



DETERMINATION OF FIBRIN DEGRADATION PRODUCTS USING LOCALLY PREPARED FIBRINOGEN AND ANTI-FIBRINOGEN

จรัลรัตน์ เลาวิลาชัยกุล วท.บ. (เทคนิคการแพทย์)
นันทนา กังใจตรง วท.บ. (เทคนิคการแพทย์)*
สนิท มกรแก้วเกียร วท.บ. (เทคนิคการแพทย์), Ph.D.*

Fibrin degradation products (FDP) เป็น products ที่เกิดจากขบวนการย่อย fibrin (Fibrinolysis) พบว่า FDP ประกอบด้วย 3 fragments คือ Fragment x Fragment y และ Fragment D แบ่งตามลำดับก่อนหลังที่ได้จากขบวนการ Fibrinolysis (Mardar 1969) half-life ของ FDP ประมาณ 9 ชั่วโมงเท่านั้น (Wintrobe 1974) ในห้องปฏิบัติการ FDP ใช้ประโยชน์คือเป็นตัวบ่งชี้ในการวินิจฉัยโรค DIC ที่มี Intravascular clotting, severe liver disease, myocardial infarction, thromboembolism ซึ่งโรคเหล่านี้จะมี FDP สูง ในการศึกษาวิธีหา FDP ทาง Lab ก็มีอยู่มากมายหลายวิธีเช่น "Coagulase" กับเชื้อ Staphylococcus aureus (Richardson, 1973) Latex agglutination, Immunodiffusion, (Merskey) แต่ที่ยอมรับว่า Sensitive ที่มากที่สุดคือ Hemagglutination Inhibition Test (Thomas et al., 1970) ถึง

แม้ว่าวิธี Radioimmunoassay (Gordon et al., 1975) จะ sensitive ที่สูงแต่ก็ทำได้ยุ่งยากและแพงกว่า

วัตถุประสงค์

ต้องการเตรียม Human fibrinogen ซึ่งใช้เป็น Antigen ด้วยวิธีที่ง่าย และ เตรียม anti-human fibrinogen ขึ้นเอง เพื่อนำมาใช้ในการหา FDP โดยวิธี Hemagglutination Inhibition Technique และต้องการหาค่าปกติจากเลือดของคนที่มาชายโลหิตให้แก่โรงพยาบาลนครเชียงใหม่ และค่า FDP ในคนที่ไข้เป็น acute glomerulonephritis

วัตถุและวิธีการ

1. การเตรียม Human Fibrinogen (Regoeczi E.: 1974) ทำลาย Prothrombin ใน Oxalated blood ด้วย Barium sulfate จาก

*ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

นั้นตกตะกอน fibrinogen ที่ 0.24 saturation ของ Ammonium sulfate แล้วละลายตะกอนด้วย 0.15 M. Phosphate buffer pH 7.8 นำไป dialyse กับ Phosphate buffer ตัวเดิม แล้วตกตะกอน Dialysate นั้นอีกครั้งหนึ่งด้วย 0.24 sat. Ammonium sulfate

2. การเตรียม Anti-human Fibrinogen ผสม Human fibrinogen ที่เตรียมได้กับ complete Freund's adjuvant ปริมาณเท่ากัน นำไปฉีดกระจายเข้าใต้ผิวหนัง 0.5 ม.ล. ครั้ง ต่อไปให้ฉีดห่างกัน 1 สัปดาห์ ด้วย 1 ม.ล. ของ fibrinogen กับ Incomplete Freund's adjuvant หลังจากฉีดไป 4 ครั้ง จึงเจาะเลือดมาตรวจหา Antibody Titer

3. การเตรียม Red blood cell coated with human fibrinogen เก็บ human O cells, Rh positive ใน Alsever's solution (1:1) หลังจากล้าง 3 ครั้งด้วย phosphate buffer saline pH 6.2 แล้วนำ 0.1 มล. ของ packed cell ที่ล้างแล้ว ผสมกับ 0.1 มก. fibrinogen และ 2 มก. BSA แล้วค่อยๆ เติม 0.25 มล. ของ 2.5% glutaraldehyde ใน phosphate buffer saline, rotate ที่ 180 rpm 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นล้าง cells อีก 3 ครั้งด้วย Citrate buffer pH 6.2 แล้วจึงทำให้

เป็น 20 มล. cell suspension ใน Diluent (.2% BSA ใน citrate buffer pH 6.2)

4. การเตรียม serum samples เจาะเลือดจากผู้ที่มาชายโลหิตให้แก่โรงพยาบาลนครเชียงใหม่ จำนวน 50 ราย และคนไข้ที่เป็น Acute glomerulonephritis (AGN) 5 ราย โดยใช้ plastic syringe เจาะเลือดมา 5 มล. รวมกับ 500 KIU ของ Trasylol (Kallikrein inactivator units) (Boehringer, Mannheim, Germany) incubate ที่ 37° ซ. 4 ชั่วโมง บั่นแยกซีรัม จากนั้นเติม 100 unit/ml ของ thrombin (Parke-Davis Co., Michigan 48232, USA.) ในอัตราส่วน 1:10 เพื่อทำลาย fibrinogen ที่เหลืออยู่ในซีรัม ทั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมงที่ 37° ซ. แยกซีรัมออกจาก fibrin ด้วยการใช้ high speed

5. Hemagglutination-Inhibition Technique Dilute serum และ Standard fibrinogen ที่รู้ปริมาณ เป็น serial two fold dilutions ใช้ Microtiter system ปริมาตร 0.025 มล. เติม Anti-fibrinogen ที่ titrate แล้ว ลงไป 0.025 มล. ทำ serum control (Diluent กับ Undiluted serum) และ fibrinogen control (Diluent กับ fibrinogen) ด้วย, Incubate ที่อุณหภูมิ

ห้อง 4 ชั่วโมง จากนั้นเติม 0.025 มล. ของ fibrinogen coated RBC suspension (ทำ RBC control ด้วย) ทั้งทั้งไว้ ที่อุณหภูมิห้องอีก 1 ชั่วโมง อ่านผล titer ของการ inhibitbit แล้วนำมาเทียบกับสูตรดังนี้

$$\text{Conc. of FDP in serum (}\mu\text{g/ml)} = \frac{\text{T-serum}}{\text{T-standard}} \times \text{Conc of standard (}\mu\text{g/ml)}$$

T-serum = ส่วนกลับของ inhibition titer ของ serum

T-standard = ส่วนกลับของ inhibition titer ของ standard

การทำกับ serum คนป่วย AGN ได้ทำเปรียบเทียบระหว่าง Commercial Ab และที่เตรียมขึ้นเอง

ผลการทดลอง

การเตรียม fibrinogen โดยวิธีดังกล่าวให้ความบริสุทธิ์ และ % yield ที่ได้โดยเฉลี่ย 26% เมื่อคิดเทียบจากค่า fibrinogen ในพลาสมาปกติ และปริมาณ พลาสมา ที่เริ่มต้นเตรียม จากการสร้าง Anti-fibrinogen ก็พบว่าได้ titer ของ Antibody ถึง 1:32, 768 ส่วนการหาค่า FDP ในคนปกติ 50 ราย มี FDP อยู่ระหว่าง 0-6.25 $\mu\text{g/ml}$ และผู้ป่วย AGN มี FDP 12.5-50 $\mu\text{g/ml}$ ตามตารางต่อไปนี้

Serum Sample	Total	FDP ($\mu\text{g/ml}$)						
		0	3.12	6.25	12.5	25	50	100
Normal	50	39	8	3	—	—	—	—
AGN (commercial Antifibrinogen)	5	—	—	—	4	—	1	—
AGN (Rabbit anti-fibrinogen)	5	—	—	—	4	—	1	—

วิจารณ์

วิธี Hemagglutination-inhibition Technique นี้ พบว่า ไว มาก แต่การทำโดยเฉพาะการ coat RBC ด้วย human fibrinogen

พบว่าถ้า Bovine serum albumin น้อยเกินไป หรือไม่มี หรือถ้าเติม glutaraldehyde มากเกินไปทั้งสองกรณีจะทำให้ เกิด Auto hemagglutination ด้วยเหตุนี้การ titration จึง

ต้อง titrate ไม่เฉพาะแต่ fibrinogen อย่างเดียวเท่านั้นแต่จะต้องใช้ BSA และ glutar-aldehyde จำนวนพอเหมาะด้วยส่วน specificity ของวิธีนี้นับว่าใช้ได้ดีมาก เนื่องจากไม่มีการ inhibition โดย human albumin และ human I-globulin เลย (Das, 1970) ขณะเดียวกัน Trasylol และ Thrombin ที่ใช้ก็ไม่มีผลต่อ specificity ของ reaction ด้วยในการทดลองนี้ได้ทำการทดลองดู Reproducibility ด้วยโดยได้ทำการทดสอบซ้ำถึง 3 ครั้งในเวลาต่าง ๆ กันก็พบว่าได้ค่า FDP เท่ากัน

ABSTRACT

Proteolysis of fibrinogen and fibrin by Plasmin results in the elaboration of polypeptids fragments known as fibrinogen fibrin degradation products (FDP). Split products of fibrinogen and fibrin (FDP), are found increasingly in patient sera with defibrination syndrome and intravascular coagulation

For hemagglutination inhibition immunoassay of FDP, human fibrinogen was prepared from normal plasma by the method of 0.24 saturation for ammonium sulfate fractionation and rabbit anti-human fibrinogen antiserum was produced. Using glutaraldehyde as a coupling agent between soluble antigen (fibrinogen) and human-O-cells, the FDP was assayed in 50 normal sera

and 5 patient sera with acute glomerulonephritis. The obtaining results are very encouraging for further study.

REFERENCES:

1. Das, P.C. Assay of fibrin degradation products by agglutination inhibition of coated erythrocytes, *J. Clin. Path.*, 23:299-303, 1970.
2. Richardson, G. The production and testing of staphylococci with clumping factor activity for use in the assay of fibrinogen degradation products, *J. Clin. Path.*, 26: 377-380, 1973.
3. Mardar, V.J., and Shulman, N.R. High molecular weight derivatives of human fibrinogen produced by plasmin. *J. Biol. Chem.* 244:2111-2119, 1969.
4. Wintrobe, M.M. (1974) Blood coagulation. *Clin. Hemat.*, 7th Edition. Igaku Shoin Ltd. Tokyo PP. 409-450, 1974.
5. Merskey, C., Kleiner, G.J., and Johnson, A.J. Quantitative estimation of split products of fibrinogen in human serum, relation to diagnosis and treatment. *Blood J. Hemat.* 28 : 1-18., 1966.

6. Thomas, D.P., Niewiaroski, S., Myers, A.R., Bloch, K.J. and Colman, R.W. A Comparative study of four methods of detecting fibrinogen degradation products in patients with various diseases New Engl. J. Med. 283 : 663, 1970.
7. Gordon, Y.B., Martin, J.J. London, J. and chard, T., The development of radioimmunoassay for fibrinogen products fragment degradation, D + E., Brit. J. Hematol., 29 : 87, 1975.
8. Reogoezi, E. Fibrinogen, in struture and function of plasma proteins, Vol. 1 (Allison; A.C. ed.) Plenum press. London & New York. pp. 133-168, 1974.