

Závěrečná zpráva projektu specifického výzkumu zakázka č. 2108 / 2021

Název projektu:

**Hodnocení interakce krevních elementů s povrchy zdravotnických materiálů
pomocí skenovací elektronové mikroskopie**

Specifikace řešitelského týmu

Odpovědný řešitel: Mgr. Martina Nalezinková

Studenti doktorského studia na UHK: -

Studenti magisterského studia na PřF UHK: -

Další výzkumní pracovníci: RNDr. Alena Myslivcová Fučíková, Ph.D.

Celková částka přidělené dotace: 117 500 Kč

Datum zahájení řešení projektu: 3. 3. 2021

Datum ukončení řešení projektu: 3. 3. 2022

Stručný popis postupu při řešení projektu:

Projekt začal studiem používaných postupů zpracování a fixace krevních vzorků, které se využívají pro skenovací elektronovou mikroskopii (SEM). Vybrané vhodné postupy a jejich modifikace byly aplikovány na vzorcích zdravotnického materiálu vystaveného cirkulační expozici krve. Takto připravené vzorky byly analyzovány pomocí SEM. Po vyhodnocení výsledného stavu vzorku a stability krevních buněk byl vybrán vhodný postup a následně modifikován podle potřeb metody se zaměřením na možné zkrácení časů jednotlivých kroků fixace, sušení a případně pokovování.

Výsledky byly následně porovnány a pro finální metodiku byl vybrán postup splňující zadané požadavky časové náročnosti, ale zároveň s dostatečně kvalitními parametry pozorování se zajištěním stability krevních buněk. Testování probíhalo za využití krve lidských dárců, kteří byli před odběrem seznámeni s účelem využití krve a podepsali informovaný souhlas. Postup byl schválen Etickou komisí UHK (stanovisko č. 9/2021). Odběry probíhaly vždy ráno na lačno do zkumavek s antikoagulanty. Neprodleně po odběru byla krev exponována testovanému prostředku za stanovených stálých podmínek (37 ± 1 °C, délka expozice 30 minut). Po interakci testovaného materiálu s krví byla provedena fixace vzorku spolu s adherovanými krevními buňkami na povrchu.

K fixaci biologického materiálu, potažmo krevních buněk, byl použit například formaldehyd, glutaraldehyd, různé druhy pufrů (PBS, kakodylát sodný apod.), roztok oxidu osmičelého, odstupňovaná etanolová odvodňovací řada a aceton. Byly testovány různé modifikace a varianty ohledně využitých chemikálií, koncentrací i časů (viz Tab. 1).

Tab. 1: Souhrn variant fixace a přípravy vzorku zdravotnického prostředku po inkubaci s krví. První chemikálie byla ponechána svému působení vždy po dobu 10 minut, po oplachu PBS následovala další řada chemikálií. Ethanolová odvodňovací řada – postupné zvyšování koncentrace ethanolu po 10 minutách (30,40,50,60,70,80, 90, 96 a 100% ethanol), CPD – pomalé vysoušení vzorku pomocí CO₂, kov – pokovení povrchu naprášením dané vrstvy kovu (zlato nebo platina, 6-7 nm, difúzně)

	1. chemikálie	2. chemikálie	3. chemikálie	Kov
1	100% May-Grünwaldův roztok	Ethanolová řada	X	Pt
2	100% May-Grünwaldův roztok	Ethanolová řada	Acetonová řada	Pt
3	50% May-Grünwaldův roztok	Ethanolová řada	X	Au
4	50% May-Grünwaldův roztok	Acetonová řada	X	Au
5	4% vodný paraformaldehyd	Ethanolová řada	X	Au
6	4% vodný paraformaldehyd	Oxid osmičelý 1 hod, RT	Ethanolová řada	Au
7	Ethanolová řada á 10 min	X	X	Au
8	Acetonová řada á 10 min	X	X	Au
9	25% vodný glutaraldehyd	Ethanolová řada	X	Au
10	25% vodný glutaraldehyd	Oxid osmičelý 24 hod, 4°C	Ethanolová řada	Au
11	2% glutaraldehyd, 2% paraformaldehyd v PBS	Ethanolová řada	X	Au
12	2% glutaraldehyd, 2% paraformaldehyd v PBS	Oxid osmičelý 24 hod, 4 °C	Ethanolová řada	Pt
13	3% glutaraldehyd v PBS	Ethanolová řada	X	Pt
14	3% glutaraldehyd v PBS	Oxid osmičelý 24 hod, 4 °C	Ethanolová řada	Pt
15	3% glutaraldehyd v kakodylu	Ethanolová řada	X	Pt
16	3% glutaraldehyd v kakodylu	Oxid osmičelý 24 hod, 4 °C	Ethanolová řada	Pt

	1. chemikálie	2. chemikálie	3. chemikálie	Kov
17	25% vodný glutaraldehyd	Oxid osmičelý 1 hod, RT	Ethanolová řada	Au
18	2% glutaraldehyd, 2% paraformaldehyd v PBS	Oxid osmičelý 1 hod, RT	Ethanolová řada	Au
19	3% glutaraldehyd v PBS	Oxid osmičelý 1 hod, RT	Ethanolová řada	Au
20	3% glutaraldehyd v kakodylu	Oxid osmičelý 1 hod, RT	Ethanolová řada	Au
21	100% May-Grünwaldův roztok	Oxid osmičelý 1 hod, RT	Ethanolová řada	Au
22	50% May-Grünwaldův roztok	Oxid osmičelý 1 hod, RT	Ethanolová řada	Au
23	100% May-Grünwaldův roztok	Oxid osmičelý 1 hod, RT	Acetonová řada	Au
24	50% May-Grünwaldův roztok	Oxid osmičelý 1 hod, RT	Acetonová řada	Au
25	2% glutaraldehyd, 2% paraformaldehyd v PBS	Oxid osmičelý 1 hod, RT	Acetonová řada	Au

K následnému vysoušení vzorku bylo v tomto výzkumu vždy využito vysoušecího přístroje LEICA EM CPD 300, který zajišťuje pomalé a šetrné vysoušení vzorku pomocí kritického bodu CO₂. Takto vysušené vzorky byly pokovovány v přístroji LEICA EM ACE 200. Tloušťka nanesené vrstvy byla během výzkumu testována tak, aby byla zvolena co nejvhodnější varianta s ohledem na kvalitu finálního pozorování v SEM. Výslednou nejvhodnější variantou bylo zvoleno difúzní pokovení platinou o tloušťce 6 nm.

Splnění cílů řešení a přínos projektu:

Cílem tohoto projektu bylo vytvoření vhodné metodiky zpracování a fixace vzorků zdravotnických materiálů s adherovanými krevními buňkami a jejich následné hodnocení pomocí SEM. Na získaných snímcích byla analyzována aktivace trombocytů a leukocytů a tvorba fibrinových vláken. Díky těmto údajům jsme získali informace o trombogenním potenciálu testovaných zdravotnických prostředků v kontaktu s krví, což je podstatné pro jejich bezpečné vyžívání v lékařské praxi. Dalším cílem projektu bylo vytvoření co nejjednodušších postupů s využitím snadno dostupných a co nejméně toxických chemikálií. Proto byly testovány různé délky jednotlivých kroků fixace se snahou tyto kroky zkrátit, ale s ohledem na maximální citlivost této metodiky, jelikož jsou krevní buňky velmi náchylné na výkyvy podmínek prostředí a pro správné hodnocení je nutné zachovat jejich stav co nejbližší fyziologickému.

Pro fixaci krevních elementů navázaných na povrchu ZP byl na základě výsledků vybrán glutaraldehyd a May-Grünwaldův roztok. Konkrétně roztok 2% glutaraldehydu a 2% paraformaldehydu v PBS, případně 3% roztok glutaraldehydu v kakodylu. V obou variantách vždy s následnou aplikací postupné etanolové řady a vysoušením pomocí kritického bodu CO₂ v absolutním etanolu. K pokovení se doporučuje 6 nm silná vrstva platiny. Využití oxidu osmičelého nebylo prokázáno jako nezbytně nutné. Pokud je ale využito, doporučuje se jeho hodinové působení v rámci postfixace. Při využití May-Grünwaldova roztoku, který dosud nebyl běžně pro tyto účely využíván, byly shledány nejlepší výsledky v kombinaci s odvodňovací etanolovou řadou a s využitím 100% roztoku vhodného pro SEM. Možnost kombinace s oxidem osmičelým je možná v případě hodinové postfixace, ale stejně jako v předchozím případě není nutná.

Všechny tyto varianty zajišťují pevnou fixaci krevních buněk nejen na povrchu ZP, ale také v prostoru. To je stěžejní zejména pro fixaci vzorků s vytvořenou fibrinovou sítí vystupující nad povrch a pro následnou správnou interpretaci trombogenicity testovaného vzorku. K samotnému hodnocení míry adheze krevních elementů byla vytvořena ucelená metodika s využitím softwaru ImageJ, která bude společně s výsledky publikována v impaktovaném časopise.

Splnění kontrolovatelných výsledků řešení:

Všechny praktické laboratorní činnosti jsou ukončené, výsledky statisticky zpracované a článek napsán. Aktuálně probíhá jeho anglická korektura a hned poté bude podán k recenznímu řízení v impaktovaném časopise (plánovaný časopis: Journal of Biomedical Science Q1, IF 12,771). Cílem je snaha o publikaci v Q1-Q2, po schválení bude zadána do OBD s vazbou na RIV.

Tab. 1 Sumář výstupů řešení projektu

Typ výstupu	Plán	Skutečnost	Poznámka
<i>Jimp (databáze WoS)</i>	1	0*	*Článek zpracován, probíhá korektura textu
Jsc (databáze Scopus)			
B (recenzovaná odborná kniha)*			
C (kapitola v recenzované odborné knize)*			
D (článek ve sborníku ve WoS, Scopus)			
P (patent)			
Počet obhájených dizertačních prací			
Počet obhájených diplomových prací			
Počet výsledků	1	0	

Datum:

Podpis odpovědného řešitele:

* Pouze renomovaná nakladatelství Elsevier, Springer, Bentham apod.