

ZKOUŠKA HEMOKOMPATIBILITY III. - DESTIČKY

Výsledek č. TH03010288 – V3

Číslo projektu: **TH03010288**

Název projektu: **Využití zkoušek hemokompatibility pro zdravotnické prostředky na bázi pokročilých materiálů**

1. Účel

Účelem SOP je stanovení postupu při hodnocení trombózy *in vitro* u biologického hodnocení zdravotnických prostředků zahrnujících zkoušky na interakce s krví v souladu s normou ČSN EN ISO 10993-4.

2. Definice, zkratky

Destičky – bezjaderná buněčná tělíska přítomná v krvi a přispívající k procesu trombózy krve tím, že adherují k povrchům, uvolňují faktory a/nebo agregují za vzniku hemostatické uzávěry

Destičky adherující – materiál nebo zdravotnický prostředek, který má tendenci umožňovat nebo podporovat uchycení destiček na svém povrchu

Antikoagulans – činidlo, které brání nebo oddaluje koagulaci krve (heparin, EDTA, citrát sodný)

Hemokompatibilní – snášenlivý s krví: zdravotnický prostředek nebo materiál zdravotnického prostředku, který je schopen přicházet do styku s krví aniž by způsobil jakékoli znatelné klinicky významné nepříznivé reakce, jako je trombóza, hemolýza, aktivace destiček, leukocytů a komplementu a nebo jinou s krví související nepříznivou událost

Plná krev – nefrakcionovaná krev odebraná od lidského dárce

ELISA – Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay – heterogenní enzymová imunoanalýza

PLT – počet krevních destiček

PF-4 – destičkový faktor

ZP – zdravotnický prostředek

NK – negativní kontrola

PK – pozitivní kontrola

3. Textová část

Text tohoto SOP byl vypracován v souladu s normou:

- ČSN EN ISO 10993-4 Biologické hodnocení zdravotnických prostředků – Část 4: Výběr zkoušek na interakce s krví, Prosinec 2017

3.1. Princip metody

V první fázi testování - fáze expozice, je zdravotnický prostředek vystaven interakci s krví za definovaných podmínek. Jako testovací systém se používá krev od dobrovolných dárců ošetřená antikoagulantem. Expozice krve zdravotnickému prostředku se provádí v Chandlerově smyčce, která simuluje fyziologický krevní tok.

Po fázi expozice následuje zpracování krve a změření jednotlivých požadovaných parametrů. Hodnocené parametry – viz Popis metody.

3. 2. Popis metody

Metoda slouží k posuzování a hodnocení aktivace destiček. Hodnotí se počet krevních destiček (% ztráty) a jejich aktivace. Aktivace destiček se projevuje růstem koncentrace krevních degranulačních proteinů, konkrétně destičkového faktoru 4 (PF-4). PF4 je protein nacházející se v alfa granulách destiček, který se ve velkém množství uvolňuje po aktivaci destiček.

Dále se hodnotí počty destiček před a po působení zdravotnického prostředku. Tyto hodnoty jsou důležité pro odhad ztráty aktivovaných destiček zachycených při tvorbě trombu.

Při aktivaci dochází také ke změnám morfologie destiček a jejich shlukování, což představuje další parametr, který se měří a hodnotí v rámci této metody.

Metody měření

Počet destiček se stanovuje pomocí hematologického analyzátoru

Aktivační protein PF-4 se stanovuje pomocí komerčních ELISA souprav

Morfologie – slouží jako doplňkový parametr a hodnotí se podle potřeby mikroskopický preparát

3.3. Provedení zkoušky

Při zkoušce se provádí měření a hodnocení:

- krve exponované zdravotnickým prostředkem
- samotné krve bez ovlivnění zdravotnickým prostředkem – negativní kontrola
- krve exponované materiálem, který způsobuje známé změny hodnocených parametrů - pozitivní kontrola

Exponovanou krev, pozitivní a negativní kontroly testujeme v duplikátech

Kontroly

Negativní kontrola – jako negativní kontrola slouží BPT hadičky naplněné krví o délce 30 cm a průměru 4,80 mm bez přidaného zdravotnického prostředku.

Pozitivní kontrola – jako pozitivní kontrola slouží hadičky z černé gumy naplněné krví o průměru 4,80 mm a délce 30 cm, nebo BPT hadičky naplněné borosilikátovými skleněnými kuličkami bez přidaného zdravotnického prostředku.

- **3.3.1. Odběr krve**

Pro *in vitro* testování hemokompatibility se využívá lidská krev dobrovolných zdravých dárců. Dárci jsou před odběrem seznámeni s účelem využití darované krve a podepíší informovaný souhlas dobrovolného dárce s odběrem periferní krve pro vědecké (výzkumné) účely. Odběr probíhá vždy ráno na lačno v prostorách laboratoře VUOS odběrovou zdravotní sestrou. Odběr žilní krve probíhá při poloze v sedě z paže dárce. Místo vpichu je těsně před odběrem dezinfikováno. Zatažení paže by nemělo trvat déle než jednu minutu. Po nabodnutí žíly je nutné turniket z paže sundat a vyhnout se pumpování paže.

Krev je odebrána vakuovým systémem do zkumavek VACUETTE bez přísad. Objem jedné zkumavky je 4 ml a jednomu dárci je odebráno celkem šest zkumavek. Při použití vakuových systémů se vloží vhodná jehla do držáku, palcem pod místem odběru se stabilizuje poloha žíly, provede se venepunkce a poté se postupně nasazují zkumavky. Vakuová zkumavka se nesmí nasadit na vnitřní jehlu držáku před venepunkcí, protože by se vakuum ve zkumavce narušilo. Jakmile krev začne pomocí vakua vtékat do zkumavky, lze odstranit turniket. Vakuum ve zkumavce zajistí přiměřené naplnění zkumavky na požadovaný objem.

Ihned po odběru je do každé zkumavky aplikován heparin v celkovém poměru 1,7 IU/ml. Tedy 1,36 μ l zásobního injekčního roztoku 5000 IU/ml do 4 ml krve. Krev je s antikoagulantem promíchána pomocí jemného opakovaného převrácení zkumavek.

- **3.3.2. Expozice krve testovanému zdravotnickému prostředku**

Expozice probíhá v systému Chandlerovy smyčky, která je složena z vodní lázně a rotoru s držákem na hadičky. Vodní lázeň se naplní vodou tak, aby hladina dosahovala prostředního šroubu držáku hadiček. Termostat se nastaví na 37 °C a zapne se ohřev. K zahájení ohřevu je nutná dostatečná hladina vody a připojený rotor k vodní lázni. Při ohřevu se doporučuje zapnout rotor, aby se usnadnilo promíchání ohřáté vody. Necháme ustálit teplotu a vložíme vzorky k testování.

Testovaný sterilní zdravotnický materiál umístíme do BPT hadiček o vnitřním průměru 4,80 mm a délce 30 cm. Hadičku předtím propláchneme fyziologickým roztokem (0,9% NaCl). Jako negativní kontrola slouží BPT hadičky o stejné délce. Pozitivní kontrolu tvoří hadičky z černé gumy o průměru 4,80 mm a délce 30 cm, případně BPT hadičky naplněné borosilikátovými skleněnými kuličkami. Kontrolní hadičky také propláchneme fyziologickým roztokem před naplněním krví. Všechny vzorky testujeme v duplikátech, tedy 2 x ZP, 2x NK, 2x PK na jednoho dárce krve.

Takto připravené hadičky naplníme krví. Krev před aplikací promícháme převrácením zkumavek. Do každé hadičky nasajeme pomocí podtlaku obsah jedné odběrové zkumavky. Podtlak vytvoříme tak, že jeden konec hadičky vložíme do zkumavky s krví a na druhý konec umístíme 10 ml injekční stříkačku a pomalu

táhneme píst do takové pozice, dokud se hadička nenaplní krví. Naplněné hadičky spojíme do kruhu pomocí 2 cm dlouhých spojovacích hadiček a větším průměru (MPH 9 x 11,4 mm).

Naplněné hadičky uzavřené do kruhu připevníme pomocí klipů do držáku Chandlerovy smyčky a zapneme rotaci na 15 RPM. Necháme rotovat 30 minut při teplotě vody 37 °C. Po skončení expozice sundáme hadičky z přístroje a vypustíme krev do uzavíratelných 2 ml zkumavek.

- **3.3.3. Zpracování krve**

Počet trombocytů

Pro měření počtu trombocytů se krev již nijak nezpracovává a po fázi expozice je co nejrychleji provedeno měření na hematologickém analyzátoru.

Plazma pro PF-4

Exponovanou krev v 2 ml zkumavkách necháme centrifugovat při 4 °C a 1500 x g (přibližně 4000 RPM) po dobu 15 minut. Poté odebereme oddělenou plazmu do nových zkumavek. Plazmu použijeme pro další testování a nebo pokud potřebujeme nashromáždit větší počet vzorků, vzorky necháme zamrazit v hluboko mrazícím boxu při – 80 °C pro pozdější testování.

Morfologie destiček (krevní nátěr)

Morfologie destiček je hodnocena pomocí sledování mikroskopického preparátu roztěru krve. Zhotovení a barvení krevního nátěru probíhá Pappenheimovou panoptickou metodou pro vzorky krve po expozici testovanému ZP. Připravíme si dvě čistá, suchá, předem odmaštěná podložní skla. Na jeden konec podložního sklíčka kápneme malou kapku krve (max. 10 µl). Šikmo přiložené druhé podložní sklo přiblížíme ke kapce krve, až se rozteče podél jeho hrany. Táhneme podložním sklem směrem dopředu. Krev se rovnoměrně rozprostře po celé ploše podložního skla.

Nátěr necháme zaschnout minimálně 10 minut při laboratorní teplotě. Barvíme na stojánku nad dřezem nebo nádobou Pappenheimovou panoptickou metodou. Zaschlý nátěr se zafixuje pokapáním koncentrovaným May-Grünwaldovým roztokem po dobu 3 – 5 min. Poté roztok slejeme. Neoplachujeme. Na minutu vložíme do May-Grünwaldova roztoku zředěnou destilovanou vodou v poměru 1:1. Opláchneme v destilované vodě. Následuje barvení roztokem Giemsa-Romanowski po dobu 15 minut. Barvivo ze sklíčka oplachujeme destilovanou vodou, dokud není stékající voda čistá. Necháme zaschnout a pozorujeme při zvětšení 1000x za použití imerzního oleje. Hodnotíme počet trombocytů, jejich morfologii a tvorbu shluků.

- **3.3.4. Podmínky zkoušky**

Fáze expozice

Teplota: 37 ± 2 °C
Délka expozice: 30 min

Zpracování krve

Teplota: $4 \pm 1 \text{ } ^\circ\text{C}$

• 3.3.5. Přístroje a zařízení

- Chandlerova smyčka (vodní lázeň s teplotou 37°C)
- odběrové zkumavky VACUETTE bez přísad
- BPT hadičky
- hadičky z černé gumy
- 2 ml zkumavky
- hlubokomrazicí box
- termostat
- hematologický analyzátor
- chlazená centrifuga
- spektrofotometr
- obvyklé laboratorní vybavení

• 3.3.6. Měření

Počet trombocytů

Počet trombocytů je měřen na hematologickém analyzátoru MEK-6500 Celltac Alpha (Nihon Kohden, Japonsko), obsluha viz SOP č. 126.

Po změření se výsledek zobrazí na monitoru. Výsledky jsou vždy hned po měření vytisknuty. Výtisk s výsledky se vlepi na formulář měření na hematologickém analyzátoru viz příloha č.1

Měření koncentrace destičkového faktoru 4 (PF-4)

Destičkový faktor PF-4 se stanovuje pomocí komerčního ELISA kitu. PF-4 Elisa kit (výrobce: Cusabio Technology LLC (USA), dodavatel: Baria s.r.o., kat.č. CSB E07882h). Před začátkem ELISA testu necháme pozvolna rozmrazit vzorky a vytemperovat na pokojovou teplotu stejně jako jednotlivé reagenty ELISA kitu. Analýzu provedeme podle návodu výrobce. Do 96jamkové destičky aplikujeme vzorky a standardy o známých koncentracích minimálně v duplikátech po 100 μl v každé jamce. Destičku inkubujeme při 37°C po dobu dvou hodin a následně po jejím vyprázdnění přidáme biotinovou protilátku. Inkubujeme při 37°C další hodinu. Poté destičku třikrát promyjeme a aplikujeme do každé jamky 100 μl HRP avidinu. Inkubujeme po dobu jedné hodiny a znovu promyjeme. Promytí opakujeme pětkrát. Do každé jamky napipetujeme 90 μl TMB substrátu a inkubujeme 15 – 30 minut při 37°C chráněné před světlem. Nakonec přidáme 50 μl stopovacího roztoku a změříme optickou denzitu pomocí spektrofotometru Epoch

(výrobce BioTek® Instrument, Inc., USA), obsluha viz SOP č. 283. V softwaru Gen 5 vytvoříme kalibrační křivku a získáme hodnoty koncentrací jednotlivých vzorků.

Po naměření absorbancí jsou všechny údaje (absorbance, koncentrace, kalibrační křivka, hodnoty CV) vytisknuty v souhrnném reportu, který obsahuje primární i sekundární údaje.

Morfologie destiček (krevní nátěr)

Hodnotíme počet trombocytů, jejich morfologii a tvorbu shluků.

Výsledky se zaznamenají volnou formou do ad hoc záznamu.

Kritéria akceptovatelnosti experimentu

- Výsledky stanoveného množství destiček jsou u negativní kontroly $\geq 20\%$ v porovnání s výsledky pozitivní kontroly (NK $\geq 20\%$ PK)
- Výsledky koncentrací markerů aktivace destiček jsou u pozitivní kontroly $\geq 20\%$ v porovnání s výsledky negativní kontroly (PK $\geq 20\%$ NK)

Pokud nejsou splněna tato kritéria, musí se experiment zopakovat.

3.4 Hodnocení výsledků

Počet trombocytů

Počet destiček je porovnán před expozicí a po expozici zdravotnického prostředku. Významný pokles destiček je způsoben adhezí, agregací, odloučením destiček nebo vznikem trombu na zdravotnických prostředcích.

Rozdíly v počtu destiček mezi exponovanou a kontrolní krví se budou hodnotit statisticky.

Měření koncentrace PF-4

PF-4 je protein nacházející se v alfa granulách destiček, který se ve velkém množství uvolňuje po aktivaci destiček. Porovnáme získané koncentrace PF-4 vzorků vystavených expozici testovaného zdravotnického materiálu s hodnotami kontrol. Výsledkem je koncentrace PF-4 v daných vzorcích, která odráží úroveň aktivace destiček. Čím vyšší je obsah PF-4 v plazmě oproti negativní kontrole, tím více daný zdravotnický prostředek aktivoval krevní destičky a je tedy z hlediska hemokompatibility méně vhodný k *in vivo* aplikaci.

Rozdíly v koncentracích PF-4 mezi exponovanou a kontrolní krví se budou hodnotit statisticky.

Morfologie

Slouží jako doplňkové hodnocení aktivace. Jsou porovnány mikroskopické preparáty negativní kontroly s preparáty exponované krve. Hodnotí se hlavně tvorba shluků trombocytů.

3.5. Závěrečná zpráva

Obsahuje minimálně následující informace:

- popis zdravotnického prostředku
- poměr velikosti zdravotnického prostředku k objemu krve (expoziční poměr)
- popis odběru krve
- použitý antikoagulant
- použitý kit ELISA soupravy
- použité přístroje
- naměřené výsledky
- hodnocení výsledků

4. Literatura

ČSN EN ISO 10993-4 Biologické hodnocení zdravotnických prostředků – Část 4: Výběr zkoušek na interakce s krví, Prosinec 2017