

Univerzita Hradec Králové

Přírodovědecká fakulta

Katedra biologie

Využití zkoušek hemokompatibility pro zdravotnické
prostředky se zaměřením na koagulaci

Bakalářská práce

Autor: Renata Rybáriková

Studijní program: Prezenční

Studijní obor: Biologie a chemie se zaměřením na vzdělávání

Vedoucí práce: RNDr. Alena Myslivcová Fučíková, Ph.D.

Odborný konzultant: Ing. Petra Plodíková, Výzkumný ústav organických syntéz, Synthesia

Hradec Králové
Červenec 2019



Zadání bakalářské práce

Autor: Renata Rybáriková

Studium: S16CH109BP

Studijní program: B1407 Chemie

Studijní obor: Biologie se zaměřením na vzdělávání, Chemie se zaměřením na vzdělávání

Název bakalářské práce: **Využití zkoušek hemokompatibility pro zdravotnické prostředky se zaměřením na koagulaci**

Název bakalářské práce AJ: Use of haemocompatibility tests for medical devices with a focus on coagulation

Cíl, metody, literatura, předpoklady:

Bakalářská práce se zabývá hemokompatibilitou zdravotnických prostředků. Cílem je navrhnout metody zkoušek na vyhodnocení interakce zdravotnických prostředků s krví, zejména pro zkoušky koagulace, které by mohly prokázat bezpečné použití zdravotnických prostředků v klinické praxi. Teoretická část obsahuje základní informace z oblasti hematologie, principu koagulace a především informace o metodách zkoušek hemokompatibility. Součástí praktické části je aplikace navržených metod zkoušek koagulace a jejich vyhodnocení.

SIEDLECKI, Christopher A. *Hemocompatibility of Biomaterials for Clinical Applications*. United Kingdom: Woodhead publishing, 2017, 469 s. ISBN: 978-0-08-100497-5.

ČSN EN ISO 10993-4. *Biologické hodnocení zdravotnických prostředků-část 4: Výběr zkoušek na interakce s krví*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2017.

SAKALOVÁ, Adriena LIPŠIČ, Tomáš a kolektiv. *Hematológia a transfuziológia*. Žilina: Nakladatelství Osveta, 1995, 527 s. ISBN: 80-217-0444-6.

Garantující pracoviště: Katedra biologie,
Přírodovědecká fakulta

Vedoucí práce: RNDr. Alena Myslivcová Fučíková, Ph.D.

Datum zadání závěrečné práce: 6.1.2018

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala pod vedením vedoucího práce samostatně a že jsem v seznamu použité literatury uvedla všechny parametry, z kterých jsem vycházela.

V Hradci Králové dne Podpis

Poděkování

Děkuji vedoucí mé bakalářské práce RNDr. Aleně Myslivcové -Fučíkové, Ph.D. za přidělení tématu, za odborné konzultace, pomoc při zpracování bakalářské práce a zprostředkování spolupráce s Výzkumným ústavem organických syntéz, Synthesia a.s.

Děkuji Ing. Petře Plodíkové, vedoucí testovacího pracoviště VUOS a Mgr. Monice Roupcové za odborné konzultace a pomoc při hledání teoretických i praktických řešení dané problematiky. Také děkuji za poskytnutí prostoru a prostředků potřebných pro vykonání praktické části mé práce.

Poděkování také patří Mgr. Martině Nalezinkové, která byla spoluřešitelkou zadaného tématu. Děkuji za pomoc při hledání vhodných zdrojů, odborné konzultace, a především za pomoc při realizování praktické části a vyhodnocení výsledků.

Granty

Tato bakalářská práce byla podpořena následujícími granty a projekty:

TAČR TH03010288 Využití zkoušek hemokompatibility pro zdravotnické prostředky na bázi pokročilých materiálů

Anotace

RYBÁRIKOVÁ, R. *Využití zkoušek hemokompatibility pro zdravotnické prostředky se zaměřením na koagulaci*. Hradec Králové, 2019. Bakalářská práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Hradec Králové.

Bakalářská práce se zabývá hemokompatibilitou zdravotnických prostředků. Cílem je navrhnout metody zkoušek na vyhodnocení interakce zdravotnických prostředků s krví, zejména pro zkoušky koagulace, které by mohly prokázat bezpečné použití zdravotnických prostředků v klinické praxi. Teoretická část obsahuje základní informace z oblasti hematologie, principu koagulace, a především informace o metodách zkoušek hemokompatibility. Součástí praktické části je aplikace navržených metod zkoušek koagulace a jejich vyhodnocení.

Annotation

RYBÁRIKOVÁ, R. Use of haemocompatibility tests for medical devices with a focus on coagulation. Hradec Králové, 2019. Bachelor thesis at the Faculty of Science, University of Hradec Králové.

The bachelor thesis applies to hemocompatibility of medical devices. The main aim is to propose testing methods to evaluate the interaction of medical devices with blood, especially for coagulation tests, which could prove safety of using medical devices in clinical applications. The theoretical part contains basic information from the field of hematology, coagulation and information about methods of hemocompatibility testing. Practical part is consist of applications of the methods of coagulation tests and their evaluation.

Obsah

Seznam zkratk	9
1 Úvod	10
2 Teoretická část	11
2.1 Koagulační systém	12
2.1.1 Plazmatické koagulační faktory	12
2.1.2 Koagulační kaskáda	24
2.1.3 Antikoagulační systém	26
2.2 Interakce zdravotnického prostředku s krví	27
2.2.1 Kardiovaskulární zdravotnické prostředky	28
2.3 Metody zkoušek	30
2.4 Zkoušky na koagulaci	32
2.4.1 Testy ELISA na stanovení komplexu trombin-antitrombin (TAT), F1.2 a fibrinopeptid A (FPA)	32
2.4.2 Parciální tromboplastinový čas (PTT)	33
2.4.3 Využití chromogenních substrátů na zkoušku tvorby trombinu	33
2.4.4 Degradací produkty fibrinogenu a fibrinu (FDP)	34
2.4.5 Měření hladiny D-dimeru	34
2.4.6 Chandlerova smyčka	34
3 Praktická část	36
3.1 Testování koagulace	37
3.2 Odběr krve	37
3.3 Dynamická zkouška pomocí Chandlerovy smyčky	37
3.4 Statická zkouška	39
3.5 ELISA test na fibrinopeptid A a trombin-antitrombin komplex	39
4 Diskuze	47
5 Závěr	49

Seznam zkratk

D-dimer	speciální produkty degradace fibrinu sestávající z dimeru D-fragmentu
ELISA	heterogenní enzymová imunoanalýza (enzyme-linked immunosorbent assay)
F1.2	nekatalytický fragment odštěpený z protrombinu při jeho konverzi na trombin
FDP	fibrin-degradační produkty
FI	fibrinogen
FII	protrombin
FIII	tkáňový faktor
FIV	vápník
FV	proakcelerin
FVII	prokonvertin
FVIII	antihemofilický faktor A
FIX	Antihemofilický faktor B
FX	Stuart-Prower faktor
FXI	Rosenthalův faktor
FXII	Hagemanův faktor
FXIII	Faktor stabilizující enzym
FPA	fibrinopeptid A
HMWK	Fitzgeraldův faktor
PK	Fletcherův faktor
PTT	parciální tromboplastinový čas
PVC	polyvinylchlorid
TAT	trombin-antitrombin komplex
TMB	tetramethylbenzidin, (3,3',5,5' – tetramethylbenzidine)
vWF	von Willebrandův faktor

1 Úvod

Na výrobu zdravotnických prostředků se používá mnoho odlišných materiálů a je tedy potřeba před klinickým použitím daný materiál či zdravotnický prostředek otestovat, jestli jeho použitím nedochází k negativním reakcím krve.

Zdravotnické prostředky přicházející do styku s krví je potřeba otestovat na hemokompatibilitu. Jestliže je zdravotnický prostředek hemokompatibilní, smí se v praxi používat, aniž by hrozila jakákoli negativní reakce při interakci zdravotnického prostředku s krví. Jestliže je prostředek nehemokompatibilní, při jeho interakci s krví by mohlo dojít k nechtěnému vyvolání hemostatického mechanismu (př. aktivace trombocytů, spuštění koagulační kaskády apod.), čímž by mohlo dojít k poškození zdravotnického prostředku (př. na implantované umělé cévě může vzniknout krevní sraženina a tím dojde k poškození jeho funkce).

Mezi zkoušky na hemokompatibilitu patří hemolýza a trombóza, která zahrnuje koagulaci, aktivaci krevních destiček apod. Velmi často dochází vlivem interakce krve a zdravotnického prostředku ke koagulaci krve, a proto je práce zaměřena především na popis funkcí a vlivů jednotlivých koagulačních faktorů a popis koagulačního mechanismu, jehož výsledkem je vznik sraženiny.

Součástí je také popis vzniku sraženiny vlivem přímého styku zdravotnického prostředku s krví a příklady kardiovaskulárních zdravotnických prostředků, jejichž hemokompatibilita je pro správné plnění jejich funkce klíčová. Zmíněny jsou také metody zkoušek na koagulaci.

Navrhnuté metody zkoušek byly v rámci praktické části aplikovány na různé typy zdravotnických prostředků. Pro porovnání výsledků byly provedeny statické i dynamické zkoušky na koagulaci.

2 Teoretická část

Hemokompatibilita vyjadřuje míru snášenlivosti materiálu s krví. Jestliže je zdravotnický prostředek hemokompatibilní, nemělo by dojít k žádné reakci při jeho interakci s krví. Klinické použití zdravotnického prostředku v přímém styku s krví často provází nepříznivé reakce, jako je aktivace krevních destiček, aktivaci komplementů a spuštění koagulační kaskády. Často dochází k poškození zdravotnických prostředků, jako jsou například katetry, umělé cévy a cévní stenty, a to zejména vlivem trombózy. Při výrobě zdravotnických prostředků je tedy potřeba vzít v potaz, zda je daný materiál kompatibilní s krví či ne [1].

Zda je daný zdravotnický prostředek hemokompatibilní lze určit pomocí zkoušek, při kterých se testuje materiál, z kterého je zdravotnický prostředek vyroben. Základními metodami je zkouška na hemolýzu a trombózu [2]. Je-li zdravotnický prostředek nekompatibilní, v postiženém místě se ihned spustí komplexní proces, tzv. hemostatický mechanismus (hemostáza) [3]. Hemostatický mechanismus se též aktivuje při poškození endotelu nebo poranění. Úlohou hemostatického mechanismu je přeměnit tekutou krev na sraženinu, která uzavře cévu. Po zahojení rány dojde k rozpuštění sraženiny a obnově cirkulace krve [3]. Hemostatický mechanismus se skládá z primární a sekundární fáze. V primární fázi dochází k agregaci a tvorbě destiček. Krevní destičky jsou aktivovány, díky čemuž se dokážou vedle sebe navázat v místě poranění. Následuje sekundární hemostáza, při které dochází k ukládání nerozpustného fibrinu, který je generován koagulační kaskádou. Fibrin vytvoří síť, ve které jsou začleněny krevní destičky. Vzniklá síť slouží ke stabilizaci krevní sraženiny [4]. Mezi faktory udržující hemostázu patří cévní stěna, trombocyty, tkáňová složka a plazmatický koagulační systém [3].

Úlohou cévní stěny je udržovat fluiditu a při poškození cévní stěny kontrolovat protrombotické děje. Při poškození vyvolá vazokonstrikci (reflexní smrštění), která zvýší protrombotické působení a sníží proudění krve. Vazokonstrikce funguje tak dlouho, dokud nedojde k aktivaci koagulačních systémů. Cévní stěna se skládá z endotelové vrstvy (endotelová vrstva je složená z endotelových buněk nasedajících na bazální laminu) a subendotelové vrstvy. Důležitou funkci má subendotelová vrstva, protože udržuje trombocyty v intaktním stavu a brání jejich adhezi na cévní stěnu. Dalším faktorem, který umožňuje udržet hemostázu je tzv. tkáňová složka, která uvolňuje ADP a tzv. tkáňový faktor [3].

Funkce trombocytů se nejvíce uplatňuje v primární hemostáze, při které dochází k postupné tvorbě fibrinové hemostatické zátky, která zastaví krvácení [5]. Trombocyty

zprostředkovávají mnoho interakcí mezi krví a cévní stěnou. Mají fosfolipidový povrch, který umožňuje navázání koagulačních faktorů, které jsou závislé na vitamínu K [3].

Poslední částí celého procesu je koagulační systém skládající se z mnoha dějů, díky kterým je umožněn vznik nerozpustného fibrinu, a tedy vznik sraženiny [3].

2.1 Koagulační systém

Koagulace krve společně s trombocyty fungují jako obranný mechanismus vůči krvácení. Dojde-li k poškození endotelu, spustí se ihned koagulační systém, který je koordinován trombocyty a vytvoří se fibrinová síť, která zachytí veškeré krevní elementy [6]. Trombocyty poskytují koagulační kaskádě trombogenní povrch. Během koagulace dochází ke zvyšování počtu krevních destiček v krvi, což umožňuje zesílení koagulační kaskády [7]. Celou reakci monitoruje tzv. antikoagulační systém, který je schopen koagulaci oddálit nebo ji případně blokovat. Jestliže dojde k narušení přirozené rovnováhy koagulačního a antikoagulačního systému, mohou se projevit onemocnění jako je například trombóza nebo hemofilie [6].

2.1.1 Plazmatické koagulační faktory

Koagulační faktory jsou nezbytnou součástí koagulačního systému. Vnitřní dráha koagulační kaskády se skládá z faktorů FI, FII, FIX, FX, FXI a FXII. Vnější dráha obsahuje faktory FI, FII, FVII a FX. Společná koagulační dráha se skládá z faktorů FI, FII, FV, FVIII, FX [8].

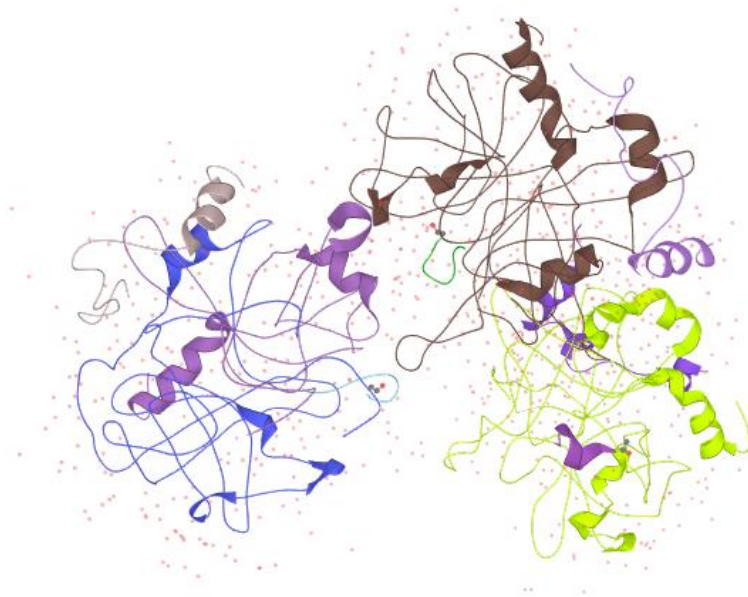
Tab.1: Faktory podílející se na koagulaci krve.

Faktor	Název	Místo tvorby	Biologický poločas	Funkce
FI	Fibrinogen	Játra	3-4 dní	Substrát
FII	Protrombin	Játra	2-3 dní	Serinová proteáza
FIII	Tkáňový faktor	Buňky tkáně		
FIV	Vápník			
FV	Proakcelerin	Játra	12-36 h	Kofaktor
FVII	Prokonvertin	Játra	4-8 h	Serinová proteáza
FVIII	Antihemofilický faktor A		8-16 h	Kofaktor

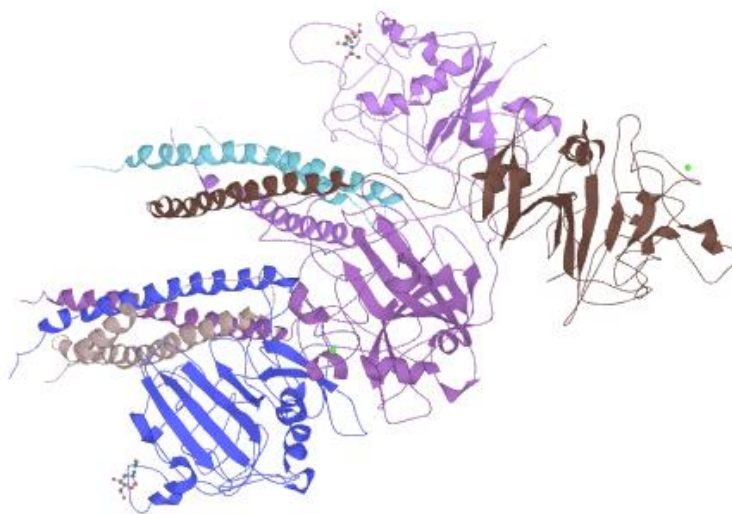
vWF	Willebrandův faktor	Endotel, megakaryocyty	2-12 h	Adheze trombocytů
FIX	Antihemofilický faktor B	Játra	18-36 h	Serinová proteáza
FX	Stuart-Prower faktor	Játra	2-3 dní	Serinová proteáza
FXI	Rosenthalův faktor	Játra	2-3 dní	Serinová proteáza
FXII	Hagemanův faktor	Játra	2 dny	Serinová proteáza
FXIII	Faktor stabilizující enzym	Játra	3-5 dní	Transamidáza
PK	Fletcherův faktor	Játra		Serinová proteáza
HMWK	Fitzgeraldův faktor	Játra	5-6 h	Kofaktor

Fibrinogen (FI) je glykoprotein přítomný v plazmě (v koncentraci 2-4 g/l) i trombocytech. Fibrinogen se v plazmě nachází ve formě dimeru složeného ze tří rozlišných párů polypeptidových řetězců α , β a γ , které jsou k sobě vázané disulfidickými můstky. Strukturu fibrinogenu udržují a stabilizují vápenaté ionty. Fibrinogen má skrytá vazebná místa, která jsou mnohdy dostupná až po konformační změně molekuly, ke které dojde nejčastěji přeměnou fibrinogenu na fibrin, anebo v některých případech také odštěpením menších částí, tzv. B. Má tři vazebná místa, kde se mohou navázat Ca^{2+} . Jestliže jsou vazebná místa obsazena, je FI chráněn vůči štěpení plazminem. Pro polymerizaci vláken fibrinogenu je nezbytná přítomnost cukerné složky na α a β řetězci. Řetězce fibrinogenu jsou kódovány geny umístěnými na 4. chromosomu. Fibrinogen se váže na membránový proteinový komplex trombocytů a na integrované i neintegrované receptory fibroblastů a specializované buňky (lymfoidní, endoteliální, nádorové, hemopoetické, aj.), čímž ovlivňuje jejich adhezi, agregaci a migraci. Fibrinogen umožňuje uvolnění vWF a podporuje agregaci trombocytů [3].

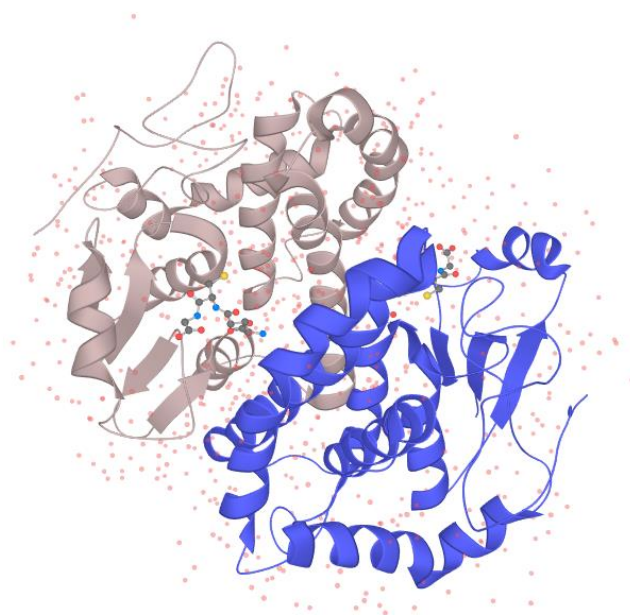
Deficit fibrinogenu způsobuje hypodysfibrinogenemii, což je vzácné onemocnění charakterizované sníženými hladinami dysfunkčního fibrinogenu. V některých případech se porucha projevuje zvýšenou krvácivostí, většinou je však porucha asymptomatická [9]. Neodostatek FI se též může projevit vrozenou afibrinogenemii, která je charakterizovaná úplnou nepřítomností fibrinogenu. Nejčastěji se příznaky projevují už u novorozenců, u kterých dochází ke krvácení z pupeční šňůry. V pozdějším věku se porucha projevuje gastrointestinálním krvácením, krvácením v genitourinálním traktu a v centrálním nervovém systému, přičemž obvykle bývá příčinou smrti intrakraniální krvácení [10].



Obr. 1: Struktura α -řetězce fibrinogenu.



Obr. 2: Struktura β -řetězce fibrinogenu.

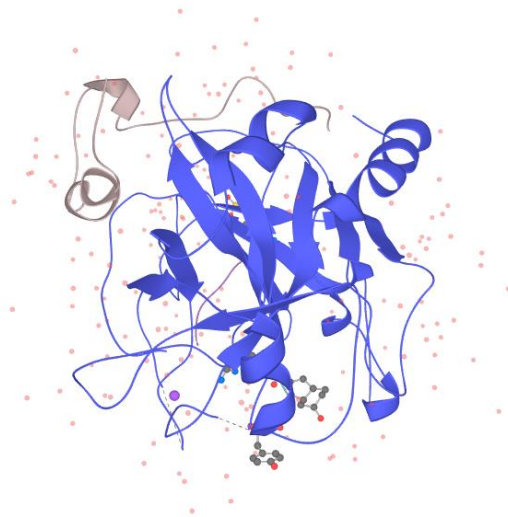


Obr. 3: Struktura γ -řetězce fibrinogenu.

Protrombin (FII) se skládá z 532 aminokyselin. Pomocí enzymu protrombinázy se mění na trombin (FIIa). Má koagulační i inhibiční účinky. Uplatňuje se při procesu hojení a zánětu, štěpí fibrinogen na fibrin, aktivuje trombocyty a faktory IX a XIII, a pomocí proteolýzy aktivuje faktory V a VIII [3].

Jedná se o nestabilní protein, který se štěpí na menší proteiny. Významný protein vznikající štěpením protrombinu je trombin, který má protizánětlivé účinky. Působení trombinu je indukováno aktivací receptorů, které aktivují proteázu nacházející se na monocytech, lymfocytech, endotelu a dendritických buňkách [11].

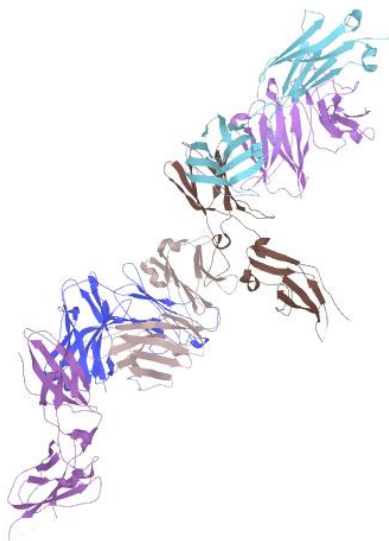
Nedostatek protrombinu je vzácná autosomálně recesivní porucha. Jedná se o nadměrné krvácení zapříčiněné vlivem nízké hladiny cirkulujícího FII. Jestliže je hladina protrombinu nižší než 10 % od normální hladiny jedná se o poruchu zvanou hypoprotrombinémie. Příznakem je závažné krvácení již od narození (z pupečnickové šňůry), krvácení sliznice, hemartróza, intrakraniální krvácení, gastrointestinální krvácení a menorrhagie. Další poruchou je tzv. dysprothrombinémie, která vzniká syntézou dysfunkčního proteinu. Příznaky jsou variabilní, závisí na množství zbytkové funkční aktivity [12].



Obr. 4: Struktura protrombinu.

Tkáňový faktor (TF) je membránový glykoprotein (z 263 aminokyselin). Umožňuje aktivaci hemostázy ihned po porušení cévy, kdy endotelové buňky vypustí TF. Tkáňový faktor nepotřebuje k vykonání své funkce žádné aktivační kroky. Slouží také jako signální receptor pro různé děje, jako například přesun vápníku v buňce, aktivace enzymů, exprese genů [3].

Tkáňový faktor se exprimuje určitými buňkami v cévní stěně a buňkami, které cévní stěnu obklopují, např. buňky hladkého svalstva cév. Ve vysokém množství vzniká v mozku, ledvinách, plicích a placentě. -V každém ze zmíněných orgánů je tkáňový faktor exprimován specifickými buňkami [7].



Obr. 5: Struktura tkáňového faktoru.

Kalcium (Faktor IV) aneb ionty vápenatého kationtu jsou nutné k udržení hemostázy. Pro hemokoagulaci je minimální potřebné množství Ca^{2+} 0,5 mmol/l. Zprostředkovává připojení γ karboxylové skupiny kyseliny glutamové na fosfolipidy u faktorů závislých na vitamínu K [3].

Proakcelerin (FV) jedná se o jednořetězcový glykoprotein. Primárně se syntetizuje v játrech a megakaryocytech. Zhruba 80 % FV obsaženého v krvi cirkuluje v plazmě a zbylé množství se ukládá do krevních destiček [13]. Minimální potřebné množství aktivního FV k zastavení krvácení je 10-15 %. Urychluje proteolytické štěpení protrombinu společně s Ca^{2+} a fosfolipidy [3]. Dojde-li k mutaci v genu F5, proakcelerin se stane rezistentní vůči štěpení a inaktivaci aktivovaným proteinem C (antikoagulační faktor), což způsobuje trombofilií a hemoragickou diatézu [14].

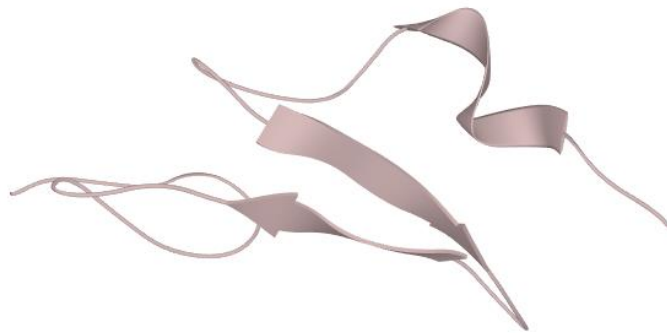


Obr. 6: Struktura proakcelerinu.

Prokonvertin (FVII) je jednořetězcový glykoprotein (z 406 aminokyselin). Vyskytuje se ve formě zymogenu a cirkuluje v krvi. V řetězci jsou přítomny glutamové kyseliny. Karboxylací glutamové kyseliny pomocí vitamínu K lze získat karboxylové sloučeniny. Během

koagulace je štěpen proteolýzou na aktivní serinovou proteázu FVIIa (stabilní asi 2,5 hodiny). Vytváří komplex s tkáňovým faktorem (tzv. vnější tenáza) a tím umocňuje jeho funkce [3].

Nedostatek prokonvertinu je vzácná vrozená autosomálně recesivní porucha způsobena mutací genu F7. Porucha se projevuje nadměrnou krvácivostí. Častým příznakem je krvácení z nosu, dásní a nadměrné krvácení při chirurgických zákrocích. Také se vyskytuje onemocnění intracerebrální hemoragie (krvácení do mozkového parenchymu) a hemartroza (přítomnost krve v kloubu). Přestože je deficit FVII spojen s nadměrnou krvácivostí, v některých případech se také objevuje zvýšená srážlivost krve [15].



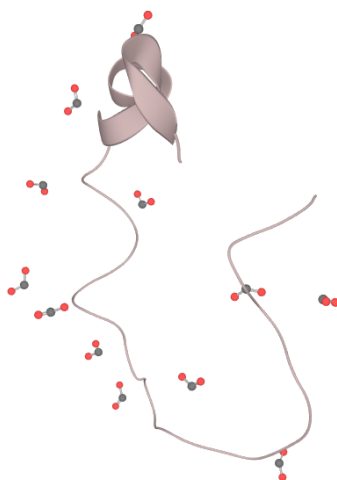
Obr. 7: Struktura prokonvertinu.

Antihemofilický faktor A (FVIII) je glykoprotein- β přítomný v plazmě. Skládá se z 2332 aminokyselin a váže se do komplexu s vWF. Aktivní FVII slouží jako kofaktor proteinů při aktivaci trombinu. Jeho nedostatek vede k hemofilii A (krvácivý defekt) [3]. Nedostatek aktivity koagulačního faktoru VIII způsobuje vzácné onemocnění hemofilii A. Jedná se o recesivní poruchu krvácení. Příznakem je nadměrné krvácení po úrazu nebo operaci. Závažnější formy hemofilie se projevují spontánním krvácením nebo nadměrným krvácením po lehkém traumatu do kloubů a svalů [16].



Obr. 8: Struktura Antihemofilického faktoru A.

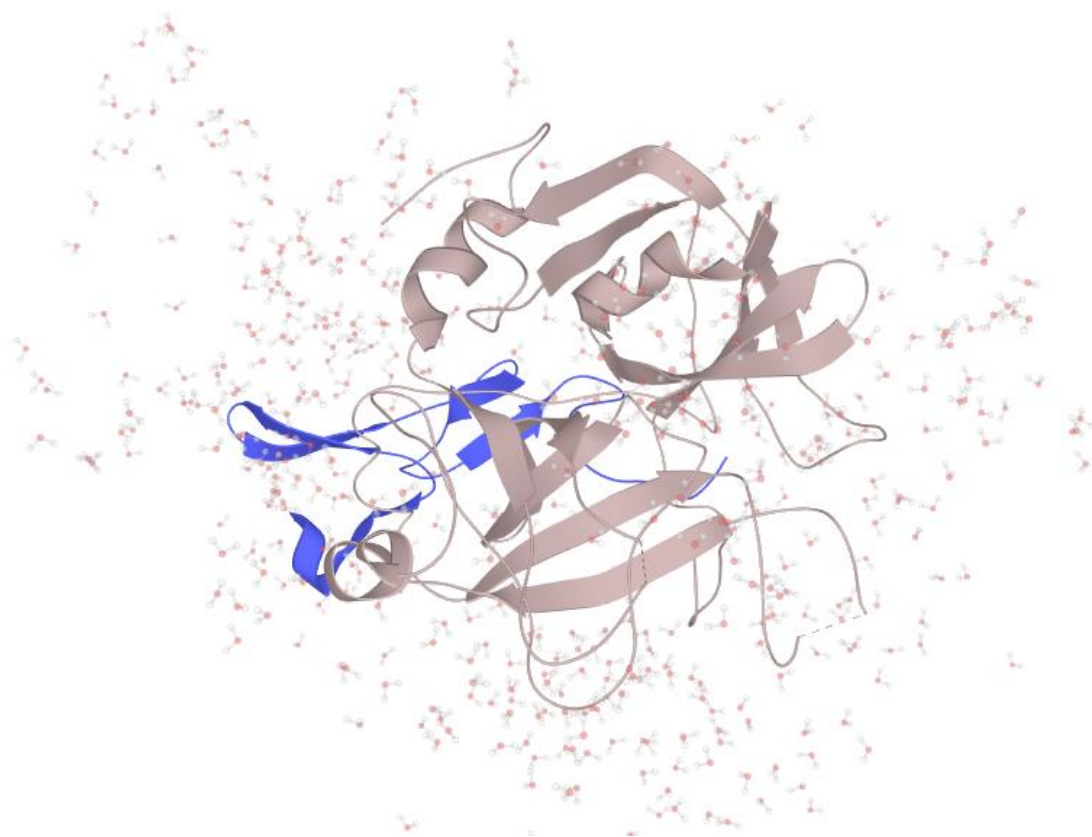
Christmas faktor (FIX) je jednořetězcový plazmatický glykoprotein. V plazmě se nachází ve formě zymogenu. V přítomnosti vápenatých iontů se přeměňuje na serinovou proteázu [17]. Štěpením FIX dochází ke vzniku dvou podjednotek vázaných dvěma disulfidickými můstky. Minimální množství k zastavení krvácení je 20-30 % [3]. Nedostatek koagulační aktivity faktoru IX způsobuje hemofilii B. Příznaky hemofilie B jsou opožděné a opakované krvácení před zahojením rány, spontánní kloubní a svalové krvácení, abnormální krvácení při operacích. Příznaky hemofilie B se častěji projevují v dětství a dospívání než v dospělosti [18].



Obr. 9: Struktura christmas faktoru.

Faktor Stuarta-Prowerové (FX) je z chemického hlediska dvouřetězcový glykoprotein. Skládá se z 11 skupin γ karboxyglutamové kyseliny. Aktivní FX je přítomen v koagulačně aktivním komplexu enzymu protrombinázy. Minimální hladina FX potřebná k zástavě krvácení je 20 % [3].

Deficit koagulačního faktoru X je autosomálně recesivní porucha krvácení. Příznaky se projevují častým krvácením z nosu a sliznice, menorrhagií a vzácně i hemartrozou. Porucha může být způsobena nízkou hladinou FX nebo syntézou dysfunkčního koagulačního faktoru X [19].



Obr. 10: Struktura faktoru Stuarta-Powerové.

Rosenthalův faktor (FXI) je glykoprotein, který cirkuluje v krvi ve formě zymogenu. K aktivaci FXI dochází v kontaktní fázi plazmatického koagulačního procesu. Snadno se váže na povrch trombocytů a na aniontové povrchy (př. sklo, kaolin, celit). Aktivuje se pomocí proteolýzy nebo trypsinem a trombinem [3].

Nedostatek faktoru XI je autosomální porucha krvácení vlivem snížené hladiny FXI v plazmě. Zvýšená krvácivost se projevuje především po úrazu nebo operaci. Kvůli snížené aktivitě a nesouladu s F11 antigenem se tato porucha dělí na častější křížově reaktivní negativní (CRM-) a vzácnější křížově reaktivní pozitivní (CRM+) [20].



Obr. 11: Struktura Rosenthalova faktoru.

Hagemanův faktor (FXII) je glykoprotein, který se v plazmě vyskytuje ve formě zymogenu. Při kontaktu FXII se subendoteliálními strukturami dochází k jeho aktivaci [3].

Při kontaktu s materiálem se FXII aktivuje pouze v přítomnosti negativně nabitých povrchů, jako je kaolin, sklo, ellagová a stearová kyselina. Hagemanův faktor objevil Oscar Ratnoff v roce 1950 [1].

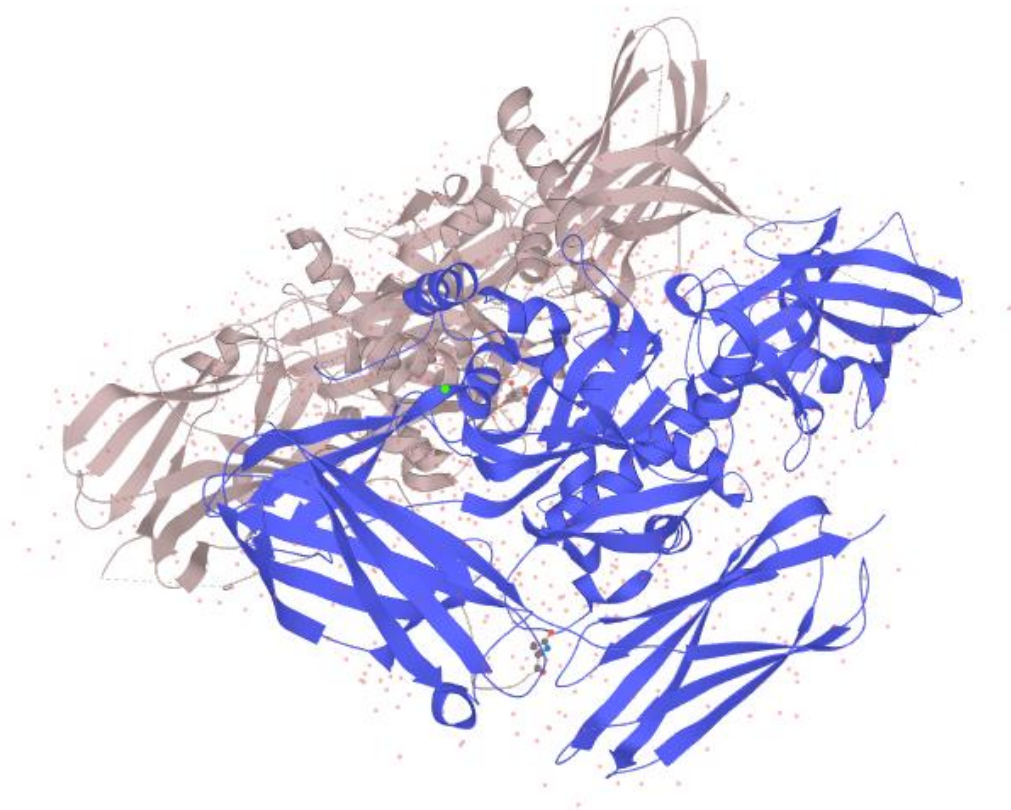
Porucha nízké hladiny FXII byla omylem objevená při provádění testů na srážení krve před chirurgickou operací. Příznakem je zvýšená tendence ke krvácení, výskyt mozkové apoplexie, těžké bolesti hlavy, bolesti břicha a různé formy alergie [21].



Obr. 12: Struktura Hagemanova faktoru.

Faktor stabilizující fibrin (FXIII) se nachází v plazmě jako zymogen navázán na fibrinogen i v komponentech buňky. Aktivuje se hydrolyzou pomocí trombinu. Během koagulační kaskády napomáhá stabilizaci fibrinové sraženiny spojením řetězců fibrinu, přičemž vzniká homopolymer. Pomáhá hojit rány a u žen v době těhotenství pomáhá při ochraně plodu [3].

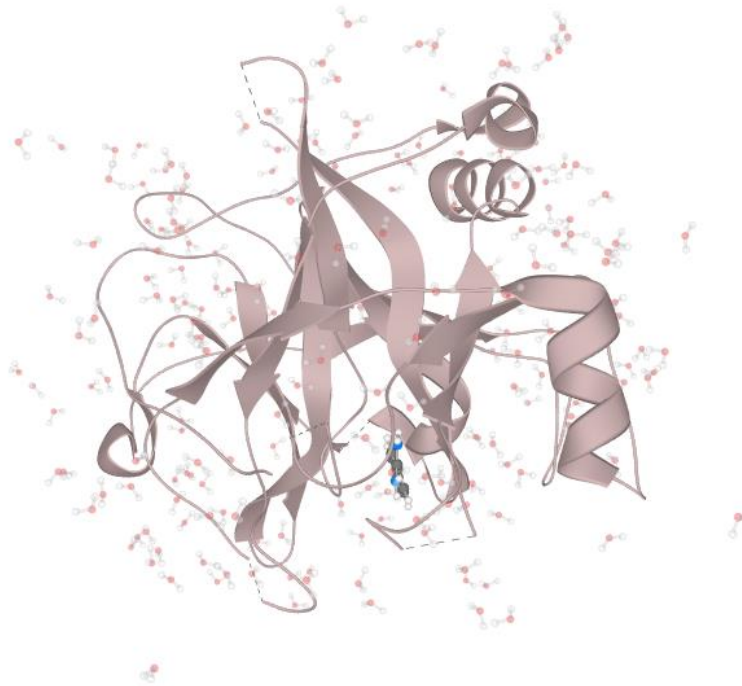
Nedostatek faktoru XIII je vrozená autosomálně recesivní porucha charakterizovaná zvýšeným krvácením a špatným hojením ran [22].



Obr. 13: Struktura faktoru stabilizující fibrin.

Fletcherův faktor (PK) je též známý jako prekalikrakin. Proteináza obsažena v krevní plazmě jako zymogen, který se váže na HMWK. Skládá se ze dvou lehkých a jednoho těžkého řetězce [3].

Nedostatek prekalikrakinu nezpůsobuje žádné zdravotní problémy. Při provedení krevních testů bývá pouze zaznamenán delší parciální tromboplastinový čas (PTT), který vypovídá o problémech s krvácením, příčinou však není nedostatek prekalikrakinu jako takový. Vzácně se vyskytnou problémy se srážením krve, krvácení nosu, žilní trombóza, srdeční infarkt a mrtvice. Jedná se však o obecné zdravotní problémy populace, takže vliv nedostatku prekalikrakinu na jejich vzniku není prokázán [23].



Obr. 14: Struktura Fletcherova faktora.

HMWK (Vysokomolekulární kininogeny) jsou plazmatické proteiny. Pomocí enzymu kininogenáza z nich vznikají kininy (vazoaktivní peptidy). Vážou se na povrch aktivních trombocytů a buňky endotelu. Umožňují aktivaci faktoru XII [3].

Pro tvorbu koagulačních faktorů II, VII, IX a X je nutná přítomnost vitamínu K, jeho nedostatek způsobuje poškození syntézy zmíněných faktorů. Syntéza probíhá v jaterních buňkách, kde glutamová kyselina usnadňuje gama-karboxylaci a vytvořená gama-karboxylová kyselina vytváří místo pro vazbu iontů vápníku, kde probíhá přeměna inaktivních zymogenů na serinové proteázy. Snížená syntéza faktorů je častá u jaterních onemocněních [24].

Deficit HMWK je autosomálně recesivní porucha koagulace. Nedostatek kininogenu se neprojevuje zvýšenou krvácivostí, ale vykazuje abnormální povrchově zprostředkovanou aktivaci fibrinolýzy [25].



Obr. 15: Struktura vysokomolekulárního kininogenu.

2.1.2 Koagulační kaskáda

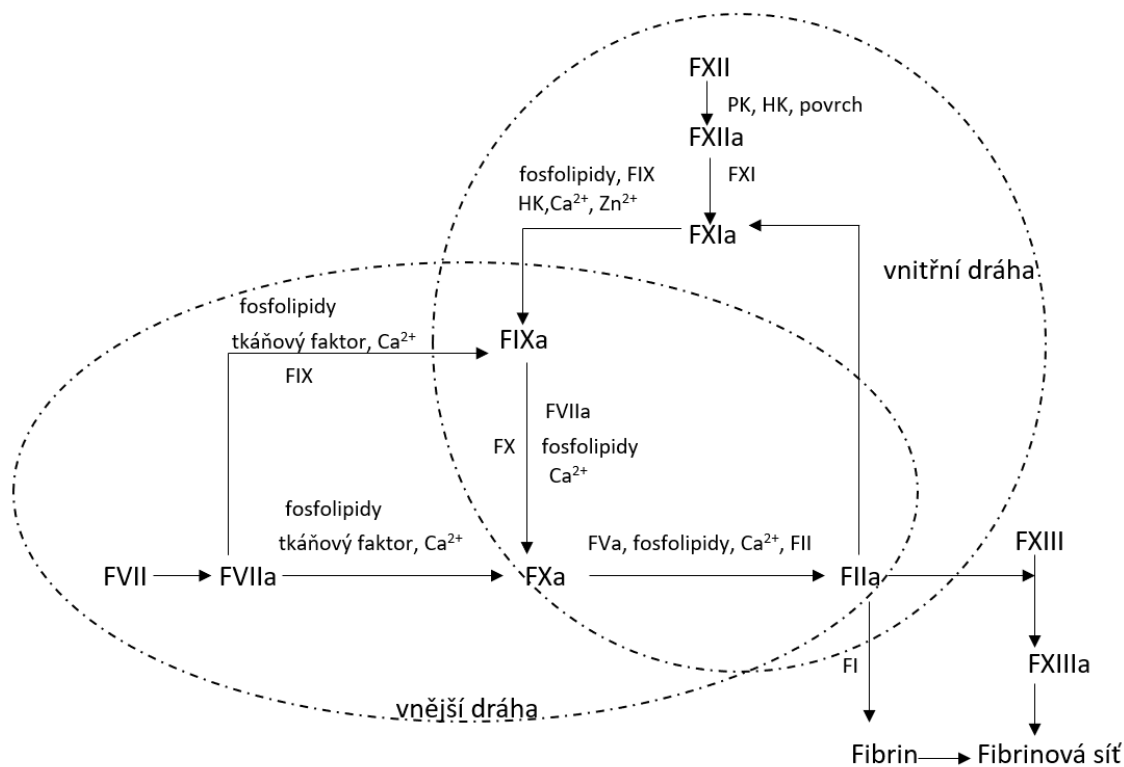
Principem koagulační kaskády je postupná aktivace všech koagulačních faktorů, které se bez potřebného aktivátoru (př. poranění endotelu) vyskytují ve formě prokoagulantů. Prokoagulační faktory spolu s antikoagulačními faktory regulují hemostázu a jejich cílem je během koagulační kaskády vyprodukovat trombus, tedy vznik sraženiny [26]. Koagulační kaskáda se skládá ze dvou paralelních drah, které jsou nazvané jako kontaktní aktivační dráha (vnitřní dráha) a dráha tkáňových faktorů (vnější dráha), a které jsou závislé na počátečním spouštěči [1]. Poslední fází koagulační kaskády je společná dráha, kde dochází k přeměně

fibrinogenu na nerozpustný fibrin, který se ve formě fibrinových polymerů zabudovává do fibrinové zátky. Vzniklá fibrinová síť stabilizuje sraženinu a vytváří hemostatickou zátku [11].

Vnější koagulační dráha je delší část koagulační kaskády, která pomáhá udržovat hemostázu při poškození cévy. Dráha se spustí uvolněním tkáňového faktoru TF, který se uvolňuje jen při poškození endotelu a ten aktivuje faktor XII, který je přítomen ve formě zymogenu a zaktivuje se na FXIIa. FXIIa funguje jako katalyzátor pro aktivaci FXI na FXIa a poté se hned FIX zaktivizuje na FIXa, který zase katalyzuje FX na FXa. Při každé aktivaci daného faktoru se zvýší jeho koncentrace v krvi. Aktivita vnější koagulační kaskády se v klinické praxi stanovuje jako částečný tromboplastinový čas (PTT) [8].

Vnitřní koagulační dráha je iniciována aktivací FXII a jeho přeměnou na FXIIa hned po vystavení endoteliálnímu kolagenu, který se vytvoří při poškození endotelu. FXIIa funguje jako katalyzátor a zaktivizuje FXI na FXIa, který způsobí aktivaci FIX na FIXa. Úlohou FIXa je katalyzovat FX na FXa. V téhle části koagulační dráhy dochází ke spojení vnitřní a vnější koagulační dráhy. Vnitřní koagulační dráha se měří jako protrombinový čas (PT) [8].

Společná dráha začíná aktivací FX na FXa, čemuž pomáhají komplexy tenáz. Tenázy mají dvě formy a to vnitřní (kofaktor FVIII, FIXa, fosfolipidy a Ca^{2+}) a vnější (FVII, TS a Ca^{2+}). Jakmile dojde k aktivaci FX zaktivuje se též FII na FIIa a FXa zaktivuje fibrinogen na fibrin. Trombin aktivuje FXI a také kofaktory V a VIII a FXIII. Podjednotky fibrinu vytvoří fibrinový řetězec a zároveň na ně působí FXIII, pomocí něhož fibrinová vlákna vytvoří fibrinovou síť, která stabilizuje trombocyty [8].



Obr.16: Koagulační kaskáda.

2.1.3 Antikoagulační systém

Pro ukončení koagulace je nutné deaktivovat koagulační faktory, aby se koagulace zastavila a nešířila se do dalších částí cévního systému. Zastavení koagulace zajišťuje antikoagulační systém, který se skládá z různých antikoagulantů. Nejčastěji se jedná o krevní bílkoviny s protisrážlivým účinkem [5].

Antitrombin III má inhibiční funkci, přičemž inhibuje především trombin a aktivovaný FX. Bývá indikován při snížené hladině antitrombinu v plazmě [27]. Antitrombin inhibuje serinové proteázy, které se vážou a inaktivují trombin. Enzymatická aktivita antitrombinu se zvyšuje v přítomnosti heparinu, což je způsobeno přítomností sulfátu na povrchu endotelových buněk heparinu [11].

Heparin zvyšuje aktivitu antitrombinu, a to indukcí změny konformace FXa a FIIa. Nefrakcionovaný heparin inhibuje FIXa, FXIa a FXIIa [28]. Jedná se o sulfátovaný glykosaminoglykan, který se účastní především inhibice vnitřní dráhy koagulační kaskády [1].

Protein C je serinová proteáza. Má antikoagulační, profibrolýtické a protizánětlivé účinky. Působením proteinu C se aktivuje trombin, který inhibuje aktivované FV a FVIII [11].

Protein S je glykoprotein závislý na přítomnosti vitamínu K. Syntetizuje se v hepatocytech a buňkách endotelu. V plazmě se vyskytuje ve volné i vázané formě, přičemž jako antikoagulant funguje volná forma proteinu S. Vázaná forma působí jako inhibitor komplementového systému. Hladina proteinu S se snižuje při zánětlivých stavech [11].

Protein Z je produkován v ledvinách. Má inhibiční účinky na FXa [11].

Antikoagulanty mají schopnost blokovat antikoagulační faktory a tím brání koagulaci krve. V klinické praxi se často užívá heparin, citrát sodný nebo EDTA [2]. Každý antikoagulant je svým účinkem specifický. Jako přímý antikoagulant je brán ten, který inhibuje trombin, který je klíčovým koagulačním faktorem. Je důležité stanovit a standardizovat vhodnou antikoagulaci, která umožňuje vyváženou inhibici koagulačních procesů, a přitom nenaruší funkce krevních buněk [1].

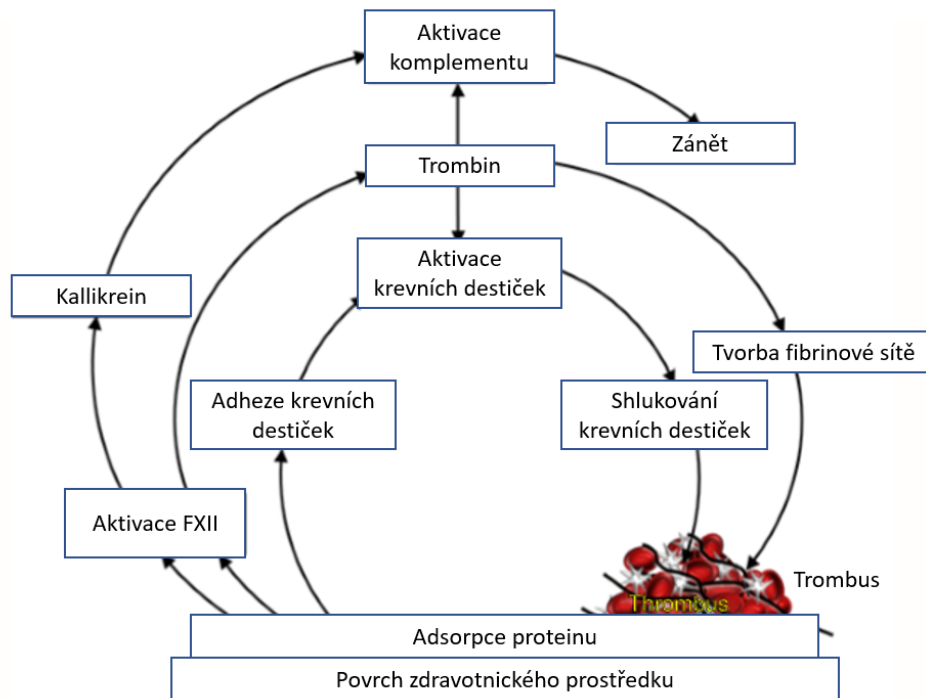
2.2 Interakce zdravotnického prostředku s krví

Dojde-li ke kontaktu krve s neznámým povrchem nějakého materiálu nebo zdravotnického prostředku, spustí se koagulační systém stejným mechanismem jako k tomu dochází při poškození endotelu. Aktivace koagulační dráhy při kontaktu materiálu s krví je jednou z příčin špatné hemokompatibility materiálů, což znemožňuje jejich klinické použití [1].

Koagulace je iniciována přítomností materiálu, často to může být sklo nebo polymer. Aktivita koagulační kaskády se zvyšuje s velikostí povrchu a chemického náboje materiálu zdravotnického prostředku, který je v přímém kontaktu s krví. Materiál je často i po opakovaném použití koagulačně aktivní, což naznačuje, že nedochází ke zničení prokoagulantu vlivem koagulačních faktorů. Interakce s materiálem způsobí aktivaci FXII, jehož koncentrace v plazmě je po celou dobu koagulace konstantní. Faktor XII se aktivuje především v přítomnosti negativně nabitých povrchů. Mechanismus aktivace FXII při interakci s různými typy materiálu není zcela znám [1].

Společně s FXII se koagulace při interakci s umělým povrchem účastní FXI, prekalikrakin (PK) a HMWK. Negativně nabitý povrch materiálu způsobí aktivaci FXII

na aktivní enzym FXIIa, který přemění PK na aktivní kalikrein a HMWK na bradykinin. Vzniklé aktivní látky mají aktivační a stimulační účinky. Aktivní FXII v následujících krocích koagulační kaskády aktivuje další plazmatické koagulační faktory. Následně dojde k přilnutí trombocytů na povrch materiálu, kde společně s koagulačními faktory vytvoří sraženinu [29].



Obr.17: Vznik sraženiny iniciované přítomností zdravotnického prostředku.

Vzniklý trombus může poškodit funkci zdravotnického prostředku. Často také dochází k oddělení části sraženiny, která pak cirkuluje krevním oběhem a může tak poškodit orgány. Vznik sraženiny na umělém povrchu může mít tedy vážné lokální i systémové následky [30].

Při výrobě zdravotnických prostředků je potřeba se zaměřit především na inhibici tvorby trombinu a fibrinu nebo inhibici trombocytů [30].

2.2.1 Kardiovaskulární zdravotnické prostředky

Pro testování hemokompatibility zdravotnického prostředku se používají části prostředku, které přichází do přímého i nepřímého styku s krví. Při nepřímém styku s krví, vstupuje zdravotnický prostředek do těla zvnějšku a slouží jako nepřímá cesta krve. V nepřímém styku s krví jsou zdravotnické prostředky pro odběr krve, kanyly, extenzní

soupravy, intravaskulární katedry a prostředky pro skladování a transfuzi krve, aj. [2]. V přímém styku s cirkulující krví jsou zdravotnické prostředky pro aterektomii, cévní zaváděcí dráty, filtry pro odstranění leukocytů, prostředky pro hemodialýzu/hemofiltraci, mimotělní membránové oxygenátory, prostředky pro dárcovskou a terapeutickou aferézu, prostředky pro intervenční kardiologii a cévní chirurgii, aj. [2].

Kanyly se používají pro přímý i nepřímý styk s krví. Jestliže je kanyla určena pro přímou aplikaci, tak se zavede pod kůži do hlavních krevních cév. Cílem je získat trvalý a přímý přístup ke krvi. Kanyly mají velký průměr a používají se například při chirurgických výkonech s kardiopulmonálním mimotělním oběhem s omezenou délkou expozice. Při klinickém použití takových typů kanyl je potřeba, aby jejich testování proběhlo za podmínek, které co nejpřesněji napodobují jejich klinické použití. U těchto kanyl totiž hrozí zvýšení hladiny koagulačních faktorů a změny hladiny cirkulujících trombocytů. Nutné je však dodat, že zvýšení hladiny faktorů může mít více spouštěcích faktorů, např. způsob zavedení kanyly, implantace a antikoagulační léčba [2]. Naopak kanyly, které se používají pro infuzi nebo pro podkožní monitorování hladiny glukosy v krvi, jsou v nepřímém styku s krví a nevyžadují tolik zkoušek jako kanyly, které jsou v přímém styku s krví [2].

Katetry a zaváděcí dráty přicházející do styku s krví jsou podobné kanylám, a tudíž pro ně platí stejné podmínky testování. Na rozdíl od kanyl je u katetrů potřeba provádět kontrolní zkoušky s použitím klinicky schváleného zdravotnického prostředku z podobného materiálu a umístěného v protilehlé tepně či žíle. Při vyjímání katetru je nutné dbát na to, aby nedošlo ke strhnutí trombu. Při následném hodnocení lze zjistit v jakém rozsahu má vliv poranění intimy nebo místa vstupu na trombotické procesy [2].

Mimotělní krevní oxygenátory, hemodialyzační/hemofiltrační zdravotnické prostředky, zařízení pro dárcovskou a terapeutickou aferézu, zařízení pro adsorpci specifických látek z krve mohou vykazovat významnou a akutní reakci s krví. Interakce může být ovlivněna mnoha faktory, např. rychlostí odsávání krve, složením tekutiny použité pro primární náplň krevní pumpy, hypotermie, kontaktem krve se vzduchem a dobou expozice. U zdravotnických prostředků, pro adsorpci specifických látek z krve a zařízení pro terapeutickou aferézu dochází často vlivem jejich vysokému poměru styčného povrchu s objemem krve k aktivaci koagulační kaskády, krevních destiček a leukocytů [2].

Protetické srdeční chlopně se vyšetřují poslechem. Využívá se ultrazvuku srdce, přičemž se obraz tvoří přijímáním a zpracováním odrazů od materiálů s různou akustickou

impedancí. Vyhodnocuje se místní zbytnění, sraženiny a náznaky ztlustění cípů chlopní. Také je potřeba měřit agregaci trombocytů a provádět krevní zkoušky na hemolýzu a trombózu [2].

Cévní štěpy se implantují do arteriálního a venózního systému. Průchodnost implantované protézy se zvyšuje při větším průměru a menší délce. Doporučené zkoušky jsou měření počtu trombocytů, složek uvolňovaných krevními destičkami, produktů degradace fibrinogenu a fibrinu a aktivovaných koagulačních faktorů. Na funkčnost zdravotnického prostředku mají velký vliv antikoagulační faktory [2].

2.3 Metody zkoušek

Při testování je vždy potřeba použít vhodný model či systém simulující geometrii a podmínky, při kterých reálně dochází k interakci zdravotnického prostředku s krví. Správná simulace má zahrnovat faktory jako je teplota, doba trvání styku, podmínky toku krve, antikoagulační faktory a sterilní podmínky [2].

Pro hodnocení hemokompatibility se používají zkoušky na hemolýzu a trombózu. V rámci zkoušky na trombózu se zkoumá koagulace, aktivace destiček, hematologie (kvantitativní stanovení buněčných struktur a plazmatických složek krve) a systém komplementu [2].

Tab. 2: Zdravotnické prostředky nebo jejich součásti ve styku s cirkulující krví a kategorie příslušných zkoušek podle ČSN EN ISO 10993-4: Biologické hodnocení zdravotnických prostředků.

Příklady zdravotnického prostředku	Kategorie zkoušek						
	Hemolýza		Trombóza				
	Indukovaná materiálem	Indukovaná mechanicky	Koagulace	Aktivace destiček	Komplement	Hematologie	In vivo /ex vivo
Zdravotnické prostředky vstupující do těla zvnějšku							
Krevní monitory (dočasné/ex vivo)	X		X	X		X	
Zařízení pro skladování a transfuzi krve (např. infuzní/transfuzní soupravy) prostředky pro odběr krve, extenzní soupravy	X		X	X		X	
Katetry na dobu kratší než 24 h (např. prostředky pro	X		X	X		X	X

aterektornii, intravaskulární sonografické katetry, antegrádní/retrográdní koronární perfuzní katedry, vodící dráty), kanyly							
Katedry na dobu delší než 24 h (např. katetry pro parentální výživu, CV katetry), kanyly	X		X	X		X	X
Cell savery (zařízení pro adsorpci specifických látek z krve-)	X		X	X	X		
Prostředky pro adsorpci specifických látek z krve	X	X	X	X	X		
Zařízení pro dárcovskou a terapeutickou aferézu a systémy pro separaci buněk	X	X	X	X	X		
Systém pro kardiopulmonální bypass	X	X	X	X	X	X	X
Zařízení pro hemodialýzu/hemofiltraci	X	X	X	X	X	X	X
Filtry pro odstranění leukocytů	X		X	X	X	X	X
Perkutánní zdravotnické prostředky na podporu krevního oběhu	X	X	X	X	X	X	X
Implantované zdravotnické prostředky							
Kroužky pro anuloplastiku, mechanické srdeční chlopně	X	X					X
Embolizační prostředky	X						X
Endovaskulární štěpy	X						X
Implantabilní vodiče defibrilátorů a kardioverterů	X						X
Intraaortální balonkové pumpy	X	X					X
Vodiče kardiostimulátorů	X						X
Protetické (syntetické) cévní štěpy a záplaty včetně arteriovenózních zkratů	X						X
Stenty (cévní)	X						X
Tkáňové srdeční chlopně, cévní štěpy a záplaty	X						X

Totální umělá náhrada srdce	X	X					X
VC filtry	X						X
Prostředky pro podporu srdeční komory	X	X					X

Pro každou zkoušku zdravotnického prostředku je potřeba provést i odpovídající kontrolní zkoušku. Kontrolní vzorek má správně zahrnovat negativní i pozitivní výsledek dané zkoušky hemokompatibility zdravotnického prostředku [2].

2.4 Zkoušky na koagulaci

Pro měření koagulace krve při její interakci se zdravotnickým prostředkem je ideální zvolit zkoušky *in vitro*. Vždy je nutné použít model, který nejvíce odpovídá použití zdravotnického prostředku a předmětu, který je zkoušen. Žádný z uvedených modelů není vhodný pro všechny aplikace, je tedy nutné použití vybraného modelu odůvodnit [2].

Podstatou použití metod *in vitro* je navrhnout simulace nejhorších předpokládaných podmínek pro aplikaci zdravotnického prostředku, a to při různém klinickém použití. Při zkoušce je potřeba zohlednit proměnné, ke kterým patří celkový hematokrit, použití antikoagulans, stáří krve či krevní složky, teplota, zavzdušnění a pH, příprava zkušební vzorku, stáří zkušební vzorku, poměr velikosti povrchu vzorku k objemu krve, a pro dynamické studie podmínky toku (především rychlost a tlak). Zkouška by měla proběhnout s co nejmenším prodlením od doby, kdy byla krev odebrána (ideálně do čtyř hodin od odběru), jelikož krev po odběru velmi rychle ztrácí své vlastnosti [2].

2.4.1 Testy ELISA na stanovení komplexu trombin-antitrombin (TAT), F1.2 a fibrinopeptid A (FPA)

Testy ELISA jsou založené na specifické reakci antigenu s protilátkou a umožňují měřit tvorbu trombinu (TAT, F1.2) a fibrinu (FPA). Vyhodnocením získáme kvantitativní odhad množství trombinu a fibrinu přítomného v krvi. Oba faktory ukazují úroveň koagulační aktivity a jsou ukazatelem probíhající trombózy. Při vyhodnocování je potřeba porovnat výsledky vzorků s vhodnými kontrolními vzorky (př. expozice bez materiálu či zdravotnického prostředku) [2].

2.4.2 Parciální tromboplastinový čas (PTT)

PTT je doba potřebná k vytvoření sraženiny, měřena v sekundách. Používá se k testování všech koagulačních faktorů s výjimkou FVII a FXIII [31].

Zkrácením této doby po interakci krve s materiálem ukazuje aktivaci kontaktní aktivační (vnitřní) dráhy koagulační kaskády krve. Přidáním antikoagulantů, jako je např. heparin, dojde k prodloužení PTT. Pro testování se používají činidla založená na aktivovaném parciálním tromboplastinovém čase (PTT), která obsahují aktivátor (př. kaolin, celit, kyselina ellagová). Pro vyhodnocení účinku zdravotnického prostředku při interakci s krví se však činidla s takovými aktivátory nepoužívají, jelikož koagulace vzniklá působením materiálu či zdravotnickým prostředkem může být aktivátorem maskována. Pro testování koagulace vzniklé působením zdravotnického materiálu se používá jako iniciátor koagulace zdravotnický prostředek, který se zrovna vyhodnocuje. - V ideálním případě se k testování používají pozitivní a negativní kontrolní materiály i s krevní plazmou použité bez zdravotnických prostředků jako negativní kontrola [2].

2.4.3 Využití chromogenních substrátů na zkoušku tvorby trombinu

Chromogenní substrát využívá specifickou enzymovou aktivitu, tudíž je schopen rychlé detekce a identifikace zkoumané látky (v rámci koagulace je zkoumán trombin) [32]. Materiál je v přítomnosti fosfolipidů vystaven neporušenému koagulačnímu systému. Měří se konverze chromogenního substrátu [2].

V případě koagulace je klíčovým enzymem trombin. Aktivita trombinu se stanovuje pomocí konverze fibrinogenu nebo štěpením chromogenního substrátu. Štěpení na chromogenním substrátu je lehčí metoda, ale dochází k nespecifickému štěpení vlivem existence enzymů podobných trombinu v plazmě. Použije-li se přímo chromogenní trombinový substrát lze uskutečnit specifické štěpení trombinu [33].

Stanovení aktivity pomocí chromogenního substrátu se skládá z několika kroků. Nejdříve je potřeba provést aktivaci FX, který obsahuje tkáňový faktor, fosfolipidy a vápenaté ionty. Následuje štěpení na chromogenním substrátu FXa na chromofor a peptid. - Konečná tvorba FX se stanovuje v roztoku, který obsahuje lidský nebo hovězí albumin₇ v takové koncentraci, aby nedocházelo k adsorpčním ztrátám. V inkubační směsi musí být též přítomen FVII, který limituje rychlost tvorby Xa, přičemž nesmí být ve směsi obsažena žádná jiná složka kromě

FVII, která by dokázala Xa tvořit. Množství vzniklého Xa za použití chromogenního substrátu (obvykle se jedná o krátký peptid, 3-5 aminokyseliny dlouhý na chromoforové skupině) se stanovuje odštěpením chromoforové skupiny z peptidového substrátu, čímž umožní spektrofotometrické stanovení jejího množství [34].

2.4.4 Degradací produkty fibrinogenu a fibrinu (FDP)

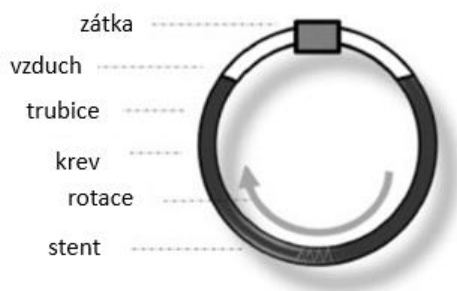
Při fibrinolýze vzniká FDP X, Y, C, D, E za běžných podmínek v koncentracích nižších než 2 mg/ml plazmy. Nízká hladina je udržována díky nízké rychlosti degradační reakce a vysoké rychlosti odstraňování FDB z krevního oběhu. Patologická degradace fibrinu a fibrinogenu způsobuje aktivaci plasminogenu, což způsobuje zvýšení hladiny FDP (2 mg až 40 mg). Měření je výhodné především pro implantované zdravotnické prostředky, přičemž je vhodné pro vyhodnocení použít opět specifickou metodu ELISA [2].

2.4.5 Měření hladiny D-dimeru

D-dimer je specifický marker tvorby a degradace fibrinu a nepřímým markerem vzniku intravaskulárních sraženin. Zvýšená hladina D-dimeru může indikovat koagulační aktivitu [35]. Kvantitativní stanovení k indikaci hladiny D-dimeru lze uskutečnit pomocí metody ELISA nebo RIA [2].

2.4.6 Chandlerova smyčka

Chandlerova smyčka byla vynalezena v roce 1958. Původně vznikla pouze pro měření času, který uplyne od vložení materiálu do smyčky do vzniku sraženiny krve. Měří se čas, který uplyne od začátku rotace trubice až do vzniku sraženiny. Během několika let od vzniku Chandlerovy smyčky byla vyzkoušena modifikace pro stanovení v antikoagulované krvi, čímž bylo umožněno měřit aktivitu krevních destiček indukovaných materiálem. Při vyhodnocení je však velkou nevýhodou přítomnost vzduchových bublin v krvi, které mohou vést k agregaci bílkovin, což může mít za následek aktivaci krevních destiček. Smyčka se skládá z trubice, která je naplněná ze 70% její kapacity krví a je propojena elastickým obojkem (zátkou). Celá smyčka se nakloní o 45 stupňů. Trubice rotuje, dokud v ní nevznikne krevní sraženina [1].



Obr.18: Chandlerova smyčka.



Obr.19: Chandlerova smyčka (Chandler loop system, ebo kunze, Neuffen, Německo).

3 Praktická část

Chemikálie:

Citrát sodný 3,8%

Chemikálie ELISA soupravy FPA (MyBioSource, San Diego, USA): standardy, standardní roztok, detekční činidlo A, detekční činidlo B, testovací roztok A, testovací roztok B, trimethylbenzidin (TMB) chromogenní substrát, promývací pufr (30 x koncentrát), roztok k zastavení reakce (stop solution)

Chemikálie ELISA soupravy TAT (Cusabio, Houston, USA): standard, biotin-protilátka, roztok biotin-protilátka, HRP-avidin, roztok HRP-avidin, ředící roztok vzorků, promývací pufr, substrát TMB, zastavovací roztok.

Destilovaná voda

Krev potkana obecného (*Rattus norvegicus*)

Materiály a pomůcky:

Hadičky z PVC (MPH, Medical Devices s.r.o., Přelouč)

Kádinky

Mikrozkumavky

Pipety

Sklo

Savý papír

Vícekanálové pipety

Zdravotnické prostředky (hadička od kapačky, stenty – ELLA-CS s.r.o., Hradec Králové)

Přístroje:

Centrifuga – Eppendorf centrifuge 5804, Eppendorf Czech & Slovakia s.r.o.

Čtečka mikrodestiček (spektrofotometr) – Absorbanční reader Epoch, Bio Tek

Chandlerova smyčka – Chandler loop system, ebo kunze, Neuffen, Německo

3.1 Testování koagulace

Pro testování zdravotnických prostředků na koagulaci byly zvoleny dynamické i statické zkoušky. Při statické zkoušce byl zdravotnický prostředek vložen do krve a ponechán v klidu na inkubaci. Pro dynamickou zkoušku byla vybrána Chandlerova smyčka, která simuluje cirkulaci krve v oběhovém systému.

Z testované krve byla odebrána plazma, která bude podrobena testu ELISA na fibrinogen a trombin-antitrombin komplex. Výsledky se následně vyhodnotí čtečkou mikrodestiček.

3.2 Odběr krve

Pro testování zdravotnických prostředků byla zvolena krev od potkana obecného (*Rattus norvegicus*). Krev byla odebrána z dospělých samců. Míšení krve jednotlivých jedinců stejného pohlaví, by nemělo mít na výsledek vliv. Výsledek by mohlo ovlivnit pouze míšení krve samic a samců.

Potkan byl vložen do narkóзовé nádoby, kde pod vlivem etheru upadnul do lehké narkózy. Projevem, že zvíře je pod narkózou, je zpomalený dech, svalová atonie a žádná reakce na dotyk. Následně byl potkan vyjmut z nádoby a pomocí skleněné heparinové kapiláry byl otevřen retrobulbární plexus ve vnitřním koutku oka zvířete. Správným stiskem kůže pak plexus zůstává otevřený a bylo tedy možné zachytit kapající krev do připravených zkumavek. Uvolněním kůže se plexus opět zatahl a krev přestala téct. Od dospělých samců potkana lze odebrat 5-7 ml krve, u samic méně [36].

Krev byla zachycena do mikrozkušavek, do kterých se těsně před odběrem krve napipetoval 3,8% roztok citrátu sodného. Potřebné množství citrátu sodného je zhruba 1 kapka (150 μ l) na 9 kapek (1350 μ l) krve [36].

3.3 Dynamická zkouška pomocí Chandlerovy smyčky

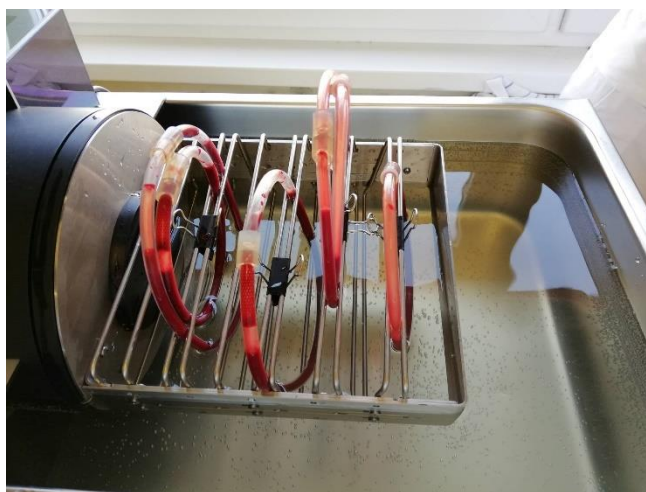
Přístroj se skládá z rotační jednotky, smyčkové kolébky a vodní nádrže, která je vyhřívána na požadovanou teplotu. Na vodní nádrž byla nasazena rotační jednotka, na které byla připevněna smyčková kolébka. Následně, bylo potřeba do vodní nádrže nalít asi 21 litrů vody (voda by měla sahat zhruba do poloviny středního šroubu rotační jednotky). Zapnutím přístroje se automaticky aktivovala kontrola teploty (vodní nádrž začne vodu zahřívát). Při experimentu

bylo potřeba, aby voda obsažená v nádrži měla 38-40 °C. Až měla voda vhodnou teplotu, mohli se do smyčkové kolébky vložit hadičky (smyčky) naplněné krví a vzorkem zdravotnického prostředku, který byl testován na koagulaci [37].

Pro testování byly vybrány hadičky vyrobené z PVC. Do hadičky byl vložen zdravotnický prostředek, případně jeho část, a následně byla hadička naplněna čerstvě odebranou krví, zhruba ze 70 % její kapacity, a uzavřena svorkou. Takhle připravené hadičky byly vsunuty do smyčkové kolébky. Bylo potřeba se ujistit, že hadička s krví je pevně uzavřená a správně vložená do smyčkové kolébky, aby nedošlo ke vniknutí vody do hadičky či úniku testované krve. Po ujištění, že jsou hadičky správně umístěny, byl zapnut rotor, díky kterému se smyčková kolébka společně s hadičkami začala otáčet. Doporučená doba rotace byly 2 hodiny. Po uplynutí doporučené doby rotace se přístroj vypnul a vyndaly se hadičky ze smyčkové kolébky [37].

Již při vytažení hadiček lze analyzovat změny krve cirkulované se zdravotnickým prostředkem (výskyt krevní sraženiny apod.). Pro přesnější výsledky se krev přelije do mikrozkušavek a vloží se do centrifugy, kde dojde k oddělení plazmy. Centrifugace probíhala 20 minut při 3000 otáčkách. Následně se plazma pipetou odebere do předem připravených mikrozkušavek a dá se zamrazit pro další testování.

Pro testování koagulace krve v interakci se zdravotnickým prostředkem byly použity stenty (4x) a hadička od kapačky (1x). Do jedné hadičky bylo přidáno sklo pro pozitivní kontrolu a v druhé hadičce byla obsažena pouze krev pro negativní kontrolu.



Obr.20: Chandlerova smyčka-hadičky naplněné krví a stentem.

3.4 Statická zkouška

Pro testování některých zdravotnických prostředků je též vhodná statická zkouška. Do mikrozkušavek byla napipetována krev potkana a následně do ní byl vložen zdravotnický prostředek nebo jeho část. Mikrozkušavka byla uskladněna v prostoru, kde byla zajištěna stálá teplota a to zhruba 38°C. Po nějaké době (minimálně hodinu) byla mikrozkušavka vložena do centrifugy kde se odstředila plazma. Plazma byla pipetou odebrána do čistých mikrozkušavek. Následně byla plazma zamrazena pro další testy.

Na statickou zkoušku byly testovány stenty.

Pro pozitivní kontrolu bylo přidáno do jedné mikrozkušavky sklo a v druhé mikrozkušavce byla obsažena pouze krev pro negativní kontrolu.

3.5 ELISA test na fibrinopeptid A a trombin-antitrombin komplex

ELISA test pro fibrinopeptid A

Souprava ELISA pro fibrinopeptid A (FPA) je inhibiční enzymová imunoanalytická technika, která slouží ke kvantitativnímu měření *in vitro* FPA [38].

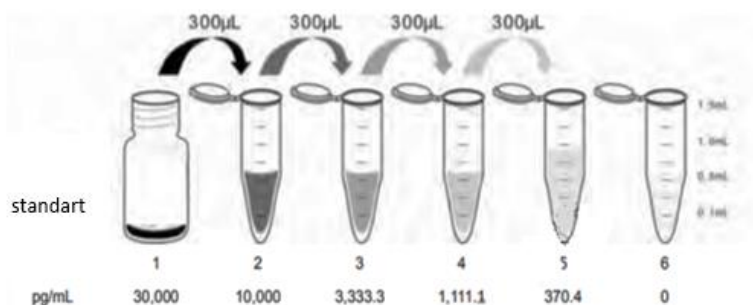
Testy byly prováděny na potkaní krvi, tudíž i ELISA test je specializovaný na potkana obecného (*Rattus norvegicus*). Je schopný měřit FPA v potkaním séru, plazmě, tkáních aj.

Byla použita souprava MyBioSource, Rat MBS2100083 ELISA Kit (MyBioSource, San Diego, USA). V soupravě byla obsažena destička se 48 jamkami, která již byla potažená a připravená k použití, papír na přikrytí destičky, 2 standardy, standardní roztok, detekční činidlo A, detekční činidlo B, testovací roztok A, testovací roztok B, trimethylbenzidin (TMB) chromogenní substrát, promývací pufr (30 x koncentrát), roztok k zastavení reakce (stop solution) [38].

Souprava ELISA byla před použitím uskladňována v lednici. Před zahájením zkoušky byl vzorek rozmrazen a následně centrifugován 20 minut při 3000 otáčkách [38].

Před samotným provedením zkoušky byla souprava temperována na pokojovou teplotu (18-25 °C). Nejprve bylo potřeba smíchat standard s 0,5 ml standardního roztoku a nechat 10 minut odstát při pokojové teplotě, lehce protřepat. Vznikl standard o koncentraci 30 000 pg/ml. Následně se nalilo 0,6 ml standardního roztoku do 5 různých zkušavek, do kterých se následně

přidával standard dle obrázku níže. Vždy bylo nutné roztok ve zkumavce důkladně protřepat. Standard se připravoval 15 minut před testem [38].



Obr.21: Ředění standardu pro FPA.

Před použitím byla detekční činidla A a B protřepána. Následně se detekční činidla A a B naředila na pracovní koncentraci 100 x jejich testovacími roztoky A a B. Promývací roztok (30x koncentrát) byl zředěn 580 ml destilované nebo deionizované vody, celkem tedy bylo připraveno 600 ml promývacího roztoku [38].

Předem bylo zapotřebí určit co se do jednotlivých jamek bude dávat (standard, vzorek) a následně bylo do každé jamky přidáno 50 µl dané látky a také bylo ihned přidáno 50 µl detekčního činidla A. Destičku byla lehce protřepána (doporučuje se použít mikrotitrační třepačku) a následně přikryta a inkubována hodinu při 37°C. Roztok byl odsát a následně byla promyta každá jamka 350- µl promývacím roztokem, ideálně pomocí vícekanálové pipety. Zbývající promývací roztok a promývací pufr byl odstraněn nasátím nebo dekantací. Následně byla destička převrácena a otřena savým papírem [38].

Do každé jamky bylo přidáno 100 µl detekčního roztoku B, destička byla přikryta a nechala se inkubovat 30 minut při 37°C. Celý proces odsávání a promývání byl opakován 5x [38].

Do každé jamky bylo přidáno 90 µl substrátového roztoku a následně byla destička přikryta a nechána 10-20 minut při 37 °C inkubovat. Destičku bylo nutné chránit před světlem. Přidáním roztoku substrátu se kapalina zbarvila modře [38].

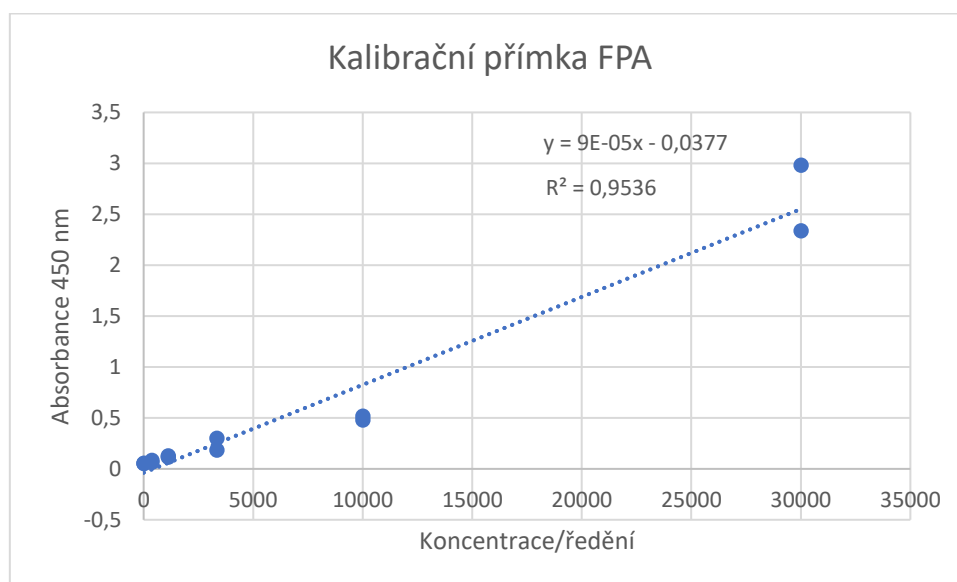
Následně bylo do každé jamky přidáno 50 µl zastavovacího roztoku. Přidáním zastavovacího roztoku se kapalina zbarvila žlutě. Nakonec bylo nutné se ujistit, že v kapalině

není žádná bublina. Měření se provádí ihned ve čtečce mikroděstiček při 450 nm [38], tedy spektrofotometrickým stanovením.

Tab. 3: Naměřené hodnoty standardů FPA ze čtečky mikroděstiček (Absorbanční reader Epoch, Bio Tek).

Vzorek		Konc/ředid. [pg/ml]	Absorbance 450 nm	Koncentrace
Kalibrační standard 1	1	30000	2,98	>28698,603
	2	30000	2,336	27415,5
Kalibrační standard 2	1	10000	0,478	9140,166
	2	10000	0,515	9665,32
Kalibrační standard 3	1	3333,3	0,299	6225,217
	2	3333,3	0,182	3703,297
Kalibrační standard 4	1	1111,1	0,125	1905,454
	2	1111,1	0,115	1469,462
Kalibrační standard 5	1	370,4	0,064	<450,616
	2	370,4	0,081	<450,616
Kalibrační standard 6	1	0	0,051	<450,616
	2	0	0,055	<450,616

Graf č.1: Kalibrační přímka fibrinopeptidu A absorbance v závislosti na koncentraci.



Rovnice kalibrační přímky: $y = 9E-05x - 0,0377$

Tab. 4: Naměřené hodnoty s FPA (Chandlerova smyčka).

Chandlerova smyčka		Absorbance 450 nm	Koncentrace	Absorbance průměr	Směrodatná odchylka	Koncentrace FPA [pg/ml]
Stent č.1	1	0,182	3687,718	0,1895	0,0075	2626,45
	2	0,197	4077,594			
Stent č.2	1	0,057	<450,616	0,063	0,006	321,87
	2	0,069	<450,616			
Stent č.3	1	0,057	<450,616	0,057	0	291,21
	2	0,057	<450,616			
Stent č.4	1	0,094	<450,616	0,093	0,001	475,13
	2	0,092	<450,616			
Negativní kontrola	1	0,08	<450,616	0,0775	0,0025	395,95
	2	0,075	<450,616			
Pozitivní kontrola	1	0,184	3747,209	0,1845	0,0005	2557,15
	2	0,185	3780,566			
Hadička od kapačky	1	0,21	4389,248	0,1965	0,0135	2723,47
	2	0,183	3729,168			

Koncentrace fibrinopeptidu A byla vypočítána z rovnice kalibrační přímky.

U vzorku č. 1 byly naměřeny jiné hodnoty než u ostatních vzorků se stenty. Důvodem zřejmě bylo, že u vzorku č. 1 byly ihned po expozici v Chandlerově smyčce v krvi bubliny, které ovlivnily výsledek.

Tab. 5: Naměřené hodnoty FPA ze čtečky mikrodestiček (statická zkouška).

Statická zkouška		Absorbance 450 nm	Koncentrace	Absorbance průměr	Směrodatná odchylka	Koncentrace FPA [pg/ml]
Stent č.1	1	0,106	1004,239	0,0985	0,0075	503,23
	2	0,091	<450,616			
Stent č.2	1	0,08	<450,616	0,094	0,014	480,24
	2	0,108	1165,27			
Stent č.3	1	0,09	<450,616	0,094	0,004	480,24
	2	0,098	<450,616			
Stent č.4	1	0,087	<450,616	0,0945	0,0075	482,8
	2	0,102	796,412			
Stent č.5	1	0,043	<450,616	0,044	0,001	224,79
	2	0,045	<450,616			
Negativní kontrola	1	0,058	<450,616	0,051	0,007	260,56
	2	0,044	<450,616			
Pozitivní kontrola	1	0,039	<450,616	0,038	0,001	194,14
	2	0,037	<450,616			

ELISA test pro trombin-antitrombin komplex

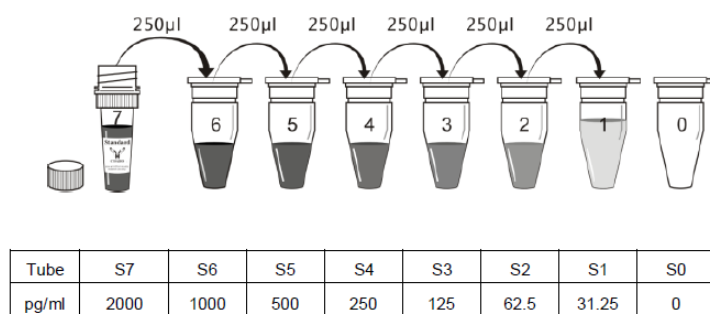
Souprava slouží ke kvantitativnímu měření koncentrace trombin-antitrombinového komplexu (TAT) potkaní plazmy, tkání, séra a jiných biologických tekutin.

Byla použita souprava Cusabio, Rat CSB-E08432r ELISA Kit (Cusabio, Houston, USA). V ELISA soupravě byla obsažena testovací destička, standard, biotin-protilátka, roztok biotin-protilátka, HRP-avidin, roztok HRP-avidin, ředící roztok vzorků, promývací pufr, substrát TMB, zastavovací roztok. Soupravu bylo potřeba před použitím uskladňovat v 2-8 °C [39].

Před zahájením testu ELISA bylo potřeba vzorek plazmy centrifugovat. Centrifugace probíhala 20 minut při 3000 otáčkách. Vzorek plazmy vyžadoval kvůli malému množství zředění. Doporučené ředění bylo 15 μ l vzorku do 285- μ l roztoku vzorku [39].

Před zahájením testu bylo důležité všechna činidla přivést na pokojovou teplotu (18-25 °C). Pro přípravu činidel bylo doporučeno použít destilovanou vodu, aby nedošlo ke kontaminaci, což by mohlo ovlivnit výsledek. Činidla byla před otevřením protřepána. Biotinová protilátka byla naředěna, bylo použito 10 μ l biotin protilátky a 990 μ l protilátky biotin roztok. HRP-avidin bylo též nutné naředit, 10 μ l HRP-avidin a 990 μ l roztok HRP-avidin. Promývací pufr byl zředěn na 500 ml roztok s destilovanou vodou. Standard byl připraven smícháním s 1 ml ředícího roztoku vzorku, směs byla smíchána. Standard bylo potřeba připravit 15 minut před zahájením testování [39].

Do připravených čistých zkumavek bylo napipetováno 250 μ l ředícího roztoku pro vzorek. Pro zdvojnásobení ředění byl použit zásobní roztok. Zkumavky byly protřepány [39].



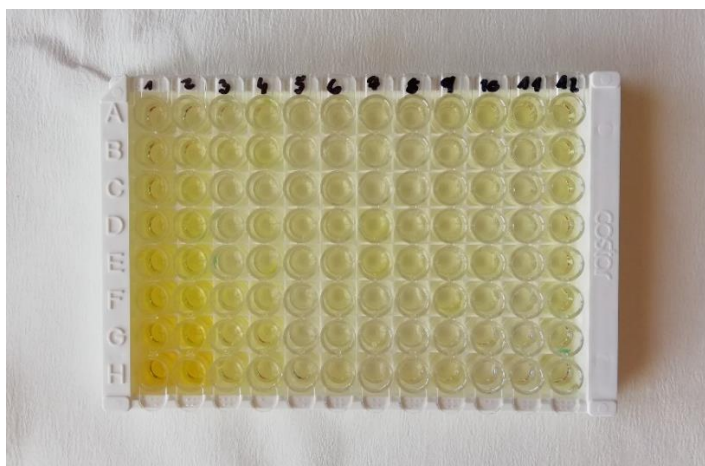
Obr.22: Ředění standardu pro TAT.

Před zahájením bylo nutné přenést všechna činidla na pokojovou teplotu. Po rozmrazení plazmy (vzorku) byla provedena centrifugace [39].

Byla připravena destička s jamkami, do kterých bylo přidáno 100 μ l standardu a vzorku. Destička byla zakryta a nechána 2 hodiny při 37 °C inkubovat. Následně byla odstraněna veškerá kapalina z každé jamky a přidána 100 μ l biotin-protilátka, destička byla znovu zakryta a nechána inkubovat 1 hodinu při 37 °C. Každou jamku bylo potřeba dvakrát nasát a promýt. Jamky byly promývány promývacím pufr (200 μ l) pomocí vícekanálové pipety. Bylo potřeba po každém kroku odstranit kapalinu, aby nebyla reakce nijak ovlivněna. Po posledním promytí byl odstraněn promývací pufr pomocí dekantace nebo nasáním [39].

Do každé jamky byl přidán 100 μ l HRP-avidin. Destička byla znovu zakryta a opět nechána 1 hodinu inkubovat při 37 °C. Proces odsávání a promývání byl pětkrát opakován. Následně byl přidán 90 μ l substrátu TMB a nechán inkubovat 15-30 minut při 37 °C. Do každé jamky bylo přidáno 50 μ l zastavovacího roztoku [39].

Po přidání TMB substrátu bylo možné pozorovat změnu barvy z bezbarvé na světle modrou. TMB substrát se snadno kontaminuje, proto bylo potřeba TMB substrát chránit před světlem. Zastavovací roztok by se měl přidávat ve stejném pořadí jako substrát TMB, přidáním zastavovacího roztoku byla modrá barva změna na žlutou. Pokud měla jamka zelenou barvu znamená to, že roztok nebyl důkladně promíchán [39].



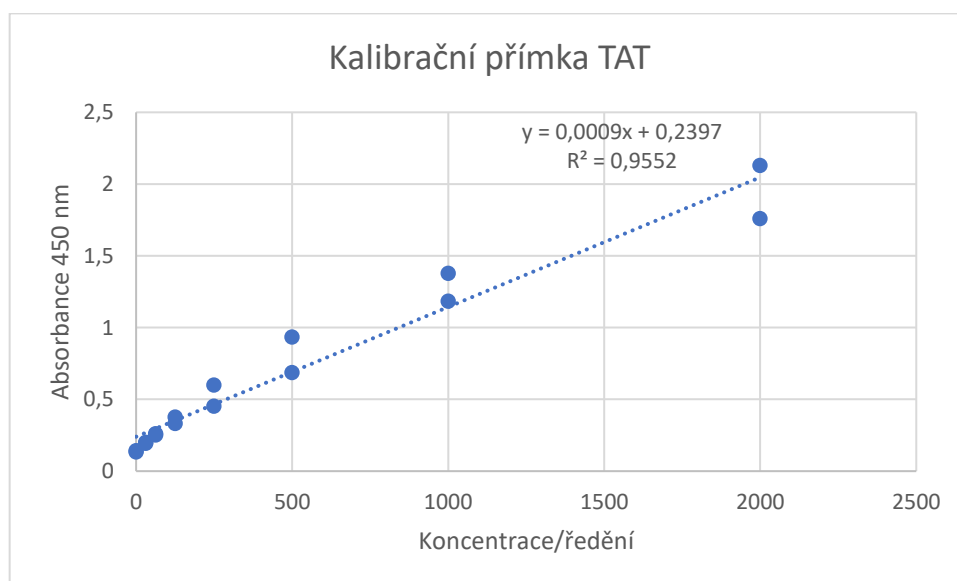
Obr.23: Test ELISA po přidání zastavovacího roztoku.

Následně byla stanovena koncentrace pomocí čtečky mikrodestiček při 450 nm [39].

Tab. 6: Naměřené hodnoty standardů TAT ze čtečky mikrodestiček (Absorbanční reader Epoch, Bio Tek).

Vzorek		Konc/ředid. [pg/ml]	Absorbance 450 nm	Koncentrace
kalibrační standard S7	1	2000	2,129	>2100,000
	2	2000	1,759	1681,996
kalibrační standard S6	1	1000	1,377	1125,333
	2	1000	1,183	886,537
kalibrační standard S5	1	500	0,934	617,183
	2	500	0,686	383,96
kalibrační standard S4	1	250	0,599	310,636
	2	250	0,451	194,844
kalibrační standard S3	1	125	0,377	142,279
	2	125	0,331	111,17
kalibrační standard S2	1	62,5	0,261	66,372
	2	62,5	0,251	60,113
kalibrační standard S1	1	31,25	0,194	27,453
	2	31,25	0,201	31,061
kalibrační standard S0	1	0	0,132	<0,000
	2	0	0,143	2,408

Graf č.2: Kalibrační přímka trombin-antitrombin komplexu v závislosti na koncentraci.



Rovnice kalibrační přímky: $y = 0,0009x + 0,2397$

Tab. 7: Naměřené hodnoty TAT (Chandlerova smyčka).

Chandlerova smyčka		Absorbance 450 nm	Koncentrace	Absorbance průměr	Směrodatná odchylka	Koncentrace TAT [pg/ml]
Stent č.1	1	0,118	<0,000	0,139	0,021	443,3924
	2	0,16	10,106			
Stent č.2	1	0,122	<0,000	0,1225	0,0005	390,7595
	2	0,123	<0,000			
Stent č.3	1	0,12	<0,000	0,1695	0,0495	540,6835
	2	0,219	41,289			
Stent č.4	1	0,195	27,887	0,204	0,009	650,7342
	2	0,213	38,045			
Hadička od kapačky	1	0,161	10,347	0,1615	0,0005	515,1646
	2	0,162	10,781			
Negativní kontrola	1	0,151	5,861	0,157	0,006	500,8101
	2	0,163	11,412			
Pozitivní kontrola	1	0,116	<0,000	0,1385	0,0225	441,7975
	2	0,161	10,588			

Koncentrace trombin-antitrombin komplexu byla vypočítána z rovnice kalibrační přímky.

Tab. 8: Naměřené hodnoty TAT (statická zkouška).

Statická zkouška		Absorbance 450 nm	Koncentrace	Absorbance průměr	Směrodatná odchylka	Koncentrace TAT [pg/ml]
Stent č.1	1	0,134	<0,000	0,158	0,024	504
	2	0,182	20,786			
Stent č.2	1	0,246	56,988	0,2185	0,0275	696,9873
	2	0,191	25,509			
Stent č.3	1	0,113	<0,000	0,112	0,001	357,2658
	2	0,111	<0,000			
Stent č.4	1	0,121	<0,000	0,1275	0,0065	406,7089
	2	0,134	<0,000			
Stent č.5	1	0,106	<0,000	0,107	0,001	341,3165
	2	0,108	<0,000			
Negativní kontrola	1	0,116	<0,000	0,105	0,011	334,9367
	2	0,094	<0,000			
Pozitivní kontrola	1	0,096	<0,000	0,101	0,005	322,1772
	2	0,106	<0,000			

4 Diskuze

V rámci teoretické části bylo navrženo několik metod zkoušek na testování koagulace krve ve styku se zdravotnickým prostředkem.

Do praktické části se zvolily pro porovnání dynamické i statické zkoušky. Jako dynamická zkouška byla zvolena Chandlerova smyčka, která dokáže simulovat oběhový systém člověka, a proto měla také přinést přesnější výsledky oproti statickým zkouškám. Krev, která byla ve styku se zdravotnickým prostředkem, byla následně podrobena testu ELISA na fibrinopeptid A a ELISA testu na trombin-antitrombin.

Při testování na fibrinopeptid A (FPA) pomocí Chandlerovy smyčky, bylo zjištěno, že testované stenty jsou vhodné pro klinickou aplikaci. Při pozitivní kontrole byla naměřena koncentrace FPA v hodnotě 2557,15 [pg/ml]. Standartní hodnota FPA v krvi je 1,5 - 3 [pg/ml]. Negativní kontrola obsahovala 395,15 [pg/ml] FPA. Testovacími zdravotnickými prostředky byly 4 stenty. U stentů bylo naměřeno 291,21-475,13 [pg/ml] FPA, z toho u jednoho bylo naměřeno 2626,45 [pg/ml] FPA. V krvi zmíněného vzorku se však po expozici v Chandlerově smyčce objevily bubliny, které silně ovlivňují výsledek. Bublinám lze předejít použitím hadiček o většího průměru, jelikož k jejich vzniku dochází při zavádění zdravotnického prostředku a krve do hadičky (krev má vysoké povrchové napětí, je tedy obtížné její zavedení do hadičky). Po expozici v Chandlerově smyčce pak ve vzorku vznikne spousta malých bublin (vlivem rotace hadiček), což znehodnocuje výsledek. Naměřená hodnota tedy neznamená, že by daný stent mohl způsobovat koagulaci, ale přítomnost bublin znemožňuje získání pravdivých hodnot FPA. Také byla testována hadička od kapačky, u které byly také naměřeny vysoké hodnoty. Jelikož, ale byla k dispozici jen jedna hadička, nemohli jsme provést více testů pro porovnání její závadnosti pro použití, protože též mohlo dojít k nějaké reakci, která ovlivnila výsledky měření stejně jako u stentu. Hadička bude tedy podrobena znovu zkoušce, společně s dalšími zdravotnickými prostředky. Testování provedou pracovníci Synthesia a.s., až bude k dispozici více vzorků pro porovnání.

U statické zkoušky na FPA nevyšla pozitivní kontrola, tudíž není možné s jistotou určit, zda hodnocené stenty negativně reagují s krví. Vzorky tedy nelze s ničím porovnat a je tedy potřeba provést celý test znovu. Testování nebylo opakováno, jelikož bylo k dispozici omezené množství potkaní krve a chemikálií v ELISA soupravě.

Pro testy na TAT u dynamických i statických testů vyšla pozitivní kontrola v podobných hodnotách jako negativní kontrola. Je možné, že aplikované sklo na pozitivní kontrolu bylo ve

styku s krví krátkou dobu, a proto nebyly naměřeny vyšší hodnoty TAT. Naměřené koncentrace TAT stentů, které byly v krvi, jsou přibližně stejné s hodnotou TAT negativní kontroly, což platí pro dynamickou i statickou zkoušku. V příštím testování by tedy bylo vhodné vyzkoušet různé druhy skla a pro jistotu provést více pozitivních kontrol. Také nechat sklo v krvi inkubovat delší dobu.

Ze získaných hodnot nelze tedy vyvodit, jestli je daný zdravotnický prostředek hemokompatibilní nebo ne. Je potřeba provést více testů, kde bude prokázáno, že zdravotnický prostředek negativně neovlivňuje krev.

Práce byla vypracována v rámci grantu pro biologické hodnocení zdravotnických prostředků, dle ČSN (česká technická norma). Součástí grantu je testování zdravotnických prostředků na více zkoušek hemokompatibility (hemolýza, trombóza, koagulace, aj.). Zdravotnické prostředky budou podrobeny dalším zkouškám, až bude podrobněji vymyšlena jejich metodika zkoušek. Prozatím proběhlo pouze testování na koagulaci a bude v nejbližší době opakováno kvůli nepřesným výsledkům. Koagulace byla testována pouze na krvi potkana obecného, aby se vyzkoušela navržená metodika testování a pro příští testy eliminovat co nejvíc rizik pro znehodnocení výsledků. Pro příští testy je v plánu použít krev lidskou, aby byly získány podrobnější výsledky.

Také se plánuje provedení zkoušky na hemolýzu a hematologii. Bohužel ještě není vypracována jejich detailní metodika a testování proběhne až po vylepšení metodiky testování koagulace. V následujícím testování zdravotnických prostředků na koagulaci s lidskou krví, je potřeba snížit riziko znehodnocení výsledků, aby se získali přesnější hodnoty.

Testování uskuteční pracovníci ve Výzkumném ústavu organických syntéz, Synthesia a.s.

5 Závěr

V praktické části byly provedeny testy na koagulaci krve u zdravotnických stentů. Naměřené hodnoty však nebyly přesné a také u testování TAT nevyšla pozitivní kontrola, takže se nedá posoudit, jestli jsou testované zdravotnické prostředky vhodné ke klinickému použití. Také byla otestována hadička od kapačky, u které byly naměřeny vyšší hodnoty koagulačních faktorů, ale jelikož byl k dispozici pouze jeden vzorek a nedal se provést víc než jeden test (byl proveden pouze jeden test na Chandlerově smyčce) nelze s přesností říct, zda by docházelo při používání k negativním reakcím mezi zdravotnickým prostředkem a krví. Zkoušky na koagulaci tedy budou provedeny znovu.

Prováděná zkouška byla prvním experimentem v rámci grantu pro biologické vyhodnocení zdravotnických prostředků. Metodika tedy nebyla ještě detailně vypracovaná, naměřené hodnoty je třeba chápat jako pilotní experiment z jehož výsledků se bude odvíjet další práce.

Pro příští zkoušky by bylo lepší použít pro dynamickou zkoušku pomocí Chandlerovy smyčky hadičky o větším průměru, aby se snížilo riziko vzniku bublin v krvi. Také by bylo vhodné vytvořit více vzorků pro pozitivní kontrolu, aby se při porovnání naměřených hodnot získaly přesnější výsledky. Pro pozitivní kontrolu se doporučuje použití skla. U měření koncentrace TAT však pozitivní kontrola nevyšla, je tedy potřeba zvážit použití různých typů skla a nechat sklo v interakci s krví delší dobu. Jestliže bude zkouška na pozitivní kontrolu provedena správně, tak budou získány hodnoty, s kterými lze srovnávat hodnoty ostatních vzorků. Jestliže by došlo ke koagulaci krve při interakci zdravotnického prostředku s krví, naměřené hodnoty by byly podobné hodnotám pozitivní kontroly.

V rámci celého grantu na biologické vyhodnocení zdravotnických prostředků bude provedena série zkoušek, které by měli prokázat, jestli je daný zdravotnický prostředek vhodný pro klinické použití nebo ne. Testování na koagulaci byla první provedena zkouška.

Zdroje:

- [1] SIEDLECKI, Christopher A. *Hemocompatibility of Biomaterials for Clinical Applications*. United Kingdom: Woodhead publishing, 2017, 469 s. ISBN: 978-0-08-100497-5.
- [2] ČSN EN ISO 10993-4. *Biologické hodnocení zdravotnických prostředků-část 4: Výběr zkoušek na interakce s krví*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2017.
- [3] PECKA, Miroslav. *Laboratorní hematologie v přehledu*. Český Těšín: FINIDR, 2004, 237 s. ISBN: 80-86682-00-5.
- [4] GALE, Andrew J. *Continuing education course: Current understanding of hemostasis*. *Toxicol Pathol*: 2011;39(1):273–280.
Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3126677/>
- [5] SAKALOVÁ, Adriana, LIPŠIČ, Tomáš a kolektiv. *Hematológia a transfuziológia*. Žilina: Nakladatelství Osveta, 1995, 527 s. ISBN: 80-217-0444-6.
- [6] DAHLBÄCK, Björn. *Blood coagulation, Haematology*. *The Lancet*: 2000, May 6, Vol 355.
Available from: <http://williams.medicine.wisc.edu/coagulationreview.pdf>.
- [7] MACKMAN, Nigel, TILLEY, E. Rachel, KEY, S. Nigel. *Role of the Extrinsic Pathway of Blood Coagulation in Hemostasis and Thrombosis*. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2007, Jun 7. Available from:
<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/ATVBAHA.107.141911>.
- [8] CHAUDHRY, Raheel a BABIKER Hani M. *Physiology, Coagulation Pathways*. [Updated 2018 Oct 27]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2018 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482253/>.
- [9] CASINI, A., BRUNGS, T., LAVANU-BOMBLED, C., VILAR, R., NEERMAN-ARBEZ, M., DE MOERLOOSE, P. *Genetics, diagnosis and clinical features of congenital hypodysfibrinogenemia: a systematic literature review and report of a novel mutation*. *J Thromb Haemost*. 2017 May;15(5):876-888.
- [10] DE MOERLOOSE, P., NEERMAN-ARBEZ, M. *Congenital fibrinogen disorders*. *Semin. Thromb. Hemost*. 35: 356-366, 2009. [PubMed: [19598064](#)].

- [11] PALTA, Sanjeev, SAROA, Richa, PALTA, Anshu. *Overview of the coagulation system*. Indian Journal of Anaesthesia: 2014, 5/58, Free full text articles from Indian J Anaesth Dostupné z: <http://www.ijaweb.org/article.asp?issn=0019-5049;year=2014;volume=58;issue=5;spage=515;epage=523;aulast=Palta>.
- [12] LANCELLOTTI, S., DE CRISTOFARO, R. *Congenital prothrombin deficiency*. Semin. Thromb. Hemost. 35: 367-381, 2009. [PubMed: [19598065](#)].
- [13] SRIDHARAN, Meera, COON, M. Lea, CHEN, Dong, PRUTHI, K. Rajiv. *Factor V Deficiency with a Thrombotic Clinical Phenotype*. Thieme Medical Publishers, 2019, Jan 10, Available from: <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/abstract/10.1055/s-0038-1677041>.
- [14] BERTINA, R. M., KOELEMAN, B. P. C., KOSTER, T., ROSENDAAL, F. R., DIRVEN, R. J., DE RONDE, H., VAN DER VELDEN, P. A., REITSMA, P. H. *Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C*. Nature 369: 64-67, 1994. [PubMed: [8164741](#)].
- [15] Factor VII deficiency - Genetics Home Reference - NIH. Genetics Home Reference - NIH [online]. Dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/factor-vii-deficiency>.
- [16] MANNUCCI, P. M., TUDDENHAM, E. G. D. *The hemophilias--from royal genes to gene therapy*. New Eng. J. Med. 344: 1773-1779, 2001. Note: Erratum: New Eng. J. Med. 345: 384 only, 2001. [PubMed: [11396445](#)].
- [17] SCIPIO, G. Di Richard, KURACHI, Kotoku, DAVIE, W. Earl. *Activation of human factor IX (christmas factor)*. The journal of Clinical Investigation, 1978, Jun, Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC372679/>.
- [18] KONKLE BA, HUSTON H, NAKAYA FLETCHER S. *Hemophilia B*. 2000 Oct 2 [Updated 2017 Jun 15]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2019. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1495/>.
- [19] MILLAR, D. S., ELLISTON, L., DEEX, P., KRAWCZAK, M., WACEY, A. I., REYNAUD, J., NIEUWENHUIS, H. K., BOLTON-MAGGS, P., MANNUCCI, P. M., REVERTER, J. C., CACHIA, P., PASI, K. J., LAYTON, D. M., COOPER, D. N. *Molecular analysis of the genotype-phenotype relationship in factor X deficiency*. Hum. Genet. 106: 249-257, 2000. [PubMed: [10746568](#)].

- [20] DUGA, S., SALOMON, O. *Factor XI deficiency*. Semin. Thromb. Hemost. 35: 416-425, 2009. [PubMed: [19598070](#)].
- [21] MCCAIN, K. F., CHERNOFF, A. I., GRAHAM, J. B. *Establishment of the inheritance of Hageman defect as an autosomal recessive trait*. In: Brinkhous, K. M. : Hemophilia and Other Hemorrhagic States. Chapel Hill: Univ. of North Carolina Press (pub.) 1959. Pp. 179-191.
- [22] KANGSADALAMPAI, S., CHELVANAYAGAM, G., BAKER, R., TIEDEMANN, K., KUPERAN, P., BOARD, P. G. *Identification and characterization of two missense mutations causing factor XIII deficiency*. Brit. J. Haemat. 104: 37-43, 1999. [PubMed: [10027709](#)].
- [23] HATHAWAY, W. E., BELHASEN, L. P., HATHAWAY, H. S. *Evidence for a new plasma thromboplastin factor*. I. Case report, coagulation studies and physiochemical properties. Blood 26: 521-532, 1965. [PubMed: [5845778](#)].
- [24] FRIEDMAN, Bedřich. *Hematologie v praxi*. Praha: Galén, 1994, 368 s. ISBN: 80-85824-05-1.
- [25] BICK, R. L. *Disorders of Thrombosis and Hemostasis*. Clinical and Laboratory Practice. (3rd ed.) Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins (pub.) 2002. P. 127.
- [26] DEREK G. WALLER BSC (HONS), DM, MBBS (HONS), FRCP, ANTHONY P. SAMPSON MA, PHD, FHEA, FBPHS, *Medical Pharmacology and Therapeutics* (Fifth Edition), Edinburgh: W.B. Saunders, 2018, 744 s. ISBN: 9780702071676.
- [27] PENKA, Miroslav, TESAŘOVÁ, Eva a kolektiv. *Hematologie a transfuzní lékařství II*. Praha: Grada Publishing, a. s., 2012, 192 s. ISBN: 978-80-247-3460-6.
- [28] HARTER, Katherine, LEVINE, Michael, HENDERSON, Sean. *Anticoagulation drug therapy: A Review*. West J Emerg Med: 2015, Jan 16. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4307693/>.
- [29] WEBER, Marbod, STEINLE, Heidrun, GOLOMBEK, Sonia, HANN, Ludmilla, SCHLENSAK, Christian, WENDEL, Hans P., AVCI-ADALI, Meltem. *Blood-Contacting Biomaterials: In Vitro Evaluation of the Hemocompatibility*, Front Bioengineering and Biotechnology, 2018, Jul 16. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2018.00099/full>.
- [30] JAFFER, Iqbal, C FREDENBURGH, J., HIRSH, Jack, WEITZ, Jeffrey. *Medical device-induced thrombosis: What causes it and how can we prevent it?*. Journal of thrombosis and

haemostasis, 2015, June. Available from:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jth.12961>.

[31] ROUNTREE KM, LOPEZ PP. *Partial Thromboplastin Time*. [Updated 2018 Oct 27]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2018 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507772/>.

[32] SHELEF, L.A. *Chromogenic agar media*. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition), Academic Press, 2003, Pages 358-365. ISBN: 978-0-12-227055-0.

[33] Stief, T. W. *Specific Determination of Plasmatic Thrombin Activity*. Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis. 2006, July 1, 324–329.

[34] *Český lékopis 2017: Pharmacopoea Bohemica MMXVII (Ph.B. MMXVII)*. 1. díl., Evropská část. Praha: Grada Publishing, 2017. ISBN 978-80-271-0500-7.

[35] SPANNAGLA, Michael, HAVERKATEB, Frits, REINAUERA, Hans, MEIJERB, Piet. *The performance of quantitative D-dimer assays in laboratory routine*. Blood Coagul. Fibrinolysis. 2005, 16 pp. 439-443.

[36] PLODÍKOVÁ, Petra, LUSKOVÁ, Miroslava *Standartní operační postup č. M/17/5: Odběr krve u potkanů*. Výzkumný ústav organických systém a.s. Centrum ekologie, toxikologie a analytiky. Rybitví, 533 54, 9.3.2015.

[37] Chandler Loop System. Chandler Loop System [online]. Dostupné z: <https://www.chandler-loop-system.de/>

[38] 302 Found. 302 Found [online]. Dostupné z: <https://www.mybiosource.com/fpa-monkey-elisa-kits/fpa/2504850>.

[39] Rat thrombin-antithrombin complex, TAT ELISA Kit - Cusabio. Antibodies, Protein, ELISA Kits, Clone and Reagents for Life Science- Cusabio [online]. Copyright © 2007 [cit. 26.07.2019]. Dostupné z: <https://www.cusabio.com/ELISA-Kit/Rat-thrombin-antithrombin-complexTAT-ELISA-Kit-107334.html>.

Zdroje obrázků:

Obr. 1: Struktura α -řetězce fibrinogenu: FGA - Fibrinogen alpha chain precursor - Homo sapiens (Human) - FGA gene & protein. UniProt [online]. Copyright © 2002 [cit. 12.06.2019]. Dostupné z: <https://www.uniprot.org/uniprot/P02671>.

- Obr. 2:** Struktura β -řetězce fibrinogenu: FGB - Fibrinogen beta chain precursor - Homo sapiens (Human) - FGB gene & protein. UniProt [online]. Copyright © 2002 [cit. 12.06.2019]. Dostupné z: <https://www.uniprot.org/uniprot/P02675>.
- Obr. 3:** Struktura γ -řetězce fibrinogenu: FGG - Fibrinogen gamma chain precursor - Homo sapiens (Human) - FGG gene & protein. UniProt [online]. Copyright © 2002 [cit. 12.06.2019]. Dostupné z: <https://www.uniprot.org/uniprot/P02679>.
- Obr. 4:** Struktura protrombinu: F2 - Prothrombin precursor - Homo sapiens (Human) - F2 gene & protein. UniProt [online]. Copyright © 2002 [cit. 12.06.2019]. Dostupné z: <https://www.uniprot.org/uniprot/P00734>.
- Obr. 5:** Struktura tkáňového faktoru: F3 - Tissue factor precursor - Homo sapiens (Human) - F3 gene & protein. UniProt [online]. Copyright © 2002 [cit. 12.06.2019]. Dostupné z: <https://www.uniprot.org/uniprot/P13726>.
- Obr. 6:** Struktura proakcelerinu: F5 - Coagulation factor V precursor - Homo sapiens (Human) - F5 gene & protein. UniProt [online]. Copyright © 2002 [cit. 12.06.2019]. Dostupné z: <https://www.uniprot.org/uniprot/P12259>.
- Obr. 7:** Struktura prokonvertinu: F7 - Coagulation factor VII precursor - Homo sapiens (Human) - F7 gene & protein. UniProt [online]. Copyright © 2002 [cit. 12.06.2019]. Dostupné z: <https://www.uniprot.org/uniprot/P08709>.
- Obr. 8:** Struktura Antihemofilického faktoru A: F8 - Coagulation factor VIII precursor - Homo sapiens (Human) - F8 gene & protein. UniProt [online]. Copyright © 2002 [cit. 12.06.2019]. Dostupné z: <https://www.uniprot.org/uniprot/P00451>.
- Obr. 9:** Struktura christmas faktoru: F9 - Coagulation factor IX precursor - Homo sapiens (Human) - F9 gene & protein. UniProt [online]. Copyright © 2002 [cit. 12.06.2019]. Dostupné z: <https://www.uniprot.org/uniprot/P00740>.
- Obr. 10:** Struktura faktoru Stuarda-Powerové: F10 - Coagulation factor X precursor - Homo sapiens (Human) - F10 gene & protein. UniProt [online]. Copyright © 2002 [cit. 12.06.2019]. Dostupné z: <https://www.uniprot.org/uniprot/P00742>.
- Obr. 11:** Struktura Rosenthalova faktoru: F11 - Coagulation factor XI precursor - Homo sapiens (Human) - F11 gene & protein. UniProt [online]. Copyright © 2002 [cit. 12.06.2019]. Dostupné z: <https://www.uniprot.org/uniprot/P03951>.

Obr. 12: Struktura Hagemanova faktoru: F12 - Coagulation factor XII precursor - Homo sapiens (Human) - F12 gene & protein. UniProt [online]. Copyright © 2002 [cit. 12.06.2019]. Dostupné z: <https://www.uniprot.org/uniprot/P00748>.

Obr. 13: Struktura faktoru stabilizující fibrin: F13A1 - Coagulation factor XIII A chain precursor - Homo sapiens (Human) - F13A1 gene & protein. UniProt [online]. Copyright © 2002 [cit. 12.06.2019]. Dostupné z: <https://www.uniprot.org/uniprot/P00488>.

Obr. 14: Struktura Fletcherova faktora: KLKB1 - Plasma kallikrein precursor - Homo sapiens (Human) - KLKB1 gene & protein. UniProt [online]. Copyright © 2002 [cit. 12.06.2019]. Dostupné z: <https://www.uniprot.org/uniprot/P03952>.

Obr. 15: Struktura vysokomolekulárního kininogenu: KNG1 - Kininogen-1 precursor - Homo sapiens (Human) - KNG1 gene & protein. UniProt [online]. Copyright © 2002 [cit. 12.06.2019]. Dostupné z: <https://www.uniprot.org/uniprot/P01042>.

Obr.16: Koagulační kaskáda: SIEDLECKI, Christopher A. *Hemocompatibility of Biomaterials for Clinical Applications*. United Kingdom: Woodhead publishing, 2017, 469 s. ISBN: 978-0-08-100497-5.

Obr.17: Vznik sraženiny iniciované přítomností zdravotnického prostředku: JAFFER, Iqbal, C FREDENBURGH, J., HIRSH, Jack, WEITZ, Jeffrey. *Medical device-induced thrombosis: What causes it and how can we prevent it?*. Journal of thrombosis and haemostasis, 2015, June. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jth.12961>.

Obr.18: Chandlerova smyčka: SIEDLECKI, Christopher A. *Hemocompatibility of Biomaterials for Clinical Applications*. United Kingdom: Woodhead publishing, 2017, 469 s. ISBN: 978-0-08-100497-5.

Obr.19: Chandlerova smyčka (Chandler loop system, ebo kunze, Neuffen, Německo): Rybáriková Renata, 28.7.2019.

Obr.20: Chandlerova smyčka-hadičky naplněné krví a stentem: Rybáriková Renata, 28.7.2019.

Obr.21: Ředění standardu pro FPA: 302 Found. 302 Found [online]. Dostupné z: <https://www.mybiosource.com/fpa-monkey-elisa-kits/fpa/2504850>.

Obr.22: Ředění standardu pro TAT: Rat thrombin-antithrombin complex, TAT ELISA Kit - Cusabio. Antibodies, Protein, ELISA Kits, Clone and Reagents for Life Science-

Cusabio [online]. Copyright © 2007 [cit. 26.07.2019]. Dostupné

[z:https://www.cusabio.com/ELISA-Kit/Rat-thrombin-antithrombin-complexTAT-ELISA-Kit-107334.html](https://www.cusabio.com/ELISA-Kit/Rat-thrombin-antithrombin-complexTAT-ELISA-Kit-107334.html).

Obr.23: Test ELISA po přidání zastavovacího roztoku: Rybáriková Renata, 23.7.2019.

Zdroje tabulek:

Tab.1: Faktory podílející se na koagulaci krve: SAKALOVÁ, Adriena, LIPŠIČ, Tomáš a kolektiv. *Hematológia a transfuziológia*. Žilina: Nakladatelství Osveta, 1995, 527 s. ISBN: 80-217-0444-6.

Tab. 2: Zdravotnické prostředky nebo jejich součásti ve styku s cirkulující krví a kategorie příslušných zkoušek podle ČSN EN ISO 10993-4: Biologické hodnocení zdravotnických prostředků: ČSN EN ISO 10993-4. *Biologické hodnocení zdravotnických prostředků-část 4: Výběr zkoušek na interakce s krví*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2017.

Tab. 3: Naměřené hodnoty standardů FPA ze čtečky mikrodestiček (Absorbanční reader Epoch, Bio Tek).

Tab. 4: Naměřené hodnoty s FPA (Chandlerova smyčka).

Tab. 5: Naměřené hodnoty FPA ze čtečky mikrodestiček (statická zkouška).

Tab. 6: Naměřené hodnoty standardů TAT ze čtečky mikrodestiček (Absorbanční reader Epoch, Bio Tek).

Tab. 7: Naměřené hodnoty TAT (Chandlerova smyčka).

Tab. 8: Naměřené hodnoty TAT (statická zkouška).

Grafy:

Graf č.1: Kalibrační přímka fibrinopeptidu A v závislosti na koncentraci.

Graf č.2: Kalibrační přímka trombin-antitrombin komplexu v závislosti na koncentraci.