

혈액응고인자 XIII 측정 키트의 평가

강원대학교 의과대학 ¹진단검사의학교실, ²의과학연구소, ³대한임상의학 IT센터,
⁴경원대학교 가천 바이오테크 연구원

유숙원^{1,2,3} · 안성수⁴ · 서인범^{1,2,3}

Evaluation of a Blood Coagulation Factor XIII Assay Kit

Sookwon Ryu, M.D.^{1,2,3}, Seong Soo An, Ph.D.⁴ and In Bum Suh, M.D.^{1,2,3}

¹Department of Laboratory Medicine, ²Institute of Medical Science, ³KCMIT Center, Kangwon National University College of Medicine, Chuncheon,
⁴Gachon Bionano Research Institute, Kyungwon University, Seongnam, Korea

Background: Plasma coagulation factor XIII (FXIII) catalyzes the formation of covalent bonds between fibrin monomers, thus stabilizing the fibrin clot and increasing its resistance to fibrinolysis. Alteration of FXIII may contribute to bleeding, wound dehiscence and recurrent abortion. However, standard clotting tests cannot detect the FXIII deficiency. In this study, we evaluated a newly developed FXIII test kit (Coalink™, PeopleBio Inc., Seoul, Korea) in patients with various clinical conditions.

Methods: We evaluated the linearity and precision of the new FXIII test kit and compared the results of the new kit and the Pefakit FXIII assay. The FXIII was tested in idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) (n=40) patients, chronic renal failure (CRF) (n=20) patients, liver cirrhosis (LC) (n=40) patients, EDTA-induced pseudothrombocytopenia (EDTAIP) (n=10) patients, and in normal healthy persons (n=50). In the normal healthy persons, we determined a complete blood count (CBC), Ed-highlight-the second (n=50) is redundant. prothrombin time (PT) measurement and activated partial prothrombin time (aPTT) measurement and evaluated the results using the two assays.

Results: Serial dilution experiments with five samples provided good linearity ($r^2=0.9717$). The intra- and inter assay precisions (CV) were 2.3~8.6% and 3.9~14.9%, respectively (n=20). There was a significant correlation between the use of the new kit and the Pefakit FXIII assay ($r=0.8798$, n=50). The FXIII activities of the normal healthy persons, ITP, CRF, LC and EDTAIP patients were $103.3\pm23.3\%$, $79.7\pm41.0\%$, $117.9\pm82.3\%$, $56.9\pm23.7\%$ and $130.0\pm29.0\%$, respectively and they were significantly decreased in the ITP and LC patients ($P<0.05$). The rates below 80% of the FXIII level were 67.5% in the ITP patients, 90.0% in the LC patients, 35.0% in the CRF patients and 0.0% in the EDTAIP patients. FXIII activities were closely related to platelet count ($r=0.832$, $P<0.05$) and negatively correlated with PT ($r=-0.389$, $P<0.05$) and aPTT ($r=-0.326$, $P<0.05$).

Conclusion: The new kit was determined to have good linearity and precision. Moreover, it was simple and rapid to perform. This method may prove useful for the evaluation of FXIII. (*Korean J Hematol* 2007;42:216-223.)

Key Words: Coagulation factor, Factor XIII (FXIII), FXIII assay kit, Evaluation

접수 : 2007년 6월 12일, 수정 : 2007년 9월 3일

승인 : 2007년 9월 6일

교신저자 : 서인범, 춘천시 효자동

© 200-947, 강원대학교병원 진단검사의학과

Tel: 033-258-2446, Fax: 033-242-1329

E-mail: bloodmd@kangwon.ac.kr

Correspondence to : In Bum Suh, M.D.

Department of Laboratory Medicine, Kangwon National University Hospital

17-1, Hyoja 3-dong, Chuncheon 200-947, Korea

Tel: +82-33-258-2446, Fax: +82-33-242-1329

E-mail: bloodmd@kangwon.ac.kr

서 론

혈액응고인자 13(factor XIII; 이하 FXIII)은 transglutaminase의 일종으로 혈액응고과정의 마지막 단계에서 thrombin에 의해 활성화되어 섬유소 단량체의 γ 와 α chain에서 Lys과 Gln 잔기 사이에 공유 교차 결합(covalent cross-linking)을 형성한다. 또한 alpha-2-antiplasmin과 thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI)와의 교차결합 등에 중요한 역할을 하여 형성된 응혈(blood clot)을 plasmin에 대해 저항할 수 있게 하여 응혈을 안정화 시키는 역할을 하므로 fibrin stabilizing factor라고 불린다.^{1,2)}

FXIII의 선천적 결핍은 5만명 당 1명정도가 이환되고 드물지만 출혈경향이 심하며, 후천적인 결핍은 간질환(liver disease), 궤양성 대장염(ulcerative colitis), Valporate 치료 후, 미란성위염(erosive gastritis), 파종혈관내응고(disseminated intravascular coagulation) 및 백혈병 등 다양한 임상양상에서 관찰된다.³⁾ 출혈경향을 보이는 경우, 출혈예방의 목적으로 혈관 내 FXIII의 주입이 효과적으로 시행되며,⁴⁾ 그 외 궤양성대장염, 다낭신장질환(polycystic kidney disease)에서도 FXIII의 주입이 질환 치료의 가능성을 보여주고 있다는 보고도 있다.^{5,6)} 또한 FXIII 유전자의 Val34Leu 변이가 있는 경우 심근경색, 뇌경색, 혈관혈전증에 방어 효과가 있으며, 뇌출혈은 증가시킨다는 보고가 있어 FXIII과 혈관질환과의 관련성 연구가 증가되고 있다.⁷⁻¹¹⁾ 이에 FXIII 결핍의 진단, 치료 효과 추적 및 다른 질환과의 연관성 연구 등에 정확한 FXIII의 측정이 필수적이지만 통상 사용하는 혈액응고검사인 prothrombin time (PT)이나 activated partial thromboplastin time (aPTT)은 FXIII이 결핍되더라도 정상결과를 보이기 때문에 임상적으로 간과되는 경우가 많다.

FXIII 측정법에는 기존의 섬유소 응괴 용해시간(fibrin clot solubility, clot lysis time)을 측정하는 방법이 있는데 초기 섬유소의 농도에 영향을 많이 받으며,¹²⁾ 암모니아 생성을 측정하는 방법으로 아민(amines)기를 혼입시켜 방사선, 형광 또는 면역학적으로 측정하는 방법이 있으나 측정시간, 정확도 및 민감도 등에서 문제점이 발견되었다.¹³⁻¹⁸⁾ 현재 상용화되어 있는 키트는 photometric assay를 이용하는 Dade사(beringwerke, Marburg, Germany)의 Berichrom[®]과 biotin incorporation assay를 이용하는 PentaPharm사(Basel, Switzerland)의 PefaKit[®]가 있으나, Dade사의 Berichrom은

ammonia를 검출해야 하므로 고가의 장비가 필요하고 Val34Leu의 변이가 있는 경우 부정확하며, PentaPharm사의 PefaKit는 비교적 정확하게 측정된다고 보고 되고 있으나, 검사자가 기질을 직접 플레이트에 부착시켜야 하므로 시간이 오래 걸리고 검사자에 따른 차이로 재현성이 떨어질 수 있다.¹⁹⁾

본 연구에서는 casein을 기질로 이용하여 2시간 이내에 측정이 가능하며 상대적으로 성능이 좋고 다른 물질에 의한 간섭이 적으며, 측정하기 쉬운 표준화된 FXIII 검사 키트(Coalink[™] FXIII incorporation assay kit, PeopleBio Inc., Seoul, Korea)를 이용하여 이의 유용성을 기존의 측정법과 비교하여 검증하고자 하였다. 또한 다양한 임상 환자를 대상으로 FXIII을 측정하여 임상적 유용성을 알아보하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 검체

정상인 및 환자의 sodium citrate혈장을 이용하였다. 검체는 환자를 정맥 천자하여 0.13M trisodium citrate가 들어있는 tube에 채취하여 4°C 2,000g으로 15분간 원심분리한 혈장을 -80°C 냉동고에 보관한 후 이용하였다.

2. Factor XIII 측정법

1) Factor XIII 측정법의 원리

FXIII과 FXIIIa의 활성도(activity)를 검사하기 위해 transglutaminase를 측정한다. 트롬빈(thrombin)에 의해 활성화된 FXIIIa가 검체에 있는 경우 플레이트에 부착된 FXIIIa 특이 기질인 카세인과 반응한다. 다음으로 HRP (horse radish peroxidase)-conjugated FXIII이 captured된 FXIIIa에 다시 결합되고 fibrinogen-HRP에 결합시켜 발색반응을 450nm 에서 흡광도를 측정한다 (Fig. 1).

2) FXIII 측정 키트

FXIII Assays 키트는 카세인을 96well플레이트(medisorp[®], Nunc, Denmark)에 tween80과 carbonate buffer로 고정하였다. 비특이적 결합을 방지하기 위하여 blocking agent를 첨가하고 fibrinogen-HRP complex를 부착하였다.

3. Factor XIII의 측정

1) 검체 준비 및 분주

혈장 10 μ L를 검체 희석액 190 μ L에 희석한 후, 이

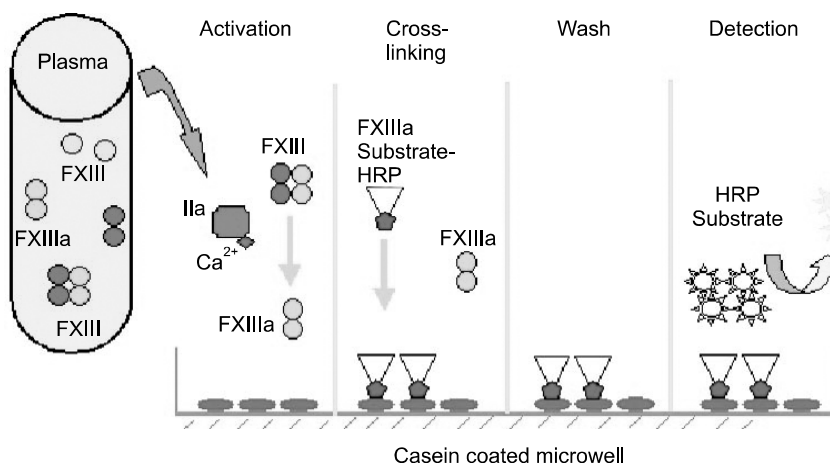


Fig. 1. Quantitative measurement of FXIII and FXIIIa activities in clinical sample by using the transglutaminase activity. The mechanism is based on the cross-linking the HRP conjugated FXIII fibrinogen complex to casein coated plate by thrombin activated FXIIIa, which is in the clinical sample. The cross-linked HRP is detected with HRP chromogenic substrate.

중 20 μ L를 well에 분주하고, 검체 완충액 80 μ L를 첨가하여 총 100 μ L가 되게 하였다.

2) 표준 곡선(standard curve)

표준액(standard solution)은 FXIII이 측정된 혈장을 혼합(pooling)하여 Dade사(behringwerke, Marburg, Germany)의 Berichrom[®]과 PentaPharm사(Basel, Switzerland)의 PefaKit[®]에 들어있는 표준액과 비교해서 농축하여 제작하였다. 1~6번째 well에 검체 희석액을 50 μ L씩 분주하고 첫 번째 well에 표준액(standard solution) 50 μ L를 넣은 후, 5번째 well까지 배수 희석한 후, 검체 완충액 50 μ L를 첨가하였다.

3) FXIII 측정

검체와 표준액이 포함되어 있는 각각의 well에 casein-HRP 결합액을 50 μ L를 분주하여 혼합한 후, thrombin cofactor를 50 μ L를 각각 분주하고 37°C에서 20분간 배양하여 FXIII을 활성화 시켰다. 이 well에 FXIII 반응정지액 100 μ L를 첨가하여 다시 20분간 실온에 방치하여 활성화 반응을 정지 시키고 세척액 250 μ L로 세척한 후, TMB 100 μ L를 첨가하여 5분간 실온에 방치하여 파란색으로 발색 시킨 후, 0.5N의 H₂SO₄ 50 μ L를 첨가하여 발색 반응을 정지 시킨 후 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 반응 및 흡광도 측정은 자동 면역분석기인 CODA automated processor (Bio-Rad laboratories, Hercules, California, USA)를 이용하였다.

4. FXIII 측정법의 검증

1) 정밀도(precision) 평가

표준액 및 환자 검체를 이용하여 고, 중 저역가의 검체를 만들었고 이를 각 검체 당 20회씩 새로 개발된 FXIII 측정 키트로 측정하여 coefficient of variation (CV)을 구하였다. 검사 내(within run) 및 검사 간

(between run) 정밀도를 각각 측정하였다.

2) 직선성(linearity) 평가

FXIII 측정의 직선성을 평가하기 위해 FXIII 표준액(200%) 및 고농도의 FXIII 검체를 희석하여 5검체를 만들었고 새로 개발된 FXIII 측정 키트와 기존의 Pefakit로 각각 2회씩 측정하여 평균값을 구하고 이의 직선성을 평가하였다.

3) 상관성(correlation) 비교

정상과 비정상 결과가 고루 포함되도록 50검체를 선별하여(range 30~200%) 새로 개발된 키트와 기존의 Pefakit를 이용하여 FXIII을 동시에 측정하여 비교하였다.

5. 각 질환군에서 Factor XIII 측정

다양한 임상환자군에서의 FXIII 값을 측정, 비교하기 위해 정상인 50명과 특발성혈소판감소성자반증(Idiopathic Thrombocytopenic Purpura), 만성신부전증(Chronic Renal Failure), 간경화증(Liver Cirrhosis) 및 EDTA유발가혈소판감소증(EDTA induced Pseudothrombocytopenia)으로 진단된 환자 각각 40, 20, 40, 10 명을 대상으로 새로 개발된 키트로 FXIII 값을 측정하였다. 정상 대조군에서는 EDTA 전혈에서 자동혈액분석기(XE-2100, Sysmex, Japan)를 이용하여 혈소판수를, sodium citrate 혈장으로 자동응고기기 ACL-9000 (Instrumental Laboratory, Lexington, USA)를 이용하여 PT (prothrombin time) 및 aPTT (activated partial thromboplastin time)를 측정하여 FXIII과의 관계를 분석하였다.

6. 통계처리

키트별 FXIII 값 간의 상관성 및 상관계수는 Pearson's coefficient를, 정상군과 질환군의 FXIII 값의 비교

는 Mann-Whitney U test를, 정상군에서 FXIII과 다른 검사와의 관계는 Spearman's rank correlation을 이용하였다. 유의수준은 $P < 0.05$ 로 하였으며 통계패키지는 SPSS 12.0 KO for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 사용하였다.

결 과

1. FXIII 측정법

FXIII에 대한 민감도 및 특이도가 높은 casein을 이용하여 플레이트에 부착하고 HRP complex에 부착시켜 TMB를 이용한 발색반응으로 측정하는 방법을 표준화하여 완성하였다. 완성된 FXIII 측정 키트는 미량($10\mu\text{L}$)의 검체로 측정이 가능하고, 100배까지 희석하여 측정함으로써 다른 물질에 의한 간섭을 줄일 수 있으며, 자동 면역분석기를 이용하여 측정함으로써 조작이 간편하고 2시간 이내에 측정이 가능한 것이 특징이다.

2. FXIII 측정법의 검증

1) 정밀도(precision) 평가

새로 개발된 FXIII 측정키트의 정밀도를 평가한 결과

Table 1. Precisions of new method using diluents of FXIII standard control plasma

| Expected (%) | Within run | | Between run | |
|--------------|-----------------|-----|-----------------|------|
| | Mean \pm SD | CV | Mean \pm SD | CV |
| 50 | 51.4 \pm 4.4 | 8.6 | 48.3 \pm 7.2 | 14.9 |
| 100 | 101.2 \pm 3.2 | 3.2 | 98.1 \pm 6.5 | 6.7 |
| 200 | 200.9 \pm 4.6 | 2.3 | 200.9 \pm 5.7 | 2.8 |

검사 내(within run) 변이계수(CV)는 2.30~8.58%였고, 검사 간(between run) 변이계수는 2.84~14.88%로 모두 양호한 결과를 얻었다(Table 1).

2) 직선성(linearity) 평가

5개의 검체로 FXIII 측정의 직선성을 평가한 결과 0~200% 구간에서 기존의 Pefakit 및 새로 개발된 키트에서 각각 $r^2=0.9948$ 및 $r^2=0.9717$ 로 우수한 결과를 얻었다(Fig. 2).

3) 상관성(correlation) 비교

50개의 임상 검체로 새로 개발된 키트와 기존의 Pefakit를 이용하여 FXIII을 동시에 측정하여 비교한 결과, 상관계수(r)는 0.8798로 양호한 결과를 얻었다(Fig. 3).

3. 각 질환군에서 FXIII 측정

정상대조군, 특발성혈소판감소성자반증(Idiopathic

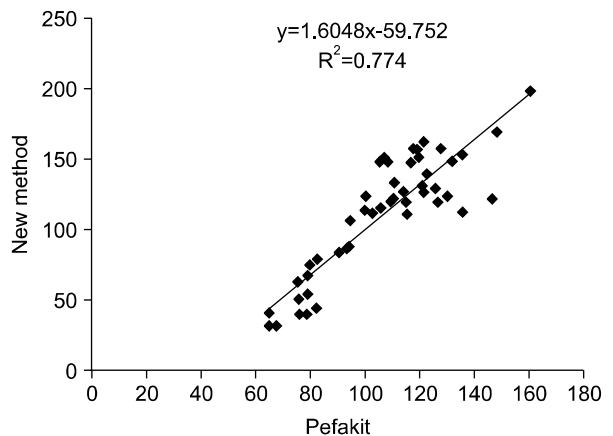


Fig. 3. Correlation of FXIII values between Pefakit and new method (n=50).

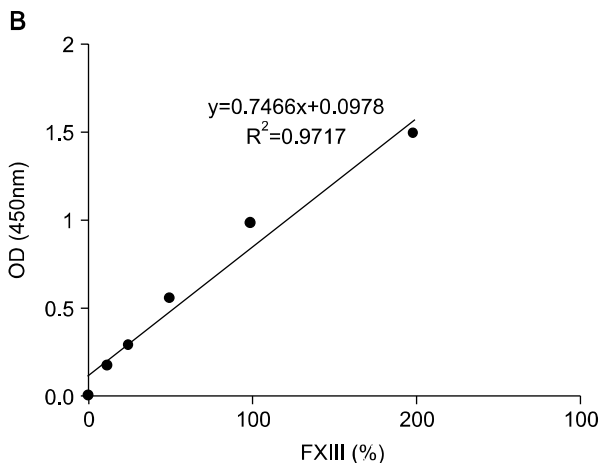
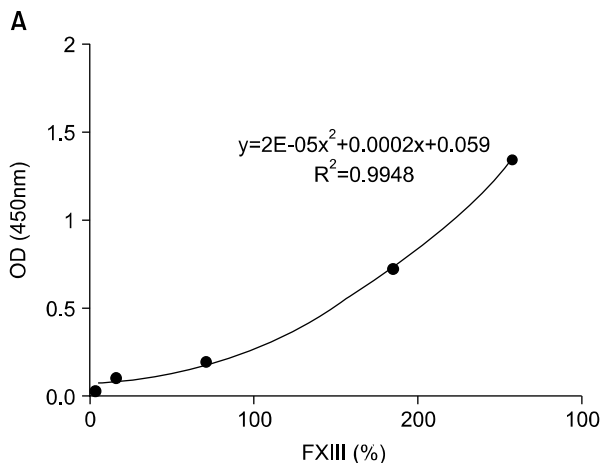


Fig. 2. Linearity of FXIII measurement by Pefakit (A) and new method (B).

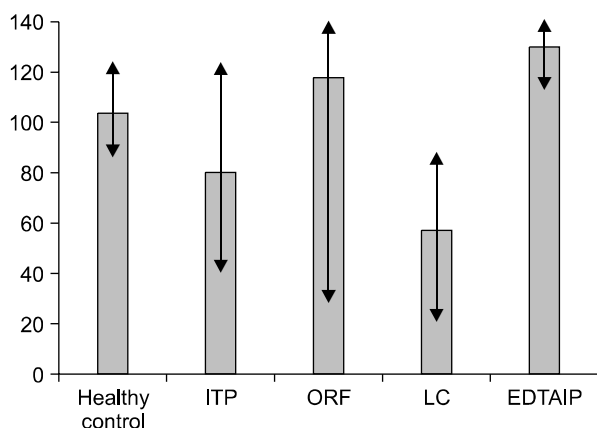


Fig. 4. Factor XIII level in patients with healthy control (n=50), Idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP, n=40), Chronic renal failure (CRF, n=20), Liver cirrhosis (LC, n=40), EDTA induced pseudothrombocytopenia (EDTAIP, n=10).

Thrombocytopenic Purpura, ITP) 만성신부전증(Chronic Renal Failure, CRF), 간경화증(Liver Cirrhosis, LC) 및 EDTA유발가혈소판감소증(EDTA induced pseudothrombocytopenia, EDTAIP)으로 진단된 환자 각각 50, 40, 20, 40, 10 명을 대상으로 FXIII을 측정 한 결과, 각각 $103.3 \pm 23.3\%$, $79.7 \pm 41.0\%$, $117.9 \pm 82.3\%$, $56.9 \pm 23.7\%$ 및 $130.0 \pm 29.0\%$ 를 보였으며, 이 중 ITP 및 LC환자군은 정상인군에 비해 통계적으로 유의하게 FXIII 값이 낮았다($P < 0.05$). FXIII 값이 80% 이하로 감소된 환자의 수의 비율은 ITP, CRF, LC 및 EDTAIP에서 각각 67.5%, 35.0%, 90.0%, 0.0%였다(Fig. 4).

정상군에서 측정된 FXIII값과 혈소판 수치와의 관계를 분석한 결과, 상관계수(r)는 0.832로 높았으며($P < 0.05$) FXIII과 PT와의 관계는 $r = -0.389$ ($P < 0.05$), aPTT와 $r = -0.326$ ($P < 0.05$)으로 모두 음성적 상관관계를 보였다.

고 찰

혈장내 XIII 응고인자(factor XIII, FXIII)는 82.2kd인 A 소단위 2개와 79.7kd인 B 소단위 2개가 비공유결합에 의해 구성된 325.8kd의 이합체로서 A 소단위는 혈소판, 간, 단핵구, 거핵구 등에서 생성되고 B 소단위는 간에서 생성된다. 이 중 A 소단위가 효소의 활성화되는 부분을 가지며 B 소단위는 혈장 내의 유리 A 소단위와 결합하여 A 소단위를 안정화 시키고 있다가 활성화되면 분리된다.¹⁾ 전체 순환하는 FXIIIa의 50% 정도가 혈장 내에 존재하며 나머지 50%는 혈구 세포에 포함된

것으로 보고되고 있는데 단핵구 및 혈소판의 세포질은 FXIII을 갖고 있으며 대부분 A소단위로 이루어져 있고 혈장 내의 FXIII과 생화학적, 기능적 및 면역학적으로 유사한 것으로 알려져 있다.¹⁾ 일부에서는 조혈과정(hemopoiesis)도 FXIII의 생성과 관여되어 있다고 보고되나 실제 정확한 FXIIIa의 유래 및 분포는 정확하지 않다.¹⁾ 혈액응고과정의 최종단계에서 섬유소원은 트롬빈에 의해서 fibrinopeptide들이 유리된 후 중합체화되기 시작할 때 트롬빈과 섬유소 복합체를 형성하는데 이복합체가 FXIII을 활성화XIII응고인자(FXIIIa)로 변환시킨다.¹⁾ FXIIIa는 주로 fibrin γ chain, α chain 간에 lysine side chain과 glutamine side chain 사이에 탈 암모니아의 isopeptide 결합(cross-linking)을 일으켜 견고한 섬유소 응괴를 형성시키고 $\alpha 2$ -antiplasmin 및 fibronectin 이 섬유소의 α -chain과 공유 결합을 형성하는 데 촉매역할을 하여 섬유소분해(fibrinolysis)에 저항을 떨 수 있게 한다.^{1,2)} 이 중 $\alpha 2$ -antiplasmin은 플라스민(plasmin)의 생리학적 억제제이며 fibronectin은 세포표면 부착에 관여하는 단백질로 섬유소 응괴가 혈관에 부착되는 것, 상처치유 및 조직 재생에 관여한다. FXIII은 대부분의 혈액응고인자들이 serine protease인 것과는 달리 transglutaminase이며 FXIII이 결핍되더라도 통상 사용하는 응고 검사는 정상인데 이는 FXIII의 이상이 응고시간을 지연시키는 것이 아니라 형성된 응괴의 질에 영향을 끼치기 때문이다. FXIII이 없는 경우에는 형성된 응괴는 불안정하며 섬유소분해에 매우 취약하게 된다.²⁾

혈전과 관련된 심근경색, 뇌경색, 혈관혈전증 등은 주 사망원인 중 하나이며, 이러한 혈전증은 S단백, C단백, V응고인자 변이, 항트롬빈 III 결핍 및 변이 등과 같이 유전적인 요인 및 수술, 임신, 흡연, 악성종양 등과 같은 환경적인 요인에 의해서 발생하는데, 혈전증에 의한 혈관의 폐색에서 FXIII과 관련된 섬유소의 교차결합은 주요 역할을 하는 것으로 알려져 있다.³⁾ 선천적 FXIII의 결핍은 심한 출혈경향을 보이고 상처 치유가 지연되며 반복적 유산 등의 임상 양상을 보인다.^{1,3)} 혈전증과 관련된 질환과 FXIII과의 관계에 대해 여러 연구가 보고 되고 있는데, FXIII 유전자의 exon2, codon 34의 G-T 변이로 인한 Val34Leu 변이가 있는 경우 응괴의 구조에 영향을 끼쳐 얇고 구멍이 작은 응괴를 만들어²⁰⁾ 심근경색증 등의 동맥 및 정맥혈전증에 대한 방어 효과를, 대뇌출혈 등 출혈질환에는 취약성을 보이는 것은 널리 알려져 있다.⁷⁻¹¹⁾ 그러나 FXIII의 유전적 다형성 및 혈중 level과 이들 질환과의 직접연

관성에 대하여는 아직까지도 논란이 있다. 이러한 논란의 원인으로 FXIII의 측정법이 표준화가 안 된 것도 원인 중 하나일 것으로 생각한다. 또한 FXIII의 혈전의 안정화 외의 역할은 아직까지 정확하게 알려져 있지 않으나 염증반응과 상처치유에도 연관되어 있어 활동성염증성장질환에서 FXIII이 감소되고⁵⁾ 심한 궤양성 대장염에서 장점막치유의 목적으로 주입되기도 하였다는 보고도 있다.²¹⁾

FXIII 측정법은 세 종류로 분류되는데 섬유소 응괴 용해시간(fibrin clot lysis time)을 측정하는 방법과 암모니아 생성을 측정하는 방법 및 아민기(amines)를 혼입시켜 방사선, 형광 또는 면역학적으로 측정하는 방법이 있다.¹²⁻¹⁸⁾ 섬유소 응괴 용해시간을 측정하는 방법은 사람의 섬유소원(fibrinogen)을 정제하여 3mM urea와 5mM의 CaCl_2 로 투석하여 오염된 XIII 응고인자를 불활성화 시키고 트롬빈을 첨가하여 섬유소원의 혈전 생성능을 증가시킨 후 섬유소응괴(fibrin clot)에 플라즈민을 첨가하여 37°C에서 1시간 배양한 후, 용해된 영역을 측정하는 것으로 반정량법이며 정확한 정량이 불가능하며 초기 검체의 섬유소원에 의해 검사결과에 큰 영향을 미치는 단점이 있다.¹²⁾

암모니아 생성을 측정하는 방법은 transglutaminase 반응의 첫 단계에서 생성되는 암모니아를 NAD(P)H-의존성-GluDH 지시반응을 이용하여 측정하는데, 측정시 섬유소를 제거하기 위한 흡수단계가 필요 없어 측정시간을 줄일 수 있고 글루타민(glutamine) 기질을 이용함으로써 표준화가 쉬워졌으나, FXIII 결핍 환자에서 비정상적으로 높게 측정되는 단점이 있다. 최근 개발된 Dade사의 Berichrom 역시 암모니아를 검출해야 하므로 비싼 장비가 필요하고 Val34Leu의 변이가 있는 경우 부정확하게 측정된다고 알려져 있다.¹³⁻¹⁴⁾

아민기(amines)를 혼입시켜 측정하는 방법은 방사선, 형광 또는 바이오틴(biotin)과 결합된 아민기질을 FXIIIa에 부착하여 결합시키고, 결합형과 유리형 아민을 분리하여 결합된 아민을 측정하는 방법인데 일반적으로 예민도가 높으나 측정시간이 오래 걸리며, 재현성이 적고, 표준화가 어렵다.¹⁵⁻¹⁸⁾ 최근 개발된 Penta-Pharm사의 PefaKit의 경우 비교적 정확하게 측정된다고 보고되고 있으나, 기질의 불안정성 때문에 측정 키트에 기질이 microtiter plate에 부착되어 있는 것이 아니라 연구자가 직접 부착시켜야 하므로 측정시간이 최소한 15시간 이상 걸리며, 재현성이 낮은 단점이 있다.¹⁹⁾

본 연구에서는 측정이 간편하고 신속하며 정확한

FXIII 측정 방법을 개발하기 위해 FXIII에 대한 여러 가지 후보 기질을 탐색하여 특이한 기질인 casein을 찾아냈고 이것을 이용하여 플레이트에 흡착시키고 fibrinogen-HRP complex와 결합시켜 발색반응으로 functional FXIII과 FXIIIa를 측정할 수 있는 FXIII 측정용 키트를 표준화하여 완성하였다. 완성된 FXIII 측정 키트의 정밀도는 검사 내 및 검사 간 변이계수는, 각각 2.3~8.6% 및 2.8~14.9%로 모두 양호하였고(Table 1) 직선성 평가에서는 기존의 Pefakit의 상관계수($r^2=0.9948$)가 본 측정법($r^2=0.9717$)에 비해 약간 높았으나 큰 차이는 보이지 않았다. 이와 같이 기존 Pefakit에 비해 본 측정용 키트는 정밀도 및 재현성이 우수하였고, 직선성에서는 차이를 보이지 않았는데 이것은 본 측정 방법에서 이용한 casein이 상대적으로 안정하고, FXIIIa에 대해 더 특이하기 때문이라 생각된다. 임상 검체를 대상으로 한 상관성 검사를 위해서는 적어도 두 가지 이상의 측정 방법과 비교해야 하지만 섬유소 응괴 용해시간을 측정하는 방법의 경우, 반 정량적 검사라 비교하기가 어렵고, 암모니아를 측정하는 방법은 고가의 장비가 필요하여 본 연구에서는 비교적 가장 정확하다고 알려져 있는 Pefakit를 이용하여 상관계수(r^2)를 측정한 결과 0.7740으로 비교적 양호한 결과를 얻었다. 더욱 정확한 검증을 위해서는 추후 다른 검사방법과의 비교, 분석 및 실제로 값이 완전히 결핍되어 있는 환자에서 분석도 필요할 것으로 생각한다.

본 연구에서는 혈소판의 변화를 보이는 ITP, CRF, LC, EDTAIP (EDTA induced pseudothrombocytopenia) 환자에서 FXIII을 측정하여 FXIII과의 관련성을 찾아내고자 하였다. 이들의 FXIII을 측정한 결과, LC 및 ITP 환자군에서도 유의하게 FXIII이 감소됨을 볼 수 있었는데 이는 만성간질환자에서 FXIII을 측정한 다른 보고와 일치하였다.²²⁾ 하지만 CRF 환자에서는 증가하는 양상을 보여 DIC 환자에서 FXIII을 측정한 다른 연구와는 반대의 결과를 보였는데²³⁾ 이에 대한 원인으로 기존의 연구가 DIC라는 혈액응고과정이 소모되는 질환에서의 신장의 기능이상 유무를 본 데 반하여 본 연구에서는 단순히 만성신부전에서 FXIII을 정상군과 비교한 것에서 차이를 찾을 수 있을 것이다. 추후 신장기능 이상환자에서의 연구가 더 필요하리라 생각한다. 정상인에서 혈소판수치와 FXIII과의 관계를 분석한 결과 높은 상관계수를 보이고 PT, aPTT와는 음성적 상관관계를 보인 것은, 기존의 보고와 일치하나 이들은 질환군에서의 관계를 비교한 반면 본 연구는 정상군에서 FXIII과 다른 검사와의 결과를 본 것이므로

의의가 있다고 생각한다.^{22,23)} 혈소판결핍혈장(Platelet Poor Plasma)에서 FXIII 값을 측정하였는데도 불구하고 FXIII과 혈소판이 밀접한 관계를 보이는 것은 혈소판에서 활성화되는 FXIII이 혈장에 영향을 끼친 것으로 생각되며 간경화증 환자에서는 FXIII이 간에서 합성되므로 합성 장애 또한 원인이었을 것이다. 혈장 내 FXIII의 유래에 대하여는 아직까지 정확히 밝혀진 바는 없지만 주로 혈소판에서 생성되는 FXIII의 세포성분이 혈장 내 FXIII에 영향을 끼친다고 알려져 있다. 최근 다른 연구결과 자가조혈모세포이식을 받은 환자에서 혈장의 FXIII과 혈소판수치가 밀접한 상관관계를 보였으며($r=0.51$) 혈소판수치가 떨어짐에 따라 FXIII도 같이 감소하는 양상을 보였다. 그러나 nadir에 빠진 환자에게 혈소판을 수혈한 후에도 FXIII은 바로 증가하지 않는 결과를 보였는데 이는 혈장 FXIII의 근원에는 혈소판 외에 조직의 단핵구 등이 관여하는 것으로 보여지며 조혈계의 생성이 감소되면 오히려 간 등에서의 합성은 증가하는 양상도 보여준다고 하였다.²⁴⁾ 일반적으로 FXIII 측정 시 혈소판에 의한 영향을 줄이기 위해 2,000g에서 10분 이상 원심 분리한 혈장을 사용하도록 되어 있으며 본 연구에서도 혈소판수에 FXIII 값이 영향을 받는 양상을 관찰할 수 있었다. 혈소판수에 따라 FXIII 값이 영향을 받는 것에 대하여는 추후 검체 내의 혈소판 수에 따른 FXIII 값의 보정에 대한 추가적인 연구가 필요하다고 생각한다. 특이한 것은 EDTA유발가혈소판감소증에서 통계적으로 유의하지는 않지만 FXIII이 증가하는 양상을 보였다. EDTA 유발가혈소판감소증은 EDTA에 의해 혈소판이 오히려 활성화되어 응집되나 이를 자동혈구계산기에서는 혈소판의 크기가 커지므로 혈소판으로 인지를 못하여 혈소판 감소증이 있는 것으로 나타나는 것이다. 본 연구에서 FXIII이 증가된 경향을 보인 것에 대한 원인을 추측해볼 때 FXIII과 혈소판 수와의 관계뿐 아니라 FXIII과 혈소판 활성화 시의 변화에 대하여 연구해 볼 필요성에 대해 생각해 보게 된다. 향후 이에 대하여 더 많은 검체로 다른 혈소판활성화 지표와의 관계를 포함하여 연구해 볼 필요가 있을 것이다. 이는 나아가 FXIII이 추후 혈소판의 수 및 기능을 평가할 수 있는 지표로 가능성을 열 수도 있을 것이라 생각한다. 결론적으로 본 연구에서는 측정이 용이하고 간편한 FXIII측정 키트를 개발, 검증하였으며 임상적 의의를 살펴보았다. 향후 이 키트를 이용한 정확한 FXIII의 측정을 통하여 임상 및 연구에 도움이 될 수 있으리라 생각한다.

요 약

배경: 혈액응고인자 13 (Factor XIII, FXIII)은 혈액응고에서 마지막 단계에서 섬유소와 공유결합을 이루어 형성된 응혈을 안정화 시킨다. FXIII의 이상은 출혈, 상처 치유의 지연, 반복적 유산 등과 관계가 있다. 그러나 통상 사용하는 혈액응고검사로 FXIII의 이상을 찾아낼 수 없다. 본 연구에서는 새로 개발된 FXIII 측정 키트를 검증하고 여러 임상양상에 따른 FXIII을 측정하고자 하였다.

방법: 새로 개발된 키트의 유용성 평가를 위해 직선성, 재현성을 측정하였으며 Pefakit (PentaPharm, Basel, Switzerland)와 상관성을 비교하였다. 각 임상양상에 따른 Factor XIII과의 관계를 보기 위해 정상대조군, 특발성혈소판감소성자반증, 만성신부전증, 간경화증 및 EDTA 유발가혈소판감소증 환자 각각 50, 40, 20, 40, 10명을 대상으로 factor XIII 값을 측정하였고 정상군에서 혈소판 수치와 PT, aPTT를 측정하여 factor XIII과의 관계를 분석하였다.

결과: 새로 개발된 키트는 직선성($r^2=0.9717$)과, 검사 내 정밀도(2.3~8.6%), 검사 간 정밀도(2.8~14.9%)가 우수하였으며 기존의 Pefakit와 상관관계가 높았다($r=0.8798$). 정상대조군, 특발성혈소판감소성자반증(Idiopathic Thrombocytopenic Purpura, ITP), 만성 신부전증(Chronic Renal Failure, CRF), 간경화증(Liver Cirrhosis, LC) 및 EDTA 유발가혈소판감소증(EDTA induced Pseudothrombocytopenia, EDTAIP)으로 진단된 환자에서 factor XIII 값은 각각 $103.3 \pm 23.3\%$, $79.7 \pm 41.0\%$, $117.9 \pm 82.3\%$, $56.9 \pm 23.7\%$ 및 $130.0 \pm 29.0\%$ 를 보였으며, FXIII이 80% 이하로 감소된 환자의 비율은 ITP, CRF, LC 및 EDTAIP에서 각각 67.5%, 35.0%, 90.0%, 0.0%였다. 정상군에서 혈소판 수치와 FXIII 값은 유의한 상관관계($r=0.8324$)를 보였으며 FXIII과 PT, aPTT와 각각 $r=-0.389$ ($P<0.05$), $r=-0.326$ ($P<0.05$)로 모두 음성적 상관관계를 보였다.

결론: 새로 개발한 FXIII 측정법은 좋은 직선성, 재현성 및 상관성을 보여주었고 사용이 간편하고 신속하였다. 향후 이 방법은 FXIII 측정 및 연구에 유용하리라 생각한다.

참 고 문 헌

- 1) Muszbek L, Yee VC, Hevessy Z. Blood coagulation

- factor XIII: structure and function. *Thromb Res* 1999;94:271-305.
- 2) Hevessy Z, Haramura G, Boda Z, Udvardy M, Muszbek L. Promotion of the crosslinking of fibrin and alpha 2-antiplasmin by platelets. *Thromb Haemost* 1996;75:161-7.
- 3) Anwar R, Miloszewski KJ. Factor XIII deficiency. *Br J Haematol* 1999;107:468-84.
- 4) Tassetto A, Castaman G, Rodeghiero F. Acquired plasma factor XIII deficiencies. *Haematologica* 1993;78:5-10.
- 5) Seitz R, Leugner F, Katschinski M, et al. Ulcerative colitis and Crohn's disease: factor XIII, inflammation and haemostasis. *Digestion* 1994;55:361-7.
- 6) Seyfert UT, Hauck W, Helmling E, Albert FW. Factor XIII deficiency in adult polycystic kidney disease. *Nephron* 1991;58:365-6.
- 7) Franco RF, Pazin-Filho A, Tavella MH, Simoes MV, Marin-Neto JA, Zago MA. Factor XIII val34leu and the risk of myocardial infarction. *Haematologica* 2000;85:67-71.
- 8) Elbaz A, Poirier O, Canaple S, Chedru F, Cambien F, Amarenco P. The association between the Val34Leu polymorphism in the factor XIII gene and brain infarction. *Blood* 2000;95:586-91.
- 9) Catto AJ, Kohler HP, Coore J, Mansfield MW, Stickland MH, Grant PJ. Association of a common polymorphism in the factor XIII gene with venous thrombosis. *Blood* 1999;93:906-8.
- 10) Wells PS, Anderson JL, Scarvelis DK, Doucette SP, Gagnon F. Factor XIII Val34Leu variant is protective against venous thromboembolism: a HuGE review and meta-analysis. *Am J Epidemiol* 2006; 164:101-9.
- 11) Gemmati D, Serino ML, Ongaro A, et al. A common mutation in the gene for coagulation factor XIII-A (VAL34Leu): a risk factor for primary intracerebral hemorrhage is protective against atherothrombotic diseases. *Am J Hematol* 2001;67:183-8.
- 12) Francis JL. The detection and measurement of factor XIII activity: a review. *Med Lab Sci* 1980;37: 137-47.
- 13) Fickenscher K, Aab A, Stuber W. A photometric assay for blood coagulation factor XIII. *Thromb Haemost* 1991;65:535-40.
- 14) Mousli S, Wakid NW. Ammonia production during clot retraction and its use in assay of fibrinolytic activity. *Clin Chem* 1977;23:1739-43.
- 15) Lorand L, Campbell-Wilkes LK, Cooperstein L. A filter paper assay for transamidating enzymes using radioactive amine substrates. *Anal Biochem* 1972;50: 623-31.
- 16) Lorand L, Lockridge OM, Campbell LK, Myhrman R, Bruner-Lorand J. Transamidating enzymes. II. A continuous fluorescent method suited for automating measurements of factor XIII in plasma. *Anal Biochem* 1971;44:221-31.
- 17) Lorand L, Parameswaran KN, Velasco PT, Hsu LK, Siefring GE Jr. New colored and fluorescent amine substrates for activated fibrin stabilizing factor (Factor XIIIa) and for transglutaminase. *Anal Biochem* 1983;131:419-25.
- 18) Lee KN, Birckbichler PJ, Patterson MK Jr. Colorimetric assay of blood coagulation factor XIII in plasma. *Clin Chem* 1988;34:906-10.
- 19) Slaughter TF, Achyuthan KE, Lai TS, Greenberg CS. A microtiter plate transglutaminase assay utilizing 5-(biotinamido)pentylamine as substrate. *Anal Biochem* 1992;205:166-71.
- 20) Ariens RA, Lai TS, Weisel JW, Greenberg CS, Grant PJ. Role of factor XIII in fibrin clot formation and effects of genetic polymorphisms. *Blood* 2002;100: 743-54.
- 21) Van Bodegraven AA, Tuynman HA, Schoorl M, Kruisshoop AM, Bartels PC. Fibrinolytic split products, fibrinolysis, and factor XIII activity in inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 1995; 30:580-5.
- 22) Tacke F, Fiedler K, von Depka M, et al. Clinical and prognostic role of plasma coagulation factor XIII activity for bleeding disorders and 6-year survival in patients with chronic liver disease. *Liver Int* 2006; 26:173-81.
- 23) Song JW, Choi JR, Song KS, Rhee JH. Plasma factor XIII activity in patients with disseminated intravascular coagulation. *Yonsei Med J* 2006;47:196-200.
- 24) Inbal A, Muszbek L, Lubetsky A, et al. Platelets but not monocytes contribute to the plasma levels of factor XIII subunit A in patients undergoing autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2004;15:249-53.