	- skenovací elektronová mikroskopie
TS	- trabekulární síťovina
β-PVDF	- forma polyvinylidenfluoridu
PP	- Polypropylen
PET	- Polyethylentereftalát
PTFE	- Polytetrafluorethylen

Seznam obrázků

<i>Obrázek 1 - Schéma vzniku zvýšeného nitroočního tlaku; 1 - nahromaděná nitrooční tekutina, 2 - trabekulární síťovina 3 - poškození očního nerv (Visique kapitole eye care 2011)</i>	17
<i>Obrázek 2 - Horní část - vytvoření „filtračního polštáře“, nebo-li prostor pro nadměrné množství tekutiny; dolní část –bleb (Healing touristry 2018; Hopkins medicine 2011)</i>	20
<i>Obrázek 3 - popis oka (Hvezdarna 2013)</i>	23
<i>Obrázek 4 - schéma cirkulace nitrooční tekutiny (Zeleny-zakal 2020)</i>	25
<i>Obrázek 6 - Strukturní vzorec DMAC (Commons wikimedia 2012)</i>	30
<i>Obrázek 7 - strukturní vzorec acetonu (Wikipedia 2020)</i>	30
<i>Obrázek 8 - strukturní vzorec MMC (Stemcell 2020)</i>	31
<i>Obrázek 9 - SEM snímky výsledné vlákněné vrstvy při zvětšení 5000x; A - vlhkost 45%, aceton přítomen od začátku; B - vlhkost 35%, aceton přítomen od začátku; C - vlhkost 55%, aceton přítomen od začátku; D - vlhkost 55%, s přidáním acetonu těsně před zvlákněním</i>	35
<i>Obrázek 10 - Sloupcový graf průměru vláken s IS 95%</i>	36
<i>Obrázek 11 - 96 jamková destička o různých koncentracích MMC/DMEM, určena k vyhodnocení CCK-8 test; 1- 15×10^{-4} mg/ml; 2- 13×10^{-4} mg/ml; 3- 11×10^{-4} mg/ml; 4- 9×10^{-4} mg/ml; 5- 7×10^{-4} mg/ml; 6- 5×10^{-4} mg/ml; 7- 3×10^{-4} mg/ml; 8- 2×10^{-4} mg/ml; 9- 1×10^{-4} mg/ml; 10- $0,1 \times 10^{-4}$ mg/ml; 11 – DMEM; 12– TR-X</i>	39
<i>Obrázek 12 –graf metabolické aktivity fibroblastů po 24 hodinové inkubaci při různých koncentracích se směrodatnou odchylkou: 1- 15×10^{-4} mg/ml; 2- 13×10^{-4} mg/ml; 3- 11×10^{-4} mg/ml; 4- 9×10^{-4} mg/ml; 5- 7×10^{-4} mg/ml; 6- 5×10^{-4} mg/ml; 7- 3×10^{-4} mg/ml; 8- 2×10^{-4} mg/ml; 9- 1×10^{-4} mg/ml; 10- $0,1 \times 10^{-4}$ mg/ml</i>	40
<i>Obrázek 13 - Zvlákněvací zařízení: A - dávkovací pumpa; B - injekční stříkačka s jehlou a polymerním roztokem; C – uzemněný kolektor pro záchyt nanovláken; D - zvlákněvací box; E - zdroj elektrického napětí</i>	42
<i>Obrázek 14 - 24 jamková destička s vlákněnými vrstvami - 2. testovací den; PK - pozitivní kontrola pro všechny tři typy vrstev; NK – negativní kontrola; A – PVDF vlákněná vrstva; B – PVDF/0,01 MMC vlákněná vrstva; C – PVDF/0,01 MMC vlákněná vrstva</i>	45

Obrázek 15 - 96 jamková destička určena pro spektrofotometrii; A – PVDF; B – PVDF/0,01 MMC; C – PVDF/0,1 MMC; PK – pozitivní kontrola; NK – negativní kontrola.....	45
Obrázek 16 - Graf závislosti velikosti absorbance na určitých vlákenných vrstvách.....	47
Obrázek 17 - SEM snímky vlákenné vrstvy z PVDF při zvětšení 3000x; A – 2. testovací den, B - 7. testovací den, C - 14. testovací den.....	48
Obrázek 18 - SEM snímky vlákenné vrstvy z PVDF/0,01 MMC při zvětšení 3000x; A – 2. testovací den, B - 7. testovací den, C - 14. testovací den.....	48
Obrázek 19 - SEM snímky vlákenné vrstvy z PVDF/0,1 MMC při zvětšení 3000x; A – 2. testovací den, B - 7. testovací den, C - 14. testovací den.....	48
Obrázek 20 - SEM snímek vlákenné vrstvy PVDF/MMC 0,01 při zvětšení 5000x, 14. testovací den; A,B,C -přibližné zastoupení chemických prvků v neznámých objektech.....	49
Obrázek 21 - FM snímky vrstev PVDF; A - 2. testovací den, B - 7. testovací den, C - 14. testovací den.....	50
Obrázek 22 - FM snímky vrstev PVDF/0,01 MMC; A - 2. testovací den, B - 7. testovací den, C - 14. testovací den.....	50
Obrázek 23 - FM snímky vrstev PVDF/0,1 MMC; A - 2. testovací den, B - 7. testovací den, C - 14. testovací den.....	50
Obrázek 24 - graf počtu buněk/mm ² na jednotlivých vrstvách.....	51

Seznam tabulek

Tabulka 1 - typy roztoků PVDF.....	33
Tabulka 2 - naměřená viskozita roztoků PVDF.....	33
Tabulka 3 - Různé podmínky a parametry při zvlákňování roztoku PVDF	34
Tabulka 4 - Aritmetický průměr a interval spolehlivosti vlákenných vrstev z PVDF....	36
Tabulka 5 - výsledné koncentrace a jejich podíl MMC/DMEM	38
Tabulka 6 - Typy roztoků PVDF a přehled jejich složení	41
Tabulka 7 - podmínky při jehlovém zvlákňování.....	42

Úvod

Glaukom je velice závažné oční onemocnění, jehož příčinou je zvýšený nitrooční tlak. Trpí jím přes 64 milionů lidí a je považováno za druhou hlavní příčinu slepoty na celém světě. I když je možná operace či snížení nitroočního tlaku, jsou stálým problémem pooperační komplikace, jako například hypotonie a fibróza tkáně. Proto je třeba vytvořit implantát, který bude těmto problémům zabraňovat. Touto otázkou se zabývá obor regenerativní medicíny, přesněji tkáňové inženýrství, které se věnuje nahrazováním a regenerací tkání.

Hlavními požadavky na implantát by měly být: dostatečný průtok oční tekutiny, tzn. minimálně se přiblížit hodnotám za běžných podmínek u zdravého oka, zabraňovat adhezi a srůstu okolních tkání, netoxicity, nedegradabilní a hlavně biokompatibilní.

Tato práce je zaměřena na výrobu implantátu, který zamezí růstu buněk přímo na něm a jeho okolí. Jako vhodný polymer se jeví polyvinylidenfluorid, kdy v předchozích testech měl nejlepší výsledky. Teoretická část se bude zabývat oborem tkáňové inženýrství a využití PVDF v tomto odvětví také v jiných oblastech, než jen pro výrobu vlákněné vrstvy k léčbě glaukomu. Dále také budou vysvětleny příčiny a způsoby léčby onemocnění glaukom. Jelikož celá práce navazuje na předchozí výzkumy předešlých studentů, nebude zaměřena na všechny jednotlivé části oka, ale pouze na vybrané části, které při ztrátě své funkce souvisí s glaukomovým onemocněním. Experimentální část, se zaměřuje na optimalizaci polymerního roztoku a podmínek při elektrostatickém zvláknění, kdy je zkoumána morfologie vláken. Následně je vystavena biologickým testům cytotoxicity v laboratoři na cytotoxicitu a účinkům antifibrotizačního činidla o různých koncentracích, které mají zabránit fibróze tkáně.

Téma, kterým se bakalářská práce zabývá je poměrně nové a dosud neprobádané. Během práce budou zjištěny nové poznatky, na které se poté bude moci ve výzkumu dále navazovat.

I. Teoretická část

V teoretické části bakalářské práce bude popsána a vysvětlena problematika fibrózy tkáně a adheze buněk ve spojení s očním onemocněním glaukomem, které bývají nejčastější pooperační komplikací. Úvodní část se zabývá využitím implantátů z polyvinylidenfluoridu i jinak, než pouze pro léčbu glaukomu. K lepšímu porozumění celé problematice, bude blíže vysvětleno samotné onemocnění a jeho příznaky, rozdělení a způsob léčby. V textu se nachází popis vybraných částí oka, které u tohoto onemocnění hrají klíčovou roli, jelikož při jejich nesprávné funkci vzniká nitrooční tlak, který nemoc vyvolává. V neposlední řadě budou specifikovány konkrétní polymery a chemická rozpouštědla, která jsou vhodná pro výrobu vlákněné vrstvy. Popsány budou také techniky přípravy vrstev a konkrétní typy zvlákňovacích zařízení.

1. Tkáňové inženýrství

Tkáňové inženýrství patří pod obor regenerativní medicíny, která má za úkol nahrazovat, zlepšovat či regenerovat části tkání a orgánů. Pro tvorbu nové tkáně většinou využívá nosiče zvané scaffoldy. Tkáňový nosič může být osazen lidskými nebo zvířecími buňkami, případně dále upraven pomocí různých aditiv. K vytvoření nové funkční tkáně jsou obvykle potřeba resorbovatelné, netoxické materiály a dále kmenové či diferencované buňky. Tkáňové inženýrství je nejvíce využíváno pro kostní a cévní náhrady, kožní kryty, srdeční chlopně, kýlní sítky, chrupavky, skelety pro regeneraci poškozené míchy, oční náhrady a mnoho dalších. V této bakalářské práci bude konkrétně řešena problematika způsobu léčby glaukomu pomocí nanovlákněné nosné vrstvy z polyvinylidenfluoridu (PVDF) a následně její modifikace (Vojtová 2016).

1.1. Aplikace PVDF ve tkáňovém inženýrství

PVDF není pro tkáňové inženýrství typickým materiálem. Ve většině případů je hlavním cílem tohoto oboru vytvořit tkáňový nosič, který bude simulovat původní orgán nebo tkáň. Tady je to ale naopak, hlavním cílem celého výzkumu je, aby se buňky nemnožily a skrz nosič mohla protékat nitrooční tekutina a materiál byl nedegradabilní, což PVDF splňuje ve všech směrech.

1.1.1. PVDF pro léčbu funkce močového měchýře

Využití PVDF ve tkáňovém inženýrství je možné mnoha způsoby, jeden z nich je například pro výrobu scaffoldu obsahující PVDF nanovláčna s trvalým uvolňováním proteinů, typ TGF- β (růstový faktor), v kombinaci s kmenovými buňkami pro léčbu poruch funkce močového měchýře, jak popisuje Ardeshirylajimi (2018). U tohoto orgánu je důležité, aby při zotavování probíhala správná funkčnost stěn resp. správné kontrakce (Ardeshirylajimi et al. 2018).

1.1.2. PVDF scaffold pro srdeční sval

Dalším objevem v tomto odvětví je hypotéza, podle které by scaffoldy z PVDF mohly sloužit jako srdeční záplata. Arumugan v roce 2019 zkoumal využití PVDF jako srdečních náplastí (patch). Jeho hypotéza byla založená na elektrostaticky zvlákněných nanovlákních z β -PVDF pro vývoj srdečních patchů. β -PVDF byl zvolen, protože vykazuje dobré piezoelektrické vlastnosti. Jde o regeneraci srdečního svalu pomocí kmenových buněk, získané od zdravého a silného dárce, následně jsou izolovány po dobu 2-3 týdnů a poté implantovány do místa jizvy v srdeční tkáni. Nevýhodou je pomalý a zdoluhavý proces. Další možnost je pomocí scaffoldů. Jizva se odstraní a následně se nahradí scaffoldem, který napomáhá růstu nových srdečních svalových buněk. Bylo zjištěno, že elektricky nabitý, vodivý a piezoelektrický scaffold je vhodný pro *in vitro* studium. Vědci použili nanokompozit na bázi β -PVDF, který zlepšuje adhezi a proliferaci srdečních svalových buněk. Vše bylo i ověřeno *in vitro* studiem i hemolytickým testem s použitím buněk H9c2 (myší myoblasty). Výsledkem bylo zjištění, že materiály na bázi β -PVDF pozitivně ovlivňují přilnavost a vývoj srdečních svalových buněk. Scaffold byl vytvořen metodou elektrostatického zvláknění. Takto zvlákněný scaffold musí také vytvořit dostatečnou hustotou povrchového náboje, kvůli pumpování srdečního svalu (Arumugam et al. 2019).

1.1.3. PVDF pro léčbu periferního nervu

Třetí hypotéza se zabývá piezoelektrickými nervovými kanály z PVDF, které jsou zabudovány předem diferencovanými kmenovými buňkami, kde mohou urychlit opravu poškození periferních nervů.

Poranění periferního nervu je běžné traumatické onemocnění, které má často za následek smyslovou a motorickou disfunkci. Ming a kol. (2005) se domnívají, že nejlepší řešení by byla umělá nervová trubice kombinovaná s kmenovými buňkami. Na základě zjištění z předchozích studií se předpokládá, že piezoelektrický nervový kanál PVDF začleněný do Schwannových buněk, které se předem diferencovaly od kmenových buněk, může podstatně podpořit opravu poškození periferních nervů. Důvod, proč byl opět zvolen PVDF je podobný jako u srdečních záplat. PVDF je organický piezoelektrický polymer, který má silné elektrofyziologické vlastnosti mechanickým natahováním nebo polarizací elektrického pole. Pomocí elektrostatického zvlákňování byl nejprve vyroben trojrozměrný nervový katetr z PVDF. Bohužel, jak bylo popsáno výše, je to pouze hypotéza a vše je v začátcích (Li et al. 2018).

1.1.4. PVDF pro výrobu kýlních sítěk

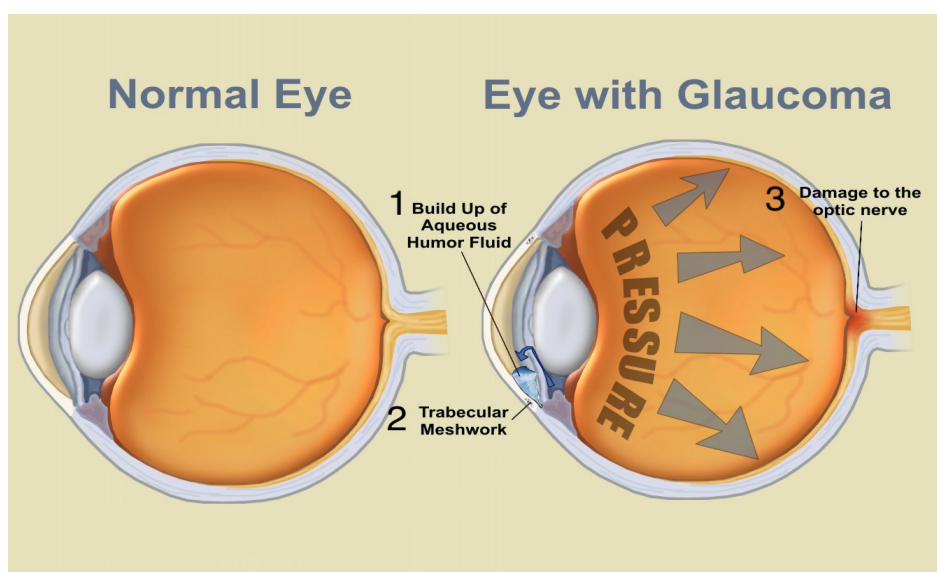
Operace kýly je nejčastějším chirurgickým zákrokem. Momentálně je operovatelná pomocí kýlních sítěk. Jejím primárním úkolem je trvalé a přiměřené posílení břišní stěny. Tento požadavek vyžaduje, aby nedošlo k žádné degradaci polymeru a textilní konstrukci. Nejčastějšími materiály jsou polymery: polypropylen (PP), polyethylentereftalát (PET) a polytetrafluorotetylen (PTFE). V této studii byly síťky z PVDF porovnány s PP a PET, s ohledem na funkční důsledky a morfologickou odezvu tkáně. Klinge a kol. (2002) se totiž domnívají, že by PVDF mohl vykazovat mnohem lepší vlastnosti.

Analýza výsledků potvrdila, že konstrukce kýlové mřížky vyrobené z PVDF by mohla být vhodnou alternativou k běžně používaným materiálům díky zlepšené biologické stabilitě a snížené tuhosti v ohybu. Ve srovnání s PET je PVDF odolnější vůči hydrolyze. Další nevýhodou kýlní síťky vyrobené z PET je ta, že po několika letech degradují. PP je sice stabilní, co se týká degradace, ale vykazuje vysokou tuhost v ohybu.

2. Onemocnění glaukom

Glaukom je název pro oční chorobu a je nejčastější příčinou ireverzibilní slepoty na celém světě. Postihuje více než 64 milionů lidí (Wu et al. 2020). Existuje mnoho projevů, jedním z nich je zvýšený nitrooční tlak, neboli oční hypertenze, který může zapříčinit neuropatii zrakového nervu.

Dochází k tomu narušeným odtokem trvale produkované tekutiny v důsledku morfologických změn (glaukom s otevřeným úhlem) nebo obstrukcí (glaukom s uzavřeným úhlem) tkání. Nahromaděná tekutina tlačí na zrakový nerv a způsobuje výše uvedený zvýšený nitrooční tlak (IOP), tzn. vyšší než 21 mmHg. Důsledkem permanentně zvýšeného IOP vzniká mechanické namáhání na zadní straně oční struktury, zejména na *lamina cribrosa* (tzn. síťovitá struktura, která se nachází kolem otvoru ve sklěře, skrze ni prostupují nervová vlákna), dále sousední struktury, což způsobuje kompresi a remodelaci, viz obrázek 1. Tyto změny vedou k poškození gangliových buněk sítnice, následně defektům zorného pole a to poté vede k úplné ztrátě zraku (Wischke et al. 2013).



Obrázek 1 - Schéma vzniku zvýšeného nitroočního tlaku; 1 - nahromaděná nitrooční tekutina, 2 - trabekulární síťovina 3 - poškození očního nerv (Visique kapitie eye care 2011)

Je to nebezpečné oční onemocnění, které se řadí mezi celosvětově druhou hlavní příčinu slepoty, protože většinou nemá žádné příznaky. Dá se z počátku řídit léky, které snižují nitrooční tlak, ovšem u většiny případů je nutný chirurgický zákrok. Při tomto onemocnění dochází ke snížení počtu vláken zrakového nervu, jeho poškození, či k defektům zorného pole (Růžičková 2016). V době, kdy si dotyčný všimne, že má problémy s viděním, je již onemocnění v pokročilém stavu (např. ztráta periferního vidění) a dochází k nevratné ztrátě zraku. Globální předpoklad glaukomu je cca 3,5% u dospělých ve věku mezi 40 a 80 lety (Tham et al. 2014). Dle statistik v roce 2010 byl odhadovaný počet pacientů s glaukomem 60,5 milionů. Pro rok 2020 modelové výpočty ukazují, že počet postižených vzroste v průběhu desetiletí o 20 milionů lidí.

Odhaduje se, že do roku 2040 bude glaukomem trpět 112 milionů lidí na celém světě a víc jak 11 milionů bude kvůli tomuto onemocnění trpět slepotou. Postižení glaukomem převládá u žen, jakož i kvůli jejich relativně větší dlouhověkosti. Vzhledem k tomu, že se u žen odhaduje, že mají celkově dvojnásobné zhoršení zraku než muži, mělo by být věnováno více pozornosti právě jim (Quigley 2006).

Nitrooční tlak (IOP) je možné měřit tonometricky, což znamená nepřímé měření na povrchu oka. Nejpřesnější metoda pro měření IOP je umístit tonometr do oka, nicméně rizika spojená s touto technikou ji činí nevhodnou pro rutinní klinické použití. V současné době existuje v praxi mnoho tonometrů a metod pro měření IOP. Měření IOP je založeno na principu Imberta-Ficka s pevně stanovenou povrchovou plochou a aplikací proměnlivé síly. Z tonometru vylétne proud vzduchu, který se opře o rohovku, a tím se změří její odpor. Rovnováha mezi silami kapilární přitažlivosti a elasticitou rohovky umožňuje měřit tlak, přičemž síla 1/10 gramu při průměru 3,06 mm se rovná tlaku 1 mmHg. Dále se dá IOP měřit pomocí gonioskopie pro kontrolu úhlu drenáže oka, optické koherenční tomografie, vyšetření zorného pole a vyšetření zrakového nervu (de Padua Soares Bezerra et al. 2019).

Onemocnění můžeme dělit na glaukom s otevřeným (OAG) a uzavřeným úhlem (ACG), kdy tímto pojmem je myšlen odtokový úhel, nacházející se uvnitř oka, mezi duhovkou a rohovkou a řídící odtok tekutiny, která je okem neustále vytvářena pomocí řasnatých tělísek. Dalšími variantami glaukomu s otevřeným úhlem jsou: glaukom s normální tenzí, sekundární glaukom, vrozený glaukom, pigmentární glaukom a další. Do skupiny glaukomu s uzavřeným úhlem dále řadíme: glaukom s akutním uzavřením, glaukom s chronickým uzavřením úhlu, neovaskulární glaukom. V této bakalářské práci se budeme konkrétně zabývat primárním glaukomem s otevřeným úhlem, který je i mimo jiné nejrozšířenější typ (Drderasmus 2020).

2.1. Glaukom s otevřeným úhlem

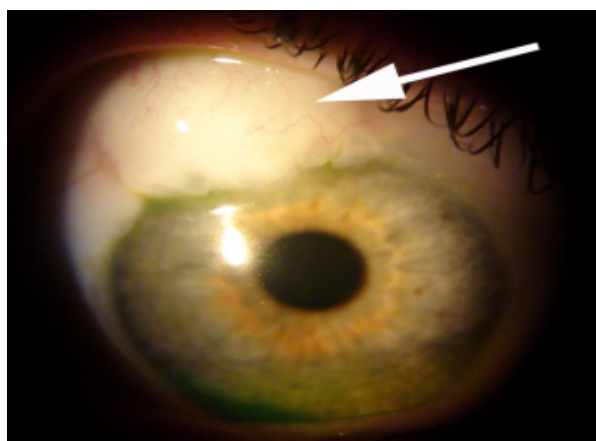
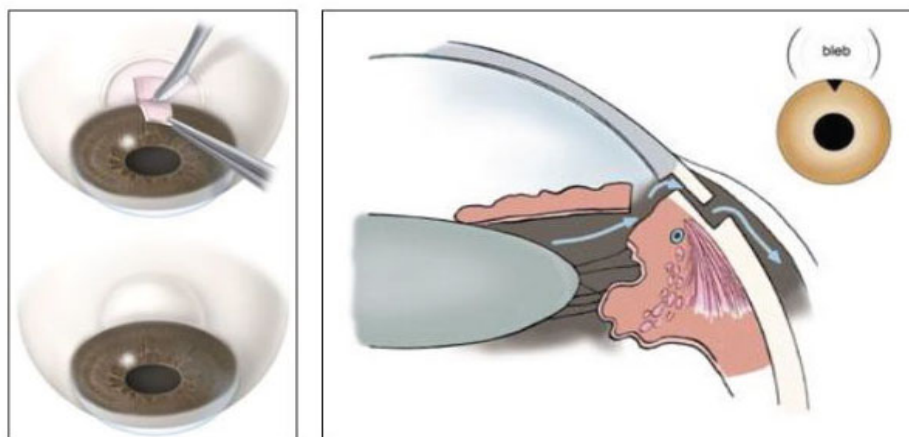
U tohoto typu je onemocnění zapříčiněno nahromaděnou tekutinou, která způsobuje zvýšený nitrooční tlak, jelikož tekutina nemá kudy odtékat. Příznaky, jak bylo psáno výše, jsou v raném stádiu těžko identifikovatelné, mezi nejčastější se řadí ztráta periferního vidění.

Léčba může probíhat pomocí medikamentů, které snižují hypertenzi, avšak ty ne vždy zabírají, proto je ve většině případů nutná operace pomocí laseru, či invazivní chirurgie např. trabekulektomie (Kuang et al. 2020; Laroche a Nkrumah 2020).

2.2. Trabekulektomie

Bakalářská práce se bude zabývat konkrétně trabekulektomií, jelikož je to nejrozšířenější typ operace glaukomu už od roku 1970. Je jednoduchá a poměrně rychlá (cca 20 minut). Úspěšnost zákroku se pohybuje kolem 95%, i přesto nese s sebou mnoho krátkodobých či dlouhodobých komplikací jako například infekce blebu, krvácení atd. (Razeghinejad et al. 2017; Nilforushan et al. 2017).

Trabekulektomie je celosvětově nejčastější chirurgický zákrok a operační technika u pacientů s glaukomem s progresivním poškozením hlavy zrakového nervu a ztrátou zorného pole (Razeghinejad et al. 2017). Operace snižuje nitrooční tlak uvnitř oka pomocí drenážního kanálu k přesměrování toku vody ven z oka, a tím dochází k postupné nápravě. Probíhá tak, že se vytvoří umělý otvor ve sklěře pro přebytečný odtok komorové tekutiny, viz obrázek 2. Správná činnost oka je zajištěna průnikem tekutiny do tzv. „filtračního polštáře“ vytvořeným správnou technikou sešití. Tekutina se může zpočátku nahromadit, ale poté protéká pod pojivovou oční tkání, kde je absorbována (Nilforushan et al. 2017).



Obrázek 2 - Horní část - vytvoření „filtračního polštáře“, nebo-li prostor pro nadměrné množství tekutiny; dolní část –bleb (Healing touristy 2018; Hopkins medicine 2011)

Během operace se používají různé druhy antifibrotizačních činidel, nejběžnějším je mitomycin C (MMC), který je aplikován na povrch oka pomocí nasáklého polštářku, za účelem snížení zjizvení tkáně a zabránění jejího srůstu. Zjizvení je nežádoucí jev, který zabraňuje vstřebávání tekutiny zpět do oběhu. MMC je karcinogenní látka, tudíž se musí po pár minutách vypláchnout vodou, neboť by při delší aplikaci mohly nastat komplikace (Drderamus 2020; Glaucoma-association 2019; Hoffmann a Pfeiffer 2018).

2.2.1. Pooperační komplikace

Tato podkapitola se bude zabývat buněčnou adhezí a fibrotickou reakcí. Tyto dva pooperační jevy jsou pro tento výzkum klíčové. Jednak vláknenná vrstva by neměla podporovat adhezi buněk a druhak fibrotická reakce je jednou z nejběžnějších příčin zánětů., která se snaží být minimalizována.

2.2.1.1. Buněčná adheze

Buněčná adheze je jeden z aspektů, který je u tohoto tématu důležitý. Hlavním cílem celého experimentu je totiž podstatné, aby vláknenná vrstva buňkami nezarůstala. Dále budou poznatky využity v experimentální části pro *in vitro* testování a testy cytotoxicity.

Buněčná adheze je děj, pomocí kterého buňky tvoří kontakt mezi sebou a mohou fungovat jako jedna jednotka. Adheze buňka s buňkou či buňka s mezibuněčnou tkání neboli matrix, je základ ve všech mnohobuněčných organismech, protože napomáhají ke tvorbě tkání. Hrají klíčovou roli v buněčném růstu, diferenciaci a migraci. Její hlavní funkcí je usnadnit přenos signálu mezi nimi a celkově buněčnou komunikaci. Adheze mezi dvěma buňkami je důležitá především kvůli interakci mezi patogenem a hostitelem. Úspěšnost tkáňového inženýrství a implantace kmenových buněk závisí na adhezí živých buněk na povrchu přírodních nebo biomimetických scaffoldů. Může k ní dojít dvěma způsoby, přímý nebo nepřímý kontakt. U nepřímého kontaktu se buňky napojují k mezibuněčné hmotě. Spojení probíhá různými typy spojů, jako např. těsné spojení, spojení mezer, spojení závislá na signálu apod. Mechanické síly jsou důležitým prvkem fungování živých buněk. Je známo, že buněčná adheze úzce souvisí s aktinovým cytoskeletem, jehož organizace je rozhodující pro stanovení strukturních a mechanických vlastností buněk (Ungai-Salánki et al. 2019).

2.2.1.2. Fibróza tkáně

Fibróza značí tvorbu nadměrné pojivové tkáně v orgánu nebo tkáni, ve které se ukládá velké množství extracelulárního matrixu. Fibróza je důležitým patologickým jevem většiny chronických onemocnění, jako je fibróza rohovky, kůže, ledvin, jater, plic a také srdce (Asadi-Azarbaijani et al. 2019; Zhao et al. 2019).

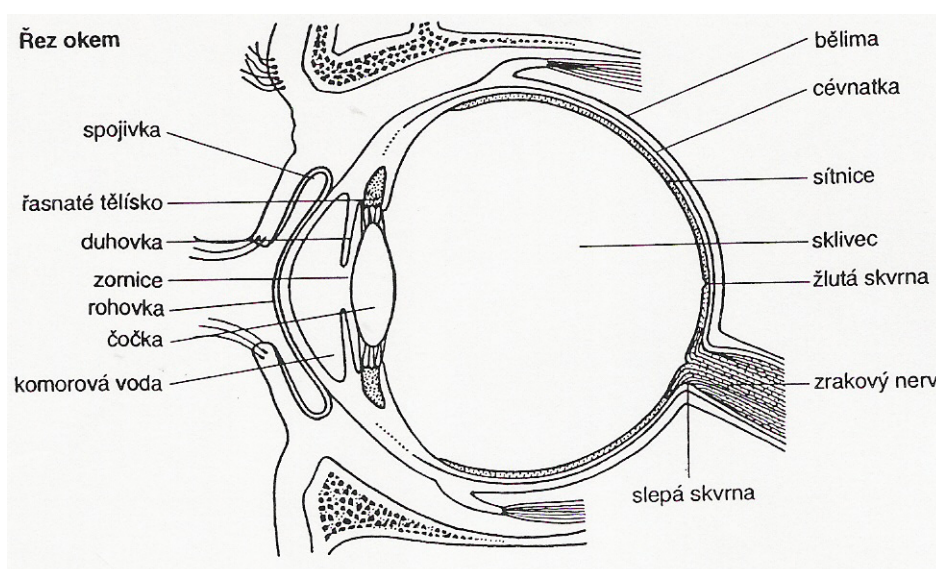
Fibróza vzniká v případě pooperačních komplikací. Může dojít k endogennímu či exogennímu poškození, tzn. zánět, zvýšený nitrooční tlak, vysoká hladina glukózy, změna vnitřního prostředí. To má za následek, že např. oční tkáň podstupující fibrózní degeneraci mění svou přechodí morfológickou strukturu a biologickou funkci (Wang et al. 2009).

Oční tkáň, jak bylo uvedeno výše, jsou také citlivé na fibrotická onemocnění, např. zjizvení v rohovce a spojivkách, při proliferativní vitreoretinopatii (onemocnění u kterého se odlučuje sítnice). Nejdůležitějším typem buněk u tkáňové fibrózy jsou myofibroblasty. Tento druh buněk je odvozen z typů epitelálních buněk (čoček nebo sítnicový pigmentový epitel) a fibroblastů (např. rohovkové), které jsou aktivovány cytokinezi po poškození tkáň. Po poranění jsou primární tkáň neustále přeměňovány, aby se obnovila normální struktura a funkce.

Fibrotické komplikace, např. kožní a rohovkové zjizvení, jsou zapříčiněny nadměrným výskytem myofibroblastů a nadměrnou akumulací extracelulárního matrixu, následkem toho vznikají kontrakce tkání a jejich zhoršená funkce. Rohovka je tkáň, která musí zůstat průhledná a pravidelně zakřivená, aby dokázala správně odrážet světlo. Proto je důležité, aby měla organizovanou strukturu kolagenových vláken extracelulárního matrixu a proteoglykanů mezi nimi. Ačkoli rohovka postrádá vaskularitu, tak její hlavní složky podílející se na opravě tkáň, jsou podobné těm co má kůže: stratifikovaný epitel (vícevrstvý) a kolagenní matrix obsahující mezenchymální buňky ležící pod ním. Hlavní příčina fibrózy je zánět, aktivace fibroblastů a akumulace extracelulárního matrixu. Nedostatek limbalních kmenových buněk vede k tvorbě vaskularizované jizvy spojivkového původu na povrchu rohovky. Průhlednost rohovky je snížena fibrózou/zjizvením, což vede k narušení vidění pacientů. Konkrétně u onemocnění glaukom se tomuto problému dá předejít pomocí antifibrotika mitomycinu C, který zabraňuje fibrotické enkapsulaci, ovšem i přesto se může stát, že nastanou pooperační komplikace (Mahale et al. 2015; Saika et al. 2008).

2.3. Vybrané části oka spojené s onemocněním glaukomu

V této kapitole bude kladen důraz na popis vybraných částí oka, který je nutný znát pro konstrukci vláknenného implantátu. Oko se skládá z přední a zadní části, kdy konkrétní popis částí je znázorněn na obrázku č. 3. Přední část je tvořena rohovkou, čočkou, duhovkou, sklivcem, řasnatým tělískem a trabekulární síťovinou. Zadní část je poté tvořena ze sítnice, cévnatky, žluté a slepé skvrny, očního nervu. Konkrétně bude popsáno řasnaté tělísko, trabekulární síťovina a oční nerv. Zbytek částí oka je popsán v diplomové práci Ing. Kláry Vršínské. Výběr těchto tři částí byl zvolen, protože jimi protéká, či je řízen, odtok nitrooční tekutiny. V momentě, kdy je jedna z částí poškozená, vzniká riziko zvýšeného nitroočního tlaku, a tím začátek oční nemoci glaukomu.



Obrázek 3 - popis oka (Hvezdarna 2013)

2.3.1. Řasnaté tělísko

Řasnaté tělísko je umístěno v přední části oka, pro které má velice důležitou funkci a podílí se na přímém vizuálním vnímání. Je tvořeno řasnatou svalovinou, která se skládá z kapilárního jádra (to je obklopeno matrixem), a je pokryta dvouvrstvým epitelem. Vnější řasnatý epitel je pigmentový a vnitřní, který je blíže k čočce, je nepigmentový. Vědci se domnívají, že řasnatá tělíska poskytují velkou plochu pro sekreci komorového moku, glykoproteinů sklivce, antioxidantních enzymů a neuropeptidů. Řasnaté tělísko je spojeno s čočkou a sklerou pomocí zonulárních vláken a řasnatých svalů. Řasnaté svaly také slouží k regulaci odtoku komorové vody přes trabekulární síťovinu a sklerální odtokové cesty.

Zajímavostí je, že u morčat, kuřat a lidí jsou řasnatá tělíska pravidelně uspořádána ve formě radiálních záhybů kolem oka, ovšem ne všichni obratlovci se vyznačují tímto pravidelným uspořádáním. U myši jsou řasnatá tělíska uspořádána nepravidelně, protínají se a prolínají navzájem. Tento vyzorovaný jev ukazuje, že v řasnatých tělískách existuje určitý stupeň strukturální variace a potenciálně funkční plasticity (Napier a Kidson 2007).

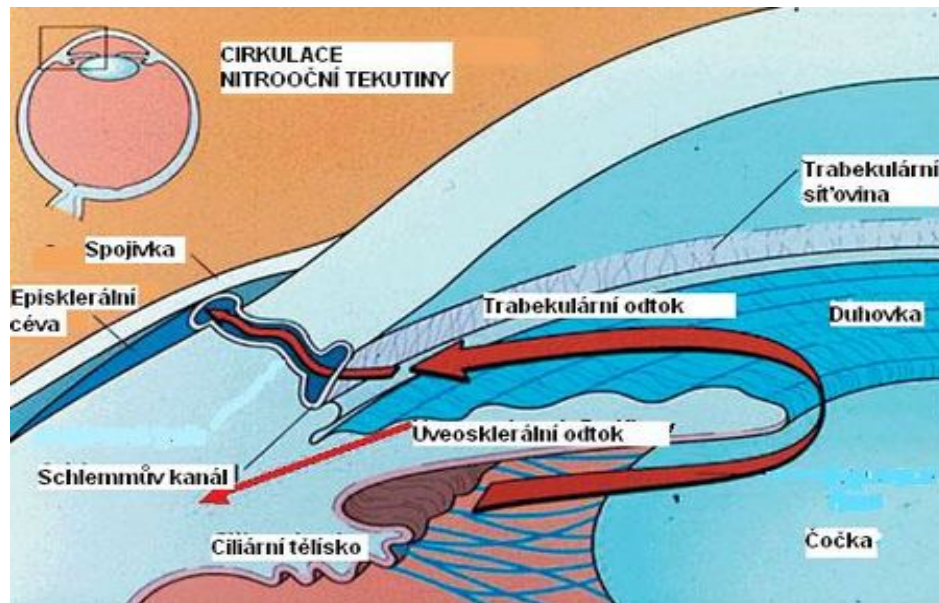
Řasnaté tělísko je považováno za multifunkční a interaktivní tkáň, která skrz neuroendokrinní systém (tzn. síť hormonálně aktivních buněk difúzně umístěných v organismu), uvolňuje endokrinní peptidy pomocí vnitřní hypertenze či hypotenze. Tímto systémem je regulován přítok a odtok komorové tekutiny, který ovlivňuje velikost nitroočního tlaku na oční nerv a tím přispívá k rozvoji glaukomu. Tato interpretace celého procesu je v souladu s fyziologickými a genetickými studiemi (Cocaprados a Escribano 2007).

Další funkcí této části oka je jev zvaný akomodace. Je to proces, při kterém se za pomoci řasnatého tělíska mění struktura skléry a oční bulvy. Když jsou objekty v blízkosti tak je zúžené a čočka je zmenšená, pokud jsou v dostatečné vzdálenosti, tak je tělísko uvolněné a čočka je naopak zvětšená. Proto, když koukáme na objekty zblízka po delší dobu, tak se změní struktura skléry a oční bulva se zdeformuje, což má za následek krátkozrakost (Xie et al. 2018).

2.3.2. Trabekulární síťovina

Trabekulární síťovina (TS) je porézní pojivová tkáň, která primárně reguluje komorový mok za účelem udržet nitrooční tlak v ideální rovině, viz obrázek 4. Tato složitá trojrozměrná struktura je umístěna v místě mezi duhovkou a rohovkou na okraji přední komory oka. Je složena z kolagenního a elastinového extracelulárního matrixu, ve kterém jsou umístěny buňky TS. V momentě, kdy se struktura TS změní, dochází k tuhosti tkání a tím k rozpadu fyziologických rovnováh mezi produkcí a vypouštěním komorového moku (Wang a Jiang 2020; Waduthanthri et al. 2019). V důsledku toho se může zvýšit nitrooční tlak, který poškodí gangliové buňky sítnice. To zapříčiní vysoký tlak na zrakový nerv a následně vznik očního onemocnění glaukom (Waduthanthri et al. 2019).

Wang et al. se domnívají, že by jeden ze způsobů léčby glaukomu mohla být izolace trabekulárních kmenových buněk (Wang a Jiang 2020).



Obrázek 4 - schéma cirkulace nitrooční tekutiny (Zelenv-zakal 2020)

2.3.3. Zrakový nerv

Optický nerv je nejdůležitějším nervem vedoucí do centrálního nervového systému. Spojuje zadní část oka s mozkem, do kterého pomocí axonů vysílá signály. Odhaduje se, že axony optického nervu tvoří 38% všech axonů vstupujících a vystupujících z centrálního nervového systému. Axony, konkrétně zrakového nervu, jsou tvořeny z cca 1,2 milionů gangliových buněk, které lemují vnitřní část sítnice. Vedené vzruchy směřují k *lamina cribrosa*, kde se sloučí do optické papily. Tím vznikne optický nerv, který přenáší akční potenciál. Optický nerv je 45 až 50 mm dlouhý a je rozdělen do čtyř anatomických částí: intraokulární (1-2 mm), intraorbitální (25-30 mm), intrakanalikulární (5-9 mm) a intrakraniální (9-10 mm) (Selhorst a Chen 2009; Benowitz 2010).

Zrakový nerv a onemocnění glaukom spolu úzce souvisí, protože ve chvíli, kdy je poškozen, znamená to začátek slepoty. Toto oční onemocnění je spojeno s nevratným poškozením axonů zrakového nervu a gangliových buněk sítnice, proto u pacientů s takovýmto degenerativním onemocněním (jako je glaukom), je ztráta zraku nevratná (Benowitz 2010). Nevratná ztráta zraku u glaukomu je způsobena apoptózou, nebo-li buněčnou smrtí gangliových buněk sítnice. Její příčina není zcela známa, protože procesy apoptózy jsou velmi komplikované.

Mechanismus, který je zodpovědný za apoptózu gangliových buněk, je spojen s hypoxií (nedostatečný přísun kyslíku), která je nejčastěji důsledkem zvýšeného nitroočního tlaku. Ten poté tlačí na zrakový nerv a dotyčný přestává vidět, jak už bylo mnohokrát zmíněno (Zalewska et al. 2016).

3. Elektrostatické zvlákňování

Elektrostatické zvlákňování (electrospinning) je proces, při kterém dochází vlivem silného elektrického pole působící na polymerní roztok nebo taveninu, k tvorbě velmi jemných vláken o průměrech v desítkách či stovkách nanometrů. Zvlákňovat můžeme dvěma způsoby, bezjehlově a jehlově. Touto metodou se připravují ultra jemná vlákna pomocí elektrostatických sil, které se snaží překonat kapilární síly, držící kapalinu ve formě roztoku. Elektrostatické proto, že je využíváno stejnosměrného zdroje vysokého elektrického napětí (Nanopharma 2015; Divínová Nikol 2017; Stránská Denisa 2018; Ding et al. 2019; Balogh et al. 2016). Tato technika je dostatečně univerzální pro zpracování všech druhů materiálů, včetně organických a anorganických polymerů v různých formách, jako jsou roztoky, emulze, směsi nebo taveniny, které slouží k vytváření komplexních nanovláknenných struktur, včetně porézních, dutých a jádrových obalů. (Ding et al. 2019; Balogh et al. 2016)

3.1. Bezjehlové elektrostatické zvlákňování

Speciální případem elektrostatického zvlákňování je tzv. bezjehlové. Samotný proces funguje tak, že zdroj vysokého napětí je spojený s polymerním roztokem, naproti tomu je dána protielektroda, neboli kolektor, který je uzemněn. Při zvlákňování z volného povrchu je třeba na elektrodu umístit či nanést roztok, ze kterého bude kapalina přitahována a následně v podobě vláken zachytávána na kolektor. Při zvyšujícím se elektrickém napětí se kapka prodlužuje a tvaruje se do tzv. Taylorova kužele. Roztok, konkrétně bezjehlově, můžeme zvlákňovat např. z tyčky, válečku, spirály, kužele, struny a řady dalších geometrií. Pro praktickou část bylo použito výrobní zařízení NanospiderTM, kde je jako elektroda použita struna (Nanopharma 2015; Divínová Nikol 2017; Stránská Denisa 2018; Ding et al. 2019).

3.1.1. Nanospider™

Jedna z technik metod výroby nanovláken uváděná v literatuře, je systém elektrostatického zvlákňování z volného povrchu využívající technologii elektrospinningu na zařízení Nanospider™. Výhoda této technologie je kontinuální sériová výroba, vysoká výrobní kapacita a snadná údržba (Yalcinkaya 2019; Kostakova et al. 2009; Elmarco 2004)

Je to nejžádanější technologie pro kontinuální a hromadnou výrobu nanovlákných vrstev. Technologie Nanospider™ byla vyvinuta profesorem Jirsákem a kol. v roce 2003 (O. Jirsák et al. 2006). Poté nové modely vylepšila společnost Elmarco, která je momentálně největším českým výrobcem Nanospiderů.

Technologie Nanospider™ je jedna ze způsobů bezjehlového zvlákňování. Umožňuje průmyslovou výrobu vrstev tvořené nanovláknky o různých průměrech. Tenká vrstva polymerního roztoku je nanášena na strunu pomocí pojízdného zásobníku (cartridge), to zajišťuje větší efektivitu elektrostatického pole na struně. Z počátku fungovalo zařízení na principu zvlákňování pomocí válečku, kdy rotační elektroda byla ponořena do polymerní lázně, postupně rotovala a z jejího povrchu s polymerem byla tvořena vlákna. Tento původní systém má oproti zvlákňování pomocí struny jednu nevýhodu. Dávkovací systém není uzavřený a zvlákňování probíhá v otevřeném prostoru. To může způsobovat, že polymerní roztok do sebe absorbuje vlhkost a během zvlákňování mění svou viskozitu a vlastnosti. Rozdíl mezi první a druhou generací je tedy typ elektrody a způsob dávkování (Elmarco 2004; Yalcinkaya 2019; Kostakova et al. 2009).

3.2. Jehlové elektrostatické zvlákňování

Elektrostatické zvlákňování pomocí jehly funguje na podobném principu jako zvlákňování z volného povrchu. Metodiku zvlákňování ovlivňují trochu jiné parametry. U této technologie polymerní roztok vytéká z jehly a je veden k uzemněnému nebo opačně nabitému kolektoru vlivem elektrického pole, tak aby vytvořil síť vláken. Vlákna jsou tvořena o velikosti nanometrů, přičemž závisí na průměru jehly, rychlosti dávkování polymeru, velikosti elektrického napětí a vzdáleností jehly od kolektoru (Ahmad et al. 2013).

V posledních letech bylo provedeno několik úprav základního principu elektrostatického zvlákňování z jehly, kvůli použití pro sériovou výrobu a pro zlepšení funkčnosti. Pro splnění vysokých požadavků bylo nedávno testováno několik zvlákňovacích zařízení s více jehlami. To se ukázalo jako nevýhoda z hlediska nejednotné tvorby vláken, při kterém muselo být dodáváno mnohem větší napětí. Ovšem vědci vyzorovali, že vyšší elektrické pole vede k většímu protažení vláken a tím jsou vlákna tenčí (Ahmad et al. 2013).

Proces zvlákňování ovlivňuje několik parametrů. Jsou jimi například vzdálenost kolektorů, velikost elektrického napětí, viskozita polymerního roztoku. Je-li zvlákňovací zařízení příliš blízko kolektoru, nebudou vznikat vlákna, ale roztok bude dělat kapky a sprejovat, protože není v dostatečné vzdálenosti, aby se stihlo vypařit rozpouštědlo. Pokud bude kolektor naopak příliš daleko, tak roztok nebude vůbec přitahován, nevytvoří se Taylorův kužel a bude pouze odkapávat na podložku. Jestliže by viskozita roztoku byla příliš nízká, opět polymer nebude zvlákňovat a vrstva bude mít mnoho defektů (Divínová Nikol 2017).

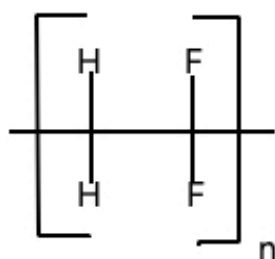
4. Materiály

V této kapitole budou popsány všechny chemikálie, které byly použity v tomto výzkumu. Konkrétně polymery a jejich rozpouštědla a látky, které ovlivňují vlastnosti výsledné textilie. Budou popsány především z hlediska jejich vlastností, využití a způsobu výroby. Konkrétní typy použitých látek poté budou k nalezení v kapitole 5.

4.1. Polymery

4.1.1. Polyvinylidenfluorid

Polyvinylidenfluorid (PVDF) je syntetický, semikrystalický termoplast, který vykazuje silnou piezoelektrickou reakci. PVDF a jeho kopolymery jsou stabilní díky schopnosti odolávat vlhkosti, oxidantům, vysokým teplotám, většině chemikálií a ultrafialovému a jadernému záření. Dále má vysokou životnost, je fyziologicky neškodný a zamezuje růstu buněk. Dle normy DIN 51007 je teplota tání krystalitu ≥ 169 °C, záleží na typu polymeru (Pariy et al. 2020; Titan-plastimex 2015).



Obrázek 5 - Strukturální vzorec PVDF

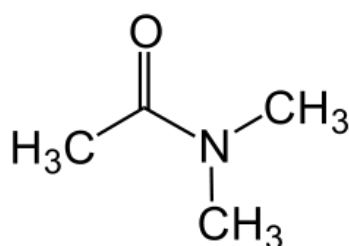
Nejhlavnější složkou v PVDF je fluor (obrázek č. 5), který tvoří 59% z celkové hmotnosti. PVDF má pět fází, alfa, beta, gama, delta a epsilon, které souvisejí s různými řetězovými konformacemi. Elektroaktivní β fáze vykazuje největší dipólový moment a je zodpovědná za to, že PVDF má vodivé a piezoelektrické vlastnosti, oproti tomu je sice fáze α nepolární, ale za to nejstabilnější (Ferri et al. 2020; Pariy et al. 2020). Tyto vlastnosti, které PVDF má, jsou výhodou například pro výrobu scaffoldů jako srdeční záplata viz kapitola 1.1.2. Další jeho výhodou je, že není degradabilní a zamezuje růstu buněk jak bylo popsáno výše. Tyto vlastnosti jsou pro tento konkrétní výzkum výhodou, jelikož je nutné, aby tekutina bez problému odtékala a nežádoucí, aby se výsledná vrstva vstřebala. To samé platí i pro růst buněk, kdyby vrstva zarostla buňkami, tak by opět zamezila cirkulaci kapaliny a správnému chodu celého systému (Pariy et al. 2020). PVDF je využíváno především ve farmaceutickém a chemickém průmyslu, k výrobě polovodičů, ke galvanickému pokování, v automobilovém průmyslu a ke zpracování celulózy a papíru (Titan-plastimex 2015).

4.2. Rozpouštědla

4.2.1. Dimethylacetamid

DMAC je jemné průmyslové rozpouštědlo pro elektrolyty i neelektrolyty. Je to čirá, bezbarvá kapalina se slabým zápachem podobným amoniaku, jejíž strukturální vzorec je zobrazen na obrázku č. 6. Široce se používá pro agrochemikálie, léčiva, umělá vlákna, průmyslové povlaky, filmy z jemných chemikálií, odstraňovače nátěrů atd. Díky svým fyzikálně-chemickým vlastnostem se DMAC snadno vstřebává inhalací nebo může proniknout kůží.

Toxicita DMAC může mít pro člověka nepříznivé účinky, např. podráždění kůže, bolesti hlavy, nechutenství, únavu a poškození jater (Behrouzeh et al. 2020; Zhang et al. 2018).

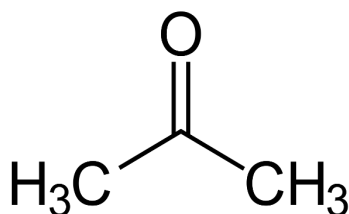


Obrázek 6 - Strukturální vzorec DMAC (Commons wikimedia 2012)

4.2.2. Aceton

Aceton nebo-li dimethylketon, 2-propanon a beta-ketopropan na obrázku č. 7, je bezbarvé, těkavé, hořlavé organické rozpouštědlo, snadno rozpustné ve vodě, ethanolu, etheru atd.. Charakterizuje se výraznou vůní a chutí. Aceton se vyskytuje v rostlinách, stromech, výfukových plynech, sopečných plynech a vzniká jako produkt při rozkladu metabolismu živočišných tuků. Dále toto činidlo může být obvykle přítomno ve velmi malém množství v moči i krvi (ve větším množství se dá nalézt v moči a krvi diabetiků).

Ve větších dávkách může být toxický. Aceton je dráždivý a jeho inhalace může vést k hepatoxickým účinkům, které způsobují například poškození jater. Využívá se k výrobě plastů, vláken, léků a dalších chemikálií. Používá se také k rozpouštění jiných látek (Kalapos 1999; Abou-Zeid et al. 1978).

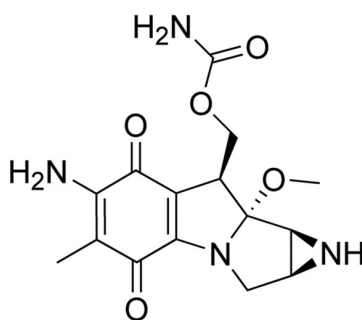


Obrázek 7 - strukturální vzorec acetonu (Wikipedia 2020)

4.3. Antifibrotizační činidla

4.3.1. Mitomycin C

Mitomycin C (MMC), viz obrázek 8, je přírodní antimetabolitové antibiotikum, které snižuje adhezi a potlačuje vaskularitu po dobu několika týdnů. Nevýhoda MMC je, že má silné karcinogenní účinky. Liu a kol. v roce 2005 zjistili, že intraperitoneální podávání MMC je účinné pro prevenci primárních nebo opakujících se intraabdominálních adhezí u potkanů, jelikož má schopnost zesíťovat DNA a inhibovat buněčnou mitózu. Další využití je při chemoterapii, konkrétně k léčbě močového měchýře a žaludku (Liu et al. 2005; Sultana et al. 2020; Abdel-Naby Awad a Hasan 2019).



Obrázek 8 - strukturní vzorec MMC (Stemcell 2020)

II. Praktická část

Praktická část se zabývá výrobou nanovláknenné vrstvy z PVDF pro léčbu glaukomu, která bude následně modifikována, aby byla schopna potlačit fibrotickou reakci. Celý výzkum navazuje na diplomovou práci Ing. Radima Pluchy, který zkoumal také vrstvy z PVDF a jejich kombinace, kdy k PVDF byl přidán polyethylenoxid (PEO). U těchto testů bylo zjištěno, že PVDF s PEO nejsou pro výrobu ideální z hlediska jejich přípravy, u které musí být dodržena teplota vyšší než 60°C.

Na základě předchozích výzkumů, byl vyhodnocen jako nevhodnější materiál PVDF. Je to nedegradabilní materiál, který zamezuje růstu buněk (Pariy a kol., 2020). PVDF je schopno právě díky této vlastnosti potlačit adhezi buněk, což je velice důležitý jev, aby vrstva nezarostla a tekutina mohla volně protékat. viz. kapitola 4.1.

První vrstvy budou vyrobeny z PVDF v rozpouštědlovém systému DMAC a acetonu, kdy budou zkoumány a hledány nejvhodnější parametry pro výrobu vrstev.

Dále budou v praktické části popsány postupy výroby vrstev na dvou typech zvláknovacích zařízení. Výhoda aplikace nanovláknenné vrstvy s inkorporovaným MMC je taková, že by se postupně uvolňoval a zabraňoval fibrotické reakci. Také budou provedeny testy cytotoxicity o různých koncentracích MMC, kdy nejvhodnější koncentrace budou elektrostaticky zvlákněny spolu s PVDF. Následně budou vláknenné vrstvy zkoumány a opět podrobeny *in vitro* testování.

5. Typy chemikálií a příprava roztoků

V následujícím textu bude popsán konkrétní typ polymeru, jeho rozpouštědlový systém, poměry a množství. Dále způsob přípravy samotných roztoků a také vhodné podmínky.

Pro tvorbu nanovláknenné vrstvy byl použit roztok z polymeru polyvinylidenfluorid (Sigma, M_w 180 000 g/mol) s rozpouštědly N,N-dimethylacetamid a aceton (Penta chemicals) v poměru (8:2). Konkrétně byly vytvořeny 3 roztoky o stejné koncentraci 26 hm. % PVDF, ale s odlišným postupem přípravy. První roztok byl připraven z PVDF, do kterého byla ihned přidána obě rozpouštědla DMAC a Ac v poměru (8:2), následně byl míchán 24 hodin při 300 ot/min a teplotě 55°C. Tato teplota byla stanovena podle teploty odpaření acetonu, což je 56°C. U druhého roztoku byla změna v přípravě roztoku, nejdříve byl smíchán PVDF pouze v DMAC a po 24 hodinách, kdy měl roztok už pokojovou teplotu, byl přidán aceton. Třetí roztok byl připraven pouze z PVDF v DMAC, bez přítomnosti acetonu. Podmínky míchání byly u všech roztoků stejné, viz tabulka č. 1.

Tabulka 1 - typy roztoků PVDF

	Typ roztoku PVDF	Koncentrace PVDF v roztoku [hm %]	Podmínky přípravy roztoku	
			Rychlost míchání [ot/min]	Teplota [°C]
A	PVDF + DMAC + Ac (8:2)	26	300	55
B	PVDF + DMAC + Ac po 24 h. (8:2)	26	300	55
C	PVDF + DMAC	26	300	55

6. Bezjehlové elektrostatické zvlákňování

Pro zvlákňování bylo použito zařízení Nanospider™ (NS 1WS500U, Elmarco), spolu s klimatizací (NS AC 150/1000/2000, Elmarco). Zvlákňování na Nanospideru™ probíhalo z důvodu optimalizace roztoku a zjištění ideálních parametrů pro zvlákňování, které budou později využity při jehlovém elektrostatickém zvlákňování.

Jako první byl zvlákňován roztok PVDF + DMAC + AC (8:2), za podmínek viz tabulka č. 3. Zvlákňování bylo problematické, chvílemi k němu vůbec nedocházelo, protože roztok po určité době zvyšoval svou viskozitu natolik, že zvlákňování nebylo možné. Jelikož roztoky s acetonem i bez něho měly na první pohled podobnou viskozitu a identické chování při zvlákňování, byly podrobeny viskozimetrickému měření viz tabulka č. 2.

Tabulka 2 - naměřená viskozita roztoků PVDF

	Typ roztoku PVDF	Viskozita [mPa.s]
A	PVDF + DMAC + Ac (8:2)	780 x 10 ⁻³
B	PVDF + DMAC + Ac po 24 h. (8:2)	420 x 10 ⁻³
C	PVDF + DMAC	730 x 10 ⁻³

Při porovnání s viskozitou samotného DMAC (945×10^{-3} mPa.s) a acetonu (316×10^{-3} mPa.s), je z naměřených hodnot v tabulce č. 2 viditelné, že roztok A (který původně aceton obsahoval) a C, vykazují podobné hodnoty i přes to, že původní složení bylo odlišné. Oba se svými hodnotami přibližují spíše k viskozitě čistého DMAC než Ac, tudíž po rozmíchání zůstalo v roztoku minimální množství acetonu. To samé platí u roztoku B, kdy je očividné, že viskozita se snížila přidáním acetonu těsně před zvlákňováním. Tímto se potvrdilo, že záleží na postupu přípravy. Aceton byl odpařen z roztoku důsledkem velmi malých netěsností a vysoké teplotě při míchání, která byla 55°C . Tím, že teplota odpaření acetonu je 56°C a má vysoce těkavé a nestabilní vlastnosti, dochází k jeho úniku. Experiment byl proveden několikrát a vždy nastal stejný problém s roztokem, který byl připravován tímto způsobem. Problémem je, že rozmíchání PVDF s DMAC je neproveditelné při nižší teplotě než je 55°C , proto byl zvolen následující postup, nejprve bylo rozmícháno PVDF s DMAC a druhý den, po zchladnutí roztoku na pokojovou teplotu, 30 minut před zvlákňováním byl přidán aceton, který snižuje viskozitu roztoku.

Tabulka 3 - Různé podmínky a parametry při zvlákňování roztoku PVDF

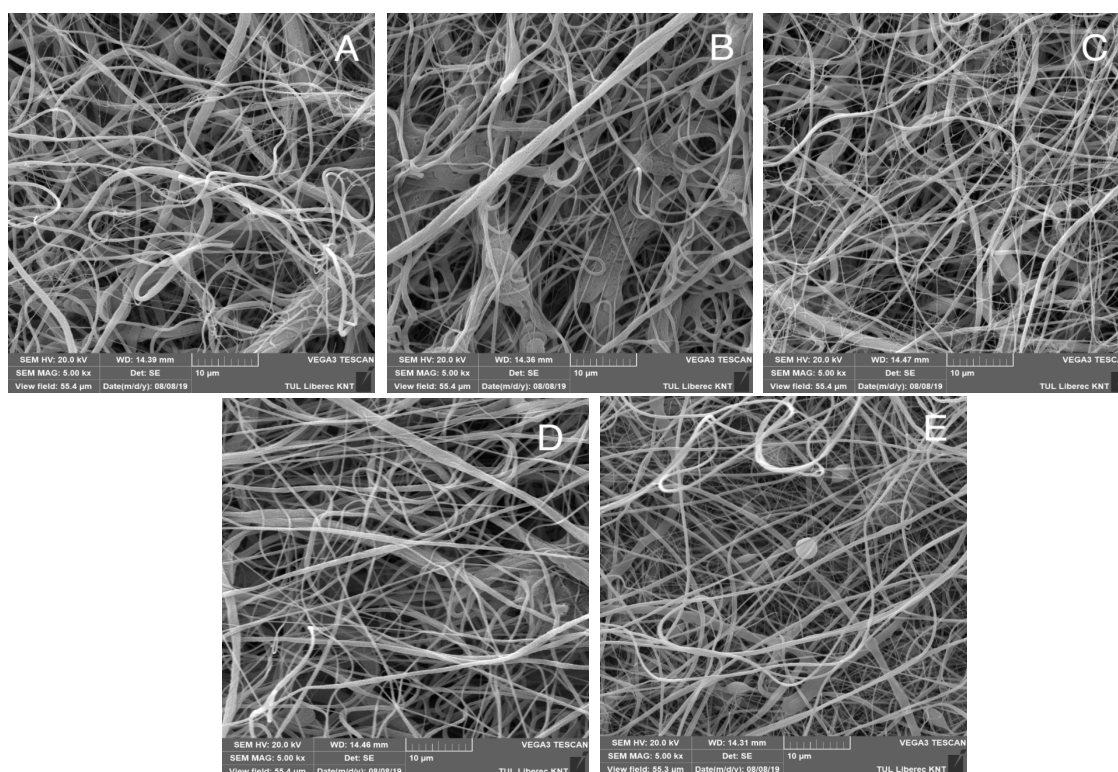
Typ roztoku PVDF	Vzdálenost zvlákňovací jednotky od kolektoru [mm]	Rychlost odtahu podkladové vrstvy [mm/min]	Relativní vlhkost vzduchu [%]	Teplota vzduchu [$^{\circ}\text{C}$]	Elektrické napětí [kV]
PVDF + DMAC + Ac (8:2)	167	19	45	22	-10; 50
	173	9	35	22	-10; 50
	173	9	55	22	-10; 50
PVDF + DMAC + Ac po 24 h. (8:2)	173	9	55	22	-10; 50
	171	12	19	22	-10; 50

Dále byl zvlákňován pouze roztok PVDF + DMAC + Ac po 24 h. za podmínek v tabulce č. 3. Zde už probíhalo zvlákňování produktivněji, roztok měl nižší viskozitu a výsledná vrstva byla na první pohled homogenní.

Zbytek podmínek byl stejný nebo pouze nepatrně změněn. Velikost průvlaku skrz který byl nanášen roztok na nerezovou zvláknovací strunu, byla 0,7 mm, která byla vybrána na základě hodnoty viskozity roztoku.

6.1. Morfologie materiálu

Vyhodnocení vzorků proběhlo na rastrovacím elektronovém mikroskopu (TESCAN, Vega 3). SEM je typ mikroskopu, který zobrazuje povrch pevných objektů. K tomu využívá paprsek elektronů s relativně nízkou energií, ty se poté odrazí od pokoveného objektu, který je vodivý a vykreslují viditelný obraz. Dokáže také orientačně určit prvkové složení preparátu (Joy et al. 2020). Vzorky byly umístěny na terčik, pokoveny vrstvou zlata o tloušťce 10 nm a dány pod rastrovací elektronový mikroskop. Následně byly pořízeny snímky o různých zvětšeních.



Obrázek 9 - SEM snímky výsledné vlákněné vrstvy při zvětšení 5000x; A - vlhkost 45%, aceton přítomen od začátku; B - vlhkost 35%, aceton přítomen od začátku; C - vlhkost 55%, aceton přítomen od začátku; D - vlhkost 55%, s přidáním acetonu těsně před zvláknováním

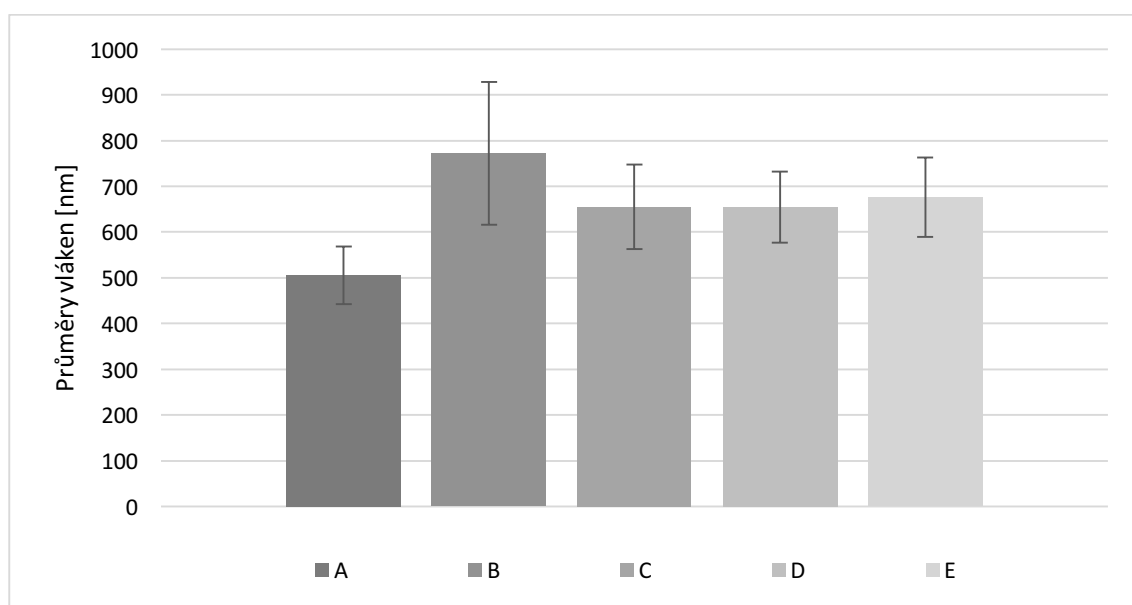
Parametr, který byl při zvláknování nejvíce měněn, byla vlhkost vzduchu, viz tabulka č. 3. To mělo dle mikroskopických snímků dopad na výslednou morfologii vlákněné vrstvy, viz obrázek 9.

Nejhorší vrstvy po vzhledové stránce byly A, B, C. Je to z toho důvodu, jak už bylo popsáno výše, že roztok zvlákňoval nestejně s častými přestávkami, kvůli zablokování zvlákňovacího průvlaku vysoce viskózním roztokem. Ze snímků je vidět, že C a E tvoří jemnější vlákna. Vrstva C obsahuje méně defektů než vrstva E.

Už na první pohled je zřejmé, že vrstvy jsou nesourodé a obsahují různé průměry vláken, proto pro lepší porovnání byly průměry naměřeny. Měření probíhalo u 100 náhodně vybraných vláken, od každého druhu vlákenné vrstvy. Na základě naměřených výsledků, byl vypočítán aritmetický průměr a také 95% interval spolehlivosti (IS 95%).

Tabulka 4 - Aritmetický průměr a interval spolehlivosti vlákenných vrstev z PVDF

Typ vrstvy	Aritmetický průměr [nm]	IS 95%
A	505,62	63,12
B	772,47	156,09
C	655,27	92,34
D	654,61	77,20
E	675,79	86,69



Obrázek 10 - Sloupcový graf průměru vláken s IS 95%

V tabulce č. 4 je vidět, že po změření průměru vláken, je vlákenná vrstva A nejjemnější. Dále pak největší průměry vláken obsahuje vrstva B, 772,47 nm. To je vidno i z obrázku č. 10, který zobrazuje graf se zaznamenanými hodnotami průměrů vláken. Další vrstvy poté vykazují přibližně stejné hodnoty, jen s lehkými odchylkami. Vlákenná vrstva na snímku D měla sice vlákna většího průměru, ale vrstva byla rovnoměrnější. Ve výsledku po vzhledové stránce, průběhu zvláknování a dle naměřených průměrů se jeví jako nejideálnější vrstvy D a E, ač nemají nejmenší průměry. Proto byl v dalších testech zvolen postup přípravy roztoku a podmínky při zvláknování podobné těmto dvěma.

7. Biologické testování ideální koncentrace MMC

V této části bylo zkoumáno 10 různých koncentrací MMC, pomocí testů na cytotoxicitu ve třech dnech. Tyto testy byly provedeny na základě dvou předpokladů výsledné vlákenné vrstvy, tj. aby daná koncentrace MMC byla schopná zamezit růstu buněk při minimální možné toxicitě, jelikož MMC je karcinogenní látka. Následně bylo důležité vybrat nejnižší možnou koncentraci. Ideální hodnota poté bude zvlákněna spolu s PVDF a následně dále zkoumána. První den probíhalo pasážování buněk a jejich nasazení do 96 jamkové destičky, druhý den byl k buňkám přidán MMC o různých koncentracích a třetí den následovalo vyhodnocení metabolické aktivity. Cílem bylo, aby buňky na vlákenných vrstvách nerostly, proto bylo určeno konkrétní rozmezí, kdy prvně musela být zjištěna cytotoxicita roztoků, ze které se poté vycházelo při dalších testech.

7.1. Pasážování buněk

Kultivace buněk je proces, při kterém dochází k jejich množení, což je možné nazývat pasážováním buněk. Testy probíhaly *in vitro*, kdy buněčná linie obsahovala 3T3 myší fibroblasty. Buňky byly předem připraveny v kultivačním mediu a následně došlo k jejich pasážování. Vše probíhalo ve sterilním prostředí, konkrétně ve flowboxu. Jako první byla zkontrolována morfologie buněk pod optickým mikroskopem. Následně byl proveden výpočet buněk na zařízení LUNA, kdy celková viabilita byla 96%. Detailní postup pasážování je možné najít ve videu od firmy Thermo Fisher scientific (Thermofisher 2019).

7.2. Test cytotoxicity

Pro stanovení testu cytotoxicity byl zvolen test CCK-8. Testy CCK-8 umožňují stanovit životaschopnost buněk v testech buněčné proliferace, toxicitu zdravotnických prostředků a materiálů, kdy se buňky nechají růst v extrační tekutině s potřebnými buňkami po určitou dobu a následně jsou vyhodnoceny, zda-li je konkrétní prostředí pro ně vhodné či nikoliv (Nelsonlabs 2019).

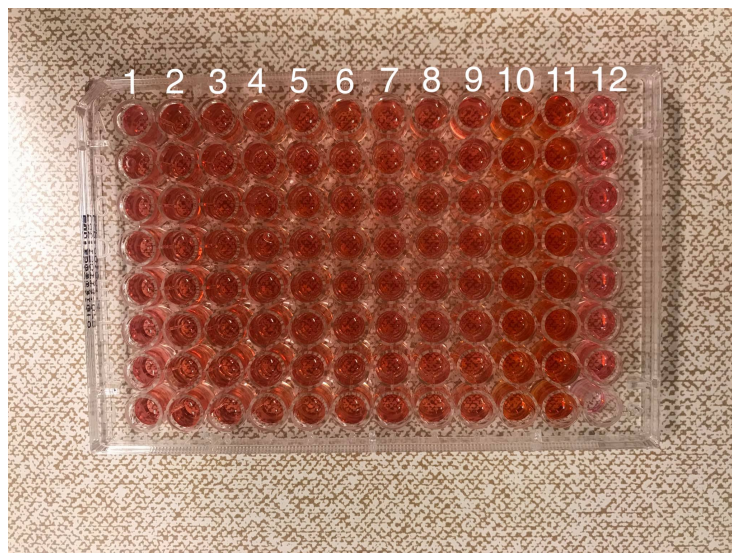
Testy probíhaly při deseti různých koncentracích MMC v kultivačním mediu DMEM (MMC/DMEM), viz tabulka č. 5., podle normy ČSN EN ISO 10993-5, kdy byl zkoumán cytotoxický účinek. Na základě stanoveného množství MMC (od 750-5 μl), bylo dopočítáno množství DMEM a z toho výsledná koncentrace MMC/DMEM, tabulka č. 5. Tyto koncentrace byly poté nasazeny na buněčnou linii z předchozího dne viz kapitola 7.1.

Tabulka 5 - výsledné koncentrace a jejich podíl MMC/DMEM

	koncentrace MMC/DMEM [mg/ml]	MMC [μl]	DMEM [μl]
1.	15×10^{-4}	750	250
2.	13×10^{-4}	650	350
3.	11×10^{-4}	550	450
4.	9×10^{-4}	450	550
5.	7×10^{-4}	350	650
6.	5×10^{-4}	250	750
7.	3×10^{-4}	150	850
8.	2×10^{-4}	100	900
9.	1×10^{-4}	50	950
10.	$0,1 \times 10^{-4}$	5	995

Jako první byla destička osázena 3T3 myšimi fibroblasty a následně po 24 hodinové inkubaci byl roztok DMEM/MMC o různých koncentracích přepipetován do 96 jamkové destičky s buňkami.

Jako negativní kontrola sloužily buňky v kultivačním mediu (DMEM), pozitivní kontrola byla cytotoxické činidlo Triton X-100 v koncentraci 0,1% Tritonu X-100 v DMEM. Destička byla inkubována 24 hodin při 37°C a 5% CO₂.

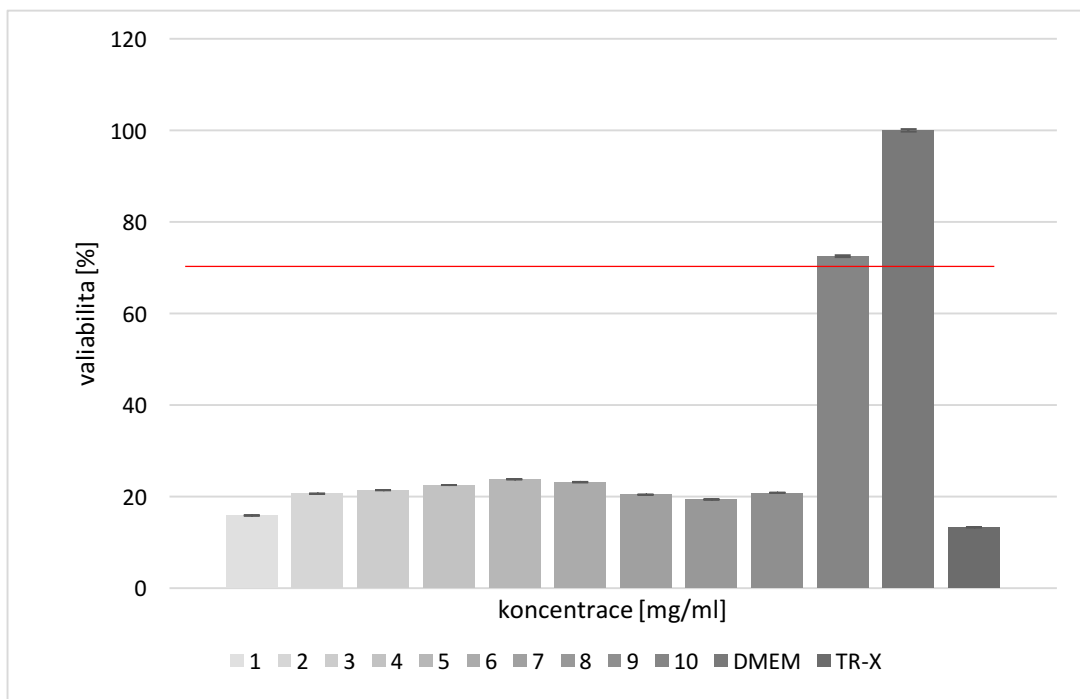


Obrázek 11 - 96 jamková destička o různých koncentracích MMC/DMEM, určena k vyhodnocení CCK-8 test; 1- 15×10^{-4} mg/ml; 2- 13×10^{-4} mg/ml; 3- 11×10^{-4} mg/ml; 4- 9×10^{-4} mg/ml; 5- 7×10^{-4} mg/ml; 6- 5×10^{-4} mg/ml; 7- 3×10^{-4} mg/ml; 8- 2×10^{-4} mg/ml; 9- 1×10^{-4} mg/ml; 10- $0,1 \times 10^{-4}$ mg/ml; 11 – DMEM; 12 – TR-X

7.3. Vyhodnocení

Po 24 hodinové inkubaci, byla metabolická aktivita buněk stanovena CCK-8 testem na zařízení spektrofotometr (TESCAN), kdy byla měřena absorbance při 450 nm. Kvůli vysokým hodnotám bylo potřeba koncentraci $0,1 \times 10^{-4}$ mg/ml a čisté DMEM 10x zředit. Zbarvení roztoku bylo dle míry viability. DMEM měl nejtmaší odstín oranžové, protože v něm byl obsažen nejvyšší počet živých buněk. Ty roztok spotřebovávají při výživě, kterou potřebují k množení, kdy za pomoci chemických reakcí, mění barvu roztoku z růžové na oranžovou. Proto v jamkách, kde byly různé koncentrace MMC a minimální počet buněk, zůstalo spíše růžovější zbarvení roztoku.

Čísla 10 a 11 na obrázku č. 11 jsou nejtmaší, důvodem je vyšší koncentrace živých buněk oproti ostatním jamkám. U 1. sloupce roztoků je vidět, že odstínem barvy se přibližuje pozitivní kontrole, což je patrné i z obrázku č. 12, kdy v grafu má hned po TR-X nejnižší viabilitu.



Obrázek 12 – graf metabolické aktivity fibroblastů po 24 hodinové inkubaci při různých koncentracích se směrodatnou odchylkou: 1- 15×10^{-4} mg/ml; 2- 13×10^{-4} mg/ml; 3- 11×10^{-4} mg/ml; 4- 9×10^{-4} mg/ml; 5- 7×10^{-4} mg/ml; 6- 5×10^{-4} mg/ml; 7- 3×10^{-4} mg/ml; 8- 2×10^{-4} mg/ml; 9- 1×10^{-4} mg/ml; 10- $0,1 \times 10^{-4}$ mg/ml

Přepočítané hodnoty životaschopnosti buněk byly vyneseny do grafu viz obrázek č. 12, kde jsou patrné cytotoxické účinky materiálů. Negativní kontrola (DMEM) byla považována za 100% životaschopnost. Hranice životaschopnosti buněk je 70% (v grafu vyznačeno červenou čarou), což vykazuje pouze čisté DMEM a roztok MMC/DMEM o koncentraci $0,1 \times 10^{-4}$ mg/ml. Jelikož je pro tento výzkum výhodnější porovnávat výsledky s pozitivní kontrolou, kdy buňky rostou minimálně, tak tyto dvě koncentrace, které nejsou toxické, jsou pro tento výzkum nevhodné, protože nepoškozují okolní buňky. Ty by měly tendenci se dále množit a vznikala by fibrotická reakce. Na pozitivní kontrole Triton X-100 (TR-X) je vidět, že buňky byly mrtvé, látka nevykazuje žádnou životaschopnost. Jak je z grafu patrné, koncentrace od 1×10^{-4} do 15×10^{-4} jsou toxické. Znamená to, že na nich buňky nerostou, proto musí být nalezena ideální koncentrace v tomto rozmezí, která dokáže potlačit fibrotickou reakci, ale také musí obsahovat nejnižší možné množství MMC, kvůli již zmíněné karcinogenní vlastnosti. Proto by bylo ideální hledat vhodnou koncentraci mezi hodnotami 1×10^{-4} a $0,1 \times 10^{-4}$ mg/ml, jelikož jsou to nejmenší možné hodnoty mezi kterými stále buňky nerostou.

8. Příprava roztoků II.

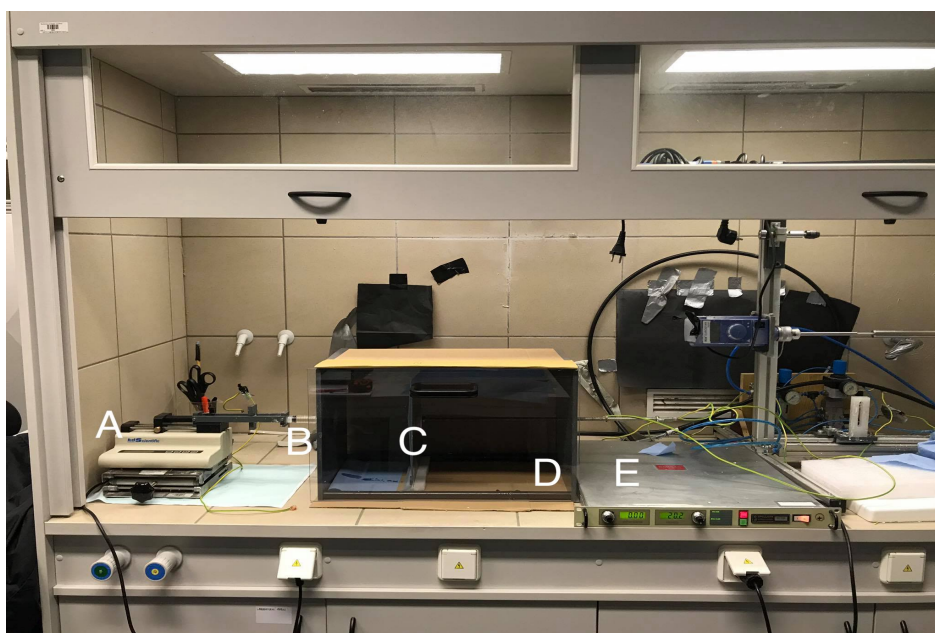
Na základě výsledků bylo potřeba připravit vhodné množství vodného roztoku MMC (Sigma aldrich) v koncentracích 0,01 mg a 0,1 mg MMC, kdy výchozí koncentrací byla 0,2 mg MMC na 1 g materiálu z PVDF, ta byla poté ještě ředěna na příslušné koncentrace. Výsledné použité koncentrace MMC byly zaznamenány do tabulky č. 6. Všechny roztoky PVDF byly připraveny stejným postupem jako u předchozího zvlákňování, tj. 26 hm% PVDF s DMAC/Ac v poměru (8:2), kdy aceton byl přidán těsně před zvlákňováním.

Tabulka 6 - Typy roztoků PVDF a přehled jejich složení

Typ roztoku PVDF	Koncentrace MMC/PVDF [mg/1g]
PVDF + DMAC + Ac po 24 h. (8:2)	-
PVDF + DMAC + Ac po 24 h. (8:2)	0,01
PVDF + DMAC + Ac po 24 h. (8:2)	0,1

9. Jehlové elektrostatické zvlákňování

Pro přípravu vlákenné vrstvy s MMC, bylo vybráno jehlové elektrostatické zvlákňování. Tento typ byl zvolen na základě karcinogenních účinků MMC. Pro tento speciální případ musel být vytvořen box, který byl celý krytý, aby práce s roztokem byla bezpečná, viz obrázek č. 13. Roztok v laboratorních podmínkách není možné zvlákňovat na zařízení NanospiderTM, bylo by to velice riskantní, protože hrozí riziko nedostatečného vymytí stroje. Z tohoto důvodu byl zvolen speciální box, kde byly všechny části poté bezpečně zlikvidovány.



Obrázek 13 - Zvlákňovací zařízení: A - dávkovací pumpa; B - injekční stříkačka s jehlou a polymerním roztokem; C – uzemněný kolektor pro záchyt nanovláken; D - zvlákňovací box; E - zdroj elektrického napětí

Celkem byly zvlákňovány tři vrstvy, první byla pouze z čistého PVDF, druhá obsahovala navíc 0,01 mg MMC/1 g PVDF a třetí 0,1 mg MMC/1 g PVDF. Tyto dvě koncentrace byly vybrány na základě předchozího testování cytotoxicity roztoků viz kapitola 7. Podkladová vrstva byla z polypropylenového spunbondu. V tabulce č. 7 byly zaznamenány podmínky při zvlákňování jednotlivých vrstev, které byly vyzorovány už při zvlákňování na Nanospideru™.

Tabulka 7 - podmínky při jehlovém zvlákňování

Typ roztoku	Vzdálenost zvlákňovací jehly od kolektoru [mm]	Rychlost dávkování polymerního roztoku [ml/h]	Relativní vlhkost vzduchu [%]	Teplota vzduchu [°C]	Elektrické napětí [kV]	Průměr jehly [mm]
PVDF + DMAC + Ac	180	3,5	40	22,9	25,3	1,2
PVDF + DMAC + Ac + 0,01 MMC	170	3,5	40	21,5	20	1,2
PVDF + DMAC + Ac + 0,1 MMC	170	3,5	40	21,5	20	1,2

9.1. Vyhodnocení

Tím, že roztoky byly optimalizovány už na NanospideruTM, probíhalo jehlové elektrostatické zvlákňování mnohem jednodušeji. Pouze stačilo najít vhodnou rychlost dávkování polymerního roztoku a velikost elektrického napětí. Důležité bylo dodržet bezpečnost práce, kvůli nebezpečnosti MMC. Výsledné vrstvy byly poté použity pro další *in vitro* testování, ve kterých bude jejich morfologie následně zhodnocena.

10. *In vitro* testování na vlákenné vrstvě

V této části experimentu budou popsány biologické testy v laboratořích. Výsledné vrstvy vyrobené na jehlovém zvlákňovacím zařízení budou vystaveny testování účinků MMC na danou vrstvu po dobu 14ti dnů. Bylo zjišťováno za jak dlouho se MMC vymyje z implantátu a jestli buňky osázené na vrstvě budou po 14ti dnech při účinku MMC vykazovat životaschopnost.

10.1. Příprava vzorků

Vzorky byly vyříznuty o průměru 15,5 mm. Takto připravené vzorky kruhového tvaru byly dány do kultivační destičky o 24 jamkách a vysterilizovány ethylenoxidem. Protože je materiál nesmáčivý, musel být zatěžkán pomocí skleněných kroužků. Celkově byly z každé vrstvy připraveny vzorky pro testy CCK-8, negativní kontrolu (NK), pozitivní kontrolu (PK), fluorescenční mikroskopii (FM) a skenovací elektronovou mikroskopii (SEM). Vzorky byly připraveny z vrstvy PVDF, PVDF/0,01 MMC a PVDF/0,1 MMC. Následně byly vzorky vysterilizovány.

10.1.1. Sterilizace materiálů

Sterilizace materiálu, konkrétně ethylenoxidem (EO), se používá hlavně ke sterilizaci lékařských a farmaceutických produktů, které nemůžou být sterilizovány pomocí vysokoteplotní páry. EO je bezbarvý plyn, který má hořlavé a výbušné vlastnosti. EO ničí mikroorganismy, které zůstaly během výrobních nebo balicích procesů. Sterilizace EO je nejčastěji používaná metoda, která je schválena podle normy ČSN EN ISO 10993 7. část (Eurotherm 2020; CDC.gov 2016).

Vzorky vyrobené v PVDF s MMC byly vysterilizovány v EO po dobu 12 hodin ve sterilizačním zařízení Anprolene za podmínek teploty 22°C a 44% vlhkosti.

10.1.2. Osázení buňkami

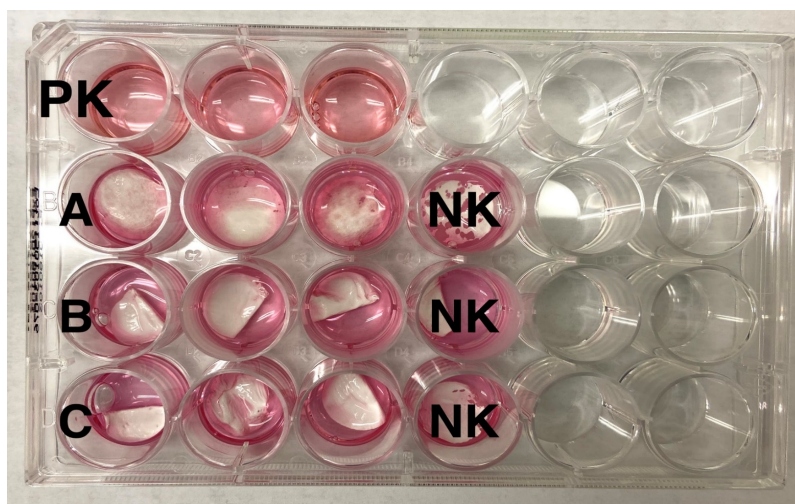
Předtím, než byly nasazeny buňky na vzorky, bylo provedeno jejich pasážování, konkrétně pasáž č. 13. To probíhalo za stejných podmínek jako u předchozího testu, viz. kapitola 7.1. Následně byly všechny vlákenné vrstvy osazeny 3T3 myšími fibroblasty, které vykazovaly 88% viabilitu. Destičky byly dány opět do inkubátoru při 37°C a 5% CO₂, kde probíhala jejich inkubace až do testování.

10.2. Postup testování

V této kapitole bude popsán postup vyhodnocení pouze pro 2. testovací den, neboť zbylé testovací dny probíhaly stejným způsobem. Vyhodnocení *in vitro* testování tedy probíhalo 2., 7. a 14. den inkubace, kdy byly připraveny vzorky pro SEM, FM a CCK-8 testy. Každý typ vzorku měl specifické postupy pro přípravu na vyhodnocení.

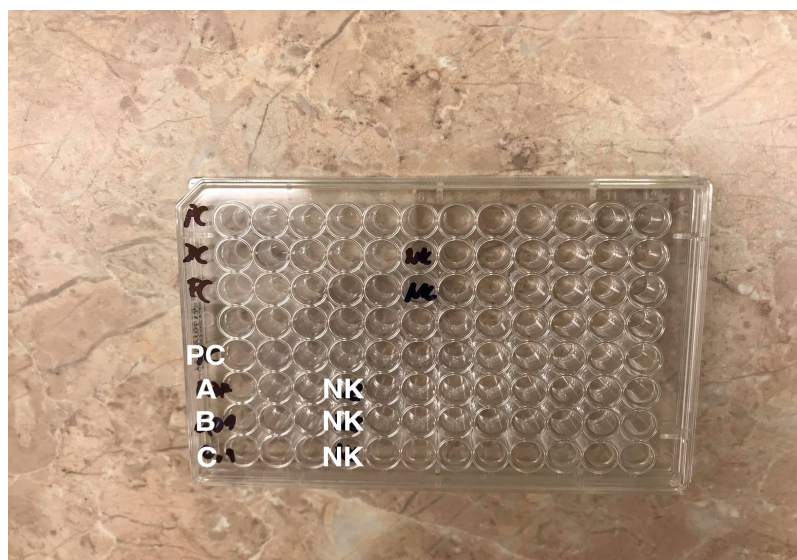
10.2.1. CCK-8 testy – 2. testovací den

Jako první byly připraveny vzorky pro metabolický test CCK-8. Vzorky po 48 hodinách od osázení buněk na vrstvy byly opláchnuty v PBS a přemístěny do 24 jamkové destičky, kdy v každé jamce bylo předem napipetováno 0,5 ml DMEM s CCK v poměru 9:1, viz obrázek č. 14.



Obrázek 14 - 24 jamková destička s vlákennými vrstvami - 2. testovací den; PK - pozitivní kontrola pro všechny tři typy vrstev; NK - negativní kontrola; A - PVDF vlákenná vrstva; B - PVDF/0,01 MMC vlákenná vrstva; C - PVDF/0,01 MMC vlákenná vrstva

Následovala 2 hodinová inkubace vzorků v inkubátoru. Po uplynutí dvou hodin bylo z každé jamky přepipetováno 200 μ l roztoku do 96 jamkové destičky (obrázek 15) a následně vyhodnocena absorbance na spektrofotometru.



Obrázek 15 - 96 jamková destička určena pro spektrofotometrii; A - PVDF; B - PVDF/0,01 MMC; C - PVDF/0,1 MMC; PK - pozitivní kontrola; NK - negativní kontrola

10.2.2. Fluorescenční mikroskopie - 2. testovací den

Po dvou dnech inkubace, kdy byly buňky nasazeny na vlákenné vrstvy, byly vyjmuty vzorky pro FM. Ty byly nejprve opláchnuty pomocí PBS a následně vloženy do 1 ml 2% glutaaldehydu v PBS, který slouží jako fixační a konzervační činidlo. Poté byl přidán 1 ml permeabilizačního roztoku, který rozrušil membránu buněk pro správné navázání fluorescenčních barviv. Následně byl připraven roztok z Phalloidinu FITZ (obaruje cytoskelet zeleně) v permeabilizačním roztoku v poměru 1:1000, kdy bylo do každé jamky vpipetováno 300 µl směsi. Po 30 minutách bylo přidáno barvivo DAPI working solution, které obaruje jádro modře. V mezikrocích bylo vše proplachováno PBS, ve kterém i vzorky zůstaly zakonzervovány do doby jejich dalšího použití.

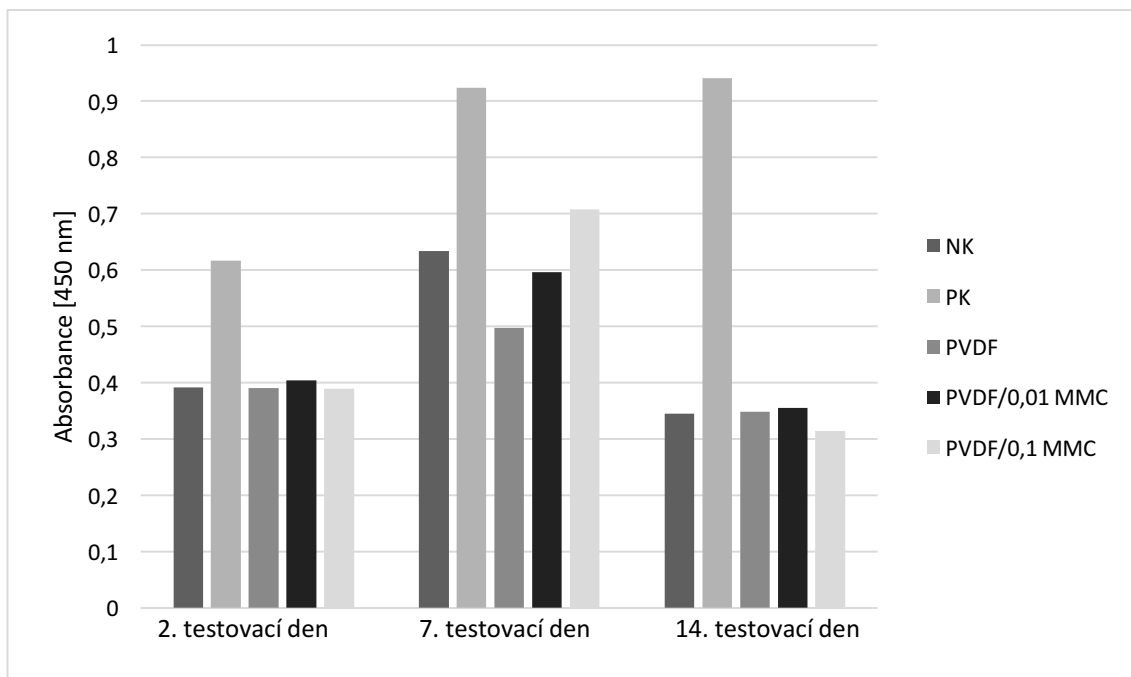
10.2.3. Rastrovací elektronová mikroskopie – 2. testovací den

Vzorky pro SEM byly také opláchnuty pomocí PBS a glutaraldehydu. Následně byly odvodněny v ethanolové řadě (60%, 70%, 80%, 90%, 96% a 100%), vždy po dobu 5 minut. Dále byly vloženy do nové destičky, kde byly uchovány pro SEM.

10.3. Vyhodnocení *in vitro* testování

10.3.1. Vyhodnocení CCK

Pro vyhodnocení CCK-8 testů bylo použito spektrofotometrické zařízení (TESCAN), které měří absorbanci při vlnové délce 450 nm. Spektrofotometr naměřil buněčnou viabilitu po 2., 7. a 14. testovacím dni. U 7. a 14. dne byly u PK tak vysoké hodnoty, že spektrofotometr nebyl schopen je zaznamenat, tudíž musel být roztok 10x zředěn. Všechny výsledné hodnoty, byly zprůměrovány a vyneseny do grafu na obrázku č. 16, kde je znázorněna absorbance jednotlivých vrstev pro 2., 7. a 14. testovací den.



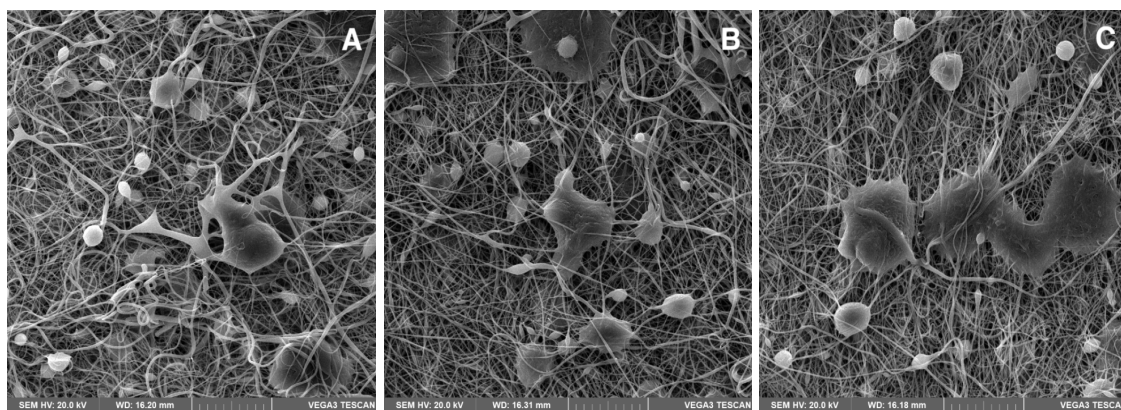
Obrázek 16 - Graf závislosti velikosti absorbance na určitých vlákenných vrstvách

Jak je v grafu na obrázku č. 16 vidět, všechny testovací dny byla nejvyšší absorbance u PK. Kde je patrné, že buňky skutečně vykazovaly metabolickou aktivitu. Na obrázku č. 16 je vidět, že všechny vrstvy při 2. a 14. testovacím dni měly přibližně stejnou absorbanci, mezi 0,3 – 0,4. U sedmého testovacího dne se pravděpodobně snažily buňky vykazovat metabolickou aktivitu a množit se, neboť absorbance lehce stoupla, ale u vrstvy pouze z PVDF byla i tak nejnižší. Zajímavé ovšem je, že výsledky vrstvy obsahující koncentraci 0,1 MMC 7. den rapidně stouply oproti ostatním a 14. den klesly na nejnižší hodnotu ze všech. Nejpravděpodobnějším vysvětlením je, že některé ze zachycených buněk na vrstvě, vykazovaly známky života a snahu o proliferaci, avšak v důsledku působení MMC a tím, že PVDF je materiál, který růst buněk nepodporuje, přestaly vykazovat metabolickou aktivitu a zanikly.

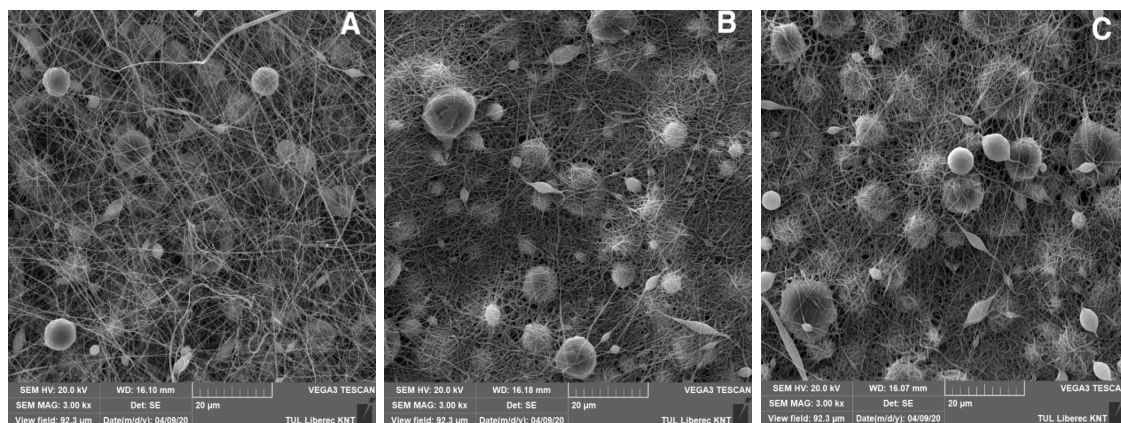
Dle obrázků č. 16 je vidět, že samotné vrstvy z PVDF a PVDF/0,01 MMC vykazují stejné hodnoty absorbance u všech testovacích dní, zde je poté přídavek MMC v takovéto koncentraci možná až zbytečný, z důvodu zabránění růstu buněk na vrstvě. Ve výsledku u 2. a 14. dne vyhodnocení všechny vrstvy kopírují absorbanci negativní kontroly, vyjma PVDF/MMC 0,1 při 7. testovacím dni. Na grafu z obrázku č. 16 je jasně vidět, že uvolňování MMC fungovalo po celou dobu testování, protože po 7. dni, kdy jejich počet stoupl, opět začal klesat a přibližovat se počtem buněk negativní kontrole.

10.3.2. Vyhodnocení SEM snímků

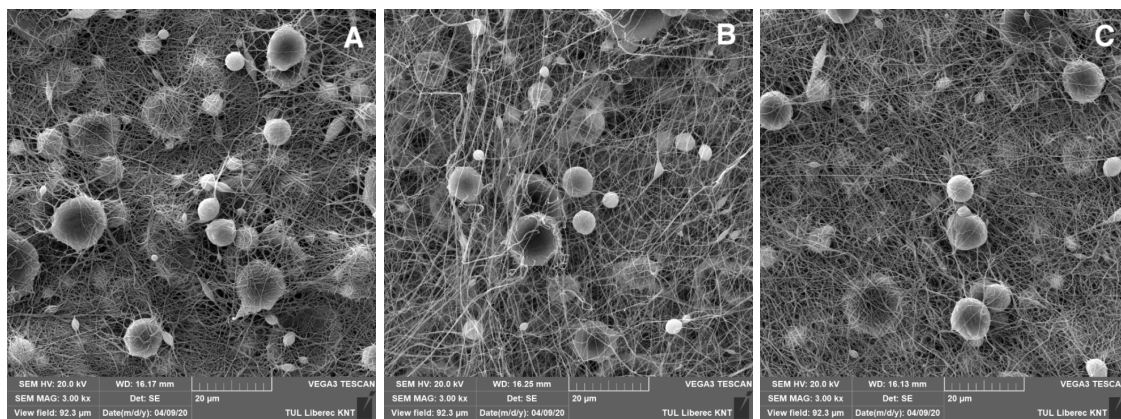
Bylo pořízeno mnoho snímků o různých zvětšeních od 500x do 5000x. Snímky na obrázcích 17-19 jsou vlákenné vrstvy z každého testovacího dne, při zvětšení 3000x. Jak už bylo zmíněno, roztoky byly zvlákněny na jehlovém zvláknovacím zařízení (JZZ) za podmínek, které jsou zaznamenány v tabulce č. 7.



Obrázek 17 - SEM snímky vlákenné vrstvy z PVDF při zvětšení 3000x; A - 2. testovací den, B - 7. testovací den, C - 14. testovací den

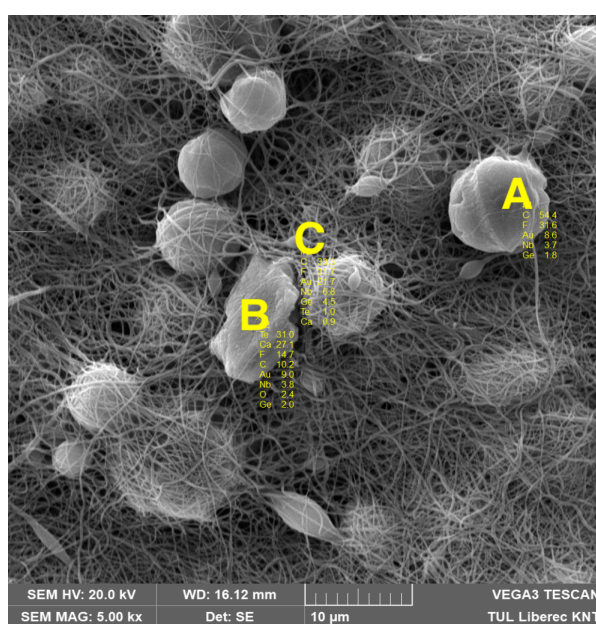


Obrázek 18 - SEM snímky vlákenné vrstvy z PVDF/0,01 MMC při zvětšení 3000x; A - 2. testovací den, B - 7. testovací den, C - 14. testovací den



Obrázek 19 - SEM snímky vlákenné vrstvy z PVDF/0,1 MMC při zvětšení 3000x; A - 2. testovací den, B - 7. testovací den, C - 14. testovací den

Při pohledu na vláknenné vrstvy je vidět mnoho defektů. Tyto defekty ve tvaru kapének, jsou zřetelně viditelné při zvětšení 3000x, viz obrázky č. 17-19. Vrstvy obsahují mnoho defektů, avšak oproti vláknenným vrstvám vytvořené na Nanospideru™, které byly nesourodé se zdá, že vrstvy zvlákněné pomocí JZZ obsahují o polovinu tenčí vlákna, což i při pozdějším změření jejich průměrů pouze pro přibližný přehled bylo potvrzeno. Na druhou stranu je zde mnoho shluků vláken a vrstva působí nehomogenně. Vytvořené defekty může mít také za následek MMC, který zhoršuje zvláknitelnost roztoku, či podmínky v laboratoři, jako je teplota a vlhkost, které se nedají u tohoto typu zvláknování nastavit podle potřeby.

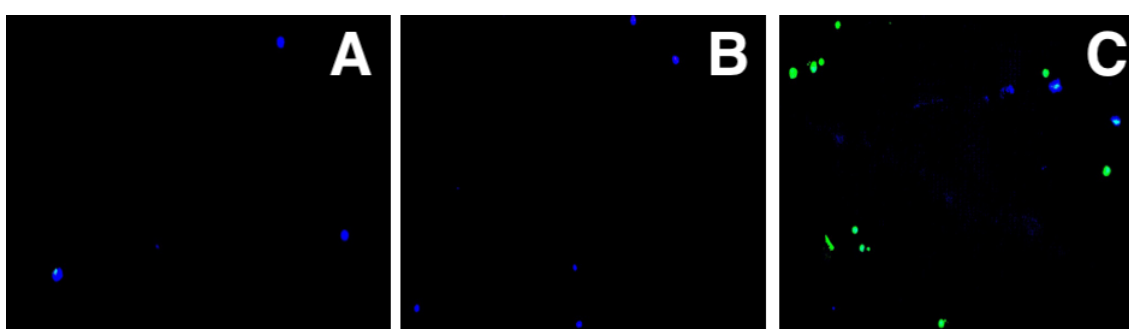


Obrázek 20 - SEM snímek vláknenné vrstvy PVDF/MMC 0,01 při zvětšení 5000x, 14. testovací den; A,B,C - přibližné zastoupení chemických prvků v neznámých objektech

Jedna z výhod skenovací elektronové mikroskopie je EDX analýza, která dokáže přibližně zjistit chemické složení prvků pozorovaných objektů. Aby byla ověřena přítomnost MMC na vrstvách, bylo nutno vyhledat místa s defekty. Na obrázku č. 20 je snímek s chemickým složením různých defektů. V jednom z nich, konkrétně B, se nachází navíc kyslík v poměrném zastoupení 2,4%. Jelikož molekula MMC obsahuje kromě uhlíků a vodíků mimo jiné také dusík a kyslík, je velmi pravděpodobné, že se jedná o část MMC. Je tedy zřejmé, že MMC na vláknenné vrstvě zůstal v malém množství i po 14ti dnech a jeho uvolňování bylo postupné. Defekty A i C jsou pravděpodobně špatně zvlákněný roztok PVDF, jelikož se v jejich složení objevuje fluor.

10.3.3. Vyhodnocení fluorescenční mikroskopie

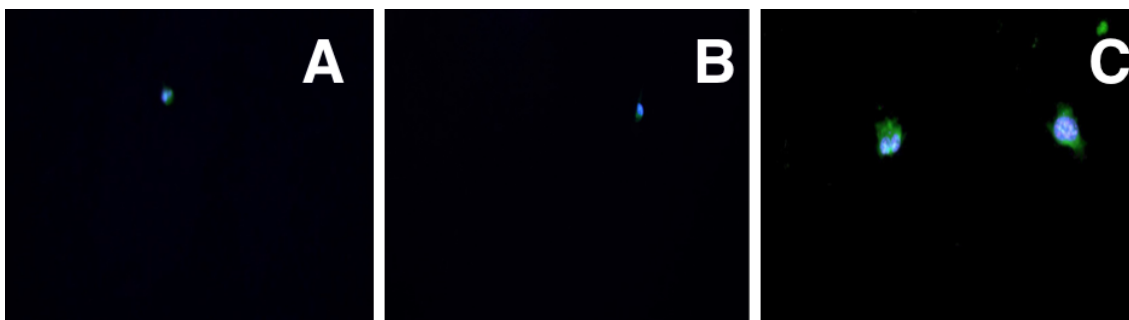
Snímky byly vyhodnoceny pomocí fluorescenčního mikroskopu. Jelikož cílem této práce bylo, aby buňky na vlákných vrstvách nerostly, probíhalo jejich hledání velice obtížně. Na snímcích 21-23 se nachází malé množství buněk, kdy modrá barva jsou jádra a zelená jejich cytoskelety. Největší množství buněk na 1 mm² se nacházelo u samotné vrstvy z PVDF, z čehož vyplývá, že MMC potlačuje mimo jiné i metabolickou aktivitu buněk, protože na vrstvách s koncentrací MMC jich už bylo méně. Pro lepší přehlednost byl počet zaznamenaných buněk vyneseno do grafu, viz obrázek 24.



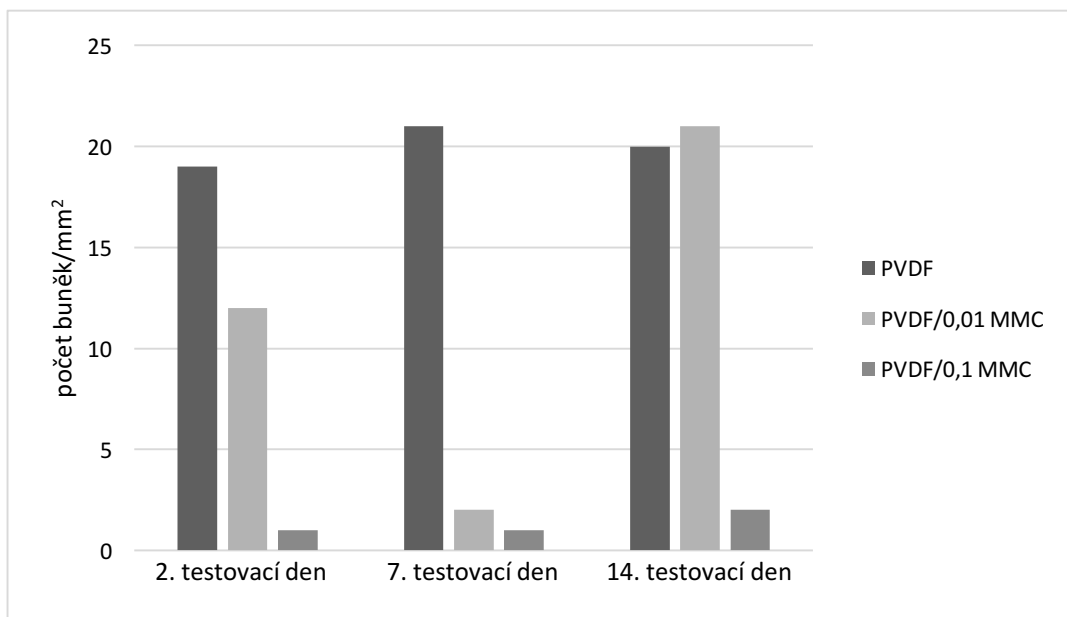
Obrázek 21 - FM snímky vrstev PVDF; A - 2. testovací den, B - 7. testovací den, C - 14. testovací den



Obrázek 22 - FM snímky vrstev PVDF/0,01 MMC; A - 2. testovací den, B - 7. testovací den, C - 14. testovací den



Obrázek 23 - FM snímky vrstev PVDF/0,1 MMC; A - 2. testovací den, B - 7. testovací den, C - 14. testovací den



Obrázek 24 - graf počtu buněk/mm² na jednotlivých vrstvách

Z grafu je patrné, že MMC o koncentraci 0,1 mg a i 0,01mg potlačuje fibrotickou reakci a adhezi buněk. Ač na vrstvách v koncentraci 0,01mg rostl větší počet buněk, tak je to stále oproti scaffoldům, na kterém je tento jev žádoucí jen nepatrné množství. Zvýšení počtu buněk při 14. dnu testování může být z důvodu, že MMC se postupně uvolňovalo do média, které muselo být v průběhu experimentu vyměněno (po 7 dnech). Poslední testovací den už působil pouze v minimálním množství, proto se zbylé buňky snažily adherovat a množit. Ovšem stále se jedná o průměrně 21 buněk na 1 mm², což je neškodné množství. Ve finále výsledky koncentrace 0,01 mg MMC pro zabránění fibrotické reakce jsou podobné jako vrstva pouze s PVDF, proto soudě dle grafu by nejideálnější byla koncentrace 0,1 mg MMC.

11. Shrnutí a závěr

Bakalářská práce se zabývala výrobou vlákenného implantátu pro léčbu očního onemocnění glaukom. Pro tento experiment byl vybrán roztok z PVDF v rozpouštědlovém systému DMAC a Ac s určitou koncentrací MMC. Z počátku probíhala optimalizace přípravy roztoku, kdy po zjištění ideálních podmínek byl do něj přidán MMC. Při této části bylo zjištěno pomocí naměřené viskozity, že aceton musí být přidán až těsně před zvlákňováním, kvůli jeho nízké teplotě odpařování. Neboť při nedodržení těchto podmínek se kvůli netěsnostem v lahvičce větší část odpařila.

Dále bylo potřeba zjistit nejnižší možnou koncentraci MMC (vzhledem k jeho karcinogenním účinkům), která by zabránila růstu buněk a srůstu tkání. Proto byla vybrána koncentrační řada, která byla testována pomocí testu cytotoxicity. Po těchto testech byl výběr zúžen na dvě koncentrace, a to 0,01 mg MMC a 0,1 mg MMC v 1g PVDF nanovláken. Toto množství MMC společně s roztokem z PVDF bylo zvlákňováno pomocí jehlového elektrostatického zařízení, kvůli bezpečnosti práce z důvodu karcinogenních vlastností MMC. Do budoucna je doporučeno zvlákňovat na zařízení NanospiderTM z důvodu průmyslové výroby a regulace přesných podmínek, jako je vlhkost, teplota apod. Tyto vrstvy byly poté podrobeny *in vitro* testování a zkoumány pomocí elektronové a fluorescenční mikroskopie. Z výsledků bylo patrné, že MMC se uvolňoval po celou dobu testování, kdy 14. den byly zachyceny pod SEM defekty obsahující kyslík, který se nachází i v molekule MMC. To potvrzují i výsledky z CCK-8, kdy 7. testovací den buňky vykazovaly vysokou metabolickou aktivitu, ale 14. den byla jejich metabolická aktivita potlačena účinky MMC.

Z výsledků *in vitro* studie se ukázala koncentrace 0,1 mg MMC v 1g PVDF jako nejvhodnější. U všech testů, vykazovala nejideálnější výsledky s malými odchylkami. Fluorescenční mikroskopie potvrdila velmi nízké počty buněk na vrstvě. Elektronová mikroskopie prokázala nejjemnější vlákna, což by mohlo mít dobrý vliv na průtok oční tekutiny. PVDF a MMC se jeví jako ideální kombinace pro vláknenný implantát při léčbě onemocnění glaukom. Dle výsledků studie, zabraňují růstu buněk na vrstvě a fibrotické reakci tkání. V budoucnu by bylo vhodné navrhnout lepší rozpouštědlový systém, neboť PVDF s DMAC a Ac nebyly úplně ideální z důvodu okamžité zvyšování viskozity při chladnutí. Dále také ze SEM snímků je vidět, že vrstvy obsahují mnoho defektů. Otázka zní, jak by tato morfologie zpomalovala průtok oční tekutiny po zavedení implantátu. Proto by bylo dobré se pro další výzkum zaměřit na transport tekutiny, konkrétně u vrstvy PVDF/0,1 MMC, neboť vykazovala nejlepší výsledky.

12. Literatura

ABDEL-NABY AWAD, Osama G. a Mahmoud M. HASAN, 2019. Topical Mitomycin-C can help as an adjunct to alkaline nasal wash and rifampicin in primary atrophic rhinitis. *American Journal of Otolaryngology* [online]. **40**(2), 137–142. ISSN 01960709. Dostupné z: doi:10.1016/j.amjoto.2019.01.007

ABOU-ZEID, A.A., M. FOUAD a M. YASSEIN, 1978. Microbiological production of acetone-butanol by *Clostridium acetobutylicum*. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Zweite Naturwissenschaftliche Abteilung: Mikrobiologie der Landwirtschaft, der Technologie und des Umweltschutzes* [online]. **133**(2), 125–134. ISSN 03236056. Dostupné z: doi:10.1016/S0323-6056(78)80023-8

AHMAD, Bilal, Simeon STOYANOV, Eddie PELAN, Eleanor STRIDE a Mohan EDIRISINGHE, 2013. Electrospinning of ethyl cellulose fibres with glass and steel needle configurations. *Food Research International* [online]. **54**(2), 1761–1772. ISSN 09639969. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodres.2013.09.021

ARDESHIRYLAJIMI, Abdolreza, Sayyed Mohammad-Hossein GHADERIAN, Mir Davood OMRANI a Sadegh Lotfalah MORADI, 2018. Biomimetic scaffold containing PVDF nanofibers with sustained TGF- β release in combination with AT-MSCs for bladder tissue engineering. *Gene* [online]. **676**, 195–201. ISSN 03781119. Dostupné z: doi:10.1016/j.gene.2018.07.046

ARUMUGAM, Ratnakar, Endu Sekhar SRINADHU, Balanehru SUBRAMANIAN a Satyanarayana NALLANI, 2019. β -PVDF based electrospun nanofibers – A promising material for developing cardiac patches. *Medical Hypotheses* [online]. **122**, 31–34. ISSN 03069877. Dostupné z: doi:10.1016/j.mehy.2018.10.005

ASADI-AZARBAIJANI, Babak, Saskia BRABER, Majorie VAN DUURSEN, Kirsi JAHNUKAINEN, Regiane SANTOS a Irma OSKAM, 2019. Imatinib mesylate does not counteract ovarian tissue fibrosis in postnatal rat ovary. *Reproductive Biology* [online]. **19**(2), 133–138. ISSN 1642431X. Dostupné z: doi:10.1016/j.repbio.2019.03.003

BALOGH, Attila, Balázs FARKAS, Geert VERRECK, Jürgen MENSCH, Enikő BORBÁS, Brigitta NAGY, György MAROSI a Zsombor Kristóf NAGY, 2016. AC and DC electrospinning of hydroxypropylmethylcellulose with polyethylene oxides as secondary polymer for improved drug dissolution. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. **505**(1–2), 159–166. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2016.03.024

BEHROUZEH, Maryam, Mohsen ABBASI, Shahriar OSFOURI a Mohammad Javad DIANAT, 2020. Treatment of DMSO and DMAC wastewaters of various industries by employing Fenton process: Process performance and kinetics study. *Journal of Environmental Chemical Engineering* [online]. **8**(1), 103597. ISSN 22133437. Dostupné z: doi:10.1016/j.jece.2019.103597

BENOWITZ, Larry I., 2010. Optic Nerve Regeneration. *Archives of Ophthalmology* [online]. **128**(8), 1059. ISSN 0003-9950. Dostupné z: doi:10.1001/archophthalmol.2010.152

COCAPRADOS, M a J ESCRIBANO, 2007. New perspectives in aqueous humor secretion and in glaucoma: The ciliary body as a multifunctional neuroendocrine gland. *Progress in Retinal and Eye Research* [online]. **26**(3), 239–262. ISSN 13509462. Dostupné z: doi:10.1016/j.preteyeres.2007.01.002

Cytotoxicita, 2019. *Nelsonlabs* [online]. Dostupné z: <https://www.nelsonlabs.com/testing/cytotoxicity/>

DE PADUA SOARES BEZERRA, Bernardo, Elsie CHAN, Rahul CHAKRABARTI a Rasik B. VAJPAYEE, 2019. Intraocular pressure measurement after corneal transplantation. *Survey of Ophthalmology* [online]. **64**(5), 639–646. ISSN 00396257. Dostupné z: doi:10.1016/j.survophthal.2019.02.011

DING, Bin, Jianyong YU a Xianfeng WANG, 2019. *Electrospinning: Nanofabrication and Applications* [online]. B.m.: Elsevier [vid. 2020-05-01]. ISBN 978-0-323-51270-1. Dostupné z: doi:10.1016/C2016-0-01374-8

DIVÍNOVÁ NIKOL, 2017. *Reologické chování roztoků polymeru vhodných pro elektrostatické zvláknění*. Brno. Vysoké učení technické v Brně.

Ethylene Oxide „Gas“ Sterilization, 2016. *Cdc.gov* [online]. Dostupné z: <https://www.cdc.gov/infectioncontrol/guidelines/disinfection/sterilization/ethylene-oxide.html>

Ethylene Oxide Sterilization Process, 2020. *Eurotherm* [online]. Dostupné z: <https://www.eurotherm.com/us/life-sciences-cpg-processes-applications/ethylene-oxide-eto-sterilization-process/>

FERRI, A., S. BARRAU, R. BOUREZ, A. DA COSTA, M.-H. CHAMBRIER, A. MARIN, J. DEFEBVIN, J.M. LEFEBVRE a R. DESFEUX, 2020. Probing the local piezoelectric behavior in stretched barium titanate/poly(vinylidene fluoride) nanocomposites. *Composites Science and Technology* [online]. **186**, 107914. ISSN 02663538. Dostupné z: doi:10.1016/j.compscitech.2019.107914

Glaukom: typy, symptomy, diagnóza a léčba, 2020. *Drderasmus* [online]. Dostupné z: <http://cs.drderamus.com/28765-glaucoma-types-symptoms>

HOFFMANN, E. M. a N. PFEIFFER, 2018. Trabekulektomie mit Mitomycin C: Videobeitrag. *Der Ophthalmologe* [online]. **115**(6), 521–523. ISSN 0941-293X, 1433-0423. Dostupné z: doi:10.1007/s00347-018-0685-1

JOY, David C., Savile BRADBURY a Brian J. FORD, 2020. *Scanning electron microscope* [online]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/technology/scanning-electron-microscope>

July is Glaucoma Awareness Month, 2011a. *Visique kapitie eye care* [online]. Dostupné z: <http://visiquekapitieyecare.blogspot.com/2011/07/july-is-glaucoma-awareness-moethn.html>

KALAPOŠ, M.P., 1999. Possible physiological roles of acetone metabolism in humans. *Medical Hypotheses* [online]. **53**(3), 236–242. ISSN 03069877. Dostupné z: doi:10.1054/mehy.1998.0752

KLINGE, U., B. KLOSTERHALFEN, A.P. ÖTTINGER, K. JUNGE a V. SCHUMPELICK, 2002. PVDF as a new polymer for the construction of surgical meshes. *Biomaterials* [online]. **23**(16), 3487–3493. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/S0142-9612(02)00070-4

KOSTAKOVA, Eva, Laszlo MESZAROS a Jan GREGR, 2009. Composite nanofibers produced by modified needleless electrospinning. *Materials Letters* [online]. **63**(28), 2419–2422. ISSN 0167577X. Dostupné z: doi:10.1016/j.matlet.2009.08.014

KUANG, Tung-Mei, Sudha XIRASAGAR, Yi-Wei KAO, Ben-Chang SHIA a Heng-Ching LIN, 2020. Association of Systemic Hypertension with Primary Open-Angle Glaucoma: A Population-Based Case-control Study. *American Journal of Ophthalmology* [online]. S0002939420301884. ISSN 00029394. Dostupné z: doi:10.1016/j.ajo.2020.04.020

LAROCHE, Daniel a Gideon NKRUMAH, 2020. Combined microinvasive glaucoma surgery in osteogenesis imperfecta patient with refractory open angle glaucoma. *American Journal of Ophthalmology Case Reports* [online]. **18**, 100617. ISSN 24519936. Dostupné z: doi:10.1016/j.ajoc.2020.100617

LI, Ming, Peixun ZHANG a Dianying ZHANG, 2018. PVDF piezoelectric neural conduit incorporated pre-differentiated adipose-derived stem cells may accelerate the repair of peripheral nerve injury. *Medical Hypotheses* [online]. **114**, 55–57. ISSN 03069877. Dostupné z: doi:10.1016/j.mehy.2018.02.027

Lidské oko, 2013. *Hvezdarna* [online]. Dostupné z: <https://sites.google.com/site/hvezdarnacz/lidske-oko>

LIU, Y, H LI, X SHU, S GRAY a G PRESTWICH, 2005. Crosslinked hyaluronan hydrogels containing mitomycin C reduce postoperative abdominal adhesions. *Fertility and Sterility* [online]. **83**(4), 1275–1283. ISSN 00150282. Dostupné

z: doi:10.1016/j.fertnstert.2004.09.038

MAHALE, Alka, Maha W. OTHMAN, Sami AL SHAHWAN, Ibrahim AL JADAAN, Ohood OWAYDHA, Zahid KHAN a Deepak P. EDWARD, 2015. Altered Expression of Fibrosis Genes in Capsules of Failed Ahmed Glaucoma Valve Implants. *PLOS ONE* [online]. **10**(4), e0122409. ISSN 1932-6203. Dostupné

z: doi:10.1371/journal.pone.0122409

Mitomycin C, 2020. *Stemcell* [online]. Dostupné z: <https://www.stemcell.com/mitomycin-c.html>

NAPIER, H.R.L. a S.H. KIDSON, 2007. Molecular events in early development of the ciliary body: A question of folding. *Experimental Eye Research* [online]. **84**(4), 615–625. ISSN 00144835. Dostupné z: doi:10.1016/j.exer.2006.07.012

NILFORUSHAN, Naveed, Maryam YADGARI, Arezoo ASTARAKI a Arezoo MIRAFTEBI, 2017. Comparison of the long-term outcomes of resident versus attending performed trabeculectomy. *Journal of Current Ophthalmology* [online]. **29**(3), 169–174. ISSN 24522325. Dostupné z: doi:10.1016/j.joco.2017.02.002

O. JIRSÁK, F. SANETRIK, D. LUKÁŠ, V. KOTEK, L. MARTINOVÁ a J. CHALOUPEK, 2006. A Method of Nanofibres Production from a Polymer Solution Using Electrostatic Spinning and A Device for Carrying out the Method. 1673493. 2006. PARIY, I.O., A.A. IVANOVA, V.V. SHVARTSMAN, D.C. LUPASCU, G.B. SUKHORUKOV, M.A. SURMENEVA a R.A. SURMENEV, 2020. Poling and annealing of piezoelectric Poly(Vinylidene fluoride) micropillar arrays. *Materials Chemistry and Physics* [online]. **239**, 122035. ISSN 02540584. Dostupné z: doi:10.1016/j.matchemphys.2019.122035

PVDF, 2015. *Titan-plastimex* [online]. Dostupné z: <http://titan-plastimex.cz/index.php/produkty/item/10-pvdf-georg-fischer-gf>

QUIGLEY, H A, 2006. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *British Journal of Ophthalmology* [online]. **90**(3), 262–267. ISSN 0007-1161. Dostupné z: doi:10.1136/bjo.2005.081224

RAZEGHINEJAD, M. Reza, Shane J. HAVENS a L. Jay KATZ, 2017. Trabeculectomy bleb-associated infections. *Survey of Ophthalmology* [online]. **62**(5), 591–610. ISSN 00396257. Dostupné z: doi:10.1016/j.survophthal.2017.01.009

RŮŽIČKOVÁ, Eva, 2016. *Glaukom: průvodce ošetřujícího lékaře*. ISBN 978-80-7345-473-9.

SAIKA, Shizuya, Osamu YAMANAKA, Takayoshi SUMIOKA, Takeshi MIYAMOTO,

Ken-ichi MIYAZAKI, Yuka OKADA, Ai KITANO, Kumi SHIRAI, Sai-ichi TANAKA a Kazuo IKEDA, 2008. Fibrotic disorders in the eye: Targets of gene therapy. *Progress in Retinal and Eye Research* [online]. **27**(2), 177–196. ISSN 13509462. Dostupné z: doi:10.1016/j.preteyeres.2007.12.002

SELHORST, John a Yanjun CHEN, 2009. The Optic Nerve. *Seminars in Neurology* [online]. **29**(01), 029–035. ISSN 0271-8235, 1098-9021. Dostupné z: doi:10.1055/s-0028-1124020

STRÁNSKÁ DENISA, 2018. *Nanovláknenné membrány jako nosiče léčiv*. Hradec Králové. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové.

SULTANA, Tamanna, Ho VAN HAI, Myeongki PARK, Sun-Young LEE a Byong-Taek LEE, 2020. Controlled release of Mitomycin C from modified cellulose based thermogel prevents post-operative de novo peritoneal adhesion. *Carbohydrate Polymers* [online]. **229**, 115552. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2019.115552

Technologie, 2015. *Nanopharma* [online]. Dostupné z: <https://www.nanopharma.cz/cs/produkty-a-technologie/technologie>

Technologie nanospider, 2004. *Elmarco* [online]. Dostupné z: <https://www.elmarco.cz/ns-technologie>

THAM, Yih-Chung, Xiang LI, Tien Y. WONG, Harry A. QUIGLEY, Tin AUNG a Ching-Yu CHENG, 2014. Global Prevalence of Glaucoma and Projections of Glaucoma Burden through 2040. *Ophthalmology* [online]. **121**(11), 2081–2090. ISSN 01616420. Dostupné z: doi:10.1016/j.ophtha.2014.05.013

Trabeculectomy, 2011. *Hopkins medicine* [online]. Dostupné z: <https://www.hopkinsmedicine.org/wilmer/services/glaucoma/book/ch17s01.html>

Trabeculectomy, 2019. *Glaucoma-association* [online]. Dostupné z: <https://www.glaucoma-association.com/about-glaucoma/treatments/surgery/trabeculectomy>

Trabeculectomy surgery, 2018. *Healing tourism* [online]. Dostupné z: <https://www.healingtourism.com/specialities-detail/trabeculectomy-surgery>

UNGAI-SALÁNKI, Rita, Beatrix PETER, Tamás GERECSEI, Norbert ORGOVAN, Robert HORVATH a Bálint SZABÓ, 2019. A practical review on the measurement tools for cellular adhesion force. *Advances in Colloid and Interface Science* [online]. **269**, 309–333. ISSN 00018686. Dostupné z: doi:10.1016/j.cis.2019.05.005

VOJTOVÁ, Lucy, 2016. Tkáňové inženýrství - od teorie k praxi. In: . Brno.

WADUTHANTHRI, Kosala D., Yuan HE, Carlo MONTEMAGNO a Sibel CETINEL,

2019. An injectable peptide hydrogel for reconstruction of the human trabecular meshwork. *Acta Biomaterialia* [online]. **100**, 244–254. ISSN 17427061. Dostupné z: doi:10.1016/j.actbio.2019.09.032

WANG, Elizabeth (Xiaomeng) a Xin JIANG, 2020a. Stem cells from trabecular meshwork cells can secrete extracellular matrix. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. **523**(2), 522–526. ISSN 0006291X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2019.12.080

WANG, Elizabeth (Xiaomeng) a Xin JIANG, 2020b. Stem cells from trabecular meshwork cells can secrete extracellular matrix. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. **523**(2), 522–526. ISSN 0006291X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2019.12.080

WANG, Jun-Yi, Guo-ge HAN, Jing WANG, Hai-Feng MEI a An-Huai YANG, 2009. BMP-7: Therapeutic target for ocular fibrotic disorders. *Bioscience Hypotheses* [online]. **2**(6), 413–416. ISSN 17562392. Dostupné z: doi:10.1016/j.bihy.2009.02.012

WISCHKE, Christian, Axel T. NEFFE, Bui Duc HANH, Christine F. KREINER, Katrin STERNBERG, Oliver STACHS, Rudolf F. GUTHOFF a Andreas LENDLEIN, 2013. A multifunctional bilayered microstent as glaucoma drainage device. *Journal of Controlled Release* [online]. **172**(3), 1002–1010. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2013.10.021

WU, Jiahui, Oliver H. BELL, David A. COPLAND, Alison YOUNG, John R. POOLEY, Ryea MASWOOD, Rachel S. EVANS, Peng Tee KHAW, Robin R. ALI, Andrew D. DICK a Colin J. CHU, 2020. Gene Therapy for Glaucoma by Ciliary Body Aquaporin 1 Disruption Using CRISPR-Cas9. *Molecular Therapy* [online]. **28**(3), 820–829. ISSN 15250016. Dostupné z: doi:10.1016/j.ymthe.2019.12.012

XIE, Yongfang, Mingling WANG, Yang CONG, Min CHENG, Sheng WANG a Guohui WANG, 2018. The pilocarpine-induced ciliary body contraction affects the elastic modulus and collagen of cornea and sclera in early development. *Biomedicine & Pharmacotherapy* [online]. **108**, 1816–1824. ISSN 07533322. Dostupné z: doi:10.1016/j.biopha.2018.10.032

YALCINKAYA, Fatma, 2019. Preparation of various nanofiber layers using wire electrospinning system. *Arabian Journal of Chemistry* [online]. **12**(8), 5162–5172. ISSN 18785352. Dostupné z: doi:10.1016/j.arabjc.2016.12.012

ZALEWSKA, Renata, Joanna RESZEĆ, Wojciech KISIELEWSKI a Zofia MARIK, 2016. Metalloproteinase 9 and TIMP-1 expression in retina and optic nerve in absolute

angle closure glaucoma. *Advances in Medical Sciences* [online]. **61**(1), 6–10. ISSN 18961126. Dostupné z: doi:10.1016/j.advms.2015.07.007

ZHANG, Heng, Fangzhou JI, Yunhong ZHANG, Zhicheng PAN a Bo LAI, 2018. Catalytic ozonation of N,N-dimethylacetamide (DMAC) in aqueous solution using nanoscaled magnetic CuFe₂O₄. *Separation and Purification Technology* [online]. **193**, 368–377. ISSN 13835866. Dostupné z: doi:10.1016/j.seppur.2017.10.028

ZHAO, Wei-Chen, Ge LI, Chu-Yi HUANG a Jun-Lin JIANG, 2019. Asymmetric dimethylarginine: An crucial regulator in tissue fibrosis. *European Journal of Pharmacology* [online]. **854**, 54–61. ISSN 00142999. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejphar.2019.03.055