Thesis Title Development of a Suitable Method for Fibrin Glue Preparation in Routine Laboratory

Author Miss Nutjeera Intasai

M.S. Medical Technology

Examining Committee

Lecturer Prasit Chanarat	Chairman
Professor Panja Kulapongs	Member
Associate Professor Decha Romcai	Member

ABSTRACT

Fibrin glue is a local hemostatic blood product, which contains 4 major components; fibrinogen, thrombin, $CaCl_2$ and antifibrinolytic agent. Problems in fibrin glue preparation include low fibrinogen concentration, time consuming, using the special device, and unsuitable ratio of fibrinogen, thrombin, $CaCl_2$ and antifibrinolytic agent. This study aims to develop the fibrinogen and thrombin preparation method in order to give high concentration, high quality, less interference, simple, and could be prepared in routine laboratory in hospital around Thailand.

To define an appropriate fibrinogen preparation, citrate-phosphate-dextrose (CPD) plasma was used in this study. Fibrinogen in plasma was precipitated by (1) cryoprecipitaton (C), (2) repeat cryoprecipitation (RC), (3) saturated ammonium sulfate precipitation (A), (4) saturated ammonium sulfate precipitation and followed by cryoprecipitation (AC), (5) absolute ethanol precipitation (E), (6) absolute ethanol precipitation and followed by cryoprecipitation (EC), (7) 10% ethanol precipitation (10E), (8) 10% ethanol precipitation and followed by cryoprecipitation (10EC), (9)

polyethylene glycol precipitation (PEG) and (10) polyethylene glycol precipitation and followed by cryoprecipitation (PEGC). The result showed that all of the precipitates were dissolved in the supernate that leaved for reconstitute except the precipitate from PEG and PEGC. The precipitates from 10E and 10EC were not dissolved after stored at –20 °C. Protein in fibrinogen solutions from precipitation that determined by Biuret's method was no statistically different ($p>0.05$). Albumin in fibrinogen solutions from precipitation that determined by Bromcresol green method was statistically different ($p<0.05$). The highest to lowest albumin represented as g/dl in mean ± SD were from C 4.5 ± 0.8 (n=12), RC 4.4 ± 0.8 (n=13), AC 4.4 ± 0.7 (n=13), A 4.0 ± 0.6 (n=13), EC 3.6 ± 1.2 (n=8) and E 3.2 ± 0.6 (n=9). Fibrinogen concentration in fibrinogen solutions from precipitation that determined by modified thrombin time method was statistically difference ($p<0.05$). The highest to lowest fibrinogen concentration represented as mg/dl in mean ± SD were from AC 1452.7 ± 515.0 (n=15), A 1373.0 ± 468.5 (n=15), RC 1251.3 ± 508.5 (n=15), E 825.3 ± 209.8 (n=10), C 735.2 ± 325.8 (n=15) and EC 554.8 ± 254.2 (n=7). Fibrinogen concentration that determined by Ratnoff's method was statistically different ($p<0.05$). The highest to lowest fibrinogen concentration represented as mg/dl in mean ± SD were from RC 1,160.3 ± 456.5 (n=10), AC 963.6 ± 218.2 (n=10), C 856.5 ± 411.8 (n=10) and A 706.6 ± 259.4 (n=10). The quality of fibrinogen from precipitation that determined by thrombin time method was no statistically different ($p>0.05$). The quantity and quality of factor XIII in fibrinogen solution from C and RC was sufficient to stabilize fibrin.

Thrombin preparation method can be performed in this study. Thrombin preparation by E, A, and PEG were compared their activities with acetone precipitation, the original method, by thrombin time method. Thrombin-liked activity of thrombin solution from acetone, E and PEG precipitation could convert fibrinogen

to fibrin, while as A was not. Thrombin-liked activities of thrombin solution from acetone and E precipitation were higher than PEG precipitation.

Cryoprecipitate, repeat cryoprecipitate and thrombin from E were prepared in lyophilized form to define an appropriate ratio of fibrinogen, thrombin, $CaCl_2$ and antifibrinolytic agent for fibrin glue. Their stability, adhesive strength and elasticity were studied. The results showed that the stability of fibrin glue from C and RC contained 7.5, 10.0 and 12.5 mg/ml EACA, and thrombin from E contained 40 mmol/l $CaCl_2$ in 2:1 ratio were more than 7 days. Their adhesive strength were more than 200 g/cm^2 and elasticity were more than 5 mm. Fibrinogen concentration in fibrinogen solution prepared by this present study and cryoprecipitate prepared by Thai Red Cross Society were not statistically different ($p>0.05$). The fibrinogen concentration in fibrinogen solution from RC was higher than the others. The stability and elasticity of fibrin glue prepared by Thai Red Cross Society were also the same as our preparation except adhesive strength was less than 200 g/cm^2.

This novel fibrin glue preparation method has a high fibrinogen concentration and high quality, and thrombin preparation is simple. It could be prepared in all routine hospital laboratories and low cost. This preparation method should be studied further for sterility, toxicity and clinical trial.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การพัฒนาวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมกาวไฟบรินในห้องปฏิบัติการประจำวัน

ชื่อผู้เขียน นางสาวณัฐจีรา อินต๊ะใส

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

อาจารย์ประสิทธิ์ ชนะรัตน์	ประธานกรรมการ
ศ. ปัญจะ กุลพงษ์	กรรมการ
รศ. เดชา ร่มไทรย์	กรรมการ

บทคัดย่อ

กาวไฟบรินเป็นผลิตภัณฑ์ของเลือดที่ใช้ในการห้ามเลือดเฉพาะที่ ประกอบด้วยส่วนประกอบหลัก 4 ชนิด คือ ไฟบริโนเจน ธรอมบิน แคลเซียมคลอไรด์ และ antifibrinolytic agent ปัญหาที่พบในการเตรียมกาวไฟบรินโดยทั่วไปคือ ปริมาณไฟบริโนเจนที่เตรียมได้ค่อนข้างน้อย ใช้เวลาในการเตรียมนาน ต้องใช้อุปกรณ์พิเศษอื่นๆ รวมทั้งอัตราส่วนของไฟบริโนเจน ธรอมบิน แคลเซียมคลอไรด์ และ antifibrinolytic agent ที่ใช้ยังไม่เหมาะสม จึงได้ทำการศึกษาและพัฒนาวิธีการเตรียมไฟบริโนเจนเพื่อให้ได้ปริมาณมาก มีคุณภาพดี มีสารรบกวนน้อย วิธีเตรียมง่าย สามารถทำได้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป รายงานนี้ได้เตรียมไฟบริโนเจนจาก CPD-plasma 10 วิธี คือ (1) cryoprecipitate (C), (2) repeat cryoprecipitate (RC), (3) ตกตะกอนด้วย saturated ammonium sulfate (A), (4) ตกตะกอนด้วย saturated ammonium sulfate และตามด้วย cryoprecipitate (AC), (5) ตกตะกอนด้วย absolute ethanol (E), (6) ตกตะกอนด้วย absolute ethanol และตามด้วย cryoprecipitate (EC), (7) ตกตะกอนด้วย 10% ethanol (10E), (8) ตกตะกอนด้วย 10% ethanol และตามด้วย cryoprecipitate (10EC), (9) ตกตะกอนด้วย polyethylene glycol (PEG) และ (10) ตกตะกอนด้วย polyethylene glycol และตามด้วย cryoprecipitate (PEGC) พบว่าตะกอนที่ได้จากการตกตะกอนด้วย PEG และ PEGC ไม่ละลายในน้ำส่วนบนที่เหลือไว้เพื่อละลายตะกอน และตะกอนที่ได้จากการตกตะกอนด้วย 10E และ 10EC ไม่ละลายหลังจากที่เก็บไว้ที่ –20 °ซ ส่วนวิธีอื่นๆ นั้นตะกอนสามารถละลายได้ดี การตรวจวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Biuret พบว่าปริมาณ

โปรตีนในสารละลายไฟบริโนเจนที่เตรียมได้ตามวิธีต่าง ๆ ไม่มีความแตกต่างกัน ($p>0.05$) ปริมาณอัลบูมินมีความแตกต่างกัน ($p<0.05$) โดยมีค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานในหน่วยกรัม/ดล. จากมากที่สุดถึงน้อยที่สุดในสารละลายไฟบริโนเจนที่ตกตะกอนด้วย C เท่ากับ 4.5 ± 0.8 (n=12), RC เท่ากับ 4.4 ± 0.8 (n=13), AC เท่ากับ 4.4 ± 0.7 (n=13), A เท่ากับ 4.0 ± 0.6 (n=13), EC เท่ากับ 3.6 ± 1.2 (n=8), และ E เท่ากับ 3.2 ± 0.6 (n=9) ปริมาณไฟบริโนเจนที่วัดโดยวิธี modified thrombin time มีความแตกต่างกัน ($p<0.05$) โดยมีค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานในหน่วย มก./ดล. จากมากที่สุดถึงน้อยที่สุดในสารละลายไฟบริโนเจนที่ตกตะกอนด้วย AC เท่ากับ $1,452.7 \pm 515.0$ (n=15), A เท่ากับ $1,373.0 \pm 468.5$ (n=15), RC เท่ากับ $1,251.3 \pm 508.5$ (n=15), E เท่ากับ 825.3 ± 209.8 (n=10), C เท่ากับ 735.2 ± 325.8 (n=15) และ EC เท่ากับ 554.8 ± 254.2 (n=7) และวัดโดยวิธีของ Ratnoff มีความแตกต่างกัน ($p<0.05$) โดยมีค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานในหน่วย มก./ดล. จากมากที่สุดถึงน้อยที่สุดในสารละลายไฟบริโนเจนที่ตกตะกอนด้วย RC เท่ากับ $1,160.3 \pm 456.5$ (n=10), AC เท่ากับ 963.6 ± 218.2 (n=10), C เท่ากับ 856.5 ± 411.8 (n=10) และ A เท่ากับ 706.6 ± 259.4 (n=10) คุณภาพของไฟบริโนเจนที่ได้จากการตกตะกอนแต่ละวิธีไม่มีความแตกต่างกัน ($p>0.05$) ปริมาณและคุณภาพของ factor XIII ในการตกตะกอนด้วย C และ RC เพียงพอที่จะคงสภาพไฟบรินได้

รายงานนี้ได้ศึกษาวิธีการเตรียมธรอมบินโดยตกตะกอนด้วย E, A และ PEG จากนั้นเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับการตกตะกอนด้วย acetone ซึ่งเป็นวิธีเดิมโดยวิธี thrombin time พบว่าสารละลายธรอมบินที่ได้จากการตกตะกอนด้วย acetone, E และ PEG มีประสิทธิภาพคล้ายธรอมบิน (thrombin-liked activity) กล่าวคือสามารถเปลี่ยนไฟบริโนเจนให้เป็นไฟบรินได้ ในขณะที่สารละลายธรอมบินที่ได้จากการตกตะกอนด้วย A ไม่สามารถทำได้ ประสิทธิภาพของสารละลายธรอมบินจากการตกตะกอนด้วย acetone และ E สูงกว่าการตกตะกอนด้วย PEG

รายงานนี้ได้เลือกเอาวิธีเตรียมไฟบริโนเจนด้วย C และ RC และตกตะกอนธรอมบินด้วย E มาเตรียมในรูปผงแห้ง (lyophilized) โดยใช้ตัวอย่าง 3, 3 และ 4 รายตามลำดับ เพื่อใช้ในการศึกษาอัตราส่วนของไฟบริโนเจน ธรอมบิน แคลเซียมคลอไรด์ และ antifibrinolytic agent ที่เหมาะสมเพื่อการเตรียมกาวไฟบริน โดยพิจารณาจากความคงทน (stability), adhesive strength และความยืดหยุ่น (elasticity) พบว่าอัตราส่วนของสารละลายไฟบริโนเจนจาก C และ RC ที่มีความเข้มข้นของ EACA 7.5, 10.0 และ 12.5 มก./มล. และสารละลายธรอมบินจากการตกตะกอนด้วย E ที่เตรียมโดยการแช่เข็งแบบช้า (slow freeze) และแบบเร็ว (quick freeze) ที่มีความเข้มข้นของ $CaCl_2$ 40 มิลลิโมล/ลิตร ที่ 2:1 มีความคงทนนานกว่า 7 วัน มีความยืดหยุ่นมากกว่า 5 มม. และมี adhesive strength มากกว่า 200 กรัม/ซม.^{2} ความเข้มข้นไฟบริโนเจนของวิธีที่แนะนำในการศึกษาครั้งนี้ที่วัดโดยวิธี modified

thrombin time และวิธีของ Ratnoff ใกล้เคียงกับกาวไฟบรินที่เตรียมโดยสภากาชาดไทย และยังพบว่าวิธี RC มีความเข้มข้นสูงกว่า กาวไฟบรินที่เตรียมโดยสภากาชาดไทยมีความคงทนนานกว่า 7 วัน และมีความยืดหยุ่นมากกว่า 5 มม. แต่มี adhesive strength น้อยกว่า 200 กรัม/ซม.^{2}

ดังนั้นการเตรียมกาวไฟบรินโดยวิธีที่ได้พัฒนาขึ้นนี้ได้ไฟบริโนเจนปริมาณมาก มีคุณภาพดี สามารถเตรียมได้ง่าย วิธีการเตรียมธรอมบินสามารถเตรียมได้ง่ายในห้องปฏิบัติการโรงพยาบาลทั่ว ๆ ไปและเสียค่าใช้จ่ายน้อย ซึ่งควรมีการศึกษาในด้านความปลอดเชื้อ ความเป็นพิษและศึกษาในทางคลินิกต่อไป

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University