

นิพนธ์ต้นฉบับ

การศึกษาระดับแฟคเตอร์ VIII และ von Willebrand factor ใน Heat Treated Freeze Dried Cryoprecipitate

ผกายมาศ ปิณฑะดิษ, ภัทรพร อิศรางกูร ณ อยุธยา*, อำไพวรรณ จวนลัมฤทธิ์*,
สุกัญญา โชตศุการย์ และ อรุณรัตน์ จันทนขจรพิง**.

สำนักงานวิจัย, *ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล, **ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติสภากาชาดไทย

บทคัดย่อ: ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทยได้ผลิต heat treated freeze dried cryoprecipitate (HTFDC) เพื่อใช้ทดแทน frozen cryoprecipitate (FC) ผลิตภัณฑ์ HTFDC มีคุณสมบัติใช้รักษาภาวะเลือดออกง่ายในโรค hemophilia A ได้ดีกว่า FC คือเก็บที่อุณหภูมิ 4°C ได้นาน สะดวกในการขนส่ง การเก็บ และการใช้รักษา HTFDC เตรียมจาก FC นำมารวมกัน โดยใช้ glycine buffer เป็น stabilizer นำมาทำให้แห้งและทำลายเชื้อด้วยความร้อน 60°C นาน 72 ชั่วโมง HTFDC 1 ขวดละลายในน้ำกลั่น 50 มล. จะมีปริมาณโปรตีน 2.5 ก./ขวด ผู้รายงานได้ศึกษาปริมาณของ factor VIII clotting activity (FVIII:C), von Willebrand factor antigen (vWF:Ag) และ ristocetin cofactor activity (RiCoF) ใน HTFDC จำนวน 69 ขวด ปริมาณ FVIII:C ตรวจโดยวิธี one stage technique, vWF:Ag โดยวิธี ELISA และ RiCoF โดยวิธี agglutination พบว่าค่าเฉลี่ย (mean±SD) ของ FVIII:C, vWF:Ag, RiCoF ใน HTFDC 1 ขวด 50 มล. เท่ากับ 336.4 ± 108.9 , 655.5 ± 163.2 และ 656.4 ± 312.9 unit/ขวด ตามลำดับ ซึ่งได้ผลเป็นที่น่าพอใจ ผลการศึกษาแสดงว่า HTFDC ที่เตรียมจากศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย มีปริมาณและคุณภาพของ FVIII และ vWF พอเพียงสำหรับใช้ในการรักษาคนไข้ hemophilia A และ von Willebrand disease ที่มีปัญหาภาวะเลือดออกง่าย

Key Words : ● Freeze dried cryoprecipitate ● von Willebrand factor ● Ristocetin cofactor

วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2544;11:33-6.

โรคเลือดออกง่ายทางพันธุกรรมที่พบบ่อยที่สุดทั้งในและต่างประเทศมี 2 โรคคือโรค Hemophilia A และ von Willebrand's disease (vWD) อุบัติการณ์ของโรค

Hemophilia A พบ 1:10,000-1:20,000 ของประชากรไทย¹ อุบัติการณ์คล้ายกับในต่างประเทศ² สำหรับ vWD พบอุบัติการณ์สูงกว่า Hemophilia A บางรายงานพบสูงถึง 1:100³ แต่ผู้ป่วยส่วนใหญ่มีอาการเลือดออกไม่รุนแรง มาพบแพทย์น้อย

สำหรับประเทศไทยการรักษาอาการเลือดออกในโรค vWD จะใช้ fresh frozen plasma (FFP), frozen

ได้รับต้นฉบับ 28 กุมภาพันธ์ 2544 และให้ตีพิมพ์ 19 มีนาคม 2544

ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ พญ.ผกายมาศ ปิณฑะดิษ สำนักงานวิจัย คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล ถนนพระรามที่ 6 เขตราชเทวี กทม. 10400

cryoprecipitate และ DDAVP ในบางราย สำหรับ factor VIII concentrate ที่มี von Willebrand factor (vWF) อยู่ด้วยมีราคาสูงจึงใช้น้อยมากในประเทศไทย พ.ศ. 2540 ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทยได้ผลิต HTFDC ซึ่งได้ทำลายเชื้อไวรัสด้วยความร้อน 60°C 72 ชั่วโมง เป็น dry heat ซึ่งสามารถจะทำลายไวรัสได้ระดับหนึ่ง การผลิต HTFDC จุดมุ่งหมายเพื่อใช้รักษาอาการเลือดออกในผู้ป่วยโรค hemophilia A และ vWD

ศูนย์ฯ เตรียม HTFDC⁴ จาก FC โดย pool 3 ถุง บรรจุเป็น 1 ขวด ใช้ glycine buffer เป็น stabilizer นำมาทำแห้ง ทำลายเชื้อด้วยความร้อน 60°C นาน 72 ชั่วโมง แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

วัตถุประสงค์

เพื่อตรวจปริมาณของ FVIII:C activity, vWF:Ag และ RiCoF activity ใน HTFDC ว่ามีปริมาณมากน้อยเพียงใด เหมาะสมที่จะนำไปรักษาคนไข้โรค hemophilia A และคนไข้โรค von Willebrand ที่มีปัญหาภาวะเลือดออกง่ายหรือไม่

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างที่ใช้ตรวจ HTFDC ที่ศูนย์ฯ ผลิตเป็นชนิดที่ heat 60°C 72 ชั่วโมง เก็บที่ 4°C จำนวน 69 ขวด เมื่อเวลาจะทดสอบนำ HTFDC เป็นผง ละลายด้วยน้ำกลั่น 50 มล. และเขย่าให้เข้ากันดี นำมาทดสอบ FVIII:C

ภายใน 4 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างที่เหลือแช่แข็ง -70°C เพื่อใช้ทดสอบ vWF:Ag และ RiCoF ภายใน 2 เดือน

วิธีการทดสอบ

1. FVIII:C activity วัดระดับโดยวิธี one stage technique⁵ สำหรับ standard normal plasma ใช้ calibration plasma ของ Instrumentation Laboratory, Italy, Substrate FVIII deficient plasma ใช้ plasma ของคนไข้ที่มี FVIII:C 0% ไม่มี inhibitor การตรวจใช้เครื่อง ACL 200, Automated Coagulation Laboratory, Milano, Italy

2. vWF:Ag ตรวจโดยวิธี ELISA⁶ ใช้ polyclonal antihuman vWF และ peroxidase conjugated immunoglobulin ต่อ vWF ของ บริษัท Dako, Denmark เป็น antibody อ่าน absorbance ที่เกิดขึ้นโดยใช้เครื่อง ELISA Reader, CERES UV 900 c, Biotek Instrument, Victoria, USA

3. RiCoF activity ตรวจโดยวิธี agglutination⁷ ใช้ ristocetin ของบริษัท Helena, USA, formalin-fixed platelet⁸ เตรียมเองจากคนปกติ อ่าน agglutination ด้วยเครื่อง Whole Blood Lumi Aggregometer Chrono-Log, Pennsylvania, USA.

ผลการศึกษา

ผลการตรวจ FVIII:C activity, vWF:Ag และ RiCoF activity ใน HTFDC แสดงในตารางที่ 1

FVIII:C เป็น factor ที่สำคัญของการผลิต HTFDC

ตารางที่ 1 ปริมาณ FVIII:C, vWF:Ag, RiCoF ใน HTFDC

Categories	FVIII:C (IU/bottle)	vWF:Ag (unit/bottle)	RiCoF (unit/bottle)
No. of samples	67	42	69
Mean	336.4	655.5	656.4
SD	108.95	163.2	312.9

หมายเหตุ 1 bottle ละลายในน้ำกลั่น 50 mL

คือต้องการให้มี FVIII:C สูง เพื่อใช้ในการรักษาโรค aemophilia A และโรค vWD ผลิตภัณฑ์ที่ตรวจมีค่าเฉลี่ย FVIII:C 336 IU/ขวด, ค่า vWF:Ag และ RiCo F 655 และ 656 unit/ขวด ตามลำดับ ซึ่งมีระดับสูงเป็นที่น่าพอใจ

วิจารณ์

จากผลการศึกษานี้จะเห็นว่า HTFDC ที่ศูนย์ผลิตเพื่อให้บริการผู้ป่วยแทน FC มีระดับ FVIII:C, vWF และ RiCoF สูงเป็นที่น่าพอใจ เมื่อนำผลิตภัณฑ์ไปใช้รักษาผู้ป่วย hemophilia A และ vWD โดยทำการศึกษาวิจัยอย่างละเอียดทั้ง clinical, laboratory และ safety response โดย อำเภอวรรณ จวนสัมฤทธิ์^{9,10} พบว่าได้ผลดีทั้งด้านคลินิกและการทดสอบทาง lab คือสามารถหยุดอาการเลือดออกในผู้ป่วยทั้ง 2 โรค

ข้อดีของผลิตภัณฑ์นี้คือให้ FVIII:C activity สูงกว่าและมีประสิทธิภาพในการรักษาดีกว่า FFP และ FC อีกประการหนึ่งผู้ป่วยสามารถนำไปฉีดเองที่บ้านได้ มีความสะดวกในการเก็บ การขนส่ง การใช้รักษา บรรจุเป็นขวดเล็กขนาด 50 มล. ละลายง่ายเก็บที่อุณหภูมิ 4°C ไม่ต้องเก็บที่ -20°C นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์นี้ราคาเพียง 10% ของราคาจากต่างประเทศ (ราคาใน พ.ศ. 2543) ผลการรักษาในผู้ป่วยโรค hemophilia A พบว่าได้ผลไม่แตกต่างจากการใช้ผลิตภัณฑ์โลหิตจากต่างประเทศ เป็นการลดค่าใช้จ่ายในการรักษา ผู้ป่วยสามารถซื้อยาเพื่อรักษาโรคในระยะแรกๆ ได้ โรคจะไม่รุนแรง ลดความพิการถาวรของข้อต่างๆ ได้ ทำให้ผู้ป่วยมีคุณภาพชีวิตที่ดี นับว่าเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการรักษาผู้ป่วยโรค Hemophilia A และ vWD

เอกสารอ้างอิง

1. Isarangkura P, Bintadit P, Hathirat P, Sasanakul W, Watanakasetr S, Thanamitra S. Study of the prevalence of hereditary bleeding disorders in Thailand. *Vajira Med J* 1980;24:183-90.
2. Montgomery RR, Scott JP. Hemophilia A and B. In: Nathan DG, Oski FA, eds. *Hematology of infancy and children*. 4th ed. Philadelphia: WB. Saunders, 1993: 1613-20.
3. Werner EJ, Broxson EH, Tucker EL, et al. Prevalence of von Willebrand disease in children: a multiethnic study. *J Pediatr* 1993;123:893-8.
4. Chantanakajornfung A, Isarangkura P, Chuansumrit A, Bunvisuthi P, Pintadit P, Nakdaeng T, Thanthien P, Hathirat P, Nuchprayoon C. Low cost production of heat treated freeze dried cryoprecipitate for treatment of hemophiliacs in Thailand. *Haemophilia* 1998;4:200.
5. Biggs. *Human Blood Coagulation, Hemostasis and Thrombosis*. 4th ed. Blackwell Scientific Publication, Oxford, 1972.
6. Cejka J. Enzyme immunoassay for factor VIII related antigen. *Clin chem* 1982;28:1356-8.
7. Macfarlane DE, Stibbe J, Kirby EP, et al. A Method for assaying von Willebrand factor (ristocetin cofactor). *Throm et Diath Haemr (Stuttgart)* 1975;34:306-8.
8. Brinkhous KM, Read MJ. Fixation platelets and platelet agglutination aggregation tests. *Methods in Enzymology* 1989;169:150-65.
9. Chuansumrit A, Pintadit P, Sangkapreecha C, Chantanakajornfung S, Hathirat P, Isarangkura P. Efficacy of lyophilized cryoprecipitate in controlling epistaxis in patients with von Willebrand disease. *Thai J Hematol Transf Med*. 2000;10:113-21.
10. Chuansumrit A, Koranes S, Suebsangad A, Pintadit P, Hathirat P. Feasibility of continuous infusion of lyophilized cryoprecipitate in hemophilia A patients with bleeding disorder. *Thai J Hematol Transf Med*. 2000; 10:29-35.

Factor VIII: C and von Willebrand Factor Level in Heat Treated Freeze Dried Cryoprecipitate

Pakaimas Pintadit, Partraporn Isarangkura*, Ampaiwan Chuansumrit*, Sukunya Chotsupakarn and Aroonrat Chantanakajornfung**

Research Center, *Department of Pediatrics, Faculty of Medicine and Ramathibodi Hospital, Mahidol University,

**National Red Cross Blood Center.

Abstract: The National Red Cross Blood Center in Thailand has produced Heat Treated Freeze Dried Cryoprecipitate (HTFDC) to replace fresh frozen plasma and frozen cryoprecipitate for the treatment of Hemophilia A and von Willebrand disease. HTFDC is prepared from 3 unit pooled frozen cryoprecipitate in glycine buffer, then lyophilized and heat treated at 60° C for 72 hours. It is stable at 4° C, which is convenient for transportation, storage and infusion. One bottle of HTFDC is dissolved in 50 mL sterile water, with protein content of 2.5 g/bottle. The levels of factor VIII clotting activity (FVIII:C), von Willebrand factor antigen (vWF:Ag) and ristocetin cofactor activity (RiCoF) of HTFDC in 69 bottles were studied by one stage clotting assay, ELISA and agglutination respectively. The mean levels of FVIII:C, vWF: Ag and RiCoF in one bottle of HTFDC were 336.4±108.9, 655.5±163.2 and 654.4±312.9 units respectively. The results showed that the locally prepared HTFDC is suitable for the treatment in patient with Hemophilia A and vWD. It has been effectively used in controlling bleeding episodes in the hospital as well as home care therapy.

Key Words : ● Freeze dried cryoprecipitate ● von Willebrand factor ● Ristocetin cofactor

Thai J Hematol Transf Med 2001;11:33-6.