

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

**Využití alternativních metod testování
pyrogenity u zdravotnických prostředků**

Bakalářská práce

2022

Sára Mrvková

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

**Alternative methods for the pyrogen testing of
medical devices**

Bachelor thesis

2022

Sára Mrvková

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Sára Mrvková**
Osobní číslo: **C18591**
Studijní program: **B2830 Farmakochemie a medicínální materiály**
Studijní obor: **Farmakochemie a medicínální materiály**
Téma práce: **Využití alternativních metod testování pyrogenity u zdravotnických prostředků**
Téma práce anglicky: **Alternative methods for the pyrogen testing of medical devices**
Zadávací katedra: **Ústav organické chemie a technologie**

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši zaměřenou na in vivo a in vitro zkoušky na pyrogenní látky. Popište současné trendy při testování pyrogenity, princip jednotlivých testovacích přístupů a diskutujte jejich výhody a nevýhody.
2. V rámci experimentální části práce navrhnete ve spolupráci s odborným konzultantem metodiku alternativní metody testování pyrogenity zdravotnických prostředků na pracovišti Centra Ekologie, Toxikologie a Analytiky, Výzkumného ústavu organických syntéz v Rybitví.
3. Výsledky zpracujte formou závěrečné práce. Bakalářskou práci zpracujte v souladu se Směrnicí UPa č. 7/2019 „Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací“ v platném znění.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Veškerá dostupná odborná literatura.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Kateřina Hrdá, Ph.D.**
Ústav environmentálního a chemického inženýrství

Konzultant bakalářské práce: **Mgr. Petra Kubincová, Ph.D.**
Výzkumný ústav organických syntéz a.s.

Datum zadání bakalářské práce: **28. února 2022**
Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2022**

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc. v.r.
děkan

L.S.

prof. Ing. Miloš Sedlák, DrSc. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2022

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne:

Sára Mrvková

Poděkování:

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Kateřině Hrdé, Ph.D., za cenné rady, ochotu a trpělivost, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnovala.

Dále bych ráda poděkovala Mgr. Petře Kubincové, Ph.D., za pomoc a trpělivost při práci v laboratoři a při zpracování bakalářské práce.

ANOTACE

Součástí hodnocení bezpečnosti zdravotnických prostředků předepsané evropskou legislativou je test pyrogenity. Tento test je standardně prováděn na králících. Kromě této *in vivo* metody byly vyvinuty a zakotveny v legislativě i alternativní *in vitro* testy jako je test bakteriálního endotoxinu nebo relativně novější test aktivace lidských monocytů (MAT test), které mohou být využívány jako náhrady *in vivo* testu na králících. V rámci této bakalářské práce jsou představeny současné trendy v testování pyrogenity zdravotnických prostředků, principy testovacích přístupů a jejich výhody a nevýhody. Praktická část se zaměřuje na alternativní *in vitro* MAT test, na jeho varianty a na možnosti jeho využití pro různé typy zdravotnických prostředků.

KLÍČOVÁ SLOVA

Pyrogenita, *in vitro* MAT test, zdravotnické prostředky, test aktivace lidských monocytů

TITLE

Alternative methods for the pyrogen testing of medical devices

ANNOTATION

The pyrogenicity test is part of the safety assessment of medical devices prescribed by European legislation. This test is normally performed on rabbits. In addition to this *in vivo* method, alternative *in vitro* tests such as the bacterial endotoxin test or the relatively newer human monocyte activation test (MAT test) have been developed and legislated, which can be used as a substitute for the *in vivo* test in rabbits. This bachelor thesis presents current trends in testing the pyrogenicity of medical devices, the principles of testing approaches and their advantages and disadvantages. The practical part is focused on the alternative *in vitro* MAT test, its variants and possibilities of its use for various types of medical devices.

KEYWORDS

Pyrogenicity, *in vitro* MAT test, medical devices, human monocyte activation test

Obsah

ÚVOD	15
1 TEORETICKÁ ČÁST	16
1.1 Pyrogen	16
1.1.1 Rostoucí potřeba pyrogenního testování.....	18
1.1.2 Dostupné metody pro detekci pyrogenů a endotoxinů	19
1.2 Králičí pyrogenní test (RPT).....	20
1.3 Princip 3R	22
1.3.1 Replacement (výměna, nahrazení).....	22
1.3.2 Reduction (snížení).....	23
1.3.3 Refinement (zmírnění).....	23
1.4 Metody pyrogenního testování zdravotnických prostředků.....	24
1.5 Toll-Like Receptors	25
1.5.1 Aktivace lidského imunitního systému prostřednictvím TLR.....	25
1.5.2 Regulační prostředí testu aktivace monocytů	26
1.6 Test lyzátu z améboctů kraba trnitého, <i>Limulus polyphemus</i> (LAL test)	27
1.7 MAT test.....	30
1.7.1 Příprava vzorku na MAT test.....	31
1.7.2 Standardizace MAT	32
1.7.3 Princip systému PyroMAT®	32
1.7.4 Princip systému PyroCell™.....	33
1.7.5 Interleukin-6.....	34
1.8 Metoda ELISA	35
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	36
2.1 Pyrocell™ MAT test (Experiment 1, 2 a 3).....	37
2.1.1 TESTOVÁNÍ NA PLNÉ KRVI – PŘÍMÝ KONTAKT (EXPERIMENT 1)	38

2.1.2	TESTOVÁNÍ NA PBMC BUŇKÁCH – EXTRAKT (EXPERIMENT 2).....	44
2.1.3	TESTOVÁNÍ NA PBMC BUŇKÁCH – PŘÍMÝ KONTAKT (EXPERIMENT 3)	47
2.2	PyroMAT™ Systém (Experiment 4).....	49
3	VÝSLEDKY	53
3.1	Pyrocell™ MAT test.....	53
3.1.1	EXPERIMENT 1	53
3.1.2	EXPERIMENT 2	56
3.1.3	EXPERIMENT 3	58
3.2	PyroMAT™ Systém	60
3.2.1	EXPERIMENT 4	60
4	DISKUZE	62
5	ZÁVĚR	64
6	LITERATURA	65

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1: Krab trnitý [4]	17
Obrázek 2: Schéma oběhového systému kraba trnitého [4]	17
Obrázek 3: Aplikace na králíku [15].....	21
Obrázek 4: LPS stimuluje vrozenou imunitu. LPS v krvi aktivuje monocyty, což vede k sekreci zánětlivých mediátorů. Při systémovém zánětu to může vést k multiorgánovému selhání a sepsi [26].....	27
Obrázek 5: Ve vodném vzorku tvoří monomerní molekuly LPS agregáty ve formě micel nebo vezikul. Bivalentní kationty tvoří můstky mezi záporně nabitými fosfátovými skupinami ve frakci lipidu A. Přidáním chelátorů (EDTA, citrát) a detergentů (DOC) lze aglomerát LPS [26].....	29
Obrázek 6: PyroMAT kit [3]	33
Obrázek 7: PyroCell™ kit [34].....	34
Obrázek 8: Struktura Interleukinu-6 [36]	35
Obrázek 9: Ředění Flagellinu [42].....	39
Obrázek 10: Ředění RSE [42]	45
Obrázek 11: Sériové ředění RSE [42].....	50
Obrázek 12: Ředění HKSA [42].....	50
Obrázek 13: Graf 1 - Koncentrační řada HKSA.....	55
Obrázek 14: Graf 2 - Koncentrační řada RSE	57
Obrázek 15: Graf 3 - Koncentrační řada RSE	59
Obrázek 16: Graf 4 - Koncentrační řada RSE	61
Tabulka 1: Ředící řada HKSA kontroly	40
Tabulka 2: Ředící řada – příprava vzorků/kontrol.....	41
Tabulka 3: Schéma 96-jamkové ELISA desky.....	42
Tabulka 4: Schéma 96-jamkové ELISA desky.....	46

Tabulka 5: Schéma 96-jamkové ELISA desky.....	48
Tabulka 6: Schéma 96-jamkové ELISA desky.....	52
Tabulka 7: Hodnoty naměřené absorbance (po odečtu referenční vlnové délky)	54
Tabulka 8: Výsledné koncentrace vypočítané dle kalibrační křivky standardu IL-6	54
Tabulka 9: Hodnoty naměřené absorbance (po odečtu referenční vlnové délky)	56
Tabulka 10: Výsledná koncentrace vypočítána z kalibrační křivky RSE (EEU/ml).....	57
Tabulka 11: Hodnoty naměřené absorbance (po odečtu referenční vlnové délky)	58
Tabulka 12: Výsledná koncentrace vypočítána z kalibrační křivky RSE (EEU/ml).....	59
Tabulka 13: Hodnoty naměřené absorbance (po odečtu referenční vlnové délky)	60
Tabulka 14: Výsledná koncentrace vypočítána z kalibrační křivky RSE (EEU/ml).....	61

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

BET	Test bakteriálního endotoxinu
CLC	Koncentrace kontaminujících látek
CSE	Kontrolní standardní Endotoxin
DAMP	Molekulární struktury spojené s nebezpečím (angl. Danger Associated Molecular Patterns)
DOC	Deoxycholát sodný
ECVAM	Evropské centrum pro validaci alternativních metod
EP	Evropský parlament
EP3	„E-prostanoid“ receptor 3
FDA	Úřad pro kontrolu léčiv a potravin
HKSA	Tepelně usmrcený <i>Staphylococcus aureus</i>
HPE BUFFER	„High Performance“ ELISA pufr – pracovní pufr
ICCVAM	Meziagenturní koordinační výbor pro validaci alternativních metod
IL-1	Interleukin 1
IL-6	Interleukin 6
IL-1 β	Interleukin 1 β
IMDM	Kompletní médium s přidavkem séra (angl. Iscove's Modified Dulbecco's Medium)
LAL	Test lyzátu amébocytů kraba trnitého, <i>Limulus polyphemus</i>
LPS	Lipopolysacharidy
LTA	Lipoteichová kyselina
MAT	Test aktivace monocytů
MMPs	Materiálně zprostředkované pyrogeny
MyD88	Myeloidní diferenační primární respons protein 88
NEP	Neendotoxinové pyrogeny

PAMP	Struktury typické po povrch buněk patogenních mikroorganismů (angl. Pathogen Associated Microbial Patterns)
PBMC	Monomolekulární buňky periferní krve
PBS	Fosfátem pufovaný fyziologický roztok
PGE2	Prostaglandin E2
PRR	Receptory pro rozpoznávání vzorů (angl. Pattern Recognition Receptors (Receptory pro rozpoznávání vzorů))
RPMI	Buněčné medium s L-Glutaminem
RPT	Pyrogenní test na králicích (angl. Rabbit pyrogen test)
RSE	Referenční standard Endotoxinu
STREPTAVIDIN-HRP	Streptavidinem konjugovaná peroxidáza
TLR	Toll-Like Receptors
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidin
TNF- α	Faktor nádorové nekrózy (angl. Tumor necrosis factor)
USP	Lékopis Spojených států amerických

ÚVOD

„Lidstvo má jen tři velké nepřátele: horečku, hladomor a válku; z nich zdaleka největší, zdaleka nejstrašnější je horečka.“ William Osler (1849-1919, Johns Hopkins University), (Osler, 1896).

Pyrogeny jsou složky mikroorganismů, jako jsou bakterie, viry nebo houby, nebo tzv. materiálově zprostředkované, a mohou v lidském těle vyvolat zánětlivou reakci. Pyrogenní kontaminace zdravotnických prostředků před operací představuje pro pacienty závažné riziko komplikací. Proto je nutné zdravotnické prostředky a léčiva testovat na pyrogenitu.

Zkouška na pyrogenní látky se prováděla a stále provádí na králíkovi. Pyrogenní *in vitro* test plné lidské krve vynalezený před více jak 25 lety, a jeho varianta založená na kryokonzervované krvi, sice přinesly impuls do oblasti testování pyrogenů, ale ta i přes široké použití testu lyzátu améboctů kraba *Limulus polyphemus* (LAL) nebo bakteriálního endotoxinového testu (BET) spotřebovává stále stovky tisíc králíků ročně po celém světě. Kvůli výše uvedenému je zapotřebí optimalizovat a využívat alternativní testy, které by mohly umožnit testovat látky na pyrogenitu bez využití pokusných králíků.

Teoretická část bakalářské práce se tedy zaměřuje na problematiku testování pyrogenity zdravotnických prostředků dle legislativy, dostupné *in vivo* testy a využití testů alternativních (*in vitro*). Experimentální část se zabývá konkrétním *in vitro* MAT testem a jeho variantami. V současné legislativě je testování pyrogenity pomocí alternativního *in vitro* MAT testu přizpůsobeno zejména rozpustným testovaným látkám např. vakcínám nebo parenterálním léčivům. Zdravotnické prostředky jsou však různé velikosti, tvarů a jedná se např. o pevné či pěnové, nerozpustné materiály, proto je potřeba testování pyrogenity *in vitro* přizpůsobit vždy konkrétnímu typu zdravotnického prostředku.

Cílem experimentální části bakalářské práce bylo tedy představit dostupné a validované varianty MAT testu a vyzkoušet různé možnosti testování zdravotnických prostředků jako je testování přímým kontaktem materiálu a testovacího systému nebo testování extraktu testovaného materiálu. Experimentální laboratorní postupy vychází z protokolů ICCVAM, ECVAM a vědecké literatury [39, 40, 41, 42,43].

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Pyrogen

Pyrogen je látka, která u člověka nebo zvířete způsobuje zvýšení teploty [1,2,3]. Pyrogeny mohou být klasifikovány jako endogenní (produkované v těle) nebo exogenní (z vnějších zdrojů). Exogenní pyrogeny zahrnují bakteriální endotoxiny, jako jsou lipopolysacharidy, nejrozšířenější pyrogeny, které jsou jedinečné pro gramnegativní bakterie. Exogenní mikrobiální neendotoxinové pyrogeny pocházejí z kvasinek, plísní, virů a dalších organismů mimo gramnegativní bakterie, jako je kyselina lipoteichová, polymer buněčné stěny nacházející se v grampozitivních bakteriích. Volně definovaná třetí třída neendotoxigenních exogenních pyrogenů se nazývá Materiálně zprostředkované pyrogeny (MMPs), které se mohou během používání vyluhovat ze zdravotnických prostředků a přímo iniciovat pyrogenní reakci [1].

Pyrogenní látky ve zdravotnických výrobcích mohou po injekci do lidského těla vyvolat život ohrožující horečnaté reakce. Proto existuje požadavek testovat takové výrobky na pyrogeny, aby byla zajištěna kvalita produktu a bezpečnost pacientů. Účelem testu je prokázat, že množství pyrogenů obsažené v produktu nepřesáhne určitou prahovou hodnotu, známou jako limitní koncentrace kontaminujících látek (CLC), která zajistí bezpečnost pacienta [3].

Používané toxikologické metodiky k detekci pyrogenů v parenterálních (mimostřevních) farmaceutických přípravcích nebo zdravotnických prostředcích, které jsou zakotveny v legislativě např. Evropský lékopis¹ nebo Americký lékopis², jsou: králičí pyrogenní test (RPT), test lyzátu améboctů kraba trnitého (LAL), často označovaný jako test bakteriálního endotoxinu (BET), který je založen na předpokladu, že krevní buňky (amébocty) extrahované z krabů trnitých (*Limulus polyphemus*) se sráží v přítomnosti bakterií, a dále test aktivace monocyty (MAT), jehož existuje pět variant. Vzhledem k vysoké spotřebě zvířat vyžadované RPT a jeho etickým důsledkům byl tento test ve většině lékopisných monografií nahrazen LAL testem. Většina regulačních orgánů však i nadále doporučuje RPT pro hodnocení léčivých přípravků pocházejících z plazmy [1,2]. LAL test byl navržen jako náhrada RPT v roce 1971 [1].

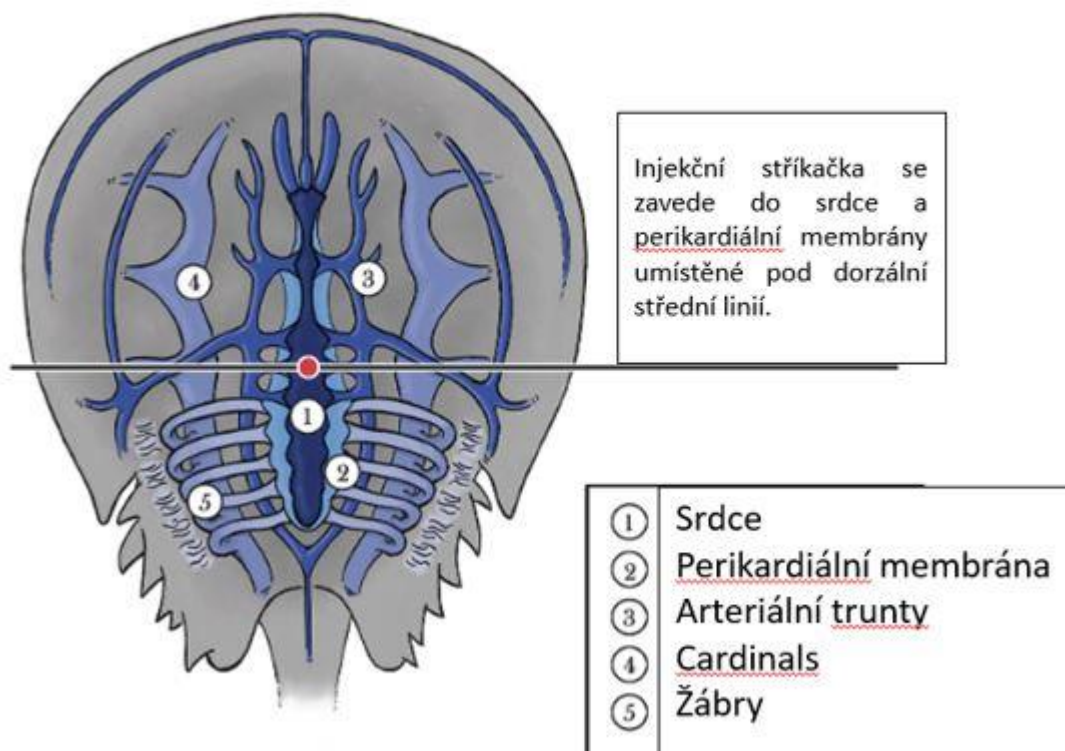
¹ EP – European Pharmacopoeia (2007). 6.0: 2.6.8. Pyrogens, EP – European Pharmacopoeia (2010). 6.7: 2.6.30. Monocyte Activation test

² USP – United States Pharmacopeia (2017). 151 -Pyrogen test



Obrázek 1: Krab trnitý [4]

Oběhový systém kraba trnitého



Obrázek 2: Schéma oběhového systému kraba trnitého [4]

Navzdory dostupnosti LAL testu i MAT testu se pyrogenní testy nadále používají ve velkém počtu na zvířatech, přičemž roční využití králíků pro tento sledovaný parametr zůstává

v posledních letech relativně konstantní. V roce 2017 bylo v pyrogenních testech použito pouze v Německu a ve Velké Británii 6 716 králíků [1].

1.1.1 Rostoucí potřeba pyrogenního testování

S vývojem injekčních farmaceutických roztoků na počátku 20. století vyvstal problém zvaný „injekční horečka“. Předpokládalo se spojení s přítomností mikroorganismů a první králíčí pyrogenní test byl vyvinut v roce 1912 [5]. Jeho relevance však byla až do zveřejnění výzkumné práce Florence Seibertové do značné míry přehlížena [6,7].

Další studie během následujících dvou desetiletí nakonec vedly k vývoji prvního oficiálního testu na pyrogenitu na králících (RPT), začleněného do Lékopisu Spojených států amerických (USP) v roce 1942 kvůli rostoucí potřebě injekčních roztoků bez pyrogenů během druhé světové války a několika případům s injekčními roztoky [8].

Dalším krokem v detekci endotoxinu byl objev Freda Banga v roce 1956, že krev kraba trnitého koaguluje na gel, když je vystavena gramnegativním bakteriím nebo jejich lyzátům [8]. Další studie spolu s hematologem Jackem Levinem vedly k základu testu Limulus Amebocyte Lysate (LAL) s použitím extraktů amebocytů z krve limulu k testování endotoxinu srážecí technikou. Velmi specifická a citlivá reakce LAL a také snadné použití ve srovnání s RPT vedly k rychlému vývoji a standardizaci testu, a nakonec k jeho přijetí do USP, přestože věděli o jeho slabosti detekovat pouze endotoxiny [9].

Vzhledem k neschopnosti testu LAL detekovat neendotoxinové pyrogeny nebo potencujícím účinkům dalších kontaminantů, jako je peptidoglykan, zůstal králíčí pyrogenový test po mnoho desetiletí standardní metodou detekce pyrogenů, bez ohledu na jeho intenzivní spotřebu zvířat, nízkou citlivost ve srovnání s testem LAL a bez ohledu na fakt, že jeho kvalitativní povaha umožňuje pouze interpretaci vyhověl/nevychověl. To se začalo měnit poté, co byl vyvinut test aktivace monocytů [10].

Pomocí produkce cytokinů z monocytů k napodobení lidské reakce na pyrogeny byla tato metoda *in vitro* brzy uznána jako alternativa ke králíčímu pyrogenovému testu a zahrnuta do Evropského parlamentu (EP) jako kompendiální metoda (2010) a USP jako alternativní metoda (2012) [11].

1.1.2 Dostupné metody pro detekci pyrogenů a endotoxinů

Pro detekci pyrogenů a endotoxinů lze v současnosti popsat čtyři metody. Rozlišují se podle:

- Cíle – buď pyrogeny (tj. endotoxiny a neendotoxinové pyrogeny), nebo pouze endotoxiny
- Použití nebo nepoužití zvířat

Endotoxinové testy mohou detekovat kontaminaci gramnegativními bakteriemi, ale při provádění endotoxinového testu může být pyrogenní aktivita přípravku u lidí podhodnocena kvůli neendotoxinovým kontaminantům. Proto lze endotoxinové testy většinou použít pro testování surovin, výrobní vody a testování v průběhu procesu [12].

Na druhé straně pyrogenní testy detekují celou škálu pyrogenů (včetně endotoxinů i neendotoxinových pyrogenů). Jsou navrženy tak, aby předpovídaly pyrogenní aktivitu přípravku u člověka, a proto se používají jako kontrola kvality konečných produktů [12].

Detekce pyrogenů může být provedena pomocí řady různých metod. Použití standardů jako pozitivních kontrol umožňuje potvrzení účinnosti metody při detekci endotoxinů a neendotoxinových pyrogenů (NEP) [12].

A. Endotoxinové standardy

Existují dva různé typy standardů endotoxinů:

1. Mezinárodní standard: Referenční standard Endotoxin (RSE): Standardy RSE lze použít bez jakýchkoli úprav. Podle definice je 1 EU (endotoxinová jednotka) ekvivalentní 100 pg každého z těchto standardů [12].
2. Standard výrobce: Kontrolní standardní endotoxin (CSE): Naproti tomu standardy CSE jsou upraveny pro konkrétní šarže testů LAL (Limulus Amebocyte Lysate). Dodavatelé musí tyto normy odkazovat na RSE [12].

B. Neendotoxinové pyrogeny

Teprve v poslední době si získala větší pozornost relevance neendotoxinových pyrogenů (např. kyselina lipoteichoová (LTA), bakteriální DNA (CpG-motivy), peptidoglykan, syntetické agonisty TLR nebo endogenní pyrogeny), především jako příčina nežádoucích reakcí u lidí. (např. bolest v místě vpichu, zarudnutí, třes a horečka) [12].

Případová studie týkající se této záležitosti byla hlášena významnou farmaceutickou společností. Inkriminované šarže život zachraňujícího léku, který vyvolal některé stížnosti, prošly BET a RPT bez zjištěné odezvy. Nebyl žádný rozdíl mezi šaržemi, které vyvolávaly nežádoucí reakce, a „čistými“ šaržemi. Bylo stále jasnější, že dosud neznámá kontaminace NEP narušuje lidské zdraví. Po zavedení MAT jako testovací metody v souladu s Úřadem pro kontrolu léčiv a potravin (FDA) pro uvolňování šarží a přijetí několika optimalizačních kroků se hlášení nežádoucích účinků výrazně snížilo [12].

Potřeba standardů neendotoxinových pyrogenů byla vznesena, protože pyrogenové testy se neomezují pouze na detekci endotoxinů. Přesto kvůli široké škále pyrogenů a jejich specifičnosti pro různé TLR nejsou v současné době k dispozici žádné standardy NEP. Nicméně několik NEP může být použito jako pozitivní kontrola, pokud neobsahují endotoxin [12].

1.2 Králičí pyrogenní test (RPT)

Předpoklad pro pozitivitu látky na pyrogenitu zní, že pyrogenní látky obsažené ve sterilním injekčním roztoku vyvolají u králíka po nitrožilním podání vzestup jeho rektální teploty [13]. Obecně se ke zkoušce používají zdraví bílí králíci o hmotnosti nejméně 1,5 kg [13,14].

Experimenty se zvířaty (*in vivo*) jsou prováděny v České republice v souladu se zákonem o ochraně zvířat č. 246/1992 Sb., pod dohledem Ministerstva zemědělství, poradním orgánem Ústřední komise pro ochranu zvířat a ve spolupráci se Státní veterinární správou.

Zvířata jsou chována v klidném prostředí v jednotlivých klecích a krmena vyváženou stravou bez obsahu antibiotik [4,13]. Jejich hmotnost nesmí během týdne před zkouškou vykazovat žádný úbytek. U všech králíků, používaných k těmto zkouškám, se vedou záznamy o jejich hmotnosti, podaných přípravcích a teplotních křivkách. Po zkoušce s nepyrogenním výsledkem se může králík vzít do nové zkoušky nejdříve za 3 dny, po zkoušce s pyrogenním přípravkem se tento interval prodlužuje na 3 týdny [13].

Pohyblivost králíka se při zkoušce omezuje vhodným zařízením, které fixuje netraumatizujícím způsobem pouze šíji zvířete a dovolí mu zaujmout pozici v sedě. K měření tělesné teploty se používají rektální teploměry nebo elektrické termometry, které udávají teplotu s přesností 0,1 °C. Po lehkém potření vazelínou jsou zavedeny do hloubky 5 cm. Tato hloubka musí být u každého králíka konstantní [13,14].

Nádoby, jehly a injekční stříkačky, které přicházejí do styku se zkoušeným roztokem se vymyjí vodou a sterilizují v autoklávu 30 minut při 250 °C. U každého králíka je potřeba otestovat jeho citlivost na nepyrogenní roztok chloridu shodného (9 g/l), zahřátý na 38,5 °C podaný nitrožilně v dávce 1 ml/kg tělesné hmotnosti. Tělesná teplota měřená průběžně 90 minut před injekcí a 3 hodiny po injekci nevykazuje změnu vyšší než 0,5 °C, jinak se zvíře nepoužije k vlastní zkoušce [13,14].

Zkouška se provádí v oddělené místnosti o pokojové teplotě 20 °C [13,14]. Ke zkoušce se použijí tři králíci, kterým je večer před testem odebrána potrava. Po upoutání do fixačního zařízení se u každého zvířete 90 minut sleduje tělesná teplota ve 30 min intervalech. Za výchozí teplotu králíka je považován průměr ze dvou odečtů, naměřených v posledních 40 minutách před podáním zkoušeného roztoku. Maximální teplotou se myslí ta teplota, která je nejvyšší naměřenou teplotou ve třiceti minutových intervalech po dobu tří hodin po podání zkoušeného roztoku. Reakce králíka je vyjádřena rozdílem mezi jeho výchozí a maximální naměřenou teplotou. Jestliže je rozdíl negativní, je výsledek počítán, jako nulová odpověď. Ze zkoušky se vyřadí králík, u kterého se při stanovení výchozí teploty liší naměřené dvě hodnoty o více než 0,2 °C nebo výchozí teplota je vyšší než 39,8 °C anebo nižší než 38 °C [13].



Obrázek 3: Aplikace na králíku [15]

1.3 Princip 3R

Koncept Replacement, Reduction and Refinement (nahrazení, redukce a zmírnění) označovaný jako princip 3R byl vyvinut před více než 50 lety a poskytuje rámec pro provádění toxikologického testování na zvířatech. Postupně byl zejména od 70. let 20. století tento koncept implementován do národní a mezinárodní legislativy a předpisů o používání zvířat v toxikologickém testování různých produktů (farmaceutik, chemikálií, kosmetických přípravků) [16].

Potřeba zavést koncept 3R vzešla nejenom z etických důvodů, ale také z důvodů ekonomických. Zejména proto, že celosvětově stoupá tlak na toxikologické testování nových látek; přípravků; produktů, což se *in vivo* testy nedá pokrýt. Dalším důvodem je finanční a časová náročnost takového testování *in vivo*, v neposlední řadě pak problematická extrapolace dat na člověka. Z minimálně těchto důvodů je snaha zavádět alternativní testy, kam patří testy *in vitro*; *in silico*; *ex vivo* [17].

1.3.1 Replacement (výměna, nahrazení)

Nahrazení lze definovat jako metody, strategie nebo přístupy, které nezahrnují použití živých zvířat. Nahrazení lze dosáhnout řadou nástrojů nebo jejich kombinací, včetně systémů *in vitro* využívajících tkáně, celé buňky nebo části buněčných systémů založených na biochemických přístupech, tj. pomocí syntetických (makro)molekul jako zástupců (reaktivních) cílů toxicity [18].

Výměnu dělíme do dvou klíčových kategorií, plnou a částečnou. Úplná náhrada zabraňuje použití jakýchkoli výzkumných zvířat. Zahrnuje použití lidských dobrovolníků, tkání a buněk, matematických a počítačových modelů a zavedených buněčných linií [16].

Částečná náhrada zahrnuje použití některých zvířat, která na základě současného vědeckého myšlení nejsou považována za schopná prožívat utrpení. Patří sem bezobratlí, jako jsou octomilky, háďátka, améby a nezralé formy obratlovců. Částečná náhrada rovněž zahrnuje použití primárních buněk (a tkání) odebraných zvířatům usmrceným výhradně pro tento účel (tj. zvířat, která nebyla použita ve vědeckém postupu způsobujícím utrpení) [16].

1.3.2 Reduction (snížení)

Pojem snížení zahrnuje jakýkoli přístup, který povede k tomu, že se k dosažení stejného cíle použije méně zvířat, včetně maximalizace informací získaných na jedno zvíře, snížení počtu zvířat použitých v původním postupu a/nebo omezení nebo zamezení následného použití dalších zvířat [16].

Počet zvířat lze rovněž snížit prováděním postupů na zvířatech více než jednou, pokud to nesnižuje vědecký cíl nebo nevede ke špatným životním podmínkám zvířat. Přínos opětovného použití zvířat by však měl být vždy v rovnováze s jakýmkoli nepříznivými účinky na jejich dobré životní podmínky, s přihlédnutím k celoživotním zkušenostem jednotlivých zvířat. V důsledku tohoto potenciálního konfliktu by opětovné použití zvířat mělo být zvažováno případ od případu [18].

1.3.3 Refinement (zmírnění)

Zmírnění se týká metod, které minimalizují bolest, utrpení, strach nebo trvalé poškození, které mohou zažít výzkumná zvířata, a které zlepšují jejich pohodu. Zmírnění se vztahuje na všechny aspekty používání zvířat, od jejich chovu až po vědecké postupy, které se na nich provádějí. Příklady zdokonalení zahrnují zajištění toho, aby byla zvířatům poskytnuta ustájení, která umožňuje projevit druhově specifické chování, použití vhodné anestezie a analgezie k minimalizaci bolesti a výcvik zvířat, aby spolupracovala s postupy k minimalizaci jakéhokoli utrpení [16].

Když zvíře zažívá bolest, utrpení nebo strach, často dochází k doprovodným fyziologickým změnám, které mohou zvýšit variabilitu vědeckých výsledků. Zmírnění proto pravděpodobně také zlepší kvalitu dat a přispěje i k redukci [18].

Zmírnění lze také dosáhnout přesunem od druhů, které jsou považovány za vnímavější, k těm méně vnímavým. Příklady: nahrazení použití dospělých ryb mladšími životními stádii (např. embrya) nebo nahrazení použití ryb dafniemi. Oba přístupy jsou považovány za metody zmírnění, protože pravděpodobně sníží bolest, utrpení a strach, které zvíře pociťuje, avšak stále vyžadují použití živých zvířat [18].

1.4 Metody pyrogenního testování zdravotnických prostředků

V současnosti se hodnocení bezpečnosti zdravotnických prostředků řídí toxikologickými a dalšími studii doporučenými v řadě norem ISO 10993 (ISO – International Organization for Standardization, je celosvětová federace národních normalizačních orgánů) [19].

Materiálem zprostředkovaná pyrogenita představuje systémový účinek, který je zahrnut v ISO 10993-11:2017, příloha G, ale bylo vynaloženo úsilí, aby se v tomto dokumentu obecně zabývaly testy pyrogenity [19].

Příloha G normy ISO 10993-11 uvádí následující neendotoxinové pyrogenní látky: cytokiny, prostaglandiny, inductory, neurotransmitery, oddělovací činidla oxidativní fosforylace, N-fenyl- β -naftylamin, Aldo- α -naftylamin a kovy jako např. jako soli niklu [1,2]. Kromě těchto chemikálií existuje možnost, že mikrosféry a nanočástice, včetně zbytků opotřeбенí pocházejících z implantátů, mohou působit jako pyrogeny [1]. Příloha G také uvádí látky narušující funkci termoregulačních center (např. LSD, kokain, morfin). Tyto látky však byly z literární rešerše vyloučeny, protože zjevně zvyšují tělesnou teplotu. Jako regulované látky by byly začleněny do zdravotnického prostředku pouze za určitých okolností [1,20].

Dinarello poskytl soubor důkazů potvrzujících, že cytokiny a prostaglandiny jsou endogenní pyrogeny. Neurotransmitery působí tak, že stimulují hypotalamus prostřednictvím kaskád neurotransmiterů během upregulace cytokinů a aktivace prostaglandinů. Dinarello předložil mechanistický důkaz, že monocyty a makrofágy reagují s externími pyrogenními látkami, konkrétně bakteriemi, během imunitní odpovědi produkují endogenních pyrogenů, jako jsou prostaglandiny a prozánětlivé cytokiny interleukin 1 (IL-1), interleukin 6 (IL-6) a faktor nádorové nekrózy (TNF- α). Cytokin interleukin 1 β (IL-1 β) byl injikován intravenózně myším divokého typu a byla pozorována horečka; avšak když byl IL-1 β injikován myším bez receptoru „E-prostanoid“ receptor 3 (EP3) a prostaglandin E2 (PGE2), nebyla pozorována žádná febrilní odpověď. Prostaglandiny a cytokiny tedy hrají klíčovou roli při produkci horečky [20].

Inductory, jako je kyselina polyadenylová, kyselina polyuridylová, virové proteiny, homopolymery nukleových kyselin a jejich syntetické analogy aktivují TLR, spouštějí downstream signální kaskády, které vedou k produkci cytokinů včetně IL-1, IL-6 a TNF- α . Tato reakce byla prokázána *in vivo*. Při intravenózním podání kyseliny polyinosinové:polycytidylové [poly(I·C)], imunostimulantu, existuje v testu pyrogenů na králících febrilní odpověď závislá na dávce. Ve skutečnosti jsou králíci asi 10 000krát citlivější

na poly(I·C) než lidé. Celkově induktory vykazují silnou pyrogenní aktivitu *in vivo*. Sloučeniny, které rozpojují oxidativní fosforylaci, mohou být pyrogenní. Studie Banerjee a Mohanana z roku 2011 prokázala pyrogenní aktivitu trinitrofenolu v interně vyvinutém testu ELISA plně lidské krve, který měřil IL-1 β . MAT prokázal pyrogenní aktivitu trinitrofenolu při velmi nízkých koncentracích 1 ng/ml. Zvyšující se koncentrace trinitrofenolu vykazovaly dramatický vztah dávka-odpověď s produkcí IL-1 β [20].

Nebyly nalezeny žádné odkazy na pyrogenitu aldo- α -naftylaminu a N-fenyl- β -naftylaminu. Používání α -naftylaminu ve Spojeném království je kontrolováno nařízením o karcinogenních látkách z roku 1967 a ve Spojených státech Federálním registrem karcinogenů z roku 1973. Nebyly nalezeny žádné odkazy, které by přímo spojovaly lékařské prostředky obsahující nikl (nebo soli niklu) s pyrogenní reakcí u lidí nebo zvířat. Soli niklu se však podílejí na vzniku horečky z kovových výparů (MFF), což je onemocnění, které vyvolává horečku u jedinců vystavených vzdušným kovovým částicím. Výskyt MFF se omezuje na populace, které pracují v prostředích, která vytvářejí kovové výpary během získávání, zpracování, ohřevu nebo svařování kovů. Nejběžnějším kovem spojeným s MFF je expozice oxidu zinečnatému při vdechování při práci. Nicméně další kovy, jako je měď, hořčík, mangan, nikl, titan, chrom, bor a arsen, se také podílejí na MFF. Plíce exponovaných jedinců vykazují zvýšené hladiny TNF- α , IL-6 a IL-8 [20].

1.5 Toll-Like Receptors

1.5.1 Aktivace lidského imunitního systému prostřednictvím TLR

Pyrogeny jsou rozpoznávány specifickým typem PRR nazývaným Toll-Like Receptors (TLR) exprimovaným monocyty. Aktivace lidského imunitního systému prostřednictvím TLR probíhá několika způsoby. Prvním z nich jsou pyrogeny spouštějící horečku prostřednictvím aktivace vrozeného imunitního systému. Podstatou této aktivace jsou monocyty. Monocyty jsou bílé krvinky zapojené do přirozené imunity. Rozpoznají antigeny díky buněčným povrchovým receptorům nazývaným Pattern Recognition Receptors (PRR), které aktivují imunitní odpověď prostřednictvím produkce endogenních pyrogenů, jako jsou cytokiny. Cytokiny mají přímý vliv na regulaci teploty v hypotalamu [21,22].

Druhou možností jsou monocyty PRR., které rozpoznávají vysoce konzervované strukturní motivy známé jako PAMP (Pathogen Associated Microbial Patterns), které jsou exprimovány

mikrobiálními patogeny, nebo DAMP (Danger Associated Molecular Patterns), což jsou endogenní molekuly uvolňované z nekrotických nebo odumírajících buněk. Rozpoznání mikrobiálních patogenů PRR je zásadním krokem pro zahájení přirozené imunitní odpovědi, jako je zánět. Toll-like receptory byly prvními identifikovanými PRR [21,22].

Třetí možností jsou signální cesty. Stimulace TLR odpovídajícími PAMP nebo DAMP spouští signální kaskády, které spouštějí specifické imunologické reakce [21]. Nejčastěji je MyD88 (myeloidní diferenciací primární-response protein 88) univerzální adaptorový protein používaný většinou TLR jako jeden z prvních proteinů v reakční kaskádě, která na konci vede k aktivaci transkripčního faktoru NF – κ B. Mezi MyD88 a NF- κ B existuje několik fosforylačních kroků a ubikvitylačních kroků, které vedou k disociaci předchozích komplexů a tvorbě nových reakčních komplexů. Jako poslední krok se NF-KB disociuje z cytoplazmatického komplexu a translokuje se do jádra, kde jsou exprimovány odpovídající cílové geny [24].

Čtvrtou možností jsou specifické ligandy. Komponenty bakteriální buněčné stěny jsou široce rozpoznávány TLR buněčného povrchu, zatímco nukleové kyseliny jsou rozpoznávány intracelulárními TLR. Rozmanitost rodiny TLR a specifita jednotlivých TLR pro detekci různých ligandů podporuje hypotézu, že reakci lidské horečky může vyvolat nejen lipopolysacharidy (LPS), ale také mnoho dalších látek pocházejících z gramnegativních a grampozitivních bakterií, plísně, kvasinky, viry a paraziti [24].

1.5.2 Regulační prostředí testu aktivace monocytů

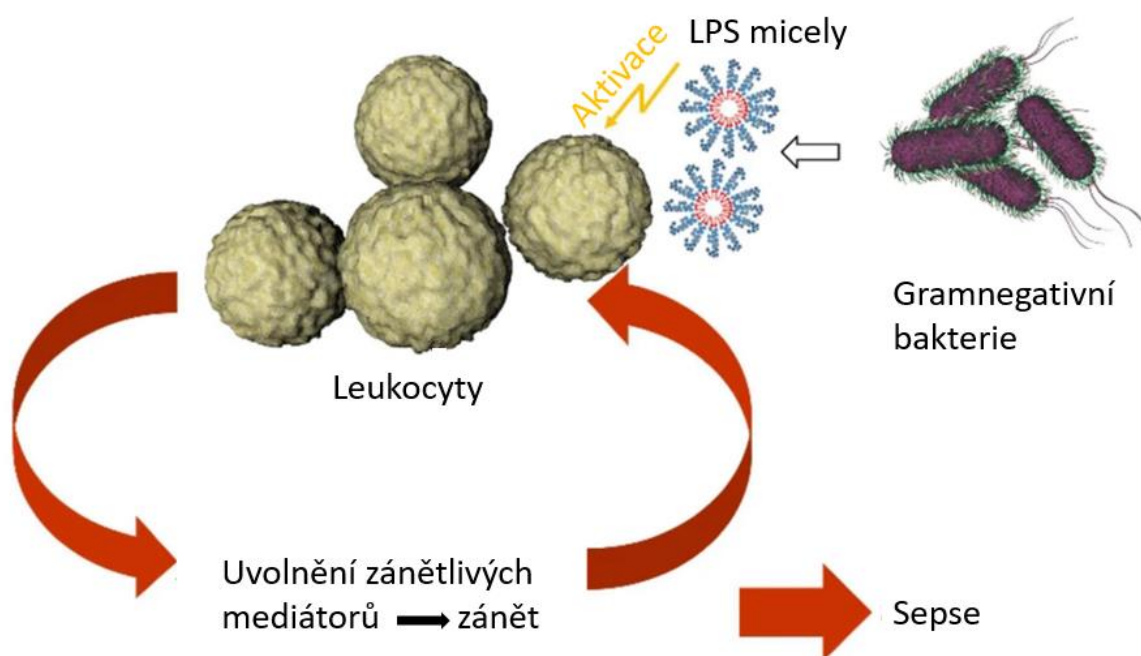
Protože kontrola pyrogenů ve farmaceutických produktech je povinná, celosvětové lékopisy popisují hlavní metody detekce a/nebo kvantifikace pyrogenů. Před objevením a ověřením testu aktivace monocytů jako alternativy k testu na králíčí pyrogen byl jedinou dostupnou *ex vivo* testovací metodou test bakteriálního endotoxinu, ale s omezením spočívajícím v nemožnosti detekovat všechny pyrogeny. V případě jakýchkoliv pochybností o přítomnosti neendotoxinových kontaminantů byla laboratoř požádána o použití testu na králících [11].

Za posledních 30 let výrazně vzrostla ochota zohledňovat bolest a utrpení zvířat a následně se zvýšil tlak na omezení testování na zvířatech [11].

1.6 Test lyzátu z amébocytů kraba trnitého, *Limulus polyphemus* (LAL test)

Limulus amebocyte lysate (LAL) je vodný extrakt krevních buněk (amébocytů) z atlantického kraba *Limulus polyphemus*.

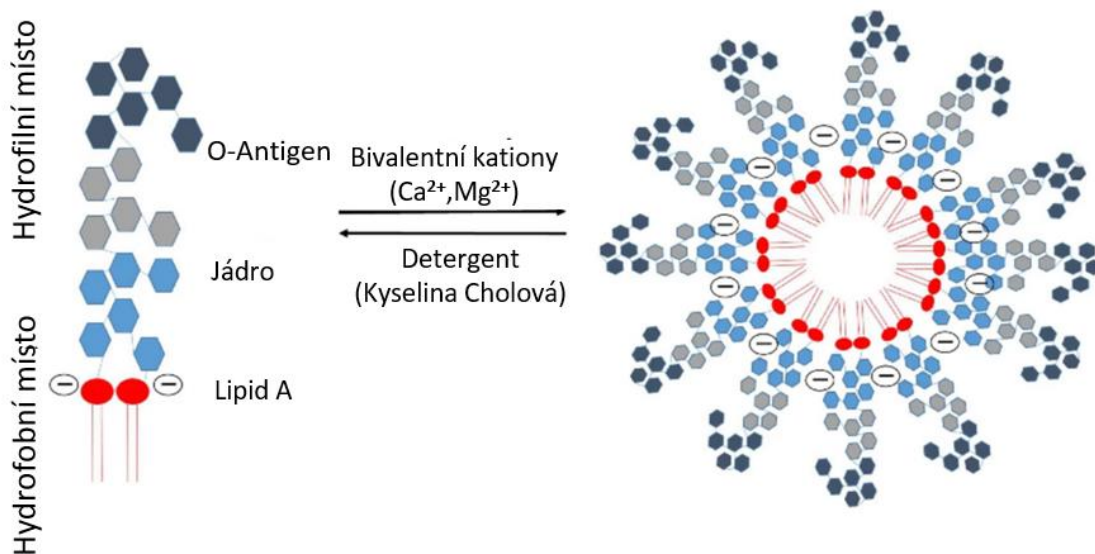
Endotoxin je hlavní složkou vnější buněčné stěny gramnegativních bakterií a je vysoce toxický. Intravenózní dávky již od 1 ng/kg tělesné hmotnosti za hodinu způsobují u lidí zánětlivou reakci [25]. Endotoxiny jsou lipopolysacharidy (LPS), které jsou složeny z hydrofilního polysacharidu a lipofilní lipidové domény (skupina lipidu A). LPS je silným stimulatorem zánětlivých reakcí, působí ve velmi nízkých koncentracích a podílí se na patogenezi septického šoku a endotoxémie [26]. LPS se uvolňuje z buněčné stěny rostoucích bakterií nebo když antibiotika nebo komplementový systém působí na bakterie [27]. LPS, který vstupuje do oběhového systému, iniciuje zánětlivou reakci monocytů a makrofágů, což vede k produkci prozánětlivých cytokinů, jako jsou TNF- α a IL-1 β [28], a aktivuje produkci kostimulačních molekul potřebných pro adaptivní imunitní odpověď [26]. V závažných případech se však zánět vymkne kontrole, a nakonec může mít za následek sepsi nebo selhání orgánů (Obrázek 4).



Obrázek 4: LPS stimuluje vrozenou imunitu. LPS v krvi aktivuje monocyty, což vede k sekreci zánětlivých mediátorů. Při systémovém zánětu to může vést k multiorgánovému selhání a sepsi [26]

Pokud by byl k dispozici citlivý a spolehlivý test na detekci LPS v krvi, bylo by možné zahájit cílenou antibiotickou terapii proti gramnegativním patogenům velmi brzy. Test LAL je nejvíce zavedenou metodou pro kvantifikaci LPS. Po aktivaci faktorů C a B lipopolysacharidem aktivuje koagulační enzym koagulaci, která je následně vyhodnocena turbidimetricky nebo pomocí barevné reakce. Test LAL se úspěšně používá pro detekci LPS v široké škále průmyslových, farmaceutických a výzkumných vzorků, včetně zásob vody, parenterálních tekutin, léků pro intravenózní podání a určitých biologických tekutin např. mozkomíšního moku. Na rozdíl od hojně využívaného LAL testu v průmyslových farmaceutických prostředích je použití LAL testu pro detekci LPS v krvi významně ztíženo přítomností inhibitorů [26].

Ředěním vzorků látky inhibující LAL méně interferují, zatímco zahřívání denaturuje plazmatické serinové proteázy, které ovlivňují měření LAL. LPS se typicky skládá z hydrofobní domény známé jako lipid A, neopakujícího se „jádrového“ oligosacharidu a distálního polysacharidu (O-antigen). Je známo, že jako amfifilní molekula LPS tvoří agregáty s vysokou molekulovou hmotností vyšší než 106 Da v hydrofilních prostředích. Velikost těchto agregátů závisí na parametrech jako je teplota, pH, hydrofilita a přítomnost mono nebo di-valentních kationtů. LPS tvoří agregát integrací acylových řetězců do vnitřku agregátu, přičemž polysacharidové části jsou plně vystaveny vodnému kompartmentu (Obrázek 5) [26].



Obrázek 5: Ve vodném vzorku tvoří monomerní molekuly LPS agregáty ve formě micel nebo vezikul. Bivalentní kationty tvoří můstky mezi záporně nabitými fosfátovými skupinami ve frakci lipidu A. Přidáním chelátorů (EDTA, citrát) a detergentů (DOC) lze aglomerát LPS [26]

Takayama a kol. [29] zjistili, že LPS monomery vykazují významně vyšší aktivitu jak v LAL kaskádě, tak v aktivaci pro-B buněčné linie. Mnoho dalších studií ukazuje, že LPS agregáty jsou zodpovědné za aktivaci LPS kaskády i za aktivaci imunitního systému [26,30]. Geometrický tvar agregátů LPS silně závisí na chemické struktuře agregujících molekul. Studie role agregátové struktury pro biologickou aktivitu LPS ukázaly, že kubické LPS agregátové struktury mají vysokou endotoxickou aktivitu, zatímco lamelární agregátové struktury mají malou nebo žádnou endotoxickou aktivitu. Tato závislost byla prokázána pro různé endotoxinové a neendotoxinové struktury [31]. Ačkoli je tato skutečnost známá již mnoho let, existuje jen málo informací o struktuře agregátu LPS a velikosti agregátu v lidské plazmě a krvi [32].

LAL aktivita LPS je zcela rozpuštěna v 0,5 % deoxycholátu sodném (DOC), ale je obnovena poté, co se DOC sníží zředěním nebo dialýzou. To znamená, že pro vyvolání pyrogenity je nezbytná minimální velikost LPS. Tento jev objevili a publikovali ve své práci již autoři Ribi a kol [26].

Avšak účinnost nebyla obnovena ředěním, pokud byla přidána lidská plazma, a přímá injekce LPS v DOC nevykazovala žádnou aktivitu LAL. Tyto výsledky naznačují, že lidská plazma bránila opětovnému sestavení LPS ředěním. Možné vysvětlení neutralizace endotoxinů v lidské krvi popisuje hypotéza endotoxin-lipoprotein, kterou stanovili Rauchhaus a kol [26]. Hypotéza říká, že se LPS váže na lipoproteiny (LDL, HDL, VDL, lipoprotein (a), triglyceridy) a tím se snižuje jejich biologická aktivita. Experimenty *in vitro* a *in vivo* naznačují, že lipoproteiny mohou neutralizovat LPS a mají imunomodulační účinek na makrofágy a také protizánětlivý účinek, když jsou aktivovány endoteliální buňky (tvoří jednoduchou vrstvu buněk vystýlající vnitřek cév). LPS navázaný na lipoproteiny se neváže na makrofágy a je 100x až 1 000x méně aktivní než volný LPS, pokud jde o aktivaci monocytů [26]. Navíc byla při podávání chylomikronů (částice velmi bohaté na triacylglyceroly, které se tvoří v buňkách sliznice tenkého střeva vstřebáváním tuku v potravě) pozorována rychlejší odbourávání LPS játry. Tento účinek je také známý jako imunomodulační odpověď jater na infekce [26,33].

1.7 MAT test

Metoda založená na aktivaci monocytů (MAT) byla stanovena a ověřena pro detekci pyrogenů Evropským centrem pro validaci alternativních metod (ECVAM) v roce 2005 a Meziagenturním koordinačním výborem pro validaci alternativních metod (ICCVAM) v roce 2008 [3]. ECVAM a ICCVAM schválily MAT test pro identifikaci gramnegativních endotoxinů a uznaly jeho schopnost detekovat širší škálu pyrogenů. V roce 2009 americký úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) uznal, že MAT test může být použit pro ověření specifčnosti produktu pro parenterální léčiva. Pokyny z roku 2012 umožňují, aby byly validované testy MAT použity jako náhrada za LAL [1].

V roce 2010 byl MAT test začleněn do obecné kapitoly 2.6.30 („Test aktivace monocytů“) v Evropském lékopisu, kde se uvádí, že MAT test lze použít jako úplnou náhradu za RPT ve chvíli kdy je pro konkrétní produkt metoda validována [1].

MAT test je založen na *in vitro* aktivaci lidských monocytoidních buněk pyrogeny, což vede k uvolňování prozánětlivých cytokinů např. In-terleukin (IL), faktor nekrózy nádorů (TNF) a interferon (IFN), které jsou určeny testem ELISA [1,2]. MAT test lze provádět pomocí plné krve, kryokonzervované krve, PBMC (mononukleární buňky periferní krve) nebo monocytoidních buněčných linií a pro každý z těchto postupů jsou k dispozici protokoly [1].

V poslední době bylo standardizováno a validováno pět variant MAT testu:

1. *In vitro* MAT využívající plnou lidskou krev, která měří upregulaci IL-1 β
2. *In vitro* MAT využívající plnou lidskou krev, která měří upregulaci IL-6
3. *In vitro* MAT využívající kryokonzervovanou plnou lidskou krev měřící upregulaci IL-6
4. *In vitro* MAT využívající lidské monomolekulární buňky periferní krve (PBMC) měřící upregulaci IL-6
5. *In vitro* MAT využívající monocytoidní linii, Mono Mac 6 (MM6), měřící upregulaci IL-6

Nicméně podle ICC-VAM nelze MAT test považovat za úplnou náhradu RPT, zejména z důvodu nedostatku srovnávacích údajů mezi těmito dvěma metodami [2]. U některých pyrogenů není jasný mechanismus působení (hlavně u těch materiálůvž-zprostředkovaných), a tak nemusí působit přes receptory TLR, na kterých je MAT metoda založena, tedy tato *in vitro* metoda nemusí tento typ pyrogenů zachytit. Dále není tento *in vitro* test zcela validován pro všechny typy testovaných látek – např. pro dobře rozpustné validován je (léčiva), ale pro nerozpustné materiály (zdravotnické prostředky) je nutné zvážít nebo poupravit design metody. Konkrétně je např. potřeba validovat testování větších zdravotnických materiálů, které jsou nerozpustné. Ukazuje se, že lepší odezva je zřejmě při přímém ponoření testovaného materiálu např. do krve než při testování výluhu z takového materiálu [1].

1.7.1 Příprava vzorku na MAT test

RPT test se provádí tak, že se pyrogenní látky potenciálně přítomné ve zdravotnickém prostředí extrahují do fyziologického roztoku. Ten se poté vstřikuje králíkovi ve 100% koncentraci. U testu LAL se extrakce provádí do depyrogenované vody a do testu se extrakt dává až do 100% koncentrace (pokud nedochází k interferenci). Pro testování MAT může být nutné ředění extraktu, ovšem musí být zváženo, jak by toto ředění mohlo ovlivnit citlivost a konzistenci metody. Přímý kontakt se zdravotnickým prostředkem by vylučoval potřebu samostatného postupu extrakce. To by bylo použitelné na malých zdravotnických prostředcích, protože není nutná samostatná extrakce a následné ředění, pokud mohou být zcela ponořeny (uvolňování cytokinů je upraveno podle objemu použitého média) [1].

1.7.2 Standardizace MAT

Je třeba standardizovat počet buněk použitých na povrchovou plochu zařízení, tj. počet buněk se bude lišit v závislosti na velikosti zdravotnického prostředku, ale celková hustota buněk by měla zůstat konzistentní. To také zahrnuje stanovení optimálního poměru pro vytváření spolehlivých a reprodukovatelných výsledků. U testů plné krve a kryokonzervované krve je třeba vzít v úvahu variabilitu dárců a provést standardizaci krevních buněk např. u krve shromážděné od několika dárců. Tento parametr lze snáze kontrolovat pomocí monocytoidní buněčné linie. Je však třeba věnovat pozornost validaci kroků ke standardizaci měření reaktivity buněk a koncentrace, protože to bude mít také velký vliv na výsledky testu [1].

1.7.3 Princip systému PyroMAT®

PyroMAT je kit, který používá jako zdroj monocytů lidské kryokonzervované monocytární buňky Mono-Mac-6 (MM6). Reakce na pyrogenní látky se stanoví měřením interleukinu-6 (IL-6) produkovaného buňkami buněčné linie s označením Mono-Mac-6. Za tímto účelem je mikrodestička ELISA dodávaná v soupravě a potažena protilátkou specifickou pro IL-6 [3].

Molekuly IL-6 uvolněné buňkami MM6 do supernatantu během inkubační fáze jsou přeneseny na destičku ELISA a vázány imobilizovanou primární protilátkou. Přidá se sekundární protilátka navázaná na enzym za vzniku komplexu vázaného na IL-6. Po promytí jakýchkoli nevázaných molekul je komplex vázaný na IL-6 detekován v barevné reakci zahájené přidáním vhodného substrátu. Vývoj barvy je úměrný množství počáteční produkce IL-6 v supernatantu a měřeno pomocí čtečky absorbance [3].



Obrázek 6: PyroMAT kit [3]

1.7.4 Princip systému PyroCell™

PyroCell™ MAT je kit, který obsahuje kryokonzervovaný přípravek PBMC shromážděný od 4 zdravých dárců (buňky pMAT) spolu s doplňkem MAT Culture Medium Supplement a kompaktní souprava PeliKine IL-6 ELISA, která obsahuje všechna činidla a koncentráty pufrů pro provedení testu IL-6 ELISA. Doplňěk MAT Culture Medium Supplement je formulován se zvláštní pozorností na nízký obsah endotoxinů, aby byly zajištěny bezchybné podmínky buněčné stimulace. Systém PyroCell™ MAT je optimálním nástrojem pro citlivou detekci prozánětlivého cytokinu IL-6 uvolňovaného lidskými monocyty během expozice endotoxinům a neendotoxinovým pyrogenům. Všechny komponenty společně podporují kompletní testování 3x 96–jamkových destiček nebo až 3 vzorků produktu na destičku podle kompendiálních požadavků pro test MAT. Na základě historických údajů je doporučena hodnota LOD pro systém PyroCell MAT, IL-6 0,02 EU/ml, toto však musí ověřit uživatel [34].



Obrázek 7: PyroCell™ kit [34]

1.7.5 Interleukin-6

Interleukin-6 je důležitý v imunitní odpovědi organismu. Jeho hladina se rychle zvyšuje po uvolnění složek bakteriální buněčné stěny patogenů anebo při tkáňovém poškození. Používá se jako marker sepse u novorozenců anebo při diagnostice těžkých infekcí, akutní pankreatitidy a dále při náhlé příhody břišní [35].

Interleukin-6 je syntetizován makrofágy, které jsou stimulovány IL-1, TNF, IL-4, IL-13 a stresovými hormony. Je velice významný při aktivaci a regulaci imunitní odpovědi, protože působí pro – i protizánětlivě. Ovlivňuje katabolismus svalové a tukové tkáně a stimuluje syntézu proteinů akutní fáze v játrech a zvyšuje tělesnou teplotu [35].



Obrázek 8: Struktura Interleukinu-6 [36]

1.8 Metoda ELISA

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) je imunologický test, který je velmi citlivý a používá se k detekci a kvantifikaci látek, včetně protilátek, antigenů, proteinů, glykoproteinů a hormonů. Detekce těchto produktů se provádí komplexováním protilátek a antigenů za vzniku měřitelného výsledku. Protilátka je typ proteinu produkovaného imunitním systémem jedince. Tento typ proteinu má specifické oblasti, které se vážou na antigeny. Antigen je protein, který může pocházet z nějakého cizího zdroje, a když je navázán na protilátku, indukuje kaskádu událostí prostřednictvím imunitního systému těla. Tato interakce se využívá při testování ELISA a umožňuje identifikaci specifických proteinových protilátek a antigenů pouze s malým množstvím testovaného vzorku. [1, 2]

Mezi tři základní metody patří přímá, nepřímá a sendvičová metoda ELISA, kde nejlepší/nejvýkonnější je varianta sendvičová. Měřený analyt je vázán mezi dvě primární protilátky. Sendvičová ELISA je velice citlivá a robustní.

IL-1 β nebo IL-6 ve vzorku je typicky vložen mezi monoklonální povlakovou protilátku a polyklonální peroxidázou značenou detekční protilátku. Nenavázaný materiál se odstraní promytím. Peroxidáza metabolizuje např. tetramethylbenzidin. Reakce se zastaví kyselinou a změří se optická hustota (OD) při 450 nm.

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Jelikož využití MAT testů pro testování pyrogenity zdravotnických prostředků je aktuální problematika, budu se jí zabývat v experimentální části práce. Experimentální část práce je zaměřena na zavedení, optimalizaci a validaci metody. Všechny tyto kroky proběhly na pracovišti Výzkumného ústavu organických syntéz (VÚOS) a. s. v Rybitví.

V rámci experimentální části byly testovány 2 komerční kity. Jeden kit je založen na testování MAT testu na frakci krve (Pyrocell™ MAT system, Lonza [44]) a druhý kit je založen na testování MAT testu na monocytické lidské tkáňové linii Mono Mac-6 (PyroMAT kit, Merck [45]). Dále byl zdravotnický materiál testován také na plné lidské krvi. Vybraný zdravotnický materiál chirurgická nit s jehlou byl také testován ve dvou formách – ve formě extraktu, který byl připraven dle normy ČSN ISO 10993-12 a potom ve formě přímého kontaktu (s testovacím systémem).

VYBAVENÍ

- Centrifuga
- Centrifugační zkumavky
- Laminární box
- Inkubátor (37 °C + 5 % CO₂)
- Automatická pipeta
- Vortex
- Třepačka mikrotitračních destiček
- Čtečka mikrotitračních destiček (450 nm s volitelným referenčním filtrem v rozsahu 600–900 nm)

CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

- Bezpyrogenní voda
- Coating pufr
- Protilátky
- HKSA (pozitivní neendotoxinová kontrola – tepelně usmrcený *Staphylococcus aureus*)

- IL-6 (Interleukin 6)
- HPE pufr („High Performance“ ELISA pufr – pracovní pufr)
- PBS (Fosfátem pufrovaný fyziologický roztok)
- Wash Buffer (Promývací roztok)
- Streptavidin-HRP (Streptavidinem konjugovaná peroxidáza)
- TMB substrát (3,3',5,5'-tetramethylbenzidin)
- Stop roztok
- IMDM (Kompletní médium s přidavkem séra)
- RPMI (Buněčné medium s L-Glutaminem)

2.1 PyrocellTM MAT test (Experiment 1, 2 a 3)

Cílem tohoto *in vitro* testu je detekce přítomnosti endotoxinového nebo neendotoxinového pyrogenu. Přítomnost pyrogenu je detekována díky jeho schopnosti indukovat uvolňování interleukinu 6 (IL-6) z monocytických buněk plné periferní krve (Peripheral Blood Mononuclear Cells = PBMC, které jsou smíšenou populací buněk s jedním jádrem). Uvolněné množství IL-6 se po inkubaci buněk s testovanou látkou nebo kontrolami (pozitivní a negativní) kvantifikuje pomocí enzymového testu ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay). Veškeré postupy vychází z manuálu k tomuto kitu a protokolů ECVAM [40,41].

U každého testovaného materiálu se musí nejprve provést zkouška interference, aby se ověřila interference mezi zkoušenou látkou a buněčným systémem a/nebo ELISA. Účelem interferenčního testu je tedy určit, zda testovaná látka ovlivňuje uvolňování cytokinů. Interferenční test se udělá tak, že se jednotlivé vzorky testovaného materiálu, případně ředění jeho extraktu, tzv. infikují pozitivní kontrolou RSE (referenční endotoxinový standard). To znamená, že se ke každému vzorku/ředění přidá i určitá koncentrace endotoxinového standardu. Pro expozici je tak u interferenčního testu připravena testovaná řada s RSE a bez RSE (tzv. „spike“ a „non-spike“).

Tento kit byl použit celkem ve třech experimentech ze čtyř, které byly provedeny v rámci této bakalářské práce. Nejprve byl proveden experiment s plnou periferní lidskou krví, kdy byl materiál testován přímým kontaktem, tedy tak, že byl testovaný vzorek ponořen přímo do krve.

Potom byl připraven extrakt materiálu v kultivačním médiu IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) a tento extrakt (výluh) byl ve třech ředěních aplikován na frakci lidské krve (tzv. PBMC buňky).

Po přímé a nepřímé expozici v různých typech testovaného systému (plná krev/PBMC buňky) byl proveden ELISA test. Spotřební materiál a roztoky, které byly v kontaktu se vzorky anebo krevními buňkami při testu, byly sterilní a bez pyrogenů.

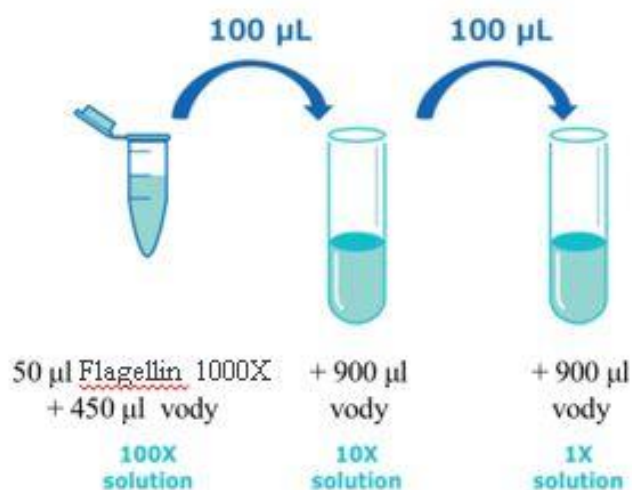
2.1.1 TESTOVÁNÍ NA PLNÉ KRVÍ – PŘÍMÝ KONTAKT (EXPERIMENT 1)

Plná periferní krev byla odebrána od zdravého dárce dle požadavků ICCVAM protokolu [39] a ihned doručena do laboratoře. Pro testování byl vybrán vzorek zdravotnického materiálu neabsorbovatelná nit (sterilní v originálním balení) i s jehlou.

Den 1 – příprava ředící řady, expozice a příprava ELISA desky

- Příprava expoziční desky

Nejprve byla připravena koncentrační řada pozitivní neendotoxinové kontroly Flagellinu. Do originální lahvičky od dodavatele byl přidán 1 ml vody bez endotoxinů a tento roztok se míchal po dobu 1 minuty. Výsledná koncentrace byla 1000X. Roztok byl rozdělen po 50 µl do mikrocentrifugačních zkumavek bez endotoxinů a uložen do -20 °C pro další experimenty. Do jedné mikrozkušavky roztoku Flagellinu byla přidána bezpyrogenní voda a roztok Flagellinu byl naředěn dle Obrázku 9 – výsledná koncentrace byla 1X a ta se pipetovala na jamku.



Obrázek 9: Ředění Flagellinu [42]

Dále byla připravena koncentrační řada pozitivní kontroly HKSA (tepelně usmrcený *Staphylococcus aureus*), což je také neendotoxinová pozitivní kontrola. Příprava roztoku HKSA bylo provedeno tak, že do originální lahvičky od dodavatele a byl přidán 1 ml vody bez endotoxinů a tento roztok se míchal po dobu 1 minuty. Výsledná koncentrace roztoku byla 1000X a tento roztok byl použit jako zásobní pro přípravu ředící řady pomocí nepyrogenní vody. Do ZK 1 (zkumavka 1) bylo napipetováno 450 µl vody a 50 µl HKSA 1000x. Do ZK 2 až 4 bylo napipetováno 900 µl vody a do ZK 5 až 6 se napipetovalo 500 µl vody. Tabulka 1 popisuje ředící řadu HKSA kontroly.

Tabulka 1: Ředící řada HKSA kontroly

ČÍSLO ZKUMAVKY	VÝSLEDNÁ KONCENTRACE	OBJEM VODY	OBJEM ROZTOKU
1	10X	900 µl	100 µl z HKSA 1000X
2	1X	900 µl	100 µl ze ZK 1
3	0,1X	900 µl	100 µl ze ZK 2
4	0,01X	900 µl	100 µl ze ZK 3
5	0,005X	500 µl	100 µl ze ZK 4
6	0,0025X	500 µl	100 µl ze ZK 5

Do ZK s pozitivní kontrolou bylo napipetováno 450 µl vody a 50 µl Flagellinu 1000X. Vzorek byl ponořen do krve a do vzorku – spike byl přidán HKSA koncentrace 100X, před každým pipetováním byl vzorek promíchán na vortexu.

Nejprve se připravil veškerý materiál a potom jednotlivé ředící řady pozitivní/negativní kontroly. Ředící řada se připravila a napipetovala dle Tabulky 2. Do ředící řady vzorků a kontrol byla dle Tabulky 2 přidávána i periferní lidská krev (získána od zdravého dárce), jako testovací systém v tomto experimentu.

Tabulka 2: Ředící řada – příprava vzorků/kontrol

OZNAČENÍ	OBJEM MÉDIA RPMI	OBJEM KRVE	OBJEM LAL WATER	OBJEM FLAGELINU	OBJEM HKSA	POČET OPAKOVÁNÍ
NK	750 µl	250 µl	—	—	—	4X
NK 2	500 µl	250 µl	250 µl	—	—	4X
PK	500 µl	250 µl	—	250 µl	—	4X
VZ	750 µl	250 µl	—	—	—	4X
VZ SPIKE	500 µl	250 µl	—	—	250 µl	4X
BLANK	—	—	1 ml	—	—	4X
BLANK KREV	—	250 µl	750 µl	—	—	4X

Vysvětlivky: NK = negativní kontrola, NK2 = negativní kontrola se sterilní vodou, PK = pozitivní kontrola Flagellin, VZ = vzorek, VZ spike = vzorek s přidavkem RSE, BLANK = voda bez endotoxinů, BLANK KREV = krev se sterilní vodou bez endotoxinů

Do vzorku a vzorku-spike byla přidána sterilní nit stejné definované velikosti.

Ze ZK 1 bylo na 24-jamkovou destičku pipetováno 250 µl do vzorek-spike (4 replikáty). Poté se deska nechala inkubovat 24 hodin v inkubátoru (37 °C, 5% CO₂, vlhčený).

- Příprava ELISA desky

ELISA destička se nechala ohřát na laboratorní teplotu a poté se nachystaly roztoky potřebné pro přípravu ELISA desky.

„Coating“ (pufr pro pokrytí povrchu dna destičky) pufr se připravil tak, že se rozpustil obsah 1 kapsule ve 100 ml destilované vody a nechal se 5 minut inkubovat. 120 µl protilátky se rozpustilo ve 12 ml „coating“ pufru. Roztok byl 10x promíchán. 100 µl roztoku protilátek se přidalo do každé jamky ELISA destičky a deska se přikryla víčkem. Deska se nechala inkubovat přes noc při 18–25 °C.

Den 2 – Příprava vzorků pro ELISA test, ELISA test

Před uplynutím inkubační/expoziční doby byla připravena IL-6 standardní kalibrační řada, která obsahovala 7 koncentrací IL-6 standardu v HPE pufru. Připravily se zkuševky

s popsanými koncentracemi: 450; 150; 50; 16,7; 5,6; 1,9 a 0,6 pg/ml. 497 µl HPE pufru se přidalo do 450 pg/ml zkumavky. Do ostatních zkumavek se přidalo všude 400 µl HPE pufru.

Dále bylo přidáno 63 µl IL-6 standardu do zkumavky 450 pg/ml a roztok se promíchal. Dále se ředilo tak, že se přeneslo vždy 200 µl roztoku až do nejnižší koncentrace.

100 µl HPE pufru/jamka se napipetovalo do nové čisté ředící 96-jamkové desky (1 deska = 10 ml) s kulatým dnem a přidal se promíchaný supernatant krve z expoziční desky, která byla inkubována s testovaným materiálem a pozitivními/negativními kontrolami (25 µl/jamka).

ELISA deska připravená z minulého dne se omyla 4x po 300 µl/jamka PBS (1 tableta rozpuštěna ve 200 ml destilované vody). Potom se rozpustilo 500 µl blokovacího reagentu ve 25 ml PBS, 10x se promíchalo. 200 µl/jamku tohoto zředěného reagentu se přidalo na desku, deska se přelepila folií a nechala se 1 hodinu při teplotě 18-25 °C působit.

Po inkubaci 1 hodina se deska omyla 300 µl/jamku promývacím „washing“ puftrem 5x.

Z této ředící (čisté) 96-jamkové desky se potom do každé jamky ELISA desky přidalo 100 µl zředěného supernatantu, dále kalibrační řada koncentrací IL-6, vše se zakrylo folií a nechalo se 1 hodinu působit při 18-25 °C (viz schéma desky v Tabulce 3).

Tabulka 3: Schéma 96-jamkové ELISA desky

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	V sterilní	V sterilní	V sterilní	V sterilní	HKSA 1000	HKSA 1000	HKSA 1000	HKSA 0,125	IL-6 50	IL-6 50	IL-6 0	IL-6 0
B	V+ HKSA	V+ HKSA	V+ HKSA	V+ HKSA	HKSA 100	HKSA 100	HKSA 100	HKSA 0,125	IL-6 150	IL-6 150	IL-6 0,6	IL-6 0,6
C	PK	PK	PK	PK	HKSA 10	HKSA 10	HKSA 10	HKSA 0,125	IL-6 450	IL-6 450	IL-6 1,9	IL-6 1,9
D	NK	NK	NK	NK	HKSA 0,5	HKSA 0,5	HKSA 0,5	BLK	HKSA 0,5	HKSA 0,5	IL-6 5,6	IL-6 5,6
E	BL	BL	BL	BL	HKSA 0,25	HKSA 0,25	BLK	BLK	BLK	BLK	IL-6 16,7	IL-6 16,7

Vysvětlivky: Vsterilní = sterilní vzorek, V + HKSA = sterilní vzorek s přídatkem HKSA, PK = pozitivní kontrola, NK = negativní kontrola, BL = blank, HKSA = tepelně usmrcený *Staphylococcus aureus*, IL-6 = kalibrační koncentrace Interleukinu 6

Během této doby se připravily protilátky: 120 µl protilátek se zředilo s 12 ml HPE pufru a 10x se vše promíchalo.

Po inkubaci se opět deska promyla 300 µl/jamku „washing“ puftrem 5x. 100 µl zředěné protilátky/jamka se přidalo na desku, přelepilo folií a nechalo se 1 hodinu inkubovat.

Těsně před koncem inkubace se připravil Streptavidin-HRP konjugát: 1,2 µl streptavidin-HRP se smíchalo s 12 ml HPE pufrem, promíchalo se 10x. 100 µl tohoto konjugátu se napipetovalo do každé jamky, přelepilo folií a nechalo se 30 minut působit při 18-25 °C.

Opět se deska promyla 300 µl/jamku washing pufrem 5x. 100 µl TMB roztoku (3,3',5,5'-tetramethylbenzidin) se napipetovalo do každé jamky, přelepilo folií a nechalo se 10 minut působit při 18-25 °C ve tmě. Dále byl přidán „stop“ roztok 100 µl/jamku. Barva byla stálá asi 30 minut.

Pro měření absorbance ELISA desky se použil spektrofotometr Biotek Epoch (USA). Mikrotitrační destička byla umístěna do držáku spektrofotometru a změřila se absorbance (OD) při 450 nm a při referenční vlnové délce 550 nm. Při analýze naměřených dat byla referenční vlnová délka 550 nm odečtena od měření při 450 nm. Ke spektrofotometru Biotek Epoch přísluší software Gen5, pomocí kterého se spektrofotometr ovládá a zároveň je možné v něm vyhodnotit naměřená data pomocí statistických modelů, jako je např. 4-parametrický nebo 5-parametrický regresní model (logistický model pro asymetrická data). Data byla vyhodnocena dle instrukcí ke kitu v tomto softwaru a jsou okomentována v kapitole 3 *Výsledky*.

2.1.2 TESTOVÁNÍ NA PBMC BUŇKÁCH – EXTRAKT (EXPERIMENT 2)

Testování probíhalo na frakci krve (PBMC buňky), která je dodávána jako součást kitu Pyrocell™ MAT test. Pro testování byl vybrán vzorek zdravotnického materiálu neabsorbovatelná nit (sterilní v originálním balení) i s jehlou a připraven jako extrakt.

Den 1 – příprava extraktu

Nejprve byl připraven extrakt dle ISO normy v poměru 100 mg/ml v médiu PBMC. Samotná neabsorbovatelná nit vážila 236 mg. Vzorek niti se připravil jako sterilní a nesterilní (vyndal se z obalu a nechal se přirozeně v nesterilním prostředí). Vzorky se umístily do sterilních zkumavek, přidalo se 2,4 ml buněčného média a nechaly se třepat do druhého dne v zahříváné monitorované třepačce (37 °C).

Den 2 – příprava ředící řady, příprava buněk, expozice a příprava ELISA desky

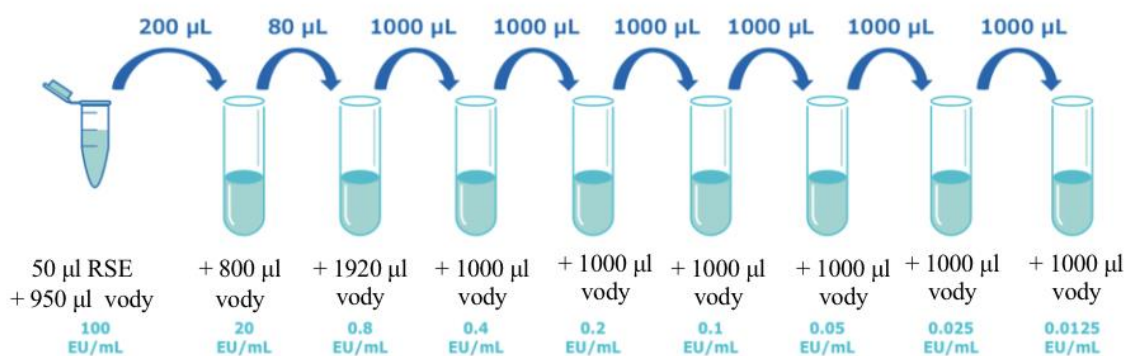
- *Příprava ředící řady*

Příprava zásobníku roztoku endotoxinu RSE byla následující. Do lahvičky RSE bylo přidáno 5 ml LAL vody bez endotoxinů a následně se roztok nechal 30 minut vortexovat při maximální rychlosti. Následně bylo provedeno ředění endotoxinu tak, že se přidalo 950 µl IMDM (médiu bez séra) do sterilní nepyrogenní zkumavky a přidalo se 50 µl zásobního roztoku RSE (2000 EU/ml) aby se dosáhlo koncentrace 100 EU/ml. Dále bylo přidáno 980 µl kompletního média (IMDM médium s přidavkem séra) do sterilní, nepyrogenní zkumavky a 20 µl 100 EU/ml ředěného RSE, aby se dosáhlo konečné koncentrace 2 EU/ml. Pro dosažení koncentrace 0,16 EU/ml bylo do sterilní zkumavky přidáno 920 µl kompletního média a 80 µl 2 EU/ml ředěného RSE.

200 µl 0,16 EU/ml endotoxinu bylo přidáno do jamek A1 až D1 expoziční desky. Do ostatních jamek expoziční desky E1–H1, A2–H2 a A3–H3 bylo přidáno 100 µl kompletního média. Následně bylo provedeno dvojnásobné ředění pipetováním 100 µl z A1–D1 (0,16 EU/ml) do A2–D2 (0,08 EU/ml) pomocí multikanálové pipety a důkladně promícháno. Ředění bylo

opakováno stejně z A2–D2 do A3–D3, z A3–D3 do E1–H1 a z E1–H1 do E2–H2. Posledních 100 µl z E2–H2 bylo zlikvidováno.

200 µl/jamku vzorku S1 (sterilní) bylo přidáno do jamek A4–A6 expoziční desky. Do ostatních jamek pro ředění vzorků bylo přidáno 100 µl kompletního média. Následně bylo provedeno dvojnásobné ředění pipetováním 100 µl S1 A4–A6 do S1-1/2 B4–B6. Tento přenos se opakoval z S1-1/2 na S1-1/4 a posledních 100 µl se zlikvidovalo. Ke vzorkům bez endotoxinu bylo přidáno 50 µl kompletního média. Následně bylo přeneseno 1920 µl kompletního média do sterilní, nepyrogenní zkumavky. Přidáno 80 µl 2 EU/ml endotoxinu, aby bylo dosaženo koncentrace 0,08 EU/ml. 50 µl z koncentrace endotoxinu 0,08 EU/ml bylo přidáno do jamek pro vzorky s přídatkem (označené spike). To samé bylo provedeno pro vzorek S2 (nesterilní). Schéma ředění viz Obrázek 10.



Obrázek 10: Ředění RSE [42]

- *Příprava buněk PBMC*

Dále se připravilo kompletní médium pro kultivaci PBMC buněk tak, že se do sterilní (nepyrogenní) zkumavky obsahující 33 ml IMDM média přenesou postupně celý obsah vialky MAT culture Medium Supplement (sérum).

Příprava suspenze buněk PBMC byla provedena následujícím postupem – sterilně a v laminárním boxu. Vialka s buňkami se vyndala z tekutého dusíku. Buňky byly rozmrazeny resuspendací (promíchávání) pomocí připraveného, teplého kompletního média 5 ml ve sterilní zkumavce. Poté byly buňky napipetovány na desku k připraveným roztokům – 50 µl/jamku. Poté se deska nechá kultivovat v inkubátoru po dobu 18-24 hodin.

- Příprava ELISA desky

Příprava ELISA desky probíhala stejně jako v Experimentu 1.

Den 3 – Příprava vzorků pro ELISA test, ELISA test

Příprava vzorků pro ELISA test probíhala jinak než v Experimentu 1. Rozdíl v postupu byl v tom, že krok ředění vzorků z expoziční desky se v Experimentu 2 nedělal. Vzorky se tedy neředily a použily se rovnou na ELISA desku (viz schéma desky Tabulka 4). Měření a vyhodnocení probíhalo stejně jako u Experimentu 1.

Tabulka 4: Schéma 96-jamkové ELISA desky

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	RSE 0,16	RSE 0,08	RSE 0,04	V1	V1	V1	V2	V2	V2	IL-6 450	IL-6 450	IL-6 450
B	RSE 0,16	RSE 0,08	RSE 0,04	V1 ½	V1 ½	V1 ½	V2 ½	V2 ½	V2 ½	IL-6 150	IL-6 150	IL-6 150
C	RSE 0,16	RSE 0,08	RSE 0,04	V1 ¼	V1 ¼	V1 ¼	V2 ½	V2 ½	V2 ½	IL-6 50	IL-6 50	IL-6 50
D	RSE 0,16	RSE 0,08	RSE 0,04	V1 SPIKE	V1 SPIKE	V1 SPIKE	V2 SPIKE	V2 SPIKE	V2 SPIKE	IL-6 16,7	IL-6 16,7	IL-6 16,7
E	RSE 0,02	RSE 0,01	RSE 0	V1 ½ SPIKE	V1 ½ SPIKE	V1 ½ SPIKE	V2 ½ SPIKE	V2 ½ SPIKE	V2 ½ SPIKE	IL-6 5,6	IL-6 5,6	IL-6 5,6
F	RSE 0,02	RSE 0,01	RSE 0	V1 ¼ SPIKE	V1 ¼ SPIKE	V1 ¼ SPIKE	V2 ¼ SPIKE	V2 ¼ SPIKE	V2 ¼ SPIKE	IL-6 1,9	IL-6 1,9	IL-6 1,9
G	RSE 0,02	RSE 0,01	RSE 0	V1	V1	V1 SPIKE	V1 SPIKE	V1 SPIKE	V2	IL-6 0,6	IL-6 0,6	IL-6 0,6
H	RSE 0,02	RSE 0,01	RSE 0	V1	BL	BL	BL	BL	V2	IL-6 0	IL-6 0	IL-6 0

Vysvětlivky: RSE = referenční standard endotoxinu, V1 = sterilní vzorek. V1 ½ = sterilní vzorek ředěný ½, V1 ¼ = sterilní vzorek ředěný ¼, V2 = nesterilní vzorek. V2 ½ = nesterilní vzorek ředěný ½, V2 ¼ = nesterilní vzorek ředěný ¼, V1 SPIKE = sterilní obohacený vzorek, V1 SPIKE ½ = sterilní obohacený vzorek ½ ředěný, V1 SPIKE ¼ = sterilní obohacený vzorek ¼ ředěný, V2 SPIKE = nesterilní obohacený vzorek, V2 SPIKE ½ = nesterilní obohacený vzorek ½ ředěný, V2 SPIKE ¼ = nesterilní obohacený vzorek ¼ ředěný, IL-6 = kalibrační koncentrace Interleukinu 6, BL = blank (voda bez endotoxinů)

2.1.3 TESTOVÁNÍ NA PBMC BUŇKÁCH – PŘÍMÝ KONTAKT (EXPERIMENT 3)

Testování probíhalo na frakci krve (PBMC buňky) jako přímý kontakt. Pro testování byl vybrán vzorek zdravotnického materiálu neabsorbovatelná nit (sterilní v originálním balení) i s jehlou.

Den 1 – příprava vzorku, příprava ředící řady, příprava buněk, expozice a příprava ELISA desky

- *Příprava buněk PBMC*

Příprava buněk byla stejná jako v Experimentu 2.

- *Příprava ředící řady*

Příprava ředící řady pozitivních kontrol byla stejná jako u Experimentu 2.

Nanášelo se na ELISA desku dle schématu v Tabulce 5.

- *Příprava ELISA desky*

Příprava ELISA desky probíhala stejně jako v Experimentu 1.

Tabulka 5: Schéma 96-jamkové ELISA desky

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	RSE 0,16	RSE 0,08	RSE 0,04	V1	V1	V1	V1	V2	V2	IL-6 450	IL-6 450	IL-6 450
B	RSE 0,16	RSE 0,08	RSE 0,04	V1 ½	V1 ½	V1 ½	V1 ½	V2	V2	IL-6 150	IL-6 150	IL-6 150
C	RSE 0,16	RSE 0,08	RSE 0,04	V1 ¼	V1 ¼	V1 ¼	V1 ¼	V2 ½	V2 ½	IL-6 50	IL-6 50	IL-6 50
D	RSE 0,16	RSE 0,08	RSE 0,04	V1 SPIKE	V1 SPIKE	V1 SPIKE	V1 SPIKE	V2 ½	V2 ½	IL-6 16,7	IL-6 16,7	IL-6 16,7
E	RSE 0,02	RSE 0,01	RSE 0	V1 ½ SPIKE	V1 ½ SPIKE	V1 ½ SPIKE	V1 ½ SPIKE	V2 ¼	V2 ¼	IL-6 5,6	IL-6 5,6	IL-6 5,6
F	RSE 0,02	RSE 0,01	RSE 0	V1 ¼ SPIKE	V1 ¼ SPIKE	V1 ¼ SPIKE	V1 ¼ SPIKE	V2 ¼	V2 ¼	IL-6 1,9	IL-6 1,9	IL-6 1,9
G	RSE 0,02	RSE 0,01	RSE 0	BL	BL	NK	NK	NK	NK	IL-6 0,6	IL-6 0,6	IL-6 0,6
H	RSE 0,02	RSE 0,01	RSE 0	BL	BL	BL2	BL2	BL2	BL2	IL-6 0	IL-6 0	IL-6 0

Vysvětlivky: RSE = referenční standart endotoxinu, V1 = sterilní vzorek. V1 ½ = sterilní vzorek ředěný ½, V1 ¼ = sterilní vzorek ředěný ¼, V2 = nesterilní vzorek. V2 ½ = nesterilní vzorek ředěný ½, V2 ¼ = nesterilní vzorek ředěný ¼, V1 SPIKE = sterilní obohacený vzorek, V1 SPIKE ½ = sterilní obohacený vzorek ½ ředěný, V1 SPIKE ¼ = sterilní obohacený vzorek ¼ ředěný, IL-6 = kalibrační koncentrace Interleukinu 6, NK = negativní kontrola (médiu + buňky), BL = blank (kompletní médium), BL2 = blank 2 (voda bez endotoxinů)

Vzorky z expoziční desky se ředily stejně jako u Experimentu 1. 150 µl/jamku vzorku S1 (sterilní) bylo přidáno do jamek A4–A7. Do jamek B4–B7 pro S1-1/2 bylo napipetováno 75 µl/jamku vzorku S1 a přidáno 75 µl/jamku kompletního média. Do jamek C4–C7 pro S1-1/4 bylo napipetováno 38 µl/jamku vzorku S1 a přidáno 112 µl/jamku kompletního média. 150 µl/jamku vzorku S1spike (sterilní) bylo přidáno do jamek D4–D7. Do jamek E4–E7 pro S1-1/2 spike bylo napipetováno 75 µl/jamku vzorku S1 a přidáno 75 µl/jamku kompletního média. Do jamek F4–F7 pro S1-1/4 spike bylo napipetováno 38 µl/jamku vzorku S1 a přidáno 112 µl/jamku kompletního média.

Pro nesterilní vzorek byl tento krok stejný. 150 µl/jamku vzorku S2 (nesterilní) bylo přidáno do jamek A8–A9 a B8–B9. Do jamek C8–C9 a D8 – D9 pro S2-1/2 bylo napipetováno 75 µl/jamku vzorku S1 a přidáno 75 µl/jamku kompletního média. Do jamek E8–E9 a F8–F9 pro S2-1/4 bylo napipetováno 38 µl/jamku vzorku S1 a přidáno 112 µl/jamku kompletního média.

2.2 PyroMAT™ Systém (Experiment 4)

Systém PyroMAT™ využívá jako zdroj monocytů kryokonzervované lidské monocytární buňky Mono-Mac-6 (MM6).

Odpověď na pyrogenní látky se určuje měřením interleukinu-6 (IL-6) produkovaného buňkami Mono-Mac-6. Molekuly IL-6 uvolněné do média buňkami MM6 během inkubační fáze jsou přeneseny na destičku ELISA a jsou vázány imobilizovanou primární protilátkou. Sekundární protilátka, navázaná s enzymem je přidána k vytvoření IL-6 vázaného komplexu.

IL-6 vázaný komplex je detekován v barevné reakci přidáním vhodného substrátu. Množství barvy (hodnoty naměřené absorbance) je úměrné množství produkce IL-6 v supernatantu buněk a měří se pomocí spektrofotometru.

V Experimentu 4 testování probíhalo na buněčné linii MM6. Pro testování byl vybrán vzorek zdravotnického materiálu neabsorbovatelná nit (sterilní v originálním balení) i s jehlou a připraven jako extrakt (stejně jako u Experimentu 2).

Den 1 – příprava extraktu

Nejprve byl připraven extrakt dle ISO normy v poměru 100 mg/ml v médiu RPMI médiu. Samotná neabsorbovatelná nit vážila 236 mg. Vzorek niti se připravil jako sterilní. Vzorek se umístil do sterilních zkumavek, přidalo se 2,4 ml buněčného média a nechaly se třepat do druhého dne v zahřívané monitorované třepačce (37 °C).

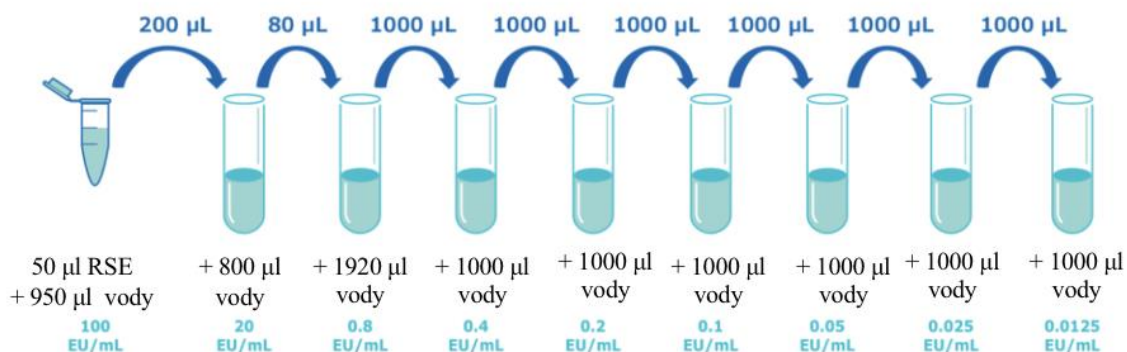
Den 2 – příprava ředící řady, příprava buněk a expozice

- *Příprava ředící řady vzorku a pozitivních kontrol*

Do lahvičky s alikvótem RSE (50 µl) bylo přidáno 950 µl LAL vody bez endotoxinů a následně se 1 minutu nechalo vortexovat při maximální rychlosti.

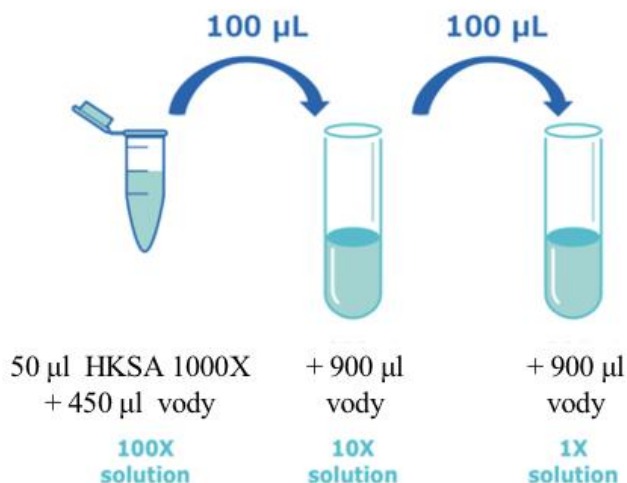
Standardní endotoxinové roztoky se připravily ze zásobního roztoku RSE v koncentraci 20 EU/ml. Připravilo se sedm koncentrací endotoxinu (0,0125; 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4 a 0,8 EU/ml) pro vytvoření standardní křivky. Sériové ředění bylo provedeno vodou bez endotoxinů

za použití zkumavek bez endotoxinů, jak je popsáno níže (viz Obrázek 11). Každá zkumavka byla vortexována po dobu 30 sekund.



Obrázek 11: Sériové ředění RSE [42]

Tepelně usmrcený *Staphylococcus aureus* (HKSA) byl zahrnut do experimentu jako pozitivní kontrola pro posouzení detekce neendotoxinových pyrogenů. Byl rozmražen alikvót HKSA (50 µl) 1000X a vortexován po dobu 1 minuty. Následně bylo provedeno sériové ředění vodou bez endotoxinů za použití zkumavek bez endotoxinů, jak je popsáno níže (viz Obrázek 12).



Obrázek 12: Ředění HKSA [42]

Do experimentu byla zahrnuta také další neendotoxinová pozitivní kontrola – Flagellin, který se naředil stejně jako HKSA (viz Obrázek 12).

Ředění samotného extraktu testovaného materiálu (vzorku) bylo následující – pro přípravu vzorku ½ bylo odebráno 600 µl extraktu + 600 µl vody, pro přípravu vzorku ¼ bylo odebráno 600 µl vzorku ½ + 600 µl vody. Endotoxinový roztok o koncentraci 20 EU/ml a HKSA 100X byl použit k obohacení vzorku („spike“).

Následně byl na expoziční desku napipetován standard, připravené vzorky a vzorky se „spike“ (RSE endotoxinem) – 50 µl/jamka: blank – voda bez endotoxinů, standardní roztoky endotoxinu od 0,0125–0,8 EU/ml, HKSA 1X roztok a obohacené („spike“) a neobohacené („non-spike“) roztoky vzorků.

- *Příprava buněk Mono Mac-6*

Nejprve se ohřálo médium RPMI na 37 °C, 20 ml média se napipetovalo do 50 ml centrifugační zkumavky bez endotoxinů. Jedna lahvička buněk PyroMAT™ se vytáhla z mrazničky a ihned byla rozmrazena ve vodní lázni při 37 °C po dobu 1 minuty ± 30 sekund. 1 ml zahřátého RPMI (20 ml v 50ml zkumavce) se přidal do lahvičky, promíchal se 3x pipetováním nahoru a dolů a přenesl zpět do zbytku RPMI (19 ml). Znovu se přidal 1 ml z předchozí směsi, aby se lahvička promyla a přemístilo se zpět do 50ml zkumavky.

Stejný krok se opakoval i při rozmrazování druhé lahvičky s buňkami PyroMAT™.

Centrifugační zkumavka se nechala centrifugovat 5 minut při 1000 ot./min. Po odstředění se odstranil supernatant a resuspendovala se peleta s malým množstvím zbývající tekutiny. Následně bylo přidáno 20 ml zahřátého RPMI na 37 °C a promíchalo se 3x pipetováním nahoru a dolů.

Nakonec bylo přidáno 200 µl/jamka buněčné suspenze linie Mono Mac-6 na desku s naředěným vzorkem a kontrolami. Takto připravená destička se nechala inkubovat po dobu 22 hodin při 37 °C, 5% CO₂, ve zvlhčené atmosféře.

Den 3 – příprava ELISA desky

Na destičku ELISA bylo přidáno 100 µl/jamku ředícího roztoku testu („assay diluent“) a následně přeneseno 100 µl/jamku buněčného supernatantu (viz schéma desky Tabulka 6). Deska se přelepila lepicí fólií a nechala se 2 hodiny inkubovat při pokojové teplotě.

Tabulka 6: Schéma 96-jamkové ELISA desky

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	RSE 0,8	RSE 0,4	RSE 0,2	RSE 0,1	V1	V1	V1	V1	FLAG. 100X	FLAG. 100X	FLAG. 100X	FLAG. 100X
B	RSE 0,8	RSE 0,4	RSE 0,2	RSE 0,1	V1 ½	V1 ½	V1 ½	V1 ½	FLAG. 10X	FLAG. 10X	FLAG. 10X	FLAG. 10X
C	RSE 0,8	RSE 0,4	RSE 0,2	RSE 0,1	V1 ¼	V1 ¼	V1 ¼	V1 ¼	FLAG. 1X	FLAG. 1X	FLAG. 1X	FLAG. 1X
D	RSE 0,8	RSE 0,4	RSE 0,2	RSE 0,1	V1 SPIKE	V1 SPIKE	V1 SPIKE	V1 SPIKE				
E	RSE 0,05	RSE 0,025	RSE 0,0125	BL	V1 ½ SPIKE	V1 ½ SPIKE	V1 ½ SPIKE	V1 ½ SPIKE				
F	RSE 0,05	RSE 0,025	RSE 0,0125	BL	V1 ¼ SPIKE	V1 ¼ SPIKE	V1 ¼ SPIKE	V1 ¼ SPIKE				
G	RSE 0,05	RSE 0,025	RSE 0,0125	BL	V1 + HKSA	V1 + HKSA	V1 + HKSA	V1 + HKSA				
H	RSE 0,05	RSE 0,025	RSE 0,0125	BL	HKSA 1X	HKSA 1X	HKSA 1X	HKSA 1X				

Vysvětlivky: RSE = standardní roztoky endotoxinu (od 0,0125-0,8 EU/ml), V1 = sterilní vzorek. V1 ½ = sterilní vzorek ředěný ½, V1 ¼ = sterilní vzorek ředěný ¼, V1 SPIKE = obohacený vzorek, V1 SPIKE ½ = obohacený vzorek ½ ředěný, V1 SPIKE ¼ = obohacený vzorek ¼ ředěný, BL = voda bez endotoxinů, HKSA 1X = 1X roztok HKSA, FLAG. = Flagellin roztok (100X; 10X; 1X)

Mezitím byl připraven „washing“ pufr – 20 ml koncentrovaného promývacího pufru 25X + 480 ml čisté vody). Po inkubaci byla destička promyta 400 µl/jamku „washing“ pufrem, celkem 4 mycí kroky, destička byla vždy vyklepána na buničinu pro úplné odstranění kapaliny.

Poté bylo přidáno 200 µl/jamku konjugátu IL-6, destička byla zakryta novou lepicí fólií a nechala se inkubovat 2 hodiny. Následně byla deska promyta 4x „washing“ pufrem.

Potom byl připraven roztok substrátu – celý obsah lavičky s barevným činidlem A byl přidán do lahvičky s barevným činidlem B, promíchán několikanásobným převrácením lahvičky. 200 µl/jamku roztoku substrátu bylo přidáno na destičku, přelepeno lepicí fólií a inkubováno 20 minut.

Poté bylo přidáno 50 µl/jamku stop roztoku a důkladně promícháno pipetováním nahoru a dolů, aby se zajistila homogenizace roztoku. Barva v jamkách se změnila z modré na žlutou. Množství barvy je úměrné množství produkce IL-6 přítomného v buněčném supernatantu. Byla změřena optická hustota při 450 nm a 630 nm (referenční vlnová délka) pomocí spektrofotometru.

3 VÝSLEDKY

Naměřené výsledky byly vyhodnoceny dle instrukcí ke kitům a dle ECVAM/ICCVAM protokolů (které vychází z European Pharmacopeia) [46]. Pro akceptovatelnost naměřených výsledků byla stanovena kritéria přijatelnosti, která jsou nutná pro určení, zda jsou výsledky použitelné a je možné test vyhodnotit.

Kritéria přijatelnosti jsou tato:

- Kritérium 1: u koncentrační křivky standardu endotoxinu (RSE) je splněna podmínka pozitivní odpovědi dávka/účinek (sigmoidální křivka)
- Kritérium 2: průměr hodnoty OD (optická denzita = hodnota absorbance) slepého vzorku (blanku) by měl být nižší než 0,1
- Kritérium 3: experiment je platný, pokud u RSE je dosaženo $LOD^* \leq 0,05$ EEU/ml (**LOD: LOD se stanoví pomocí standardní křivky endotoxinu – je to koncentrace endotoxinů, která odpovídá mezní hodnotě. Mezní hodnota je vyjádřena jako hodnota OD a odpovídá průměru hodnot OD slepého vzorku (blank) ze 4 opakování + 3x směrodatná odchylka blanku*).
- Kritérium 4: OD ze 4 replikátů RSE s nejvyšší koncentrací by měla být vyšší než 3
- Kritérium 5: průměr hodnot přepočítaných na endotoxinovou koncentraci (EEU/ml) ze 4 replikátů pozitivní kontroly HKSA a/nebo Flagellinu musí splnit podmínku, že výsledek (koncentrace) je vyšší než hodnota 0,05 EEU/ml

Cílem *in vitro* MAT testu je detekovat množství pyrogenů pod tzv. limitní koncentrací (CLC = contaminant limit concentration) – 0,05 EEU/ml, která určí, zda je zdravotnický prostředek bezpečný.

3.1 Pyrocell™ MAT test

3.1.1 EXPERIMENT 1

Jako první experiment, byl proveden *in vitro* PyroCell™ MAT test na plné lidské periferní krvi. Testovaný materiál chirurgická nit byla použita ve sterilizované formě, napřímo ponořena do krve, takže se jednalo o testování přímým kontaktem (viz ISO norma 10993–12). Jako pozitivní kontrola byly použity neendotoxinové HKSA a Flagellin. Dále byla zařazena negativní kontrola

(krev + médium) a blank (pouze médium bez krve). Standardní endotoxin (RSE) nebyl testován. Hodnoty naměřené absorpance jsou v Tabulce 7.

Tabulka 7: Hodnoty naměřené absorpance (po odečtu referenční vlnové délky)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,157	0,011	0,059	0,29	3,222	3,693	3,422	0,045	0,071	0,076	0,017	0,017
B	1,845	1,052	2,047	3,785	2,955	2,651	3,127	0,046	0,174	0,229	0,02	0,018
C	0,014	0,012	0,015	0,019	0,356	0,399	0,24	0,056	0,589	0,72	0,023	0,02
D	0,014	0,015	0,012	0,017	0,105	0,145	0,161	0,014	0,066	0,11	0,035	0,032
E	0,023	0,014	0,012	0,016	0,017	0,089	0,112	0,018	0,02	0,021	0,001	0,054

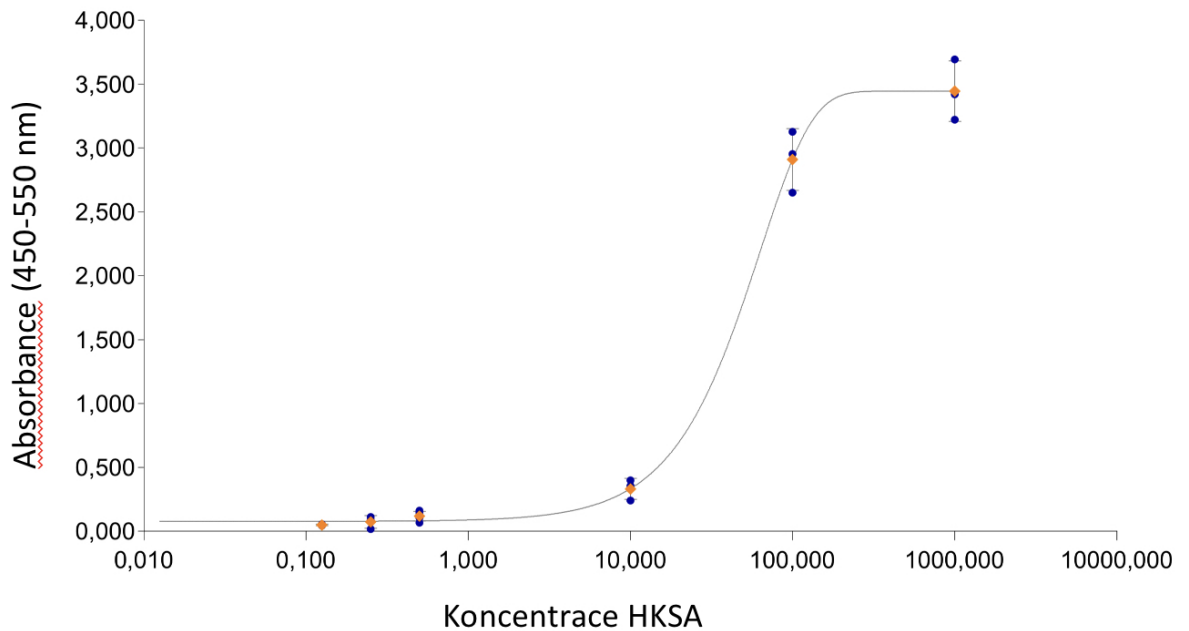
Na základě naměřených absorpací (a upravených dle návodu v protokolu ICVAM, ECVAM a návodu ke kitu) u standardu IL-6 (koncentrační řada 0–450 pg/ml) byla sestrojena kalibrační křivka a hodnota absorpací byla převedena na hladinu naměřeného interleukinu 6 přítomném v buněčném supernatantu.

Protože v prvním experimentu nebyl použit standard RSE, ale pouze pozitivní neendotoxinové kontroly HKSA a Flagellin, nebylo možné koncentrace IL-6 převést na RSE koncentrace (EEU/ml). Výsledné koncentrace jsou tedy udávány v pg/ml (viz Tabulka 8).

Tabulka 8: Výsledné koncentrace vypočítané dle kalibrační křivky standardu IL-6

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	115,215	<0,000	36,357	210,31	>472,500	>472,500	>472,500	23,139	46,267	50,883	<0,000	<0,000
B	>472,500	>472,500	>472,500	>472,500	>472,500	>472,500	>472,500	23,906	127,284	167,813	<0,000	<0,000
C	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	255,602	284,137	174,985	33,023	408,457	>472,500	<0,000	<0,000
D	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	74,566	106,082	117,912	<0,000	42,627	78,393	13,024	9,682
E	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	61,581	80,533	<0,000	<0,000	<0,000	—	31,382

Koncentrační řada HKSA



Obrázek 13: Graf 1 - Koncentrační řada HKSA

Z naměřených absorbancí byla také sestrojena křivka dávka-odpověď koncentrační řady pozitivní neendotoxinové kontroly HKSA (viz Obrázek 13). Tato křivka splňuje sigmoidální tvar koncentrační závislosti dávka/odpověď.

Experiment 1 byl spíše screeningový, protože zde nebyl použit standard RSE a experiment tedy nemohl být plně vyhodnocen. Z akceptačních kritérií splnil experiment pouze Kritérium 2 (OD blanku $> 0,1$) a částečně Kritérium 4 (HKSA 1000X měla naměřenou absorbanci vyšší než 3). Ostatní kritéria jsou spojena se standardem RSE, který nebyl použit pro testování. HKSA splnila kritérium dávka/opověď (sigmoidální křivka). Pozitivní HKSA měla v nejvyšších koncentracích (1000X a 100X) hodnoty IL-6 větší než 450 pg/ml. Zatímco negativní kontrola (neovlivněná krev v RPMI médiu) i blank měly koncentrace IL-6 < 0 , takže základní kritéria kvality experimentu jsou splněna – negativní kontrola vykazovala negativní odpověď a pozitivní kontrola vykazovala v experimentu pozitivní odpověď.

3.1.2 EXPERIMENT 2

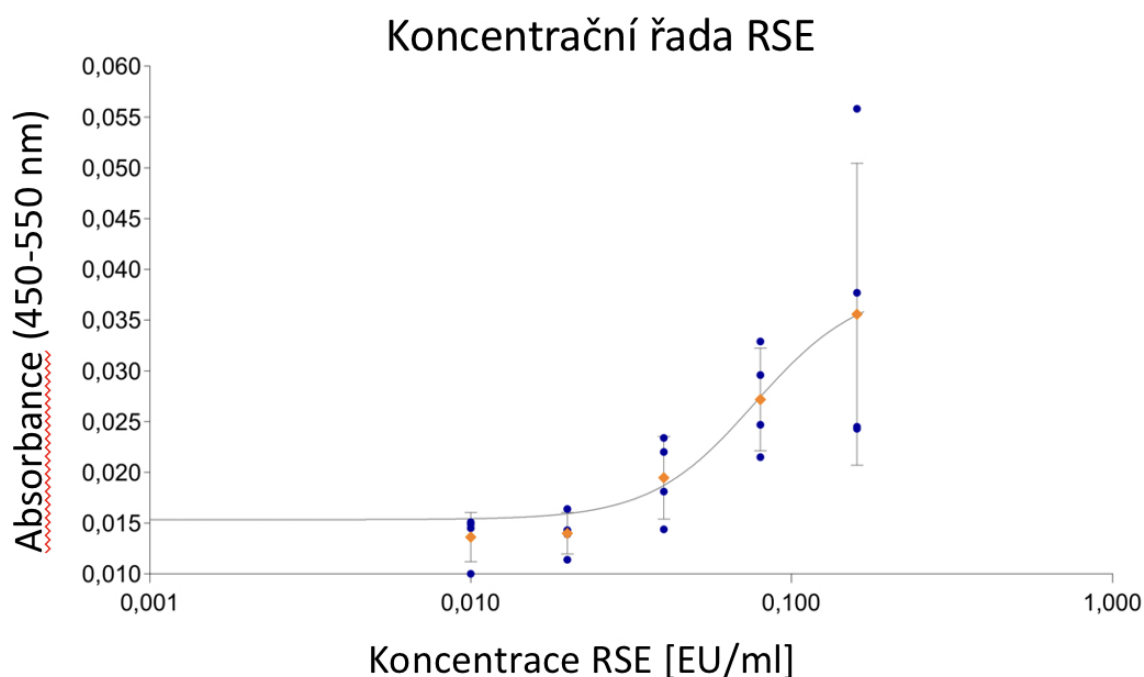
Jako druhý experiment, byl proveden *in vitro* PyroCell™ MAT test jako extrakt v PBMC buňkách. Zde se použil jako sterilní a nesterilní materiál neabsorbovatelná nit s jehlou. Extrakt byl použit ve 3 koncentracích: jako neředěný a dále ředěný na ½ a na ¼ (označení V, V1/2, V1/4). Jako pozitivní kontrola byl použit RSE standard. Jako blank bylo použito kultivační médium. Hodnoty naměřené absorbance jsou v Tabulce 9.

Tabulka 9: Hodnoty naměřené absorbance (po odečtu referenční vlnové délky)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,056	0,03	0,022	0,013	0,011	0,012	0,015	0,012	0,015	3,264	3,09	2,665
B	0,024	0,021	0,014	0,014	0,013	0,013	0,015	0,014	0,013	1,817	1,749	1,686
C	0,038	0,025	0,023	0,015	0,012	0,011	0,015	0,015	0,01	0,789	0,729	0,69
D	0,024	0,033	0,018	0,019	0,018	0,026	0,017	0,024	0,019	0,327	0,297	0,274
E	0,011	0,014	0,015	0,029	0,022	0,027	0,021	0,024	0,015	0,126	0,112	0,102
F	0,016	0,015	0,019	0,021	0,019	0,018	0,019	0,017	0,025	0,05	0,049	0,046
G	0,014	0,015	0,018	0,022	0,023	0,033	0,043	0,054	0,014	0,032	0,029	0,027
H	0,014	0,01	0,022	0,013	0,012	0,009	0,011	0,007	0,008	0,016	0,012	0,013

Na základě naměřených absorbancí (a upravených dle návodu v protokolu ICVAM, ECVAM a návodu ke kitu) u standardu IL-6 (koncentrační řada 0–450 pg/ml) byla sestrojena kalibrační křivka a hodnota absorbancí byla převedena na hladinu naměřeného interleukinu 6 přítomném v buněčném supernatantu. Naměřené koncentrace IL-6 a křivka byly porovnány s křivkou od dodavatele kitu. Kritérium 2 akceptovatelnosti výsledků bylo splněno (viz Tabulka 9, jamka H5 – H8). Kritérium 3 akceptovatelnosti výsledků je splněno (viz Tabulka 9, jamka H5 – H8; LOD = 0,016). Kritérium 4 splněno nebylo. Kritérium 5 také ne, protože nebyly použity jiné pozitivní kontroly než RSE.

Dále byla sestrojena křivka dávka/odpověď RSE standardu (závislost koncentrace na absorbanci) – viz Obrázek 14. Naměřené absorbance byly přepočítány na koncentrace EEU/ml (viz Tabulka 10). Kritérium 1 akceptovatelnosti výsledků bylo splněno, protože má křivka sigmoidální tvar.



Obrázek 14: Graf 2 - Koncentrační řada RSE

Tabulka 10: Výsledná koncentrace vypočítána z kalibrační křivky RSE (EEU/ml)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	>0,168	0,09	0,055	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	>0,168	>0,168	>0,168
B	—	0,053	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	>0,168	>0,168	>0,168
C	0,146	0,066	0,061	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	>0,168	>0,168	>0,168
D	0,065	0,11	0,038	0,04	0,035	0,073	0,032	0,065	0,04	>0,168	>0,168	>0,168
E	<0,000	<0,000	<0,000	0,086	0,056	0,075	0,052	0,064	<0,000	>0,168	>0,168	>0,168
F	0,027	<0,000	0,043	0,05	0,044	0,038	0,043	0,033	0,068	>0,168	>0,168	>0,168
G	<0,000	<0,000	0,035	0,057	0,058	0,107	>0,168	>0,168	<0,000	0,105	0,086	0,079
H	<0,000	<0,000	0,054	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	0,025	<0,000	<0,000

Extrakt sterilního i nesterilního vzorku (ředěného i neředěného) byl pod limitem detekce endotoxinu, tj. 0,05 EEU/ml (Tabulka 10, řádek A, B, C; sloupec 4–9), takže nebyla detekována přítomnost pyrogenů. Neředěné sterilní i nesterilní extrakty, které byly obohaceny o endotoxin („spike“ vzorek), měly hodnotu 0,05 EEU/ml (Tabulka 10, jamky D4–D6; jamky D7–D9), takže v těchto vzorcích byla detekována přítomnost pyrogenů. Pozitivní kontrola RSE splnila sigmoidální závislost dávka-odpověď a v blanku nebyla detekována přítomnost pyrogenů.

3.1.3 EXPERIMENT 3

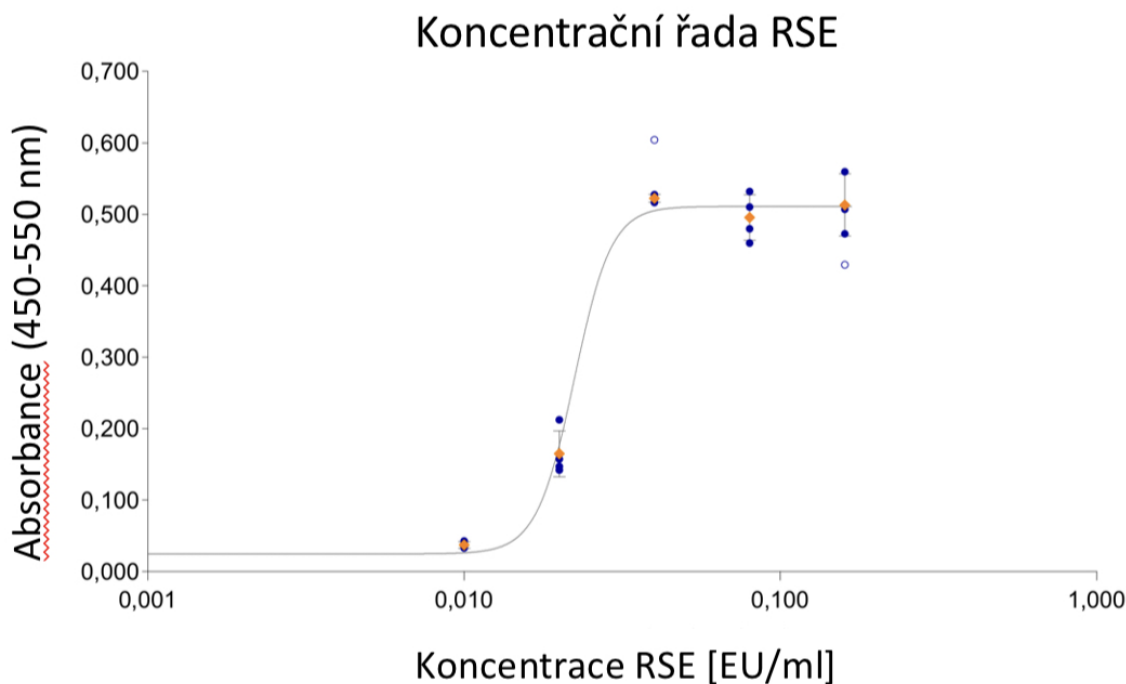
Třetí experiment byl proveden jako přímý kontakt v PBMC buňkách. Vzorek byl testován jako sterilní a nesterilní, opět jako neřaděný a řaděný, stejně jako v Experimentu 2. Jako pozitivní kontrola byl použit standard RSE, jako negativní kontrola bylo zařazeno kultivační médium s buňkami a jako blank pouze kultivační médium. Hodnoty naměřené absorbance jsou v Tabulce 11.

Tabulka 11: Hodnoty naměřené absorbance (po odečtu referenční vlnové délky)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,507	0,48	0,527	0,608	0,551	0,56	0,58	0,655	0,582	0,421	0,523	0,305
B	0,56	0,46	0,523	0,481	0,462	0,433	0,449	0,615	0,594	0,21	0,297	0,162
C	0,429	0,532	0,604	0,354	0,354	0,276	0,292	0,531	0,513	0,121	0,127	0,008
D	0,473	0,51	0,517	0,596	0,595	0,547	0,539	0,489	0,452	0,051	0,05	0,039
E	0,212	0,043	0,012	0,429	0,467	0,425	0,411	0,384	0,288	0,026	0,029	0,019
F	0,147	0,034	0,014	0,338	0,325	0,33	0,316	0,427	0,429	0,017	0,019	0,011
G	0,142	0,033	0,013	0,011	0,01	0,019	0,014	0,018	0,012	0,01	0,011	0,007
H	0,158	0,039	0,015	0,008	0,013	0,013	0,011	0,016	0,012	0,006	0,011	0,007

Na základě naměřených absorbancí (a upravených dle návodu v protokolu ICVAM, ECVAM a návodu ke kitu) u standardu IL-6 (koncentrační řada 0–450 pg/ml) byla sestrojena kalibrační křivka a hodnota absorbancí byla převedena na hladinu naměřeného interleukinu 6 přítomném v buněčném supernatantu. Naměřené koncentrace IL-6 a kalibrační křivka byly porovnány s křivkou od dodavatele kitu. Kritérium 2 akceptovatelnosti výsledků bylo splněno (viz Tabulka 11, jamka H5–H8). Kritérium 3 akceptovatelnosti výsledků je splněno (viz Tabulka 11, jamka H5–H8; LOD = 0,019). Kritérium 4 splněno není. Kritérium 5 také ne, protože nebyly použity jiné pozitivní kontroly než RSE.

Dále byla sestrojena koncentrační křivka dávka/odpověď RSE standardu (závislost koncentrace na absorbanci) – viz Obrázek 15. Naměřené absorbance byly přepočítány na koncentrace EEU/ml (viz Tabulka 12). Kritérium 1 akceptovatelnosti výsledků bylo splněno, protože má křivka sigmoidální tvar.



Obrázek 15: Graf 3 - Koncentrační řada RSE

Tabulka 12: Výsledná koncentrace vypočítána z kalibrační křivky RSE (EEU/ml)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,042	0,032	>0,168	>0,168	>0,168	>0,168	>0,168	>0,168	>0,168	0,027	>0,168	————
B	>0,168	0,03	>0,168	0,032	0,03	0,028	0,029	>0,168	>0,168	0,021	0,023	————
C	————	>0,168	————	0,025	0,025	0,022	0,023	>0,168	>0,168	0,018	0,019	————
D	0,031	0,053	>0,168	>0,168	>0,168	>0,168	>0,168	0,033	0,029	0,015	0,015	————
E	0,021	0,014	<0,000	0,028	0,03	0,027	0,027	0,026	0,023	0,01	0,012	————
F	0,019	0,013	————	0,024	0,024	0,024	0,024	0,028	0,028	<0,000	<0,000	<0,000
G	0,019	0,013	<0,000							<0,000	<0,000	<0,000
H	0,019	0,014	<0,000		<0,000	<0,000	<0,000	<0,000		<0,000	<0,000	<0,000

Extrakt sterilního i nesterilního vzorku (ředěného i neředěného) měl hodnotu endotoxinu >0,05 EEU/ml (Tabulka 12, sloupec A, B, C, D; sloupec 4–9), takže byla detekována přítomnost pyrogenů. Neředěný sterilní extrakt, který byl obohacen o endotoxin („spike“ vzorek), měl hodnotu >0,05 EEU/ml (Tabulka 12, řádek D, E, F; sloupec 4–7), takže byla detekována přítomnost pyrogenů. Ředěný sterilní extrakt obohacen o endotoxin měl hodnotu <0,05 EEU/ml, takže v tomto vzorku nebyla detekována přítomnost pyrogenů. Pozitivní kontrola RSE vykazovala sigmoidální tvar křivky dávka-odpověď, v negativní kontrole ani v blanku nebyla detekována přítomnost pyrogenů.

3.2 PyroMAT™ Systém

3.2.1 EXPERIMENT 4

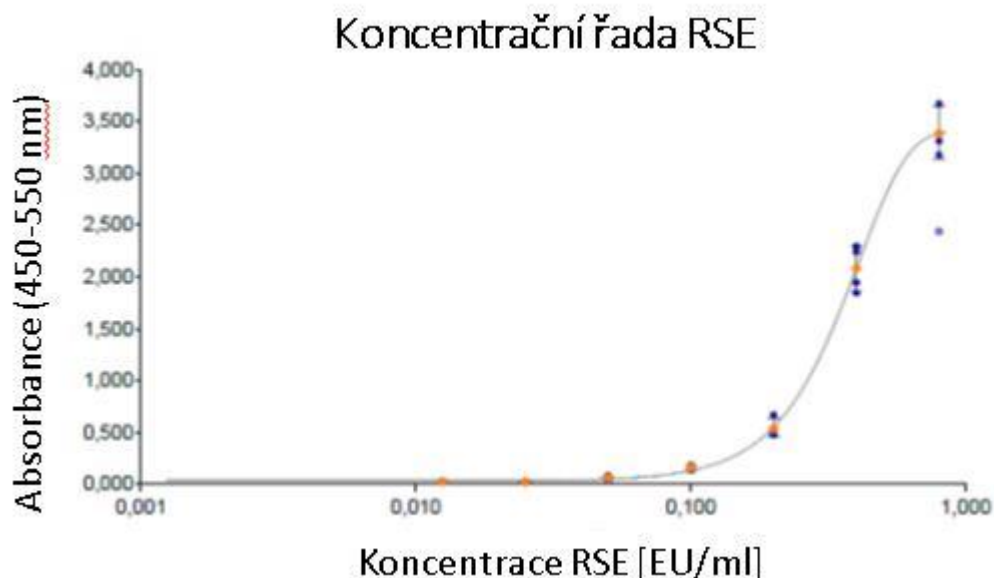
Čtvrtý experiment byl založen na testování monocytické lidské tkáňové linii Mono Mac-6. Vzorek byl testován jako sterilní a ve formě extraktu. Jako pozitivní kontrola byl použit standard RSE, HKSA (koncentrace 1X) a Flagellin (koncentrace 100X, 10X, 1X). Vzorek byl obohacen nejen o endotoxin RSE, ale i o HKSA 1X („spike“ vzorek). Jako blank bylo zařazeno kultivační médium. Hodnoty naměřené absorbance jsou v Tabulce 13.

Tabulka 13: Hodnoty naměřené absorbance (po odečtu referenční vlnové délky)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	3,673	2,243	0,488	0,181	0,028	0,028	0,022	0,025	3,083	3,193	3,285	3,278
B	3,314	1,845	0,667	0,184	0,011	0,026	0,025	0,023	1,253	1,648	1,402	1,377
C	2,441	2,297	0,527	0,138	0,022	0,022	0,025	0,025	0,039	0,032	0,058	0,041
D	3,178	1,947	0,477	0,137	0,2	0,15	0,306	0,225				
E	0,083	0,023	0,025	0,022	1,105	0,988	1,283	1,535				
F	0,071	0,023	0,026	0,022	0,895	0,925	1,152	1,464				
G	0,051	0,021	0,024	0,021	0,929	0,611	0,982	0,909				
H	0,029	0,021	0,025	0,023	0,432	0,158	0,273	0,367				

Na základě naměřených absorbancí (a upravených dle návodu v protokolu ICVAM, ECVAM a návodu ke kitu) u standardu IL-6 (koncentrační řada 0–450 pg/ml) byla sestrojena kalibrační křivka a hodnota absorbancí byla převedena na hladinu naměřeného interleukinu 6 přítomném v buněčném supernatantu. Naměřené koncentrace IL-6 a křivka byly porovnány s křivkou od dodavatele kitu. Kritérium 2 akceptovatelnosti výsledků bylo splněno (viz Tabulka 13, jamka E4 – H4). Kritérium 3 akceptovatelnosti výsledků je splněno (viz Tabulka 13, jamka E4–H4; LOD = 0,024). Kritérium 4 bylo také splněno (viz Tabulka 13, jamka A1, B1, D1). Kritérium 5 bylo také splněno, HKSA 1X splnila kritérium positivity, tj. koncentrace byly vyšší než 0,05 EEU/ml (viz Tabulka 13, jamka H5–H8). U Flagellinu bylo toto kritérium 5 také splněno (u koncentrací 100X a 10X; Tabulka 13, řádek A, B, C; sloupec 9–12).

Dále byla sestrojena křivka dávka/odpověď RSE standardu (závislost koncentrace na absorbanci) – viz Obrázek 16. Naměřené absorbance byly přepočítány na koncentrace EEU/ml (viz Tabulka 14). Kritérium 1 akceptovatelnosti výsledků bylo splněno, protože má křivka sigmoidální tvar.



Obrázek 16: Graf 4 - Koncentrační řada RSE

Tabulka 14: Výsledná koncentrace vypočítána z kalibrační křivky RSE (EEU/ml)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	>0,839	>427,500	0,189	0,118	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	0,583	0,624	0,673	0,668
B	0,695	426,001	0,219	0,119	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	0,298	0,346	0,316	0,313
C	—	>427,500	0,196	0,103	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	0,03	<0,000	0,057	0,035
D	0,617	>427,500	0,187	0,102	0,124	0,107	0,152	0,131				
E	0,075	<0,000	<0,000	<0,000	0,279	0,264	0,301	0,332				
F	0,067	<0,000	<0,000	<0,000	0,251	0,255	0,285	0,323				
G	0,05	<0,000	<0,000	<0,000	0,256	0,21	0,263	0,253				
H	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	0,179	0,11	0,144	0,166				

Extrakt sterilního vzorku (ředěného i neředěného) měl hodnotu endotoxinu <0,05 EEU/ml (Tabulka 14, řádek A, B, C; sloupec 5–8), takže nebyla detekována přítomnost pyrogenů. Neředěný i ředěný sterilní extrakt, který byl obohacen o endotoxin („spike“ vzorek), měl hodnotu >0,05 EEU/ml (Tabulka 12, řádek D, E, F; sloupec 4–7), takže byla detekována přítomnost pyrogenů. Sterilní vzorek byl také obohacen o HKSA (koncentraci 1X) a také měl hodnotu >0,05 EEU/ml (Tabulka 12, jamky G5–G8), takže byla detekována přítomnost pyrogenů. V obou testovaných pozitivních kontrolách HKSA a Flagellin byla detekována přítomnost pyrogenů (hodnoty byly >0,05 EEU/ml). Hodnoty blanku byly <0,05 EEU/ml, takže nebyla detekována přítomnost pyrogenů.

4 DISKUZE

K hodnocení pyrogenní kontaminace se tradičně používá králičí pyrogenní test, tedy test *in vivo*. Jeho omezení však spočívá v tom, že jeho manipulace se zvířaty by mohla poskytnout falešně pozitivní nebo negativní výsledky. Dalším omezením je, že se citlivost na pyrogenitu u lidí a králíků liší a extrapolace dat na člověka tedy není zcela možná. V neposlední řadě je zde etický aspekt nákladného používání zvířat pro toxikologické testování a snaha snížit náklady a zpřesnit výsledky za použití alternativních metod, např. metod *in vitro*.

Alternativou k posouzení pyrogenity je test Limulus amebocyte lysate, a jedná se o test *in vitro* za použití krve kraba, která má také svá omezení: např. falešné výsledky v přítomnosti glukonů nebo řady rostlinných přípravků.

Ve srovnání s těmito testy nevyžaduje *in vitro* pyrogenový MAT test, který se provádí na lidské plné periferní krvi nebo frakci lidských krevních buněk nebo lidské tkáňové linii Mono Mac-6, živočišné produkty a snadno se provádí. Metoda testu aktivace monocytů byla kvalifikována a ověřena pro detekci pyrogenů Evropským centrem pro validaci alternativních metod (ECVAM) v roce 2005 a Meziagenturním koordinačním výborem pro validaci alternativních metod (ICCVAM) v roce 2008. MAT test je proto vhodný jako náhradní test za králičí pyrogenní test (RPT) po validaci specifické na produkt. Od roku 2010 patří mezi kompendiální metody pro detekci pyrogenů v Evropském lékopisu (kapitola 2.6.30) [46].

V rámci této práce byl validován MAT test na 3 různých dostupných testovacích systémech (krev/frakce krve/tkáňová linie) pomocí 2 komerčních kitů. Testovaný vzorek byl zdravotnický prostředek, konkrétně sterilní neabsorbovatelná nit s jehlou. Vzorek byl testován také v různých formách, buď jako sterilní/nesterilní/případně obohacen o endotoxin (referenční standardní endotoxin nebo needotoxinovou pozitivní kontrolu (HKSA/Flagellin). Byly testovány také různé druhy styku s testovacím systémem – buď jako přímý kontakt nebo jako extrakt (výluh).

Jak je vidět z výsledků, experiment 1 (test na plné lidské periferní krvi) byl spíše screeningový, tzn. že jsem si vyzkoušela manipulaci se vzorkem, lidskou krví, správné a přesné pipetování, přípravu vzorku a práci s ELISA testem. V blanku i negativní kontrole nebyly detekovány pyrogeny, ve sterilním vzorku obohaceném o HKSA pyrogeny detekovány byly. Avšak ve sterilním vzorku jako takovém byly detekovány pyrogeny, i když by zde neměly být, a naopak v pozitivní kontrole Flagellin pyrogeny detekovány nebyly, ačkoliv byla detekce očekávána. Tento výsledek by mohl být způsoben vlivem prvního experimentu v rámci zavádění testu,

manipulace se vzorkem, případně v nepřesném pipetování. V experimentu 2 vše vyšlo dle očekávání, tedy pozitivní kontroly a vzorky obohacené o endotoxin vykazovaly pozitivní odpověď (tedy přítomnost pyrogenů), naopak extrakt sterilního i nesterilního vzorku a blank vykazoval negativní odpověď (tedy nepřítomnost pyrogenů). V experimentu 3 byl testován vzorek přímým kontaktem ve formě sterilní i nesterilní a zde naopak vykazoval přítomnost pyrogenů, včetně vzorku obohaceného o endotoxin. Negativní kontroly i blank vykazovaly negativní odpověď, pozitivní kontrola endotoxin vykazovala pozitivní odpověď dle očekávání. V experimentu 4 extrakt sterilního vzorku vykazoval negativní odpověď a extrakt sterilního vzorku obohacený o endotoxin a/nebo HKSA zase pozitivní odpověď dle očekávání. Pozitivní kontrola HKSA i Flagellin vykazovaly pozitivní odpověď a blank negativní odpověď. V experimentech 1–3 byl použit jiný kit než v experimentu 4.

Z našich výsledků vyplývá, že poslední experiment 4 vykazoval nejlepší experimentální výsledky. To může být dáno použitím jiného kitu a/nebo také zaučením se ve správném pipetování a manipulaci se vzorky, kitem, roztoky atd.

Zajímavé srovnání vyšlo v rámci experimentu 2 a 3 (použit stejný kit), kde extrakt sterilního vzorku vyšel negativní, obohacený o endotoxin vyšel pozitivní, ale při testování stejného sterilního vzorku přímým kontaktem vyšly obě formy vzorků (neobohacený/obohacený endotoxinem) pozitivní. To by bylo v souladu s informacemi ve vědeckých člancích [1, 47], kde je zmíněno, že testování přímým kontaktem má větší výpovědní hodnotu, tedy lépe imituje fyziologickou situaci, než testování pomocí výluhu (extraktu). Ne všechny zdravotnické materiály však lze testovat přímým kontaktem vzhledem k jejich velikosti a různým formám, proto je nutné metodiku *in vitro* MAT testu dále optimalizovat, což jsem si prakticky vyzkoušela v experimentální části této práce a tyto závěry jsou v souladu s literaturou [41].

Když se srovnají oba kity, tak expozice destičky je u obou kitů stejná, ale ELISA deska je jiná. U Lonza kitu se musela ELISA destička nachystat (přes noc pokrýt „coating pufrem“) a až poté se mohla použít. Kdežto u kitu od Mercku byla ELISA destička nachystaná. Podle mého názoru je jednodušší pracovat s kitem od Mercku. Není to časově tak náročné.

S kryokonzervovanou krví nebo s čerstvou krví mohou být testovány i biomateriály. To je důležité pro uživatele, či pracoviště, kteří nemají k dispozici stálý přísun čerstvé krve pro test. Kryokonzervovanou krev lze vyrábět ve velkých sériích, které procházejí kontrolou kvality včetně screeningů na HIV a virus hepatitidy. Pokud srovnám oba testovací systémy, tak z mé vlastní zkušenosti se mi lépe pracovalo s buněčnými systémy než s krví.

5 ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo:

- popsat současné trendy v testování pyrogenity zdravotnických prostředků
- zmapovat dostupné a validované alternativní metodiky
- v experimentální části se zaměřit na alternativní *in vitro* MAT test a jeho dostupné varianty

V rámci práce byly popsány existující metodiky pro testování pyrogenity zdravotnických prostředků, které jsou zakotvené v legislativě EU, konkrétně v evropském lékopisu. Dále byly diskutovány *in vivo* metodiky i jejich alternativní *in vitro* varianty, jejich princip, omezení a výhody. Součástí této práce byla i experimentální část, kde byly představeny a prakticky vyzkoušeny dostupné varianty alternativního *in vitro* MAT testu na různých formách zdravotnického prostředku. Výsledky experimentální části potvrdily vhodnost a jednoduchost MAT testu a jeho použití pro testování zdravotnických prostředků i potřebu další validace pro různé typy/formy zdravotnických prostředků.

6 LITERATURA

1. BROWN J., CLIPPINGER AJ., FRITZ Briglia C., CASEY W., COLEMAN K., FRITSCH A., HARTUNG T., MAOUYO D., MULLER T., REICH J., ROBERT L., ROEDER Ř., SANCHEZ G., SAWYER AY., SOLATI S., TIRUMALAI R., ZWISLER W., ALLEN D., Using the monocyte activation test as a stand-alone release test for medical devices. *ALTEX*. **2021**, 38 (1)
2. PERDOMO-MORALES R., PARDO-RUITZ Z., SPREITZER I., LAGARTO A., MONTAG T. Monocyte activation test (MAT) reliably detects pyrogens in parenteral formulations of human serum albumin. *ALTEX*. **2011**, 28 (3), s. 227–235.
3. FRITSCH Anja, CSO, CONFARMA Francie. Detection of non-endotoxin pyrogens by Monocyte Activation Test (MAT) using the PyroMAT® system. *Merk*. **2020**
4. KRISFALUSI-GANNON, J., ALI, W., DELINGER, K., ROBERTSON, L., BRADY TERRY, E., GODDARD MELINDA, K. M., TINKER-KULBERG, R., KEPLEY, CH. L., DELLINGER, A. L. The Role of Horseshoe Crabs in the Biomedical Industry and Recent Trends Impacting Species Sustainability. **2018**, 5, s. 1–13
5. HORT, E. C., PENFOLD, W. J. Microorganisms and their Relation to Fever: Preliminary Communication. **1912**, 12 (3), s. 361–390
6. SEIBERT, F. B. Fever-producing substances found in some distilled water. *Am. J. Physiol.* **1923**, 87, s. 90–104
7. SEIBERT, F. B. The causes of many febrile reactions following intravenous injections. *Am. J. Physiol.* **1925**, 71, s. 621–652
8. BANG, F. B. A bacterial disease of *Limulus polyphenus*. *Bull Johns Hopkins Hosp.* **1956**, 98, s. 325–351
9. LEVIN, J., BANG, F. B. The role of endotoxin in the extracellular coagulation of *Limulus* blood. *Bull Johns Hopkins Hosp.* **1964**, 115, s. 265–274
10. HARTUNG, T., WENDEL, A. Detection of pyrogens using human whole blood. *ALTEX*. **1995**, 12 (2), s. 70–75
11. Monocyte Activation Test (MAT). Merck on-line. Darmstadt: Merck KgaA., ©2021 [cit. 18. 11. 2021] Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/marketing/global/documents/109/402/pyromat-white-paper-wp1071en-mk.pdf>

12. HASIWA, N., DANESHIAN, M., BRUGGER, P., FENNRICH, S., HOCHADEL, A., HOFFMANN, S., RIVERA-MARIANI, F. E., ROCKEL, C., SCHINDLER, S., SPREITZER, I., STOPPELKAMP, S., VYSYARAJU, K. HARTUNG, T. Evidence for the detection of non-endotoxin pyrogens by the whole blood monocyte activation test. *ALTEX*. **2013**, 30 (2), s. 169–208
13. Český lékopis 1997, nakladatelství Grada Publishing, Praha **1997**
14. SILVA, Cristiane, C., PRESGRAVE, Octavio, A. F., HARTUNG, Thomas., MORAES, Aurea. M. L., DELAGO, Isabella F. Applicability of the Monocyte Activation Test (MAT) for hyperimmune sera in the routine of the quality control laboratory: Comparison with the Rabbit Pyrogen Test (RPT). *Toxicology in Vitro*. **2016**, 32, s. 70–75
15. The Rabbit and the Horse Shoe Crab. Fujifilm, **2014**
16. The 3Rs. National Centre for the Replacement Refinement & Reduction of Animals in Research
17. KUBINCOVÁ, P., NOVÁK, J., SOVADINOVÁ, I. Nový přístup při stanovení akutní systémové toxicity. *Chemické listy*, **2016**, 110 (2), s. 118–125
18. Animals used for scientific purposes – Environment – European Commission
19. ISO/TR 21582, Pyrogenicity – Principles and methods for pyrogen testing of medical devices. Technical report, **2021**
20. BORTON, L.K., COLEMAN, K., P. Material-mediated pyrogens in medical devices: Applicability of the in vitro Monocyte Activation Test. *ALTEX*. **2018**, 35(4), s. 453–463. DOI: 10.14573/altex.1709221
21. AKIRA, S., UEMATSU, S., TAKEUCHI, O. Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell*. **2006**, 124 (4), s. 783–801
22. BEUTLER., B. A. TLRs and innate immunity. *Blood*. **2009**, 113 (7), s. 1399–1407
23. KAWAI, T., AKIRA, S., Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*. **2011**, 34 (5), s. 637–650
24. HENDERSON, B., WILSON, M. Cytokine induction by bacteria: beyond lipopolysaccharide. *Cytokine*. **1996**, 8 (4), 269–268
25. Cohen, J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 420. **2002**, s. 885–891
26. HARM, S., SCHILDBOCK, C., STROBL, K. An in vitro study on factors affecting endotoxin neutralization in human plasma using the Limulus amoebocyte lysate test. **2021**

27. Buttenschoen, K., Radermacher, P. & Bracht, H. Endotoxin elimination in sepsis: physiology and therapeutic application. *Langenbecks Arch Surg* 395. **2010**, s. 597–605
28. DINARELLO, C. A., THOMPSON, R. C. Blocking IL-1: Interleukin 1 receptor antagonist in vivo and in vitro. **1991**, 12 (11)
29. TAKAYAMA, K., MITCHELL, DH., DIN, ZZ., MUKERJEE, P., COLEMAN, DL. Monomeric Re lipopolysaccharide from *Escherichia coli* is more active than the aggregated form in the *Limulus* ameocyte lysate assay and in inducing Egr-1 mRNA in murine peritoneal macrophages. *J Biol Chem.* **1994**, 269 (3), s. 2241–2244
30. RIBI, E., ANACKER, RL., BROWN, Ř., HASKINS, WT., MALMGREN, B., MILNER, KC., RUDBACH, JA. Reaction of endotoxin and surfactants. I. Physical and biological properties of endotoxin treated with sodium deoxycholate. *J Bacteriol.* **1966**, 92 (5), s. 1493–1509.
31. SEYDEL, U., HAWKINS, L., SCHROMM, A., HEINE, H., SCHEEL, O., KOCH, M., BRANDENBURG, K. The generalized endotoxic principle. *Eur. J. Immunol.* **2003**, 33, s. 1586–1592
32. RICHTER, W., VOGEL, V., HOWE, J., STEINIGER, F., BRAUSER, A., KOCH, MH., ROESSLE, M., GUTSMANN, T., GARIDEL, P., MANTALE, W., BRANDENBURG, K. Morphology, size distribution, and aggregate structure of lipopolysaccharide and lipid A dispersions from enterobacterial origin. *Innate Immun.* **2011**, 17 (5), s. 427–438
33. EMANCIPATOR, K., CSAKO, G., ELIN, RJ. In vitro inactivation of bacterial endotoxin by human lipoproteins and apolipoproteins. *Infect Immun.* **1992**, 60 (2), S. 596–601
34. LONZA BIOTEC SPOL. S.R.O. PyroCell™ MAT System, IL-1 beta. Dostupné z: https://bioscience.lonza.com/lonza_bs/CZ/en/EndotoxinDetection/p/000000000000254715/PyroCell-MAT-System%2C-IL-1-beta
35. KIMMELOVÁ, Nikola. Porovnání výsledků a posouzení diagnostického významu prokalcitoninu, presepsinu, interleukinu-6 a ICIS [online]. Brno, **2021**
36. RCSB PDB – 1IL6: HUMAN INTERLEUKIN-6, NMR, MINIMIZED AVERAGE STRUCTURE
37. KONSTANTINOOU G. N. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Methods Mol Biol.* **2017**, 15(92), str. 79–94. DOI: 10.1007/978-1-4939-6925-8_7. PMID: 28315213

38. AYDIN S. A short history, principles, and types of ELISA and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *PEPTIDES*. **2015**, 72, str. 4–15. DOI: 10.1016/j.peptides.2015.04.012
39. ICCVAM. ICCVAM Test Method Evaluation Report: Validation Status of Five In Vitro Test Methods Proposed for Assessing Potential Pyrogenicity of Pharmaceuticals and Other Products: ICCVAM-Recommended Test Method Protocol The Human Whole Blood/Interleukin-6 In Vitro Pyrogen Test. **2008**, str. C47–C70.
40. DB-ALM Protocol n° 133: Human Whole Blood/Interleukin (IL)-1 Beta In Vitro Pyrogen Test (WBT).
41. LONZA. PyroCell™ MAT System Instructions for routine use. **2020**
42. MERCK Millipore. PyroMAT™ System. Monocyte Activation Test (MAT). **2019**
43. STANG K., FENNRICH S., KRAJEXSKI S., STOPELKAMP S., BURGNER I., WENDEL HANS-PETER, POSTR M. *Highly sensitive pyrogen detection on medical devices by the monocyte activation test*. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **2013**, 25 (4), str. 1065–075.
44. PyroCell™ MAT System. LONZA. Dostupné z: https://bioscience.lonza.com/lonza_bs/CZ/en/EndotoxinDetection/p/000000000000254714/PyroCell-MAT-System%2C-IL-6
45. PyroMAT kit. *Reagents and Interleukin-6 ELISA kit for Monocyte Activation Test (MAT), for Pyrogen testing*. SIGMA-ALDRICH. **2020**. Dostupné z: https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/product/mm/pyr0matkit?gclid=EA1aIQobChMliZvjh-qY-AIVis13Ch3shwBvEAAAYASAAEgLnOfD_BwE
46. European Pharmacopeia (2010). 6.7: 2.6.30. Monocyte Activation test.
47. HARTUNG T. Pyrogen testing revisited on occasion of the 25th anniversary of the whole blood monocyte activation test. *ALTEX*. 2021, 38 (1), str. 3–19. DOI: 10.14573/altex.2101051