การประเมินความปลอดภัยของถุงบรรจุโลหิตโดยใช้เซลล์สัตว์เพาะเลี้ยง

โดย
นายชัยวัฒน์ ฤทธิ์สุข

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2560
ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

การประเมินความปลอดภัยของถุงบรรจุโลหิตโดยใช้เซลล์สัตว์เพาะเลี้ยง

โดย
นายชัยวัฒน์ ฤทธิ์สุข

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2560
ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

SAFETY ASSESSMENT OF BLOOD BAGS USING ANIMAL CELL CULTURE

By

MR. Chaiwat RITSUK

A Thesis Submitted in partial Fulfillment of Requirements

for Master of Science (BIOTECHNOLOGY)

Department of BIOTECHNOLOGY

Graduate School, Silpakorn University

Academic Year 2017

Copyright of Graduate School, Silpakorn University

หัวข้อ	การประเมินความปลอดภัยของถุงบรรจุโลหิตโดยใช้เซลล์สัตว์เพาะเลี้ยง
โดย	ชัยวัฒน์ ฤทธิ์สุข
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	รองศาสตราจารย์ ดร. กัลยาณี จิรศรีพงศ์พันธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปานใจ ธารทัศนวงศ์)

พิจารณาเห็นชอบโดย

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณัฐวุฒิ ชัยยุตต์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร. กัลยาณี จิรศรีพงศ์พันธ์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(อาจารย์ ดร. นวลอนงค์ จิระกาญจนากิจ)

..... ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กนกวรรณ กิตตินิยม)

58401202 : เทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
คำสำคัญ : ถุงบรรจุโลหิต, ความเป็นพิษต่อเซลล์, เซลล์ไลน์ L929, ISO 10993-5

นาย ชัยวัฒน์ ฤทธิ์สุข: การประเมินความปลอดภัยของถุงบรรจุโลหิตโดยใช้เซลล์สัตว์เพาะเลี้ยง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : รองศาสตราจารย์ ดร. กัลยาณี จิรศรีพงศ์พันธ์

ถุงบรรจุโลหิตเป็นอุปกรณ์การแพทย์ที่ต้องมีความปลอดภัยและมีมาตรฐานเป็นที่ยอมรับได้ ซึ่งการนำเข้าถุงบรรจุโลหิตจากต่างประเทศต้องผ่านการประเมินความปลอดภัยตามมาตรฐาน มอก.1298-2555 มาตรฐาน ISO 10993 หรือมาตรฐานอื่นๆ ที่เทียบเท่า การศึกษาวิจัยนี้เป็นการประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพของถุงบรรจุโลหิตชนิด 4 ถุง ซึ่งผลิตในประเทศเวียดนาม อินเดีย และญี่ปุ่น ด้วยการตรวจสอบความเป็นพิษตามมาตรฐาน ISO 10993-5 ประกอบด้วยความเป็นพิษเฉียบพลัน ความเป็นพิษแบบกึ่งเรื้อรังและเรื้อรัง และความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมโดยใช้เซลล์สัตว์เพาะเลี้ยง (L929) ผลการตรวจสอบความเป็นพิษเฉียบพลันของตัวอย่างวัสดุถุงบรรจุโลหิต พบว่าตัวอย่างจากทั้ง 3 แหล่งผลิตมีความเป็นพิษระดับที่ 1 (พิษน้อยมาก) และระดับที่ 2 (พิษน้อย) ในการวิเคราะห์ด้วย agar diffusion และ direct contact ตามลำดับ และจากลักษณะสัณฐานของเซลล์ที่สัมผัสกับสารสกัดจากวัสดุที่ความเข้มข้นของสารตัวอย่าง 0.2 g/ml ในวิธี MEM elution มีความเป็นพิษระดับที่ 2 (พิษน้อย) และให้ค่าความมีชีวิตของเซลล์มากกว่า 70 % เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี MTT assay แสดงถึงวัสดุบรรจุโลหิตจาก 3 แหล่งผลิตไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ในการวิเคราะห์แบบเฉียบพลัน ส่วนการตรวจสอบความเป็นพิษแบบกึ่งเรื้อรังและเรื้อรัง ใช้สภาวะจำลองการใช้งานจริงของถุงบรรจุโลหิต โดยแทนโลหิตด้วยสารละลายอาหารเลี้ยงเซลล์ แล้วนำตัวอย่างจากเกล็ดเลือดและถุงบรรจุเม็ดเลือดแดงไปศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยการดูลักษณะสัณฐานของเซลล์แล้ววัดความมีชีวิตด้วยวิธี MTT assay พบว่าลักษณะสัณฐานของเซลล์ที่สัมผัสกับสารตัวอย่างเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีพิษระดับที่ 1 (พิษน้อยมาก) และมีค่าความมีชีวิตของเซลล์มากกว่า 70 % ของสารตัวอย่างที่ความเข้มข้นเจือจางเป็น 1:5 ผลตรวจวัดพิษแบบกึ่งเรื้อรังและเรื้อรังด้วยวิธี colony forming assay พบว่าสารละลายอาหารจากถุงบรรจุโลหิตในสภาวะจำลองการใช้งานจริงมีผลให้เซลล์ที่สัมผัสมี % Plating efficiency มากกว่า 70% จากการบ่มเซลล์กับสารตัวอย่างที่ความเข้มข้นเจือจาง 1:5 จำนวน 1 ครั้งและ 2 ครั้งต่อเนื่องกัน แสดงถึงการใช้ถุงบรรจุโลหิตไม่ส่งผลกระทบต่อการเจริญของเซลล์จากการได้รับสารจากถุงบรรจุโลหิตซ้ำๆ การตรวจสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของตัวอย่างด้วยวิธี micronuclei assay พบว่าทุกสภาวะให้ค่า NDI มากกว่า 1 แสดงถึงประชากรเซลล์มีการแบ่งตัวผ่านวัฏจักรเซลล์ ส่วนค่าความถี่ของการเกิด micronuclei ในเซลล์ที่ได้รับตัวอย่างถุงเลือดมีค่าระดับต่ำกว่า colchicine ซึ่งเป็นตัวควบคุมบวกอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นจากผลทั้งหมดที่ได้นี้ อาจกล่าวได้ว่าถุงบรรจุโลหิตที่เป็นตัวอย่างในการศึกษานี้มีความปลอดภัยตามเกณฑ์ของมาตรฐาน มอก.1298-2555 และมาตรฐาน ISO 10993

58401202 : Major (BIOTECHNOLOGY)

Keyword : Blood bag, ISO 10993-5, Cytotoxcicity, L929 cells line

MR. CHAIWAT RITSUK : SAFETY ASSESSMENT OF BLOOD BAGS USING ANIMAL CELL CULTURE THESIS ADVISOR : ASSOCIATE PROFESSOR KANYANEE JIRASRIPONGPUN, PH.D.

Blood bag is a medical device that must be safe and be acceptable according to the standard for clinical used. The imported blood bags from oversea should pass the safety assessment of ISO 10993-5 or the guideline from public health ministry and TIS 1298-2555. This study aimed to investigate the safety of quadruple blood bags from 3 manufacturers (Vietnam, India and Japan). The safety test was performed according to ISO 10993-5 emphasizing on acute cytotoxicity assay, subchronic assay, chronic assay and genotoxicity assay using mouse fibroblast L929 cell line. Acute toxicity assay revealed that all blood bag materials demonstrated toxicity at level 1 (slight) and 2 (mild) based on agar diffusion and direct contact assay, respectively. Cells contacted with extract samples also exhibited cell viability more than 70% from all 3 tested samples using MTT assay and cell morphology revealed toxicity at level 2 (mild) at the sample concentration of 0.2 g/ml. This demonstrated that blood bag materials of 3 sample sources were no cytotoxic. The subchronic and chronic assay were performed under simulation on the actual use of blood bags, medium represented as blood was feed into blood bag and the collected samples from bags of red blood cell and platelet were tested on cell viability using MTT assay. The cell morphology after extract samples incubation for 24 hr revealed toxicity grade at level 1 (slight) with cell viability greater than 70% at the sample concentration of 1:5 fold of sample. Subchronic and chronic toxicology assay were also performed using colony forming assay. The cell revealed percentage of plating efficiency at more than 70% after exposure to samples at the sample concentration of 1:5 fold of solution, for 1 or 2 repetitive treatment. This implied that repeated use of blood bags has no effect on cell growth. The genotoxicity of the samples were performed using micronuclei assay. All test condition provided NDI> 1, implying cell undergo proliferation in cell cycle. The frequency of micronuclei from cell exposured to sample was lower than that exposured to colchicine. It can be concluded from all results that all tested blood bags meet acceptable safety criteria according to the TIS 1298-2555 and ISO 10993-5.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้านายชัยวัฒน์ ฤทธิ์สุข ซึ่งเป็นผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.กัลยาณี จิรศรีพงศ์พันธ์ และอาจารย์ ดร.นวลอนงค์ จิระกาญจนากิจ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่คอยให้คำแนะนำ ชี้แนะในการทำวิจัย ช่วยสนับสนุนและแก้ไขปัญหาต่างๆที่เกิดขึ้น ระหว่างการทำวิจัย ตลอดจนตรวจแก้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐวุฒิ ชัยยุตต์ ภาควิชาวิทยาการและวิศวกรรมวัสดุ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่ให้ความกรุณาเป็นประธานกรรมการสอบหัวข้อวิทยานิพนธ์และสอบวิทยานิพนธ์ พร้อมทั้งให้คำปรึกษาและข้อเสนอแนะให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กนกวรรณ กิตตินิยม ที่ให้ความกรุณาเป็นคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ พร้อมทั้งให้คำปรึกษาและข้อเสนอแนะให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ประจำภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่อบรมสั่งสอน มอบความรู้ และทักษะต่างๆ สำหรับการศึกษาและวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณนักวิทยาศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ที่ให้ความช่วยเหลือในด้านเครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี ตลอดจนช่วยเหลืออำนวยความสะดวกในการดำเนินการเกี่ยวกับเอกสารต่าง ในการศึกษาและวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณเพื่อนๆ และนักศึกษาทุกชั้นปีของภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพที่คอยให้คำปรึกษาและกำลังใจ

ขอกราบขอบพระคุณ พ่อ แม่ และครอบครัว ที่เป็นแรงผลักดันและคอยเป็นกำลังใจ ที่จนทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ชัยวัฒน์ ฤทธิ์สุข

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญภาพ ..... ญ

สารบัญตาราง ..... ฎ

บทที่ 1 1

บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ 1

1.2 วัตถุประสงค์ 2

1.3 ขอบเขตงานวิจัย 2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

บทที่ 2 3

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3

2.1 การถ่ายโลหิต (Blood Transfusion) 3

2.1.1 การบริจาคโลหิต 3

2.1.2 การเตรียมส่วนประกอบของโลหิต 5

2.1.3 การเก็บ การขนส่งและอายุการเก็บโลหิตและส่วนประกอบโลหิต 9

2.2 ภาชนะบรรจุโลหิต 15

2.2.1 ลักษณะของถุงบรรจุโลหิต 15

2.2.2 ชนิดของถุงบรรจุโลหิต 16

2.2.3 ประวัติของภาชนะบรรจุโลหิต 17
2.2.4 วัสดุที่ใช้ทำภาชนะ (ถุง) บรรจุโลหิต.....18
2.2.5 น้ำยากันโลหิตแข็งตัวและน้ำยาเสริมสำหรับเก็บเม็ดเลือดแดง 21
2.3 มาตรฐานของถุงบรรจุโลหิต 26
2.3.1 การทดสอบตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ด้านชีวภาพ 28
2.3.2 การศึกษาความเป็นพิษของอุปกรณ์การแพทย์.....37
บทที่ 3.....40
อุปกรณ์และวิธีวิจัย.....40
3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี.....40
3.1.1 เครื่องมือ.....40
3.1.2 วัสดุอุปกรณ์และเครื่องแก้ว 40
3.1.3 สารเคมี 41
3.2 เซลล์ที่ใช้ในงานวิจัยและการเพาะเลี้ยง 42
3.3 ตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย 42
3.4 ระเบียบวิธีวิจัย.....42
บทที่ 4.....48
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง 48
4.1 การทดสอบความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน (Acute toxicity) ต่อความมีชีวิตของเซลล์ L929...49
4.2 การทดสอบความเป็นพิษแบบกึ่งเรื้อรัง (Sub-chronic toxicity) และแบบเรื้อรัง (Chronic toxicity) ต่อความมีชีวิตของเซลล์ L929.....61
4.3 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม (Genotoxicity) ของถุงบรรจุโลหิตจากสภาวะจำลองการใช้งานจริง.....67
บทที่ 5.....71
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 71

5.1 สรุปผลการทดลอง 71
5.2 ข้อเสนอแนะ 72
รายการอ้างอิง 74
ประวัติผู้เขียน 77

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 2. 1 แผนผังสรุปการแยกส่วนประกอบของโลหิตและอนุพันธ์ของโลหิต.....8

รูปที่ 2. 2 ลักษณะทั่วไปของถุงบรรจุโลหิต 15

รูปที่ 3. 1 ลักษณะการเกาะแผ่ของเซลล์ L929.....42

รูปที่ 4. 1 สัณฐานของเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นหลังจากการวางชิ้นตัวอย่างบนชั้นวุ้นและบ่มนาน 24 ชั่วโมง ซึ่งประกอบไปด้วย positive control (a, b) and negative control (c) ชิ้นวัสดุตัวอย่างจากประเทศเวียดนาม (d-g); (d- RCB bag, e-CPD bag, f-platelet bag I, g- platelet bag II) โดยแสดงลักษณะของเซลล์ ที่ด้านบนของแต่ละรูปตั้งแต่ b-g คือบริเวณใต้ชิ้นวัสดุตัวอย่าง และด้านล่างของรูปเป็นบริเวณนอกตัวอย่าง.....52

รูปที่ 4. 2 สัณฐานของเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นหลังจากการวางชิ้นตัวอย่างบนผิวหน้าเซลล์โดยตรงและบ่มนาน 24 ชั่วโมง ซึ่งประกอบไปด้วย positive control (a) and negative control (b) ชิ้นวัสดุตัวอย่างจากประเทศเวียดนาม (c-f); (c- RCB bag, d-CPD bag, e-platelet bag I, f- platelet bag II),ชิ้นวัสดุตัวอย่างจากประเทศอินเดีย (g-h); (g-RCB bag, h-CPD bag) โดยแสดงลักษณะของเซลล์ ที่ด้านบนของแต่ละรูปตั้งแต่ a-h คือบริเวณใต้ชิ้นวัสดุตัวอย่าง และด้านล่างของรูปเป็นบริเวณนอกตัวอย่าง 56

รูปที่ 4. 3 ค่าความมีชีวิตของเซลล์ที่วิเคราะห์ด้วย MTT assay ในการตรวจสอบแบบ MEM elution ของเซลล์ที่บ่มกับสารสกัดวัสดุถุงบรรจุโลหิตส่วนต่างๆ จากประเทศเวียดนาม (a) อินเดีย (b) และญี่ปุ่น (c) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยตัวอักษร (a, b) ที่แตกต่างกันในแต่ละชุดข้อมูลหมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) 59

รูปที่ 4. 4 สัณฐานของเซลล์หลังจากที่บ่มกับสารสกัดวัสดุถุงบรรจุโลหิตส่วนต่างๆ ของตัวอย่างประเทศเวียดนาม (a-CPD, b-RCB bag, c-Platelet bag, d-Satellite bag), อินเดีย (e-RBC Bag, f-CPD Bag, g-Platelet I Bag, h-Platelet II Bag) , และญี่ปุ่น (i-RBC Bag, j-CPD Bag, k-Platelet I Bag , l-Platelet II Bag) ที่ระดับความเข้มข้น 0.2 g/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....60

รูปที่ 4. 5 ความมีชีวิตของเซลล์ (%) จากสารละลายผสมจากถุงเกล็ดเลือดที่เวลาการเก็บ 3 วัน (a) และ 5 วัน (b) และถุงเม็ดเลือดแดงที่เวลาการเก็บ 30 วัน (c) และ 42 วัน (d) ที่สภาวะบ่มนาน 24 ชั่วโมงโดยตัวอักษร (a, b) ที่แตกต่างกันในแต่ละชุดข้อมูลหมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P< 0.05).....63

รูปที่ 4. 6 ลักษณะสัณฐานของเซลล์หลังจากบ่มกับสารละลายผสมความเข้มข้น 1:5 เท่า ที่สภาวะการบ่ม 24 ชั่วโมง จากถุงเกล็ดเลือดที่เวลาการเก็บ 3 วัน (a-c; a: Vietnam, b: India, and c: Japan) กับ 5 วัน (d-f; d: Vietnam, e: India, and f: Japan) และถุงเม็ดเลือดแดงที่เวลาการเก็บ 30 วัน (g-i; g: Vietnam, h: India, and i: Japan) กับ 42 วัน (j-l; j: Vietnam, k: India, and l: Japan).....64

รูปที่ 4. 7 %Plating efficiency ของเซลล์หลังจากที่ได้รับสารละลายผสมจากถุงเกล็ดเลือดที่เวลาการเก็บ 3 วัน (a) และ 5 วัน (b) และถุงเม็ดเลือดแดงที่เวลาการเก็บ 30 วัน (c) และ 42 วัน (d) เป็นครั้งที่ 1 โดยตัวอักษร (a, b, c, d, e) ที่แตกต่างกันในแต่ละชุดข้อมูลหมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05).....65

รูปที่ 4. 8 %Plating efficiency ของเซลล์หลังจากที่ได้รับสารละลายผสมจากถุงเกล็ดเลือดที่เวลาการเก็บ 3 วัน (a) และ 5 วัน (b) และถุงเม็ดเลือดแดงที่เวลาการเก็บ 30 วัน (c) และ 42 วัน (d) เป็นครั้งที่ 2 โดยตัวอักษร (a, b, c, d, e) ที่แตกต่างกันในแต่ละชุดข้อมูลหมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05).....66

รูปที่ 4. 9 ลักษณะการเกิด Mononucleus (Mono), Binucleus (BN), Micronucleus (MN), Trinucleus (Tri) และ Multinucleus (Multi) จากการทดสอบผลความเป็นพิษต่อพันธุกรรมของถุงบรรจุโลหิตแบบชนิด 4 ถุงจากแหล่งผลิตของประเทศเวียดนาม อินเดีย และญี่ปุ่น ในรูปแบบการจำลองสภาวะการใช้งานจริง.....69

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2. 1 ข้อกำหนดการเก็บ การขนส่งและอายุการเก็บโลหิตและส่วนประกอบโลหิต 10

ตารางที่ 2.2 บริษัทผลิตถุงบรรจุโลหิต 18

ตารางที่ 2. 3 ข้อมูลต่างที่เกี่ยวกับถุงบรรจุเก็บเม็ดเลือดแดง 20

ตารางที่ 2. 4 แสดงข้อมูลต่างที่เกี่ยวกับถุงบรรจุเก็บเกล็ดเลือด 22

ตารางที่ 2.5 น้ำยากันโลหิตแข็งชนิดต่างๆ 25

ตารางที่ 2. 6 แสดงรายละเอียดส่วนประกอบน้ำยาเสริมสำหรับเก็บเม็ดเลือดแดง 26

ตารางที่ 2. 7 การประเมินระดับความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง.....29

ตารางที่ 2. 8 การประเมินความเข้ากันได้ทางชีวภาพของอุปกรณ์การแพทย์.....32

ตารางที่ 2. 9 การประเมินระดับความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง.....34

ตารางที่ 2. 10 ระดับความเป็นพิษจากการทดสอบด้วยวิธี direct contact และ agar diffusion.....35

ตารางที่ 3. 1 ระดับความเป็นพิษจากการทดสอบด้วยวิธี direct contact และ agar diffusion.....43

ตารางที่ 3. 2 การประเมินระดับความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง.....44

ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบทางเคมีของสารละลาย CPD.....48

ตารางที่ 4.2 องค์ประกอบทางเคมีของสารละลาย AS-5/ SAG-M-2.....49

ตารางที่ 4. 3 แสดงค่าการเกิดวงใสและระดับที่ประเมินความเป็นพิษด้วยวิธี Agar diffusion โดยตัวอักษร (a, b) ที่แตกต่างกันในแต่ละชุดข้อมูลหมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$).....51

ตารางที่ 4. 4 แสดงค่าการเกิดวงใสและระดับที่ประเมินความเป็นพิษด้วยวิธี Direct contact โดยตัวอักษร (a, b) ที่แตกต่างกันในแต่ละชุดข้อมูลหมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$).....55

ตารางที่ 4. 5 สรุปผลการทดสอบ Micronucleus test ของตัวอย่างถุงบรรจุโลหิตจากแหล่งผลิตของประเทศเวียดนาม อินเดีย และญี่ปุ่น โดยตัวอักษร (a, b, c) ที่แตกต่างกันในแต่ละชุดข้อมูลหมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$).....70

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

โลหิตเป็นเนื้อเยื่อที่มีลักษณะเป็นของเหลวภายในหลอดเลือดร่างกาย ประกอบไปด้วยส่วนสำคัญ 4 ส่วน คือ น้ำเลือด เซลล์เม็ดเลือดแดง เซลล์เม็ดเลือดขาว และ เกล็ดเลือด ซึ่งมีความจำเป็นต่อร่างกายในการลำเลียงสารและอนุภาคต่างๆ ควบคุมกลไกของร่างกาย และป้องกันการสูญเสียเลือดและช่วยกำจัดสิ่งแปลกปลอม (สัญญา ร้อยสมมุติ, 2555) โลหิตจึงเป็นสิ่งสำคัญในทางการแพทย์อย่างยิ่งต่อการรักษาอาการของผู้ป่วยที่ต้องการการทดแทนเลือดที่สูญเสียไปจากการรับบริจาคจากผู้ให้สู่ผู้รับ (ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย, 2015) ซึ่งการบริจาคโลหิตนั้นต้องทำการเจาะเลือดจากผู้ให้มายังภาชนะบรรจุโลหิต (Blood Bags) แล้วนำไปเข้าสู่กระบวนการคัดแยกและวิเคราะห์คุณภาพก่อนนำไปให้ผู้รับเลือด ถุงบรรจุโลหิตเป็นอุปกรณ์การแพทย์แบบหนึ่งทำจากพลาสติกใช้สำหรับบรรจุโลหิตและ/หรือส่วนประกอบของโลหิตมนุษย์ ในกระบวนการบริจาคโลหิต ถุงบรรจุโลหิตที่ใช้โดยทั่วไปนั้น ทำจากพอลิโอเลฟินหรือพอลิไวนิลคลอไรด์ ที่มีการบรรจุน้ำยาป้องกันการแข็งตัวของโลหิตหรือน้ำยารักษาสภาพส่วนประกอบของโลหิตซึ่งถุงบรรจุโลหิตจะต้องมีความปลอดภัยต่อโลหิตและผู้รับโลหิต รวมทั้งมีผลรักษาคุณภาพของโลหิตที่ดี ดังนั้นถุงบรรจุโลหิตจะต้องผ่านการตรวจสอบคุณสมบัติของถุงบรรจุโลหิต เช่น ลักษณะทั่วไป ลักษณะการใช้งาน ลักษณะทางฟิสิกส์ ลักษณะทางเคมี และความปลอดภัยของถุงบรรจุโลหิตทั้งนี้เพื่อให้เกิดความปลอดภัยต่อผู้รับโลหิตและลดความเสียหายของโลหิตระหว่างกระบวนการต่างๆได้ (คณะกรรมการเครื่องมือแพทย์, 2559)

ถุงบรรจุโลหิตเป็นอุปกรณ์ทางการแพทย์ชนิดหนึ่งที่ต้องมีการตรวจสอบคุณภาพให้เป็นไปตามมาตรฐานทั้งในระดับชาติและนานาชาติ เพื่อให้ตรงตามคุณลักษณะที่ต้องการ อาทิเช่น การทดสอบทางกายภาพ การทดสอบทางเคมี และการทดสอบทางชีวภาพ ปัจจุบันการทดสอบทางชีวภาพนี้ถือได้ว่ามีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งในการตรวจสอบประเมินความปลอดภัยของถุงบรรจุโลหิตก่อนที่จะนำมาใช้งาน ถุงบรรจุโลหิตที่มีการผลิตหรือนำเข้าจากต่างประเทศนั้นต้องมีการตรวจประเมินคุณภาพอย่างเคร่งครัด เพื่อให้เกิดความปลอดภัยต่อผู้ให้และผู้รับโลหิต ฉะนั้นจึงต้องมีการตรวจสอบให้เป็นไปตามเกณฑ์ในระดับชาติ คือมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมสำหรับภาชนะพลาสติกปราศจากเชื้อสำหรับบรรจุโลหิตและส่วนประกอบของโลหิต (มอก.1298-2555) ที่กำหนดโดยกระทรวงอุตสาหกรรมของไทย ซึ่งการตรวจสอบทางชีวภาพเป็นการประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง และ/หรืออาจใช้มาตรฐานการประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพของอุปกรณ์

การแพทย์ที่เป็นสากล (ISO 10993) ที่เป็นการประเมินความเข้ากันได้ทางชีวภาพ ตาม ISO 10993-5 ด้วยการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ในสภาวะหลอดทดลอง และตาม ISO 10993-3 ที่เป็นการทดสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม โดยผลการตรวจสอบความปลอดภัยนี้ต้องอยู่ในเกณฑ์อันเป็นที่ยอมรับได้ของแต่ละมาตรฐาน และแสดงความสอดคล้องถึงความปลอดภัย ของโลหิต และส่วนประกอบของโลหิตจากการใช้งานของถุงบรรจุโลหิต

1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อตรวจสอบความปลอดภัยทางชีวภาพของถุงบรรจุโลหิตที่เป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จ โดยตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์สัตว์เพาะเลี้ยง และความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม ของถุงบรรจุโลหิตตามกระบวนการตรวจสอบของ ISO 10993-5 และ มอก. 1298-2555 ด้วยเซลล์สัตว์เพาะเลี้ยง

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1.3.1 ตรวจสอบความเป็นพิษของถุงบรรจุโลหิตต่อเซลล์ L929 ด้วยวิธี

1.3.1.1 Acute methods ด้วยวิธี MTT assay Direct contact และ Agar diffusion

1.3.1.2 Subchronic methods ด้วยวิธี MTT assay และ Colony Forming Assay

1.3.1.3 Chronic methods ด้วยวิธี Colony Forming Assay

1.3.2 ตรวจสอบความเป็นพิษของถุงบรรจุโลหิตต่อสารพันธุกรรมของเซลล์ L929 โดยใช้วิธี micronuclei assay

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ทราบถึงความปลอดภัยของถุงบรรจุโลหิตจากผู้ผลิตทั้ง 3 แหล่ง และเป็นแนวทางการตรวจสอบความเป็นพิษของอุปกรณ์ทางการแพทย์ชนิดถุงบรรจุโลหิตด้วยเซลล์สัตว์เพาะเลี้ยง

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 การถ่ายโลหิต (Blood Transfusion)

การถ่ายโลหิตเป็นวิวัฒนาการทางการแพทย์และวิทยาศาสตร์ที่มีการใช้โลหิตหรือส่วนประกอบของโลหิต (เม็ดโลหิตแดง, เม็ดโลหิตขาว, พลาสมาสดแช่แข็ง) ในกระบวนการรักษาโรค (Booth & Allard, 2017) เพื่อการทดแทนโลหิตที่เสียไปจากการบาดเจ็บของผู้รับโลหิต หรือเพื่อการรักษาอาการป่วยต่างๆ ในกรณีที่ร่างกายของผู้ป่วยไม่สามารถสร้างโลหิตได้เพียงต่อร่างกาย จึงจำเป็นต้องทำการรับบริจาคโลหิตจากบุคคลหนึ่งเพื่อนำไปให้กับอีกบุคคลหนึ่งและช่วยเหลือชีวิตผู้ป่วยได้ทันท่วงที ซึ่งในการบริจาคโลหิตนั้นได้มีการกำหนดคุณสมบัติและเกณฑ์ต่างๆ เพื่อให้เกิดความปลอดภัยต่อผู้บริจาคโลหิตและผู้รับโลหิต โดยการบริจาคโลหิตต้องมีการเจาะเก็บโลหิตจากผู้ที่ทำการบริจาคในระบบปิดและใช้เทคนิคที่ทำให้ปราศจากเชื้อ เพื่อป้องกันการติดเชื้อของผู้บริจาคโลหิตและผู้รับโลหิต และเพื่อให้แน่ใจว่าทั้งยูนิตของภาชนะบรรจุโลหิตและส่วนประกอบของโลหิตมีความสะอาดและปราศจากเชื้อ ซึ่งภาชนะรองรับโลหิตที่เป็นระบบปิดส่วนใหญ่แล้วจะเป็นถุงบรรจุโลหิตที่เป็นพลาสติก เนื่องจากมีความสะดวกในการใช้งาน ฉะนั้นการออกแบบถุงบรรจุโลหิตจึงต้องคำนึงถึงการใช้งานที่ง่าย และความปลอดภัยในการป้องกันรักษาโลหิตให้ยังคงคุณสมบัติและคุณภาพ ในระหว่างของกระบวนการบริจาคโลหิตนี้จนถึงผู้ที่รับโลหิต (ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย, 2015)

2.1.1 การบริจาคโลหิต

ในวันที่บริจาคโลหิต ผู้บริจาคต้องได้รับการซักประวัติสุขภาพและตรวจร่างกายโดยแพทย์หรือบุคลากร ทางการแพทย์ที่ได้รับการฝึกอบรมมาโดยเฉพาะ โดยปฏิบัติตามเกณฑ์และคู่มือการคัดเลือกผู้บริจาคโลหิตของ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ เพื่อให้แน่ใจว่าโลหิตที่ได้มีคุณภาพและไม่ทำให้เกิดอันตรายต่อผู้บริจาคโลหิต กระบวนการและขั้นตอนต่างๆ ในการรับบริจาคโลหิต ระเบียบปฏิบัติงานและวิธีทำงาน ต้องเขียนไว้อย่าง เป็นระบบ และปฏิบัติตามในแนวทางเดียวกัน

คุณสมบัติและเกณฑ์สำหรับการคัดเลือกผู้บริจาคโลหิต

- อายุของผู้บริจาคโลหิต ต้องมีอายุระหว่าง 17 ปี ถึง 70 ปีบริบูรณ์ ผู้ที่มีอายุ 17 ปี ต้องมีหนังสือยินยอมจากผู้ปกครอง ถ้าเป็นผู้บริจาคครั้ง แรกต้องอายุไม่เกิน 55 ปี

การคัดเลือกผู้บริจาคโลหิตอายุ มากกว่า 60 จนถึง 70 ปี

1. ผู้บริจาคโลหิตอายุ มากกว่า 60 จนถึง 65 ปี

1.1 เป็นผู้บริจาคโลหิตประจำมาโดยตลอดจนกระทั่งอายุ 60 ปี

1.2 บริจาคโลหิตได้ไม่เกินปีละ 3 ครั้งคือทุก 4 เดือน

1.3 ตรวจ Complete Blood Count (CBC) ทุกครั้งก่อนบริจาคโลหิต

1.4 ตรวจ Serum Ferritin (SF) Blood Chemistry (BC) ปีละ 1 ครั้ง

1.5 แพทย์หรือพยาบาลพิจารณาและบันทึกผล SF และค่า Hemoglobin (Hb) และ Hematocrit และค่าที่ผิดปกติ ของการตรวจทางห้องปฏิบัติการอื่นๆ ถ้าผลเลือดและความดันโลหิตปกติ อนุญาตให้บริจาคโลหิตได้

2. ผู้บริจาคโลหิตอายุ มากกว่า 65-70 ปี

2.1 เป็นผู้บริจาคโลหิตต่อเนื่องสม่ำเสมอในช่วงอายุ มากกว่า 60-65 ปี

2.2 บริจาคโลหิตได้ไม่เกินปีละ 2 ครั้ง คือทุก 6 เดือน

2.3 ตรวจ CBC ทุกครั้งก่อนบริจาคโลหิต

2.4 ตรวจ BC, SF, และ Electrocardiogram (EKG) ปีละ 1 ครั้ง

2.5 มีใบรับรองแพทย์ ออกโดยแพทย์ประจำตัว หรือแพทย์ของศูนย์บริการโลหิต

- น้ำหนักตัวของผู้บริจาคโลหิต ต้องมีน้ำหนักตัวที่เหมาะสม คือ ตั้งแต่ 45 กิโลกรัมขึ้นไป มีสุขภาพร่างกายที่สมบูรณ์
- ระยะห่างระหว่างการบริจาคโลหิต ซึ่งควรมีระยะห่างอยู่ที่ 12 สัปดาห์
- ความดันโลหิต ควรมีค่าความดัน systolic ไม่เกิน 160 มิลลิเมตรปรอท และความดัน diastolic ไม่เกิน 100 มิลลิเมตรปรอท
- ชีพจร ของผู้บริจาคโลหิตต้องเต้นปกติ สม่ำเสมอ อัตราการเต้นอยู่ระหว่าง 50 ถึง 100 ครั้งต่อนาที
- ประวัติการเจ็บป่วย ผู้บริจาคโลหิตต้องไม่มีประวัติเป็น โรคหัวใจ โรคตับ โรคปอด โรคเลือด โรคมะเร็ง หรือมี ภาวะโลหิตออกง่ายและหยุดยาก
- การตั้งครรภ์ การให้นมบุตร ไม่รับบริจาคโลหิตจากผู้ที่กำลังตั้งครรภ์ หรือสงสัยว่ากำลังตั้งครรภ์ หรือหลังการแท้ง หรืออยู่ในระยะการให้นมบุตร หลังคลอดอย่างน้อย 6 เดือน จึงบริจาคโลหิตได้ ระยะมีประจำเดือนถ้าไม่มีอาการผิดปกติ สามารถบริจาคโลหิตได้
- การใช้ยาเพื่อการรักษา ผู้ที่กำลังใช้ยาใดๆ เพื่อการรักษา ต้องได้รับการประเมินจากแพทย์หรือเจ้าหน้าที่ทางการแพทย์ที่ ได้รับการอบรม โดยปฏิบัติตามคู่มือการคัดเลือกผู้บริจาคโลหิตของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย
- พฤติกรรมเสี่ยง ผู้ที่จะทำการบริจาคโลหิตต้องไม่ดื่มเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์หรือใช้สารเสพติดก่อนการบริจาคโลหิต รวมถึงต้องไม่มีพฤติกรรมเสี่ยงทางเพศ

- การรับโลหิต ส่วนประกอบของโลหิต และเนื้อเยื่อของมนุษย์ ผู้ที่เคยได้รับโลหิต ส่วนประกอบของโลหิต และเนื้อเยื่อของมนุษย์ต้องงดบริจาคโลหิตอย่างน้อย 12 เดือน
- การรับเซรุ่มและวัคซีน ผู้ที่ได้รับเซรุ่มควรเว้นการบริจาคอย่างน้อย 12 เดือน และสำหรับผู้ที่ได้รับวัคซีนนั้น ถ้าเป็น toxoids หรือวัคซีนที่ได้มาโดยการสังเคราะห์ หรือ การฆ่าเชื้อให้บริจาคโลหิตได้ถ้าไม่มีไข้และไม่มีอาการผิดปกติใดๆ หรือเว้นบริจาคอย่างน้อย 2-4 สัปดาห์ สำหรับวัคซีนบางชนิด
- โรคติดเชื้อ ผู้บริจาคโลหิตต้องปลอดจากการติดเชื้อต่างๆ ที่จะสามารถถ่ายทอดทางโลหิต

ทั้งนี้ ต้องลงชื่อรับรองก่อนการบริจาคโลหิตทุกครั้ง ใบรับรองคำยินยอมต้องมีข้อความที่ผู้บริจาค สามารถอ่านได้ชัดเจนและเข้าใจ ควรมีเนื้อหาที่สำคัญคือ ความเสี่ยงในการบริจาคและการตรวจทางห้องปฏิบัติการ เพื่อลดความเสี่ยงต่อการติดเชื้อ ผู้บริจาคควรมีโอกาสได้ซักถามถึงกระบวนการและขั้นตอนก่อนการบริจาคและมีสิทธิในการปฏิเสธการบริจาค (ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย, 2015)

หลังจากที่คัดเลือกผู้บริจาคโลหิตตามคุณสมบัติและเกณฑ์สำหรับการคัดเลือกผู้บริจาคโลหิตของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทยแล้ว ก็จะทำการเจาะเก็บโลหิต โดยใช้ระบบปิดและเทคนิคที่ทำให้ปราศจากเชื้อ ซึ่งต้องบรรจุและขนส่งที่อุณหภูมิ 1-10 °C เพื่อนำไปเตรียมแยกส่วนประกอบของโลหิตต่อไป

2.1.2 การเตรียมส่วนประกอบของโลหิต

การเตรียมส่วนประกอบโลหิตจะต้องทำโดยเทคนิคปราศจากเชื้อ เครื่องมือและน้ำยาต้องผ่านการฆ่าเชื้อ โดยโลหิตที่เจาะเก็บจากผู้บริจาคนี้จะเรียกว่า โลหิตรวม (Whole Blood)

โลหิตเป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่มีลักษณะเป็นของเหลวที่หมุนเวียนผ่านระบบหลอดเลือดของหัวใจ หลอดเลือดแดง หลอดเลือดฝอย และหลอดเลือดดำภายในร่างกาย ในผู้ใหญ่โดยเฉลี่ยแล้วจะมีเลือดประมาณ 7-8 % ของน้ำหนักตัวหรือเทียบเท่า 5 ลิตร โดยโลหิตรวมนี้จะประกอบไปด้วยเซลล์เม็ดเลือดแดง เซลล์เม็ดเลือดขาว และเกล็ดเลือด ซึ่งมีประมาณ 45 % และทั้งหมดนี้จะละลายอยู่ในของเหลวที่เรียกว่า พลาสมา ซึ่งคิดเป็น 55 % ของโลหิตทั้งหมด ซึ่งส่วนประกอบของโลหิตแต่ละชนิดมีรายละเอียดดังนี้

1. เซลล์เม็ดเลือดแดง (Red blood cells หรือ Erythrocytes) เป็นเซลล์ที่มีปริมาณมากที่สุด ซึ่งสร้างจากไขกระดูก โดยคนเพศชายจะมีปริมาณเม็ดเลือดแดงมากกว่าเพศหญิง เซลล์เม็ดเลือดแดงไม่มีนิวเคลียสและมีอายุประมาณ 100-120 วัน ก่อนถูกทำลายที่ตับและม้าม ซึ่งในเลือด 1 μl จะมีเซลล์เม็ดเลือดแดงประมาณ 5 ล้านเซลล์ หรือ 5×10^{12} เซลล์ต่อลิตรในผู้ใหญ่ เซลล์เม็ด

เลือดแดงมีลักษณะรูปร่างเป็น แผ่นเว้าทั้ง 2 ด้าน มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 7 μm มีความหนาประมาณ 2.0 μm และมีฮีโมโกลบินที่เป็นโปรตีนสามารถจับกับออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งโครงสร้างของเซลล์เม็ดเลือดแดงมีความยืดหยุ่น สามารถบีบผ่านหลอดเลือดฝอยที่มีขนาดเพียง 3 μm รูปร่างที่เป็นแผ่นของเม็ดเลือดแดงยังช่วยเพิ่มอัตราส่วนของพื้นที่ต่อปริมาตร เพื่อให้มีประสิทธิภาพในการแลกเปลี่ยนแก๊สได้ดี

2. เซลล์เม็ดเลือดขาว (White blood cell หรือที่รู้จักว่า Leucocytes) มีอยู่ประมาณ 4.0-11.0×10^9เซลล์ต่อลิตร ภายในร่างกาย โดยจะมีปริมาณมากขึ้นเมื่อเกิดการติดเชื้อ เป็นเซลล์ที่มีนิวเคลียส ไม่มีฮีโมโกลบิน สามารถเคลื่อนผ่านหลอดเลือดฝอยมายังเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อได้ โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่มคือ 1) แกลนูโลไซด์ ที่เป็นเม็ดเลือดขาวที่มีกลุ่มเล็กๆภายในเซลล์ที่แบ่งเป็น Neutrophils, Eosinophils และ Basophils กับกลุ่มที่ไม่มีแกลนูล หรืออะแกลนูโลไซด์ ที่แบ่งเป็น Lymphocytes และ Monocytes โดยเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้ง 5 ชนิด มีความถี่พบในเลือดจากมากไปน้อย คือ

- Neutrophils เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มีอยู่มากที่สุด หรือประมาณ 1.5-7.5×10^9 เซลล์ต่อเลือด 1 ลิตร มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 9-15 μm ภายในเซลล์ประกอบไปด้วยแกรนูลเล็กๆมากมายและมีนิวเคลียสที่แบ่งออกเป็นติ่งหรือ lobes (ปกติมี 2-5 lobes) เซลล์เม็ดเลือดขาวทำหน้าที่ต่อการตอบสนองทางเคมีไปยังบริเวณที่เกิดการอักเสบ จากนั้นก็ทำการโอบล้อม (phagocytosis) และฆ่าเซลล์จุลชีพแปลกปลอม

- Lymphocytes เป็นเม็ดเลือดขาวชนิดที่มีอยู่ในน้ำเลือดเป็นอันดับสอง มีประมาณ 1.2-3.5×10^9 เซลล์ต่อเลือดปริมาตร 1 ลิตร เซลล์ lymphocytes มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 7-16 μm และมีนิวเคลียสขนาดใหญ่เกือบเต็มเซลล์ เซลล์เม็ดเลือดขาว lymphocytes ประกอบไปด้วย B-cells 10-30 %, T-cells 65-80%, และอีก 2-10% เป็นกลุ่มของ non B-, non T-(null) cells ซึ่งเซลล์ lymphocytes นี้จะเกี่ยวข้องกับการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันโดยเซลล์เม็ดเลือดขาว lymphocytes จะมีอายุอยู่ประมาณ 100-300 วัน

- Monocytes สามารถพบได้ใน 0.2- 0.8×10^9 เซลล์ในเลือด 1 ลิตร ซึ่งเซลล์นี้มีขนาดประมาณ 15-30 μm มีอัตราส่วนนิวเคลียสต่อไซโทพลาซึมที่ค่อนข้างต่ำ โดยนิวเคลียสจะมีรูปร่างที่ไม่แน่นอน แต่ที่พบบ่อยจะเป็นแบบ C- และ U-shaped ซึ่งเซลล์ monocytes ครึ่งหนึ่งจะพบอยู่ที่ม้าม ส่วนที่เหลืออีกครึ่งหนึ่งจะพบอยู่ในกระแสเลือดและมีชีวิตอยู่ได้ประมาณ 1-3 วัน

- Eosinophils สามารถพบได้ 0.02-0.6×10^9 เซลล์ในน้ำเลือด 1 ลิตร หรือประมาณ 2-5 % ของเม็ดเลือดขาวทั้งหมด โดยเซลล์มีขนาดประมาณ 12-17 μm มีอัตราส่วนนิวเคลียสต่อไซโทพลาซึมต่ำ ซึ่งปกติแล้วจะมีนิวเคลียส 2 พู เซลล์ Eosinophils ทำหน้าที่ในการป้องกัน พาราไซท์

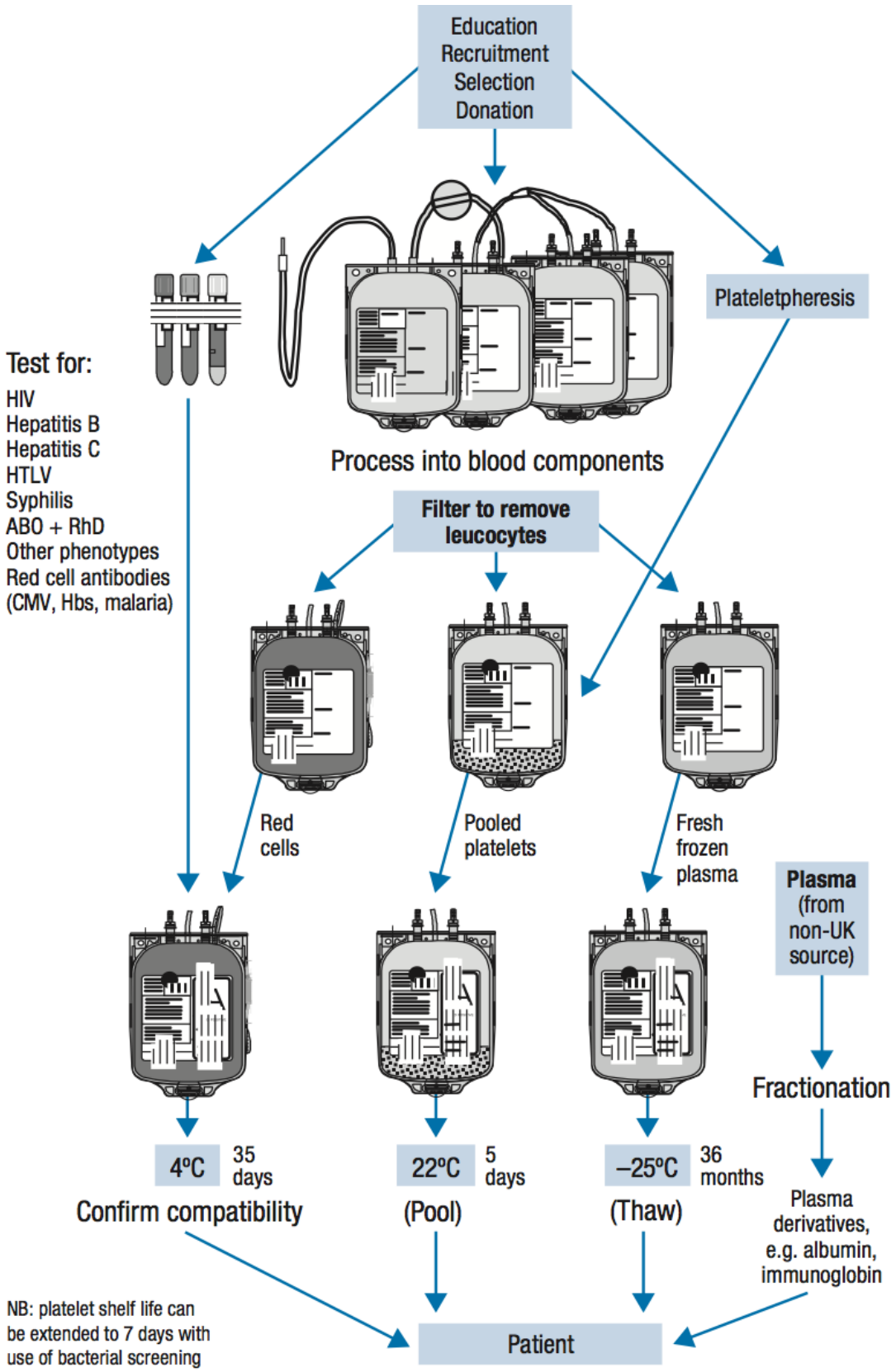
ไวรัส และพิษต่างๆ รวมทั้งสิ่งกระตุ้นภูมิแพ้ โดยเซลล์ eosinophils เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มีอายุประมาณ 6 ชั่วโมงในเลือด

- Basophils เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มีขนาด 10-14 μm ซึ่งในน้ำเลือด 1 ลิตรสามารถพบได้ 0.01 - 0.15 × 10^9เซลล์ เป็นเซลล์ที่มีอัตราส่วนของนิวเคลียสต่อไซโทพลาซึมต่ำนิวเคลียสโดยปกติมี 2 ส่วนที่ซ้อนอยู่กับแกรนูล โดยในแกรนูลประกอบไปด้วย histamine, เอนไซม์ proteolytic, cytokines, และ heparin ที่ช่วยการแข็งตัวของเลือด

3. เกล็ดเลือด (Platlet) เป็นชิ้นส่วนของเซลล์เมกะคาริโอไซต์ (megakaryocyte) มีขนาดเล็กมาก รูปร่างไม่แน่นอน มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 ไมโครเมตร อายุประมาณ 10 วัน มีจำนวน 250,000 –500,000 ชิ้นต่อเลือด 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร โดยเป็นตัวการสำคัญในกระบวนการแข็งตัวของเลือด

4. พลาสมา (Plasma) เป็นของเหลวสีเหลืองอ่อน สำหรับให้องค์ประกอบต่างๆของเลือดละลายอยู่ โดยพลาสมาจะมีอยู่ประมาณ 55 % ของปริมาตรเลือดทั้งหมด ซึ่ง 90 % ของพลาสมาจะเป็นน้ำและส่วนที่เหลือจะเป็นโปรตีนต่างๆประมาณ 7-8 % ที่เกี่ยวข้องกับปัจจัยการแข็งตัวของเลือดและมี fibrinogen กลูโคส ฮอร์โมน อิออนต่างๆ และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (Docherty, 2012)

ในการเตรียมส่วนประกอบของโลหิตที่ได้จากผู้บริจาคโลหิตนั้น โลหิตรวมปริมาตร 350 หรือ 450 มิลลิลิตร ในถุงแบบ double, triple, quadruple หรือ penta ถูกผสมอยู่กับสาร CPDA-1 หรือสารเติมแต่ง และถูกนำแยกส่วนประกอบของโลหิตภายใน 5-8 ชั่วโมง ห้องที่ใช้สำหรับการเตรียมส่วนประกอบของโลหิตนี้ควรเป็นห้องที่ถูกสุขอนามัย แยกออกต่างหาก เพื่อลดการปนเปื้อน และต้องคำนึงถึงข้อควรระวังต่างๆเพื่อหลีกเลี่ยงโอกาสที่ก่อให้เกิดการปนเปื้อน เช่น การสัมผัสของส่วนปลายอุปกรณ์ การจัดสมดุลของถุงด้านตรงข้ามภายในเครื่องปั่นเหวี่ยง โดยการแยกส่วนประกอบของโลหิตนี้จะใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) มีการปั่นแยก 2 แบบ คือ heavy spin (e.g., 5000 G for 10-15 min) และ light spin (e.g., 1500 G for 5-7 min) การเตรียม red blood cells (PRBCs) และ fresh frozen plasma (FFP) ใช้การปั่นเหวี่ยง heavy spin เพียงครั้งเดียว ในขณะที่การเตรียม platelet concentrates (PLTCs) PRBC concentrates และ FFP จะทำการปั่น 2 ครั้ง (Debdatta & Rajendra, 2014) ซึ่งขั้นตอนการเตรียมส่วนประกอบของโลหิตนี้สามารถสรุปได้ดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2. 1 แผนผังสรุปการแยกส่วนประกอบของโลหิตและอนุพันธ์ของโลหิต (Derek, 2013)

หลังจากที่ทำการแยกส่วนประกอบของโลหิตแล้ว ต้องมีการเก็บรักษาส่วนประกอบและอนุพันธ์ของโลหิตให้อยู่ในสภาวะที่เหมาะสม เพื่อให้ส่วนประกอบและอนุพันธ์ของโลหิตนั้นมีประสิทธิภาพสูงสุดที่จะนำไปใช้กับผู้ป่วย ทั้งนี้ยังรวมถึงสภาวะที่ใช้ในการขนส่งด้วย

2.1.3 การเก็บ การขนส่งและอายุการเก็บโลหิตและส่วนประกอบโลหิต

โลหิตที่ได้จากการบริจาคต้องมีการขนส่งไปยังศูนย์โลหิตภายใต้อุณหภูมิที่เหมาะสม มั่นคง ปลอดภัย และถูกสุขลักษณะตามขั้นตอนการปฏิบัติงานที่ถูกต้อง ซึ่งประเทศไทยมีขั้นตอนปฏิบัติงานการเก็บ การขนส่งและอายุการเก็บโลหิตและส่วนประกอบโลหิต (Requirement for storage, transportation and expiration of blood and components) ตามมาตรฐานธนาคารเลือดและงานบริการโลหิต ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ซึ่งได้กำหนดสภาวะการเก็บ การขนส่งและอายุการเก็บโลหิตและส่วนประกอบโลหิต ดังตารางที่ 2.1 ทั้งนี้เพื่อให้มีความเข้าใจที่ถูกต้องสำหรับการปฏิบัติ เพื่อให้เกิดการใช้ประโยชน์ที่สูงสุดจากการบริจาคโลหิต

ในการเจาะเก็บโลหิตจากผู้บริจาคโลหิตต้องทำในระบบปิดและด้วยเทคนิคที่ทำให้ปราศจากเชื้อ เพื่อป้องกันการติดเชื้อของผู้บริจาคโลหิตและผู้รับโลหิต ซึ่งยูนิตของโลหิตและส่วนประกอบของโลหิตนั้นควรสะอาดและปราศจากเชื้อ จึงมีการใช้ภาชนะรองรับโลหิตที่เป็นระบบปิด ซึ่งส่วนใหญ่แล้วมักเป็นถุงบรรจุโลหิตที่เป็นพลาสติก เนื่องจากมีความสะดวกต่อการใช้งาน ในกระบวนการเจาะเก็บโลหิต กระบวนการเตรียมส่วนประกอบของโลหิต รวมถึงการเก็บรักษาและการขนส่งส่วนประกอบของโลหิตไปยังผู้ป่วย ฉะนั้นการออกแบบถุงที่บรรจุโลหิตจึงต้องคำนึงถึงการใช้งานที่ง่าย และความปลอดภัยในการป้องกันรักษาโลหิตให้ยังคงคุณสมบัติและคุณภาพ ในระหว่างของกระบวนการบริจาคโลหิตนี้จนถึงผู้ที่รับโลหิต (ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย, 2015)

ตารางที่ 2. 1 ข้อกำหนดการเก็บ การขนส่งและอายุการเก็บโลหิตและส่วนประกอบโลหิต (ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย, 2015)

ลำดับที่	ส่วนประกอบโลหิต	การเก็บรักษา	การขนส่ง	อายุการเก็บ	ข้อกำหนดเพิ่มเติม
1	โลหิตรวม (Whole Blood)	1-6 °C ยกเว้นถ้าจะเตรียมเกล็ดเลือด เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 20-24 °C	1-10 °C	ACD, CPD, CP2D 21 วัน CPDA-1 35 วัน	
2	โลหิตฉายรังสี (Irradiated Whole Blood)	1-6 °C	1-10 °C	28 วันหลังจากการฉายรังสี ยกเว้นโลหิตจะหมดอายุก่อน	
3	เม็ดเลือดแดงเข้มข้น (Red Blood Cells)	1-6 °C	1-10 °C	ACD, CPD, CP2D 21 วัน CPDA-1 35 วัน Additive solution 42 วัน Open system 24 ชั่วโมง	
4	เม็ดเลือดแดงแช่แข็งที่ล้างน้ำยา glycerol ออก	1-6 °C	1-10 °C	24 ชั่วโมง	
5	เม็ดเลือดแดงแช่แข็ง (Frozen RBCs) 40 % glycerol 20 % glycerol	≤ -65 °C ≤ -120 °C	สภาพแช่แข็ง	10 ปี (กรณีเก็บโลหิตแช่แข็งเกิน 10 ปี ต้องกำหนดเป็นนโยบาย	แช่แข็งภายใน 6 วันหลังการเจาะเก็บ -ถ้าใส่ additive solution แช่แข็งก่อนโลหิตหมดอายุ

ตารางที่ 2.1 ข้อกำหนดการเก็บ การขนส่งและอายุการเก็บโลหิตและส่วนประกอบโลหิต (ต่อ)

ลำดับที่	ส่วนประกอบโลหิต	การเก็บรักษา	การขนส่ง	อายุการเก็บ	ข้อกำหนดเพิ่มเติม
6	เม็ดเลือดแดงเข้มข้นฉายรังสี (Irradiated RBCs)	1-6 °C	1-10 °C	28 วันหลังจากการฉายรังสี ยกเว้นโลหิตจะหมดอายุก่อน	
7	เม็ดเลือดแดงที่มีจำนวนเม็ดเลือดขาวน้อย (Leuko-reduced RBCs)	1-6 °C	1-10 °C	ACD, CPD, CP2D 21 วัน CPDA-1 35 วัน Additive solution 42 วัน Open system 24 ชั่วโมง	
8	เม็ดเลือดแดงที่ล้างแล้ว (Washed RBCs)	1-6 °C	1-10 °C	24 ชั่วโมง	
9	เกล็ดเลือดเข้มข้น (Platelet Concentrate, PC) รวมถึงเกล็ดเลือดเข้มข้นทุกชนิดที่เตรียมโดยวิธีปั่นแยก	20-24 °C มีการเขย่าเบาๆ ตลอดเวลา	20-24 °C	4 ชั่วโมง (เตรียมแบบ open system) หรือ 5 วัน (เตรียมแบบ closed system) ขึ้นกับชนิดของถุงที่ใช้เจาะเก็บโลหิต	ถ้าไม่มีการเขย่าตลอดเวลาเก็บได้นาน 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 2.1 ข้อกำหนดการเก็บ การขนส่งและอายุการเก็บโลหิตและส่วนประกอบโลหิต (ต่อ)

ลำดับที่	ส่วนประกอบโลหิต	การเก็บรักษา	การขนส่ง	อายุการเก็บ	ข้อกำหนดเพิ่มเติม
10	เกล็ดเลือดเข้มข้นฉายรังสี (Irradiated PC)	20-24 °C มีการเขย่าเบาๆ ตลอดเวลา	20-24 °C	4 ชั่วโมง หรือ 5 วัน ขึ้นกับชนิดของถุงที่ใช้เจาะเก็บโลหิต และระบบการเตรียม (open หรือ closed system)	ถ้าไม่มีการเขย่าตลอดเวลาเก็บได้นาน 24 ชั่วโมง
11	เกล็ดเลือดเข้มข้น ที่มีจำนวนเม็ดโลหิตขาวน้อย โดยการกรองชนิด Open system (Leukocyte-reduced PC)	20-24 °C มีการเขย่าเบาๆ ตลอดเวลา	20-24 °C	4 ชั่วโมง	
12	เกล็ดเลือดเข้มข้นชนิดรวมถุงที่มีจำนวนเม็ดเลือดขาวต่ำ (Pooled Leukocyte-poor PC)	20-24 °C มีการเขย่าเบาๆ ตลอดเวลา	20-24 °C	5 วันหลังเจาะเก็บโลหิต เนื่องจากเป็นระบบปิด และใช้ถุงพลาสติกชนิดเก็บเลือดได้ 5 วัน	ถ้าไม่มีการเขย่าตลอดเวลาเก็บได้นาน 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 2.1 ข้อกำหนดการเก็บ การขนส่งและอายุการเก็บโลหิตและส่วนประกอบโลหิต (ต่อ)

ลำดับที่	ส่วนประกอบโลหิต	การเก็บรักษา	การขนส่ง	อายุการเก็บ	ข้อกำหนดเพิ่มเติม
13	Pooled PC หรือ Washed PC โดยวิธี open system	20-24 °C มีการเขย่าเบาๆ ตลอดเวลา	20-24 °C	4 ชั่วโมง	ถ้ารวมโดยเครื่องเชื่อมสายปลอดเชื้อเก็บได้นานเท่า closed system
14	เม็ดเลือดขาวเข้มข้น (Granulocytes)	20-24 °C	20-24 °C	24 ชั่วโมง	รีบให้ผู้ป่วยโดยเร็วที่สุด
15	เม็ดเลือดขาวเข้มข้นฉายรังสี (Irradiated Granulocytes)	20-24 °C	20-24 °C	เท่าเดิม	รีบให้ผู้ป่วยโดยเร็วที่สุด
16	Cryoprecipitated AHF	≤-18 °C	สภาพแช่แข็ง	12 เดือน (นับจากวันเจาะ)	เตรียมโดยละลาย FFP ที่อุณหภูมิ 1-6 °C ให้แช่แข็ง cryoprecipitate ภายใน 1 ชั่วโมงหลังจากการแยก FFP
17	ไครโอปรีซิปิเตทที่ละลายแล้ว (Cryoprecipitated AHF, thawed)	20-24 °C	20-24 °C	4 ชั่วโมง (pooled หรือ open system) 6 ชั่วโมง (ถุงเดียว)	ละลายที่อุณหภูมิ 30-37 °C

ตารางที่ 2.1 ข้อกำหนดการเก็บ การขนส่งและอายุการเก็บโลหิตและส่วนประกอบโลหิต (ต่อ)

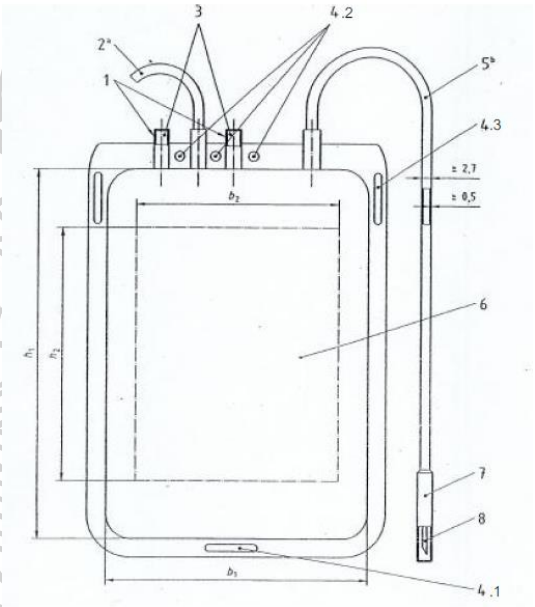
ลำดับที่	ส่วนประกอบโลหิต	การเก็บรักษา	การขนส่ง	อายุการเก็บ	ข้อกำหนดเพิ่มเติม
18	พลาสมาสดแช่แข็ง (FFP)	≤-18 °C ≤-65 °C	สภาพแช่แข็ง	12 เดือน (≤-18 °C) 7 ปี (≤-65 °C)	แช่แข็งภายในเวลา 8 ชั่วโมง ถ้าแยกได้จากเลือดที่เจาะใส่ CPD, CP2D, CPDA-1
19	พลาสมาสดแช่แข็งที่ละลายแล้ว (FFP, thawed)	1-6 °C	1-10 °C	24 ชั่วโมง	ละลายที่อุณหภูมิ 30-37 °C
20	พลาสมาที่เหลือจากการแยกไครโอปริซิปิเตท (Cryo-removed plasma)	≤-18 °C ≤-40 °C	สภาพแช่แข็ง	12 เดือน 5 ปี	
21	พลาสมาที่เหลือจากการแยกไครโอปริซิปิเตทที่ละลายแล้ว (Cryo-removed plasma, thawed)	1-6 °C	1-10 °C	24 ชั่วโมง	ละลายที่อุณหภูมิ 30-37 °C

หมายเหตุ ACD คือ Acid Citrate Dextrose, CPD คือ Citrate Phosphate Dextrose, CP2D คือ Citrate Phosphate Dextrose ที่มี dextrose เป็น 2 เท่า

CPDA คือ Citrate Phosphate Dextrose ที่มีการเติม Adenin

2.2 ภาชนะบรรจุโลหิต

ถุงบรรจุโลหิต คือภาชนะพลาสติกที่ใช้บรรจุโลหิตและส่วนประกอบของโลหิต มักบรรจุน้ำยาป้องกันการแข็งตัวของโลหิต และ/หรือน้ำยาเก็บรักษาสภาพส่วนประกอบของโลหิต ซึ่งเป็นถุงเดี่ยวหรือถุงหลักของถุงชุด ส่วนถุงอื่นๆ ที่มิใช่ถุงหลักของถุงชุดอาจมีน้ำยารักษาสภาพโลหิตหรือส่วนประกอบของโลหิตด้วยก็ได้ โดยมีอุปกรณ์ needle, collection tube, port และอาจมีหรือไม่มีอุปกรณ์ประกอบอื่นก็ได้ (คณะกรรมการเครื่องมือแพทย์, 2559) ซึ่งมักมีส่วนประกอบโดยทั่วไปตามรูปที่ 2.2



รูปที่ 2. 2 ลักษณะทั่วไปของถุงบรรจุโลหิต 1. ฝาหรือปลอกหุ้ม(protector) 2. สายส่ง (transfer tube) และที่ปิด(ถ้ามี) 3. ทางออก (outlet port) 4.1 หูหรือรูแขวนสำหรับกรณีให้โลหิตหรือส่วนประกอบของโลหิต (eyelet) 4.2 รูแขวนสำหรับกรณีแยกส่วนประกอบของโลหิต 4.3 รูเสียบหลอดโลหิตตัวอย่าง(ถ้ามี) 5. สายเข้า (collection tube) 6. บริเวณแสดงเครื่องหมายและฉลาก (label area) 7. ปลอกหุ้มเข็ม (protective cap) 8. เข็มแทงเข้าเส้นโลหิต (blood-taking needle) (กระทรวงอุตสาหกรรม, 2555)

2.2.1 ลักษณะของถุงบรรจุโลหิต

ถุงบรรจุโลหิตที่มีการใช้ในประเทศไทยต้องผ่านการการตรวจสอบมาตรฐานที่ต้องมีลักษณะตามที่กำหนดในมาตรฐานอุตสาหกรรม ซึ่งลักษณะของถุงบรรจุโลหิตที่ได้มาตรฐานควรมีลักษณะดังนี้

1. มีความโปร่งแสง ไม่มีสีหรือออกเหลืองเล็กน้อย มีความนิ่มหยุ่นตัว และไม่เหนียวเยิ้ม

2. ไม่ทำให้น้ำยาป้องกันการแข็งตัวของโลหิตหรือน้ำยาเก็บรักษาสภาพส่วนประกอบของโลหิตมีความผิดปกติ เช่น ขุ่น ตกตะกอน

3. สายเข้าและสายส่ง ต้องไม่มีข้อบกพร่องใดๆ เช่น ปริ แฟบ บิด พับ พับไขว้ โดยสายเข้าต้องมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในไม่น้อยกว่า 2.7 มิลลิเมตร ผนังท่อหนาไม่น้อยกว่า 0.5 มิลลิเมตร และยาวไม่น้อยกว่า 800 มิลลิเมตร สายส่งต้องมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน ไม่น้อยกว่า 2.7 มิลลิเมตร ผนังท่อหนาไม่น้อยกว่า 0.5 มิลลิเมตร และยาวไม่น้อยกว่า 200 มิลลิเมตร ซึ่งทั้งสายเข้าและสายส่งของแต่ละชุดต้องมีหมายเลขเดียวกัน ที่ติดถาวร โดยมีระยะห่างกันแต่ละช่วงไม่เกิน 7 เซนติเมตร

4. ทางออกของถุงบรรจุโลหิตต้องมีอย่างน้อย 1 ทาง เพื่อเป็นทางให้โลหิตและส่วนประกอบของโลหิตไหลออกไปยังชุดสำหรับให้โลหิต ทางออกนี้ก่อนใช้ต้องมีฝาหรือปลอกผนึกปิดอยู่เพื่อป้องกันการสัมผัส ภายในมีไดอะแฟรมที่เมื่อเจาะแล้วจะเสียไป ใช้ใหม่ไม่ได้อีก เพื่อรักษาสภาพการปราศจากเชื้อภายในไว้ และต้องมีขนาดพอเหมาะกับเข็มเจาะของชุดสำหรับให้โลหิต โดยเมื่อเสียบเข็มเข้าไปแล้วต้องอุดทางออกก่อนที่ปลายเข็มจะเจาะไดอะแฟรม

5. การเชื่อมต่อระหว่างสายกับตัวถุงต้องมีการเชื่อมต่อเข้ากับตัวถุงได้แน่นสนิท ไม่รั่วซึม

6. เข็มแทงเข้าเส้นโลหิตต้องมีมิติ มีความทนต่อการกัดกร่อน ความแข็งตึง และทนทานต่อการแตกหัก โดยเข็มต้องติดกับปลายสายเข้า มีปลอกหุ้มเข็มที่รักษาสภาพปราศจากเชื้อได้ ไม่รั่วซึม ถอดออกได้ง่าย มีการป้องกันการสัมผัสกับตัวเข็ม ในกรณีที่ต้องทำลายผนึกก่อนถอดออก เมื่อทำลายผนึกแล้วต้องผนึกกลับเข้าไปใหม่ไม่ได้ ซึ่งอาจมีอุปกรณ์ป้องกันเข็มแทงผู้ปฏิบัติการหรือถุงบรรจุ

7. หูหรือรูแขวนสำหรับแขวนและเสียบหลอดเก็บตัวอย่างโลหิตที่ไม่เป็นอุปสรรคในการชูถุงบรรจุโลหิตในกรณีต่างๆ เช่น เจาะ แยก เก็บ และใช้โลหิต (กระทรวงอุตสาหกรรม, 2555)

2.2.2 ชนิดของถุงบรรจุโลหิต

ถุงบรรจุโลหิตที่มีการใช้งานในปัจจุบันสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ลักษณะตามวัตถุประสงค์การใช้งาน คือ

1. ชนิดหนึ่งถุง (Single Blood Bag) เป็นถุงที่ใช้บรรจุโลหิตในการเปลี่ยนถ่ายโลหิต โดยมีน้ำยากันโลหิตแข็งบรรจุอยู่ภายในถุงด้วย

2. ชนิดสองถุง (Double Blood Bag) มีการออกแบบมาเพื่อการเก็บและแยกโลหิต สำหรับในส่วนเม็ดเลือดแดง และพลาสมา ประกอบด้วยถุง satellite 2 ถุง ซึ่งภายในถุงแรกจะมีการบรรจุน้ำยากันโลหิตแข็งเอาไว้

3. ชนิดสามถุง (Triple Blood Bag) เป็นชุดถุงที่ใช้สำหรับแยกองค์ประกอบของโลหิตออกเป็น 3 ส่วน คือ เม็ดเลือดแดง เกล็ดเลือด และพลาสมา โดยการปั่นเหวี่ยงและการแยก โดยภายในถุงจะมีการบรรจุน้ำยากันโลหิตแข็งและน้ำยาเสริมสำหรับเก็บเม็ดโลหิตแดง

4. ชนิดสี่ถุง (Quadruple Blood Bag) เป็นชุดถุงที่ใช้สำหรับแยกองค์ประกอบของโลหิตออกเป็น 4 ส่วน คือ เม็ดเลือดแดง เกล็ดเลือด พลาสมา และcryoprecipitate หรือ leukocyte โดยการปั่นเหวี่ยงและการแยก ซึ่งภายในถุงจะมีการบรรจุน้ำยากันโลหิตแข็งและน้ำยาเสริมสำหรับเก็บเม็ดโลหิตแดง (Srinivas, 2016)

2.2.3 ประวัติของภาชนะบรรจุโลหิต

จากปัญหาความต้องการโลหิตในปริมาณมากช่วงสงครามโลกครั้งที่ 2 หรือประมาณปี ค.ศ. 1939-1945 ขวดแก้วจึงถือได้ว่าเป็นวัสดุชนิดแรกที่มีการนำมาใช้ในการบรรจุโลหิตมนุษย์ อย่างไรก็ตาม การใช้ขวดแก้วนั้นมีความไม่สนิทระหว่างตัวขวดแก้วและจุกยางที่ใช้ปิดขวดแก้ว จะทำให้มีฟองอากาศเกิดขึ้นภายในขวด และอาจก่อให้เกิดการปนเปื้อนของแบคทีเรียจากสิ่งแวดล้อมภายนอก ในสภาวะการเก็บได้ ซึ่งจะมีผลให้เกิดการแตกของเม็ดเลือดแดง จนนำไปสู่การเกิดสภาวะแทรกซ้อนรุนแรงในระหว่างการถ่ายเลือด ซึ่งจากปัญหาดังกล่าว ในปี ค.ศ. 1950 Carl Walter ได้ให้แนวคิดเกี่ยวกับถุงปิดผนึกอย่างแน่นหนาที่ทำจากพลาสติกซึ่งมีพื้นผิวแบบ hemorepellent เนื่องจากภาชนะบรรจุแบบพลาสติกสามารถจัดการได้ง่าย มีความยืดหยุ่น และใช้งานได้ง่ายในการแยกส่วนประกอบของโลหิต ซึ่งวัสดุส่วนใหญ่ที่นิยมใช้จะเป็นกลุ่มของพอลิเมอร์ อาทิเช่น polyvinyl chloride (PVC) Polyethylene Polypropylene Polystyrene Polycarbonate Acetal copolymers และพอลิเมอร์ที่มีการสังเคราะห์ทางเทคโนโลยีชีวภาพ กระทั่งช่วงสงครามเกาหลี อเมริกามีการเริ่มใช้ถุงพลาสติกชนิด PVC ในการบรรจุโลหิต แต่ถุง PVC ก็ยังไม่ปรากฏถึงการใช้ที่แน่ชัด มีเพียงแต่กล่าวถึงการใช้ถุง polyvinyl resin (Ausman & Bellamy, 1984); (Deepak & Umesh, 2010)

การถือกำเนิดของถุงบรรจุโลหิตเป็นความก้าวหน้าที่สำคัญในประวัติศาสตร์ของการเก็บและการถ่ายโลหิต อันเป็นการพัฒนาให้เกิดการขับเคลื่อนในวงการแพทย์ ซึ่งในปี 1980 ถุงบรรจุโลหิตแทบทุกแบบผลิตจาก PVC ร่วมกับ di-(2-etylhexyl)-phthalate (DEHP) ที่เป็น plasticizer ในการบรรจุโลหิตชนิดต่างๆ ได้แก่ โลหิตรวม เม็ดเลือดแดง เกล็ดเลือด พลาสมา ได้เป็นเวลานาน โดยมีผล hemolysis น้อยและได้เม็ดเลือดแดงที่รอดชีวิตได้ดีกว่าการเก็บในภาชนะแก้ว ซึ่ง DEPH สามารถรักษาความเสถียรของเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดง จึงช่วยยับยั้งการเกิด hemolysis ได้ ทำให้ถุงบรรจุโลหิต PVC/DEHP เป็นที่ยอมรับสำหรับการใช้บรรจุโลหิต อย่างไรก็ตามถุงบรรจุโลหิต PVC/DEHP จะมีการปลดปล่อย DEHP ออกมาบางส่วน ในระดับต่ำและปลอดภัยต่อผู้รับโลหิต แต่อาจมีความเสี่ยงในกลุ่มผู้รับโลหิตที่เป็นทารก จึงมีการกำหนดให้มีการลดปริมาณ DEHP ในกลุ่ม

ผู้ใช้ดังกล่าว เนื่องจาก PVC/DEHP มีความแข็งแรง โปร่งใส ยืดหยุ่น การหลอมขึ้นรูป และการเก็บรักษาง่าย จึงทำให้อุปกรณ์ทางการแพทย์แทบทุกชนิดทำจาก PVC ที่มี DEHP (Stig, 2008)

2.2.4 วัสดุที่ใช้ทำภาชนะ (ถุง) บรรจุโลหิต

ถุงบรรจุโลหิตที่มีการจำหน่ายในปัจจุบัน ถูกผลิตมาจากบริษัทต่างๆทั่วโลก ซึ่ง Prowse และคณะ (ค.ศ. 2014) ได้ทำการสำรวจถึงบริษัทที่ผลิตถุงบรรจุโลหิตตามแบบสอบถามของ The Biomedical Excellence for Safer Transfusion Collaborative (BEST Collaborative's Conventional Components Team) โดยในการสำรวจครั้งนี้มีทั้งบริษัทที่เคยผ่านการสำรวจของ BEST รวมถึงบริษัทที่ไม่ไม่เคยผ่าการสำรวจ ดังตารางที่ 2.2 ซึ่งการสำรวจครั้งนี้ยังไม่ครอบคลุมถึงทุกบริษัทที่ทำการผลิต ซึ่งส่วนใหญ่เป็นตัวแทนของบริษัทผู้ผลิตถุงบรรจุโลหิตในยุโรปและอเมริกาเหนือ

ตารางที่ 2.2 บริษัทผลิตถุงบรรจุโลหิต (Prowse et al., 2014)

America n Fluoroseal Corp	Grifols
CaridianBCT[a]	Haemonetics[b]
Cerus	MacoPharma
Fenwal[c]	Pall[b]
Fresenius Kabi[c]	Terumo[a]

หมายเหตุ [a]CaridianBCT and Terumo have since merged into TerumoBCT.

[b]Haemonetics has recently acquired Pall.

[c]Fresenius Kabi has recently acquired Fenwal.

ปัจจุบันถุงพลาสติกบรรจุโลหิตมีการพัฒนาให้มีความปลอดภัยและประสิทธิภาพในการแยกและจัดเก็บส่วนประกอบของเลือด เพื่อการใช้งานแทนขวดแก้ว เนื่องจากสามารถช่วยป้องกันการปนเปื้อน การแตกหัก และการอุดตันของอากาศ รวมถึงการเตรียมส่วนประกอบของโลหิตที่ปราศจากเชื้อและง่ายต่อการแยกจัดเก็บ พลาสติกที่จะนำมาใช้ในการผลิตถุงบรรจุโลหิตนี้ต้องมีความทนทานต่ออุณหภูมิที่ใช้ในการฆ่าเชื้อและการเก็บแช่แข็ง มองเห็นได้ชัด และมีความแข็งแรงพอที่จะทนต่อกระบวนการปั่นเหวี่ยงและความดัน พลาสติก PVC (polyvinyl chloride) เป็นพอลิ-เมอร์ที่มีการใช้งานมานานกว่า 60 ปี ทั้งในการผลิตอุปกรณ์ทางการแพทย์ และการผลิตถุงบรรจุโลหิตตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน (Iverson et al., 2004) โดย PVC เป็นพลาสติกที่นิยมใช้ที่มีโมเลกุลของ chloride ประกอบอยู่ ซึ่งมีคุณสมบัติที่ปลอดภัย อันเป็นที่น่าเชื่อถือ และเป็นวัสดุที่มีประสิทธิภาพสูงที่มีความอ่อนนุ่มและยืดหยุ่นดี จึงเป็นคุณสมบัติที่ต้องการในทางการแพทย์โดยเฉพาะถุงบรรจุโลหิต (PVCMed Alliance, 2016) อย่างไรก็ตาม พลาสติก PVC มีการใช้สารเติมแต่งชนิด di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) ในการผลิตถุงบรรจุโลหิต โดยมีอัตราส่วนของ PVC ที่

ประมาณ 55 % และสารเติมแต่งอีกประมาณ 40 % โดยน้ำหนัก ซึ่งให้ DEHP-PVC ที่เป็นส่วนสำคัญของถุงบรรจุโลหิต และอุปกรณ์ทางการแพทย์ เนื่องจาก DEHP มีข้อดีต่อการคงสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงในสภาวะการเก็บรักษาและช่วยให้เม็ดเลือดแดงมีการฟื้นตัวดีหลังจากการเปลี่ยนถ่ายโลหิต ฉะนั้นวัสดุ PVC ที่มี DEHP เป็นสารเติมแต่งจึงมีการผลิตและใช้งานกันอย่างกว้างขวาง ตารางที่ 2.3 แสดงข้อมูลเกี่ยวกับถุงบรรจุเก็บเม็ดเลือดแดง ตารางที่ 2.4 แสดงข้อมูลเกี่ยวกับถุงบรรจุเก็บเกล็ดเลือด (Prowse et al., 2014)

ตารางที่ 2. 3 ข้อมูลต่างที่เกี่ยวกับถุงบรรจุเก็บเม็ดเลือดแดง (Prowse et al., 2014)

Company	Bag name	Plastic	Plasticizer	Volume, ml	Film thickness, texture	Product limits	Manuf. code	Comment
CaridianBCT	N/A	PVC	DEHP	<627	0·36 mm, very slight texture on both sides	Max collect volume of 627 ml	Various	For WB. Classic plastic, not for PLT storage
CaridianBCT	N/A	PVC	DEHP	<627	0·47 mm, internally smooth on one side, very slight texture on the other	Max collect volume of 627 ml	Various	For apheresis. Classic plastic, not for PLT storage
Cerus	Transfufol 3226	PVC	DEHP	100–600	0·42 mm	Meets requirements for WB, RBC storage	N/A	Currently for Clinical Study use only
Fenwal	PL146	PVC	DEHP	100–600	0·38 mm, taffeta/matte	Meets requirements for WB, RBC storage	Blood containers	Stability studies for CPD, CPD-A1, SAG-M, ADSOL. Not very gas permeable plastic. Not for PLT storage. Steam sterilized
Fenwal	PL2209	PVC	BTHC	400–500	0·37 mm, taffeta/matte	Meets requirements for WB, RBC storage	Blood containers	Stability studies for CPD, CPD-A1, SAG-M, ADSOL Also for PLT and plasma storage. Steam sterilized
Fenwal	PL1813	PVC	DEHP	150–2000	0·38 mm taffeta/matte	Meets requirements for RBC storage	Transfer containers, Amicus, Auto-C, ALYX	Not very permeable plastic. Not for PLT storage. Sterilized by radiation. Used on apheresis kits and transfer containers
Fresenius Kabi	Compoflex	PVC	DEHP	17–600	0·38 mm			Classic plastic
Grifols	CPD bag	PVC	DEHP	450 (nominal)	0·40 mm, internally modified			
MacoPharma	A	PVC	DEHP	400–550	0·35 mm			Meets stability data and Guidelines for RBC concentrates (including leucoreduction) for CPD, CPDA-1, SAG-M, PAGGS-M, AS1
MacoPharma	B	PVC	DINCH	400–550	0·35 mm			Meets stability data and Guidelines for RBC concentrates

ตารางที่ 2.3 ข้อมูลต่างที่เกี่ยวกับถุงบรรจุเก็บเม็ดเลือดแดง (ต่อ)

Company	Bag name	Plastic	Plasticizer	Volume, ml	Film thickness, texture	Product limits	Manuf. code	Comment
								(including leucoreduction) for CPD, SAG-M
Pall	Standard PVC	PVC	DEHP	~400–650	0·43 mm; internally textured	Meets requirements for WB, RBC cell storage	Various	Classic plastic. Not sufficient gas permeability for PLT storage; steam sterilized; used with CPD, CPDA-1, and CP2D anticoagulants
Terumo	XT-150	PVC	DEHP	600 (nominal)	0·39 ± 0·05 mm	WB Collect 450 ml ± 10% or 500 ml ± 10%	Various	Stability studies for CPD, CPD-A1, OPTISOL. For RBC, plasma storage, suitable for 3 day PLT storage. Steam sterilized

PLT, platelet; WB, whole blood; BTHC, n-Butyryl tri-n-hexyl citrate; DEHP, Di (2-ethylhexyl) phthalate; DINCH, Di(isononyl) cyclohexane-1,2 dicarboxylate; EVA, ethylene vinyl acetate; PVC, Polyvinyl chloride; TOTM, Tri octyl trimellitate, identical to TEHTM, tri ethylhexyl trimellitate.

2.2.5 น้ำยากันโลหิตแข็งตัวและน้ำยาเสริมสำหรับเก็บเม็ดเลือดแดง

การเจาะเก็บโลหิตรวมในงานบริการโลหิตปัจจุบันจะเจาะเก็บลงในถุงบรรจุโลหิตที่มีน้ำยากันโลหิตแข็ง (anticoagulant) เพื่อป้องกันการแข็งตัว (prevent clotting) และถนอมโลหิตให้อยู่ได้นาน (cell preservation) โดยรักษาความมีชีวิตและการทำงานของเซลล์ภายในภาชนะบรรจุให้คงอยู่ในระหว่างการเก็บรักษาโลหิต ซึ่งน้ำยากันโลหิตแข็งที่มีการใช้ในงานบริการโลหิตนั้นมีส่วนประกอบต่างๆที่แตกต่างกัน แสดงดังตารางที่ 2.5

การเก็บรักษาโลหิตที่อุณหภูมิต่ำจะทำให้ glycolytic activity เกิดได้ช้าลง แต่เม็ดโลหิตยังคงมี metabolic activity ในระหว่างการเก็บรักษา มีการใช้สารอาหารและการลดลงของแหล่งพลังงานของเซลล์ (intracellular energy sources) และเนื่องจาก ATP มีความสัมพันธ์กับการรอดชีวิตหลังการถ่ายเลือด (post-transfusion viability) การพัฒนา สูตร anticoagulant-preservative จึงมุ่งไปที่การส่งเสริมการสร้าง ATP ซึ่งจำ เป็นต้องใช้สารช่วยที่มีหน้าที่ต่างๆ กันดังนี้

- Citrate เป็นตัวช่วยยับยั้งกระบวนการแข็งตัวของโลหิต (coagulation) ที่เกี่ยวข้องกับ calcium ด้วยการจับ (chelating) กับ calcium
- Dextrose ช่วยเสริมการสร้าง ATP ใน glycolytic pathways
- Sodium biphosphate ทำหน้าที่ช่วยควบคุม pH ที่ลดลงอันเนื่องมาจากการสร้าง lactic acidที่เป็น end product จาก glycolysis

ตารางที่ 2. 4 แสดงข้อมูลต่างที่เกี่ยวกับถุงบรรจุเก็บเกล็ดเลือด (Prowse et al., 2014)

Company	Bag name	Plastic	Plasticizer	Volume, ml	Film thickness, texture	Product limits	Manuf. code	Comment
American Fluoroseal Co	VueLife	FEP	None	30–3000	0·50 mm	Currently not used for PLT storage		No leachables. PLTs cannot stick to the surface, material is highly gas permeable
CaridianBCT	N/A	PVC	BTHC	1000	0·43 mm, internally smooth on one side, very slight texture on the other	Up to $5{\cdot}1 \times 10^{11}$ PLTs per bag	Various	Decline in PLT quality measures may be seen at upper yield limit for PLTs in PAS, dependent on processing methods, type of PAS, plasma carry-over, storage duration
Cerus	PL2411 Amotosalen Container	Polyolefin	None	20	0·30 mm, taffeta	N/A	N/A	Steam sterilized
Cerus	PL2410 Illumination Container	EVA blend	None	1000	0·32 mm, taffeta	N/A – in process container	N/A	Gamma sterilized
Cerus	PL2410 Platelet CAD Container	EVA blend	None	1000	0·32 mm, taffeta	N/A – in process container	N/A	Gamma sterilized
Cerus	PL2410 Platelet Storage Container	EVA blend	None	1300	0·32 mm, taffeta	N/A – in process container	N/A	Gamma sterilized. Good gas permeability
Fenwal	PL2209	PVC	BTHC	400–500	0·38 mm, taffeta/matte	Meets requirements for PLT storage	Blood containers	Steam sterilized
Fenwal	PL1240	PVC	TOTM	400–500	0·38 mm, taffeta/matte	Meets requirements for PLT storage	Blood containers	Steam sterilized
Fenwal	PL2410	Polyolefin	None	1000–1300	0·28 mm, taffeta/matte	Meets requirements for apheresis and pooled buffy coat PLT storage	Transfer containers, Pooling sets, Amicus	Very gas permeable. Specific for PLT storage. 7 days PLT shelf life.
Fresenius Kabi	Compoflex	PVC	DEHP	450–600	0·38 mm			Classic plastic for storage of single PLT concentrate
Fresenius Kabi	Compoflex	PVC	TOTM	450–600	0·38 mm			Classic plastic for storage of single PLT concentrate
Fresenius Kabi	Compoflex	PVC	DINCH	450–600	0·41 mm			Newer plastic for storage of single PLT concentrate
Fresenius Kabi	Compoflex F730	PVC	BTHC	1300	0·38 mm			Storage of pooled PLT concentrates
Fresenius Kabi		Polyolefin	None	1300	0·30 mm			Storage of pooled PLT concentrates
Fresenius Kabi		PVC	TOTM	1300	0·41 mm			Storage of pooled PLT concentrates
Grifols	Transfer bag	PVC	TOTM	300–400				

ตารางที่ 2.4 แสดงข้อมูลต่างที่เกี่ยวกับถุงบรรจุเก็บเกล็ดเลือด (ต่อ)

Company	Bag name	Plastic	Plasticizer	Volume, ml	Film thickness, texture	Product limits	Manuf. code	Comment
					0·39 mm, internally modified	Intended for PLT storage		PLT storage for up to 7 days from one unit of WB
Haemonetics	CPP	PVC	BTHC	1500	Taffeta external texture, inside smooth	Up to $5{\cdot}0 \times 10^9$		PLT storage
Haemonetics	PO80	Polyolefin	None	1500	Taffeta external texture, inside smooth			Japanese market only. For storage of PLTs
MacoPharma	A	PVC	TOTM	500–1800	0·35 mm			Meets Guidelines for leucoreduced PLTs up to 5 days storage
MacoPharma	B	PVC	BTHC	500–1800	0·38 mm			Meets Guidelines for leucoreduced PLTs up to 7 days storage
Pall	CLX	PVC	TOTM	~400–500	0·41 mm; internally textured	Meets requirements for PLT storage	Various	Appropriate gas permeability for PLT storage up to 5 days
Pall	CLX HP	PVC	TOTM	1500	0·41; internally textured	Meets requirements for PLT storage	732-80, 732-82, 732-83, 732-86	Appropriate gas permeability for pooled PLT concentrates up to 5 days
Pall	ELX	Polyolefin	None	1300	0·32 mm; internally smooth	Meets requirements for PLT storage	NFPIEU	For splitting apheresis PLTs. Non-leaching plastic; appropriate gas permeability for storage of pooled buffy coat PLT concentrates up to 7 days
Pall	ELX	Polyolefin	None	1300	0·32 mm; internally smooth	Meets requirements for PLT storage	ATSBC1E family	Single container with filter; see above
Pall	ELX HP	Polyolefin	None	1300	0·27 mm, internally smooth	Meets requirements for PLT storage	732-89 732-90	Non-leaching plastic; appropriate gas permeability for pooled buffy coat PLT concentrates up to 7 days
Terumo	XT-612	PVC	DEHP	500 (nominal)	0·32 ± 0·04 mm		Various	Steam Sterilized. Five day storage of WB derived PLTs, non-LR and LR. For RBC, plasma storage

PAS, platelet additive solution; PLT, platelet; RBC, red blood cell; WB, whole blood; BTHC, n-Butyryl tri-n-hexyl citrate; DEHP, Di (2-ethylhexyl) phthalate; DINCH, Di(isononyl) cyclohexane-1,2 dicarboxylate; ELX, polyolefin; EVA, ethylene vinyl acetate; FEP, Fluoroethyl propylene; HDPE, High-density polyethylene; PVC, Polyvinyl chloride; TOTM, Tri octyl trimellitate, identical to TEHTM, tri ethylhexyl trimellitate.

- Adenine เป็นสารเสริม (supplement) ที่ช่วยในการสังเคราะห์และเพิ่มระดับ ATP ในเซลล์เม็ดเลือดแดง จึงช่วยให้ความมีชีวิตของเซลล์ดีขึ้น เมื่อเทียบกับน้ำยาที่ไม่มี adenine

น้ำยาเสริมสำหรับเม็ดโลหิตแดง (additive solutions; AS) เป็นน้ำยาที่มีสารอาหารสำหรับเก็บรักษาเม็ดเลือดแดง AS ที่มีการใช้ในปัจจุบันมีหลายชนิด และมีรายละเอียดที่แตกต่างกันดังตารางที่ 2.6 ระบบของ additive system จะประกอบด้วย primary collection bag ที่มี anticoagulant-preservative และมีถุง พ่วง (satellite bag) อีกอย่างน้อย 2 ใบ โดยใบแรกจะเป็นถุงเปล่า (empty bag) และอีกใบจะมี AS อยู่ภายใน AS มีส่วนประกอบ ได้แก่ sodium chloride, dextrose, adenine และสารอื่นๆ ที่ช่วยเสริมความรอดชีวิตและการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดแดง ให้อยู่ได้ถึง 42 วัน ใน ชุดเจาะเก็บโลหิตขนาด 450 mL มักมีปริมาตร AS อยู่ 100 mL ซึ่งจะถูกผสมเข้ากับเซลล์เม็ดเลือดแดงจากถุง primary bag หลังจากที่แยกเอา plasma ออกไปแล้ว ทำให้สามารถแยก plasma ได้ในปริมาณสูงสุดและได้ RC ที่มี hematocrit ประมาณร้อยละ 60 ซึ่งเป็น ระดับที่ทำให้อัตราการไหลดีและง่ายต่อการให้โลหิต ส่วนเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ผสมเข้ากับ AS ซึ่งต้องผสมภายใน 72 ชั่วโมงภายหลังการเจาะโลหิต (phlebotomy) AS ที่ใช้ในท้องตลาดมีอยู่หลายชนิด ซึ่งที่ US FDA ยอมรับ และใช้ในสหรัฐอเมริกามี 3 ชนิดคือ AS-1 AS-3 และ AS-5 ส่วนที่ใช้ในยุโรปคือ SAGM น้ำยา AS แต่ละชนิดมีส่วนประกอบ ที่แตกต่างกันไปดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 2.6 ซึ่ง SAG เป็นน้ำยาเสริมชนิดแรกที่ถูกพัฒนาขึ้นในสวีเดนช่วงปลาย ทศวรรษ 1970 มีส่วนประกอบคือ saline, adenine และ glucose ต่อมามีการเติมสาร mannitol เพิ่มเข้าไปเป็นน้ำยา SAGM เพื่อ ช่วยชะลอการแตกของเม็ดโลหิต การใช้ระบบน้ำยาเสริมนอกจากช่วยเพิ่มระยะ เวลาเก็บรักษาเซลล์เม็ดเลือดแดง จาก 35 วัน (ใน CPDA-1) เป็น 42 วันแล้ว ยังมีข้อดีอื่นๆ ได้แก่ ช่วยลดความหนืด ช่วยกำจัด excessive nutrients ใน platelets และช่วยให้ควบคุมสัดส่วนของเซลล์เม็ดเลือดแดงต่ออาหารให้เหมาะสม การเก็บรักษาเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ 42 วัน ซึ่งน่าจะเป็นสิ่งที่เพียงพอสำหรับงานธนาคารเลือดในปัจจุบัน การยืดระยะเวลา เก็บรักษาให้นานกว่านี้เป็นสิ่งที่ทำ ได้ยากเนื่องจากภายหลัง 42 วัน การลดของ pH และการเปลี่ยนแปลงของ membrane จะอยู่ในขั้นวิกฤติ และยังไม่มีน้ำยาเสริมตัวใดที่สามารถรักษาระดับ 2,3- diphosphoglycerate (2,3-DPG) ให้คงอยู่ได้นานเกินกว่า 7-14 วัน (นรินทร์ กิจเกรียงไกรกุล, 2555)

ตารางที่ 2.5 น้ำยากันโลหิตแข็งชนิดต่างๆ (นรินทร์ กิจเกรียงไกรกุล, 2555)

Variable	ACD-A	ACD-B	CPD	CP2D	CPDA-1	4% Citrate
pH	4.5-5.5	4.5-5.5	5.3–5.9	5.3–5.9	5.3–5.9	6.4-7.5
Ratio (mL solution to blood)	1.5:10	2.5:10	1.4:10	1.4:10	1.4:10	0.625:10
FDA-approved shelf life (days)	Automated collection of RBCs, platelets, and FFP		21	21	35	Automated collection of plasma and for plasma exchange
Content (g in 1,000 mL solution)						
Citric Acid (anhydrous)	7.3	4.4	2.99	2.99	2.99	As needed for pH adjustment
Sodium Citrate (dihydrate)	22	13.2	26.3	26.3	26.3	40
Monobasic Sodium Phosphate (monohydrate)	-	-	2.22	2.22	2.22	-
Dextrose (monohydrate)	24.5	14.7	25.5	51.1	31.9	-
Adenine	-	-	-	-	0.275	-

โดย CPD = citrate-phosphate-dextrose; CP2D = citrate-phosphate-dextrose-dextrose; CPDA-1 = citrate-phosphate-dextrose-adenine; ACD-A = acid-citrate-dextrose (formula A); ACD-B = acid-citrate-dextrose (formula B); FDA = Food and Drug Administration; FFP = Fresh Frozen Plasma

ตารางที่ 2. 6 แสดงรายละเอียดส่วนประกอบน้ำยาเสริมสำหรับเก็บเม็ดเลือดแดง (นรินทร์ กิจเกรียงไกรกุล, 2555)

Composition	**SAG**	**SAGM**	**AS-1 (Adsol®)**	**AS-3 (Nutricel®)**	**AS-5 (Optisol®)**	**Circle Pack (Cir/Pk®)**
Dextrose	900	900	2200	1100	900	400
Adenine	17	17	27	30	30	7
Monobasic Sodium Phosphate	-	-	-	276	-	285
Mannitol	-	520	750	-	525	-
Sodium Chloride	877	877	900	410	877	718
Sodium Citrate	-	-	-	588	-	588
Citric Acid	-	-	-	42	-	42
Primary bag anticoagulant	CPD	CPD	CPD	CP2D	CPD	CP2D

SAG = saline-adenine-glucose; SAGM = saline-adenine-glucose- mannitol

2.3 มาตรฐานของถุงบรรจุโลหิต

ถุงบรรจุโลหิตเป็นเครื่องมือแพทย์ชนิดหนึ่งที่มีการใช้งานกันอย่างกว้างขวาง ที่ผู้ผลิต ผู้นำเข้า และผู้จำหน่ายต้องได้รับใบอนุญาต ซึ่งถุงบรรจุโลหิตต้องขายเฉพาะแก่สถานพยาบาล สภากาชาดไทย หรือผู้รับอนุญาตขายเครื่องมือแพทย์ โดยถุงบรรจุโลหิตต้องมีมาตรฐานและได้มีข้อกำหนดเป็นไปตามประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม ว่าด้วยเรื่อง มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม ภาชนะพลาสติกปราศจากเชื้อสำหรับบรรจุโลหิตและ ส่วนประกอบของโลหิต (มอก. 1298 -2555) หรือที่จะประกาศใช้ต่อไป แล้วแต่กรณี หรือ มาตรฐานสากลที่เทียบเท่า ยกเว้นเครื่องหมายและฉลาก ถุงบรรจุโลหิตต้องผลิตโดยผู้ผลิตที่ได้รับการรับรองระบบคุณภาพการผลิตสำหรับ ผลิตภัณฑ์ดังกล่าว ตามมาตรฐานระดับประเทศหรือมาตรฐานระหว่างประเทศ เช่น หลักเกณฑ์และ วิธีการที่ดีในการผลิต (GMP) มาตรฐานองค์กรระหว่างประเทศว่าด้วยการมาตรฐาน 13485 (ISO 13485) การตรวจสอบคุณภาพถุงบรรจุโลหิตให้เป็นไปตามมาตรฐานทั้งในระดับชาติและนานาชาติ เพื่อให้ตรงตามคุณลักษณะที่ต้องการ อาทิเช่น การทดสอบ

ทางกายภาพ การทดสอบทางเคมี และการทดสอบทางชีวภาพ ปัจจุบันการทดสอบทางชีวภาพนี้ถือได้ว่ามีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งในการตรวจสอบประเมินความปลอดภัยของถุงบรรจุโลหิตก่อนที่จะนำมาใช้งาน ถุงบรรจุโลหิตที่มีการผลิตหรือนำเข้าจากต่างประเทศนั้นต้องมีการตรวจประเมินคุณภาพอย่างเคร่งครัด เพื่อให้เกิดความปลอดภัยต่อผู้ให้และผู้รับโลหิต ฉะนั้นจึงต้องมีการตรวจสอบให้เป็นไปตามเกณฑ์ในระดับชาติ คือมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมสำหรับภาชนะพลาสติกปราศจากเชื้อสำหรับบรรจุโลหิตและส่วนประกอบของโลหิต (มอก.1298-2555) ที่กำหนดโดยกระทรวงอุตสาหกรรมของไทย ในส่วนของการประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง และ/หรืออาจใช้มาตรฐานการประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพของอุปกรณ์การแพทย์ที่เป็นสากล (ISO 10993)

ผู้รับอนุญาตผลิตหรือนำเข้าถุงบรรจุโลหิตที่ขายหรือมีไว้เพื่อขายภายในประเทศ จัดให้มีเอกสารกำกับเครื่องมือแพทย์เป็นภาษาไทยที่อ่านได้ชัดเจน และจะมีภาษาอื่นนอกจากภาษาไทยประกอบอยู่ด้วยได้ แต่ข้อความภาษาอื่นนั้นต้องมีความหมายตรงกับข้อความภาษาไทย โดยแสดงรายละเอียดอย่างน้อย ดังต่อไปนี้

(1) ชื่อผลิตภัณฑ์หรือชื่อการค้า

(2) ข้อความที่แสดงว่าเป็นถุงเดี่ยว หรือถุงชุด

(3) จำนวนถุงบรรจุโลหิตที่บรรจุ

(4) ชื่อและที่ตั้งของสถานที่ผลิต หรือสถานที่นำเข้า แล้วแต่กรณี ในกรณีเป็นผู้นำเข้า ให้แสดง ชื่อสถานที่ผลิต เมือง และประเทศที่ผลิตถุงบรรจุโลหิตด้วย

(5) ชื่อและปริมาตร เป็นมิลลิลิตรของน้ำยาป้องกันการแข็งตัวของโลหิตหรือน้ำยารักษาสภาพ ส่วนประกอบของโลหิต และสูตรส่วนประกอบของน้ำยานั้น (ถ้ามี)

(6) วัสดุที่ใช้ทำถุงบรรจุโลหิต

(7) วัตถุประสงค์การใช้ คำแนะนำการใช้ และวิธีการเก็บรักษา

(8) คำเตือน ข้อห้ามใช้ ข้อควรระวัง

(9) ข้อความที่แสดงว่า ถุงบรรจุโลหิตที่ใช้งานแล้วถือเป็นขยะติดเชื้อ (คณะกรรมการเครื่องมือแพทย์, 2559)

การทดสอบถุงบรรจุโลหิตจะมีการชักตัวอย่างและเกณฑ์ตัดสิน ถุงบรรจุโลหิต ให้เป็นไปตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 1298 ที่ประกาศใช้ล่าสุด โดยผู้รับอนุญาตผลิตหรือนำเข้าถุงบรรจุโลหิต จัดเก็บตัวอย่างถุงบรรจุโลหิตแต่ละรุ่น ที่ผลิตหรือนำเข้าตามเลขที่หรืออักษรแสดงครั้งที่ผลิตหรือนำเข้าที่ระบุไว้บนฉลากในจำนวนเพียงพอสำหรับการตรวจสอบหรือวิเคราะห์คุณภาพมาตรฐานและข้อกำหนด เป็นเวลาไม่น้อยกว่าอายุการใช้งาน ที่ระบุไว้บนฉลาก โดยทำ

บัญชีไว้เป็นหลักฐาน ในกรณีที่นำเข้าถุงบรรจุโลหิต ให้ผู้รับอนุญาตจัดทำฉลากเป็นภาษาไทยที่ภาชนะบรรจุ ให้ถูกต้องแล้วเสร็จก่อนขาย ทั้งนี้ ไม่เกินสามสิบวัน นับแต่พนักงานเจ้าหน้าที่ ณ ด่านตรวจสอบ เครื่องมือแพทย์ ได้ตรวจปล่อยให้นำเข้า

2.3.1 การทดสอบตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ด้านชีวภาพ

การควบคุมถุงบรรจุโลหิตตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม ภาชนะพลาสติกปราศจากเชื้อสำหรับบรรจุโลหิตและส่วนประกอบของโลหิต มาตรฐานเลขที่ มอก. 1298-2555 ของประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม ฉบับที่ 4449 (พ.ศ. 2555) ที่ออกตามความในพระราชบัญญัติมาตรฐานอุตสาหกรรม พ.ศ. 2511 แห่งราชอาณาจักรไทยนี้ เป็นมาตรฐานอุตสาหกรรมที่ครอบคลุมภาชนะพลาสติกปราศจากเชื้อที่ทำจากพอลิโอเลฟินหรือพอลิไวนิลคลอไรด์ สำหรับบรรจุโลหิตและส่วนประกอบของโลหิต และภาชนะพลาสติกที่บรรจุน้ำยาป้องกันการแข็งตัวของโลหิต และ/หรือ น้ำยาเก็บรักษาสภาพส่วนประกอบของโลหิต ที่ระบุถึงมาตรฐานในด้านต่างๆ ได้แก่ คุณลักษณะทั่วไป คุณลักษณะทางฟิสิกส์ คุณลักษณะทางเคมี และคุณลักษณะทางชีวภาพ

การทดสอบถึงคุณลักษณะทางชีวภาพของมาตรฐานอุตสาหกรรม (มอก. 1298-2555) ในด้านความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง (L929 cells line) เป็นการประเมินความเป็นพิษที่ได้จากการสกัดวัสดุถุงพลาสติกที่ใช้บรรจุโลหิตเพียงแบบเดียว โดยทำการประเมินสภาพของเซลล์หลังจากที่ปล่อยให้เซลล์เพาะเลี้ยงสัมผัสกับสารละลายทดสอบ สารละลายทดสอบควบคุม และ blank เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง จากนั้นดูลักษณะของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (inverted microscopy) แล้วบันทึกการตายของเซลล์ การเปลี่ยนแปลงเซลล์สัณฐาน (morphological change) และความหนาแน่นของเซลล์ที่มีชีวิต (cell density) โดยมีแนวการประเมินผลตามตารางที่ 2.7 ซึ่งระดับความเป็นพิษของตัวอย่างต้องมีค่าไม่มากกว่าระดับ 2 จึงจัดเป็นตัวอย่างที่ปลอดภัย (กระทรวงอุตสาหกรรม, 2555)

ตารางที่ 2. 7 การประเมินระดับความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง (กระทรวงอุตสาหกรรม, 2555)

ระดับความเป็นพิษ	ปฏิกิริยา (reactivity)	สภาพของเซลล์เพาะเลี้ยง (conditions of cell culture)
0	ไม่เป็นพิษ (none)	เซลล์แผ่เป็นชั้นเดียว มีเม็ดอินทราไซโทพลาสมิก (intracytoplasmic granule) กระจายอยู่ในเซลล์ปกติ ไม่พบการแตกทำลายของเซลล์
1	เป็นพิษน้อยมาก (slight)	เซลล์มีลักษณะกลม ใกล้หลุดออกจากพื้นผิว ไม่เกินร้อยละ 20 อาจพบการแตกทำลายของเซลล์ได้บ้าง
2	เป็นพิษน้อย (mild)	เซลล์มีลักษณะกลม ไม่เกินร้อยละ 50 อาจพบการแตกทำลายของเซลล์แต่ไม่รุนแรง และไม่พบช่องว่างระหว่างเซลล์ชั้นเดียว
3	เป็นพิษปานกลาง (moderate)	เซลล์มีลักษณะกลมหรือพบการแตกทำลายของเซลล์ ไม่เกินร้อยละ 70
4	เป็นพิษอย่างรุนแรง (severe)	การทำลายของเซลล์ชั้นเดี่ยวเกือบทั้งหมดหรือทั้งหมด

องค์การอาหารและยา (FDA) ได้จัดทำเอกสารที่เป็นแนวทางสำหรับอุตสาหกรรมเพื่อช่วยในการเตรียมพัฒนาผลิตภัณฑ์ถึงระดับก่อนออกสู่ตลาด (Premarket Applications (PMAs), Humanitarian Device Exceptions (HDEs), Investigational Device Applications (IDEs), Premarket Notifications (510(k)s), และ *de novo* request) สำหรับอุปกรณ์การแพทย์ที่ต้องสัมผัสกับร่างกายมนุษย์ ทั้งโดยตรงและโดยอ้อม โดยเอกสารที่จัดทำขึ้นนี้เป็นการรวบรวมข้อควรพิจารณาใหม่ๆ ซึ่งจะเกี่ยวข้องแนวทางในการประเมินความเสี่ยงของการทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพ ที่เป็นการประเมินทางเคมี และการเตรียมตัวอย่างสำหรับการทดสอบทางชีวภาพ ของอุปกรณ์ที่มีการผลิตจากกระบวนการของพอลิเมอร์ และ/หรือวัสดุที่ดูดซับ ซึ่งเอกสารที่จัดทำนั้นจะมีข้อจำกัดเฉพาะการประเมินทางชีวภาพของอุปกรณ์ทางการแพทย์ที่ปลอดเชื้อและไม่ผ่านการฆ่าเชื้อที่เข้ามาสัมผัสโดยตรงหรือโดยอ้อมกับร่างกายมนุษย์ ซึ่งครอบคลุมเฉพาะมาตรฐาน ISO 10993-1 แต่ยังเกี่ยวข้องกับมาตรฐานความเข้ากันได้ทางชีวภาพอื่นๆ การประเมินทางชีวภาพของอุปกรณ์ทางการแพทย์ (ISO 10993 - Biological evaluation of medical devices) จะดำเนินการเพื่อประเมินการยอมรับการตอบสนองทางชีวภาพที่อาจเกิดขึ้นจากการสัมผัสกับวัสดุที่เป็นส่วนประกอบของอุปกรณ์กับ

ร่างกาย ซึ่ง ISO 10993 ได้แบ่งย่อยหัวข้อการประเมินความปลอดภัยของอุปกรณ์การแพทย์เป็นส่วนๆ หลากหลายด้าน ดังนี้

ส่วนที่ 1 การประเมินและการทดสอบในขั้นตอนการจัดการความเสี่ยง

ส่วนที่ 2 ข้อกำหนดด้านสวัสดิภาพของสัตว์ทดลอง

ส่วนที่ 3 การทดสอบความเป็นพิษทางพันธุกรรม การก่อมะเร็งและผลต่อการจำลองพันธุกรรม

ส่วนที่ 4 การเลือกการทดสอบการมีปฏิสัมพันธ์กับเลือด

ส่วนที่ 5 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ในหลอดทดลอง

ส่วนที่ 6 การทดสอบผลกระทบเฉพาะที่หลังจากปลูกถ่าย

ส่วนที่ 7 เอทิลีนออกไซด์ที่ตกค้างหลังจากที่ทำให้ไร้เชื้อ

ส่วนที่ 8 การเลือกและคุณสมบัติของวัสดุอ้างอิงสำหรับการทดสอบทางชีววิทยา

ส่วนที่ 9 กรอบการระบุและการหาปริมาณผลิตภัณฑ์ที่มีศักยภาพในการย่อยสลาย

ส่วนที่ 10 การทดสอบความระคายเคืองและอาการแพ้ผิวหนัง

ส่วนที่ 11 การทดสอบความเป็นพิษของร่างกาย

ส่วนที่ 12 การเตรียมตัวอย่างและวัสดุอ้างอิง

ส่วนที่ 13 การระบุและการหาปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่สลายตัวได้จากอุปกรณ์ทางการแพทย์ที่เป็นพอลิเมอร์

ส่วนที่ 14 การระบุและการหาปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่สลายตัวจากเซรามิค

ส่วนที่ 15 การระบุและการหาปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่สลายตัวจากโลหะและโลหะผสม

ส่วนที่ 16 การออกแบบศึกษากลไกความเป็นพิษสำหรับผลิตภัณฑ์ที่สลายตัวได้

ส่วนที่ 17 การกำหนดขีดจำกัดที่ยอมรับได้สำหรับสารที่สามารถถูกชะออกมา

ส่วนที่ 18 ลักษณะทางเคมีของวัสดุ

ส่วนที่ 19 ลักษณะทางเคมีกายภาพ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและพื้นผิววัสดุ

ส่วนที่ 20 หลักการและวิธีการทดสอบความเป็นพิษต่อภูมิคุ้มกันของอุปกรณ์ทางการแพทย์ (International Organization for Standardization, 2016)

การเลือกแผนการทดสอบในการประเมินทางชีวภาพของอุปกรณ์การแพทย์ตาม ISO 10993 นั้น ต้องพิจารณาถึงวัสดุที่ใช้ ลักษณะของการสัมผัส และระยะเวลาที่สัมผัสของอุปกรณ์นั้นๆ ในการเลือกแผนการทดสอบที่เหมาะสม ดังแสดงในตารางที่ 2.8 ซึ่งถุงบรรจุโลหิตเป็นอุปกรณ์การแพทย์ที่มีการใช้งานภายนอกร่างกาย ที่ไม่เกี่ยวกับเส้นเลือดโดยตรง และมีระยะเวลาที่สัมผัสอยู่กับเลือดตั้งแต่ ช่วงเวลาน้อยกว่า 24 ชั่วโมง จนถึงมากกว่า 30 วัน โดยมีรายละเอียดของตัวอย่าง

ผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์ดังแสดงในตารางที่ 2.8 อย่างไรก็ตาม ISO 10993 ไม่ได้เป็นรายการตรวจสอบอย่างเป็นทางการ แต่เป็นคู่มือสำหรับข้อกำหนดด้านข้อมูลโดยทั่วไปสำหรับเจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้อง ไม่ว่าจะเป็นผู้ผลิตและผู้จัดการ ในการออกแบบแผนการทดสอบที่เหมาะสมในแต่ละอุปกรณ์ ซึ่งรายละเอียดของการทดสอบจะมีความเฉพาะเจาะจงกับแต่ละอุปกรณ์และการใช้งานของอุปกรณ์นั้นๆ แต่การทดสอบอาจมีความคล้ายคลึงกันสำหรับอุปกรณ์หลายประเภท (Bigham, 2017)

การประเมินความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (Evaluation of Biocompatibility) ถือเป็นการพิจารณาที่สำคัญในการประเมินวัสดุที่มีการใช้งานในทางการแพทย์ เพื่อให้เกิดความปลอดภัยในการใช้งานของผลิตภัณฑ์ ซึ่งตามมาตรฐานสากล ISO 10993 สามารถแบ่งการทดสอบการประเมินความเข้ากันได้ทางชีวภาพออกเป็น

1. การประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง (Cytotoxicity : ISO 10993-5)
2. การประเมินการระคายเคืองหรืออาการแพ้ที่ผิวหนัง (Irritation or intracutaneous reactivity : ISO 10993-10)
3. การประเมินความเป็นพิษต่อระบบร่างกาย (Systemic toxicity : ISO 10993-11)
4. การประเมินความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม (Genotoxicity : ISO 10993-3)
5. การประเมินความเข้ากันได้กับโลหิต (Hemocompatibility : ISO 10993-4) (Biomerics, 2011)

ซึ่งการประเมินความเข้ากันได้ทางชีวภาพด้วยเซลล์เพาะเลี้ยง จะสามารถทำในหัวข้อ ISO 10993-5 และ ISO 10993-3

ตารางที่ 2. 8 การประเมินความเข้ากันได้ทางชีวภาพของอุปกรณ์การแพทย์ (International Organization for Standardization, 2016)

Medical device categorization by			Biological effect												
Nature of Body Contact		Contact Duration A – limited (<24 h) B – prolonged (>24 h to30 d) C – permanent (> 30 d)	Cytotoxicity	Sensitization	Irritation or Intracutaneous Reactivity	Acute Systemic Toxicity	Material-Mediated Pyrogenicity	Subacute/Subchronic Toxicity	Genotoxicity	Implantation	Hemocompatibility	Chronic Toxicity	Carcinogenicity	Reproductive/Developmental Toxicity#	Degradation@
Category	Contact														
Surface device	Intact skin	A	X	X	X										
		B	X	X	X										
		C	X	X	X										
	Mucosal membrane	A	X	X	X										
		B	X	X	X	O	O	O		O					
		C	X	X	X	O	O	X	X	O		O			
	Breached or compromised surface	A	X	X	X	O	O								
		B	X	X	X	O	O	O		O					
		C	X	X	X	O	O	X	X	O		O	O		
External communicating device	Blood path, indirect	A	X	X	X	X	O				X				
		B	X	X	X	X	O	O			X				
		C	X	X	O	X	O	X	X	O	X	O	O		
	Tissue^{+}/bone/ dentin	A	X	X	X	O	O								
		B	X	X	X	X	O	X	X	X					
		C	X	X	X	X	O	X	X	X		O	O		
	Circulating blood	A	X	X	X	X	O		O^		X				
		B	X	X	X	X	O	X	X	X	X				
		C	X	X	X	X	O	X	X	X	X				
Implant device	Tissue^{+}/bone	A	X	X	X	O	O								
		B	X	X	X	X	O	X	X	X					
		C	X	X	X	X	O	X	X	X		O	O		
	Blood	A	X	X	X	X	O		O	X	X				
		B	X	X	X	X	O	X	X	X	X				
		C	X	X	X	X	O	X	X	X	X	O	O		

หมายเหตุ X = ISO 10993-1:2009 recommended endpoints for consideration*

O = Additional FDA recommended endpoints for consideration*

Note * All X's and O's should be addressed in the biological safety evaluation, either through the use of existing data, additional endpoint-specific testing, or a rationale for why the endpoint does not require additional assessment.

Note + Tissue includes tissue fluids and subcutaneous spaces

Note ^ For all devices used in extracorporeal circuits

Note # Reproductive and developmental toxicity should be addressed for novel materials, materials with a known reproductive or developmental toxicity, devices with relevant target populations (e.g., pregnant women), and/or devices where there is the probability for local presence of device materials in the reproductive organs.

Note @ Degradation information should be provided for any devices, device components, or materials remaining in contact with tissue that are intended to degrade.

2.3.1.1 การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันของวัสดุ

มาตรฐาน ISO 10993-5 เป็นส่วนที่ 5 ของมาตรฐาน ISO 10993 ที่มีการบังคับใช้โดยทั่วไป โดยส่วนที่ 5 จะเป็นการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงในสภาวะหลอดทดลอง และเป็นมาตรฐานการประเมินทางชีววิทยาของอุปกรณ์ทางการแพทย์ ด้วยการกำหนดแนวทางการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ในสภาวะหลอดทดลองเป็น 3 แบบ คือ 1) extract test 2) direct contact test และ 3) indirect contact test แล้วกำหนดค่าความเป็นพิษของเซลล์จากการประเมินตามแบบที่แตกต่างกันได้แก่ การประเมินความเสียหายของเซลล์ด้วยวิธีทางสัณฐานวิทยา การวัดความเสียหายของเซลล์ที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์ หรือต่อเมทาบอลิซึมของเซลล์ ซึ่งวิธีทดสอบที่ใช้ในการประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ตามมาตรฐานของ ISO 10993-5 ได้ระบุตั้งแต่วิธีการสกัดสารตัวอย่างและปริมาณสารตัวอย่างในการสกัดที่เทียบเคียงเป็นน้ำหนักต่อปริมาตรหรือพื้นที่ต่อตัวอย่างในการตรวจสอบวิเคราะห์ รวมทั้งวิธีวิเคราะห์ ซึ่งมีรายละเอียดของวิธีวิเคราะห์ดังนี้

1. Extract test เป็นวิธีประเมินความเป็นพิษของสารสกัดตัวอย่างต่อเซลล์ทั้งในเชิงคุณภาพและปริมาณ โดยการกำหนดให้มีการสกัดสารจากตัวอย่างเพื่อประเมินความสามารถในการชะหลุดของสารในตัวอย่างที่อาจมีผลกระทบต่อเซลล์ในร่างกาย ด้วยการกำหนดให้มีการสกัดสารจากตัวอย่างตาม ISO 10993-12 ที่กำหนดระยะเวลา อุณหภูมิ และสารละลายในการสกัดตามสภาวะการใช้ผลิตภัณฑ์ถุงบรรจุโลหิตจริง โดยนิยมใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัมในการสกัดที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งตรวจสอบในเชิงคุณภาพด้วยการประเมินผลกระทบต่อเซลล์หลังจากที่ได้สัมผัสสารตัวอย่างนาน 24 ชั่วโมง โดยตรวจดูสัณฐานและความเสียหายของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แล้วเปรียบเทียบผลที่เกิดขึ้นกับตัวบอกมาตรฐานในการประเมินระดับความเป็นพิษ ดังตารางที่ 2.9 โดยหลังจากบ่มสารทดสอบนาน 24 ชั่วโมงจะใช้วิธี MTT assay ซึ่งเป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ในการวัดในเชิงปริมาณ โดยวิธีนี้เป็นการวัดความมีชีวิตของเซลล์หลังจากที่ได้สัมผัสกับสารสกัดตัวอย่างตามเวลาที่เหมาะสม แล้วประเมินความมีชีวิตของเซลล์จากการเปลี่ยนสารละลายสีเหลืองของ MTT ให้เป็นผลึก formazan แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm โดยถ้าความมี

ชีวิตของเซลล์ที่สัมผัสกับสารทดสอบมีลักษณะของเซลล์ไม่มากกว่าระดับความเป็นพิษที่ระดับ 2 และมีค่า % ความมีชีวิตมากกว่า 70 % ของตัวควบคุมลบที่เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ จะยอมรับได้ว่าตัวอย่างนั้นไม่เป็นพิษ ที่สามารถนำไปใช้ได้อย่างปลอดภัย

ตารางที่ 2. 9 การประเมินระดับความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง (International Organization for Standardization, 2009)

ระดับความเป็นพิษ	ปฏิกิริยา (reactivity)	สภาพของเซลล์เพาะเลี้ยง (conditions of cell culture)
0	ไม่เป็นพิษ (none)	เซลล์แผ่เป็นชั้นเดียว มีเม็ดอินทราไซโทพลาสมิก (intracytoplasmic granule) กระจายอยู่ในเซลล์ปกติ ไม่พบการแตกทำลายของเซลล์
1	เป็นพิษน้อยมาก (slight)	เซลล์มีลักษณะกลม ใกล้หลุดออกจากพื้นผิว ไม่เกินร้อยละ 20 อาจพบการแตกทำลายของเซลล์ได้บ้าง
2	เป็นพิษน้อย (mild)	เซลล์มีลักษณะกลม ไม่เกินร้อยละ 50 อาจพบการแตกทำลายของเซลล์แต่ไม่รุนแรง และไม่พบช่องว่างระหว่างเซลล์ชั้นเดียว
3	เป็นพิษปานกลาง (moderate)	เซลล์มีลักษณะกลมหรือพบการแตกทำลายของเซลล์ ไม่เกินร้อยละ 70
4	เป็นพิษอย่างรุนแรง (severe)	การทำลายของเซลล์ชั้นเดี่ยวเกือบทั้งหมดหรือทั้งหมด

2. Direct contact เป็นการประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งสามารถประเมินได้ทั้งในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ ของอุปกรณ์การแพทย์ที่เป็นของแข็งกับเซลล์สัตว์เพาะเลี้ยงในสภาวะทดลอง โดยขนาดตัวอย่างที่นำมาทดสอบต้องมีขนาดที่เหมาะสมกับภาชนะที่ใช้ในสภาวะทดลอง และตัวอย่างที่นำมาใช้นี้จะต้องไม่ได้ผ่านกระบวนการใดๆที่มีผลให้ตัวอย่าง ไม่ใช่ตัวแทนของผลิตภัณฑ์ จึงต้องตัดตัวอย่างภายใต้สภาวะและเทคนิคที่ปลอดเชื้อ แล้วนำตัวอย่างไปสัมผัสกับเซลล์ โดยไม่ผ่านการชะล้างใดๆ ซึ่งหลังจากบ่มวัสดุกับเซลล์แล้วเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะทำการย้อมเซลล์ด้วย neutral red เพื่อประเมินลักษณะของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์หัวกลับ แล้วเทียบผลความเป็นพิษกับตารางที่ 2.10 ซึ่งค่าระดับความเป็นพิษของตัวอย่างต้องมีค่าไม่มากกว่า 2 จึงถือเป็นที่ยอมรับว่าตัวอย่างไม่เป็นพิษและสามารถนำไปใช้งานได้

3. Agar diffusion เป็นวิธีโดยอ้อม (indirect contact) ในการประเมินความเป็นพิษในเชิงคุณภาพของวัสดุที่มีต่อเซลล์ ด้วยการวางชิ้นตัวอย่างแล้วให้เกิดการชะออกของสารจากชิ้นตัวอย่างและแพร่ผ่านชั้นวุ้น โดยชั้นวุ้นที่ใช้ในการเททับชั้นแผ่นเซลล์ต้องมีความเข้มข้นที่เหมาะสม เพื่อไม่ให้เกิดการกดทับเซลล์จนเกิดความเสียหาย และความเข้มข้นที่ใช้นี้ต้องไม่ทำให้เกิดการขัดขวางการชะของสารจากตัวอย่างด้วย สำหรับตัวอย่างที่ใช้ในการประเมินความเป็นพิษนี้ต้องมีขนาดที่เหมาะสมกับกับภาชนะที่ประเมิน เพื่อลดการรบกวนของตัวอย่างที่อาจส่งผลให้เกิดการประเมินผิดพลาดได้ ซึ่งการประเมินความเป็นพิษด้วยวิธีนี้ต้องเลี้ยงเซลล์ให้เจริญเต็มพื้นที่ภาชนะ แล้วปิดทับด้วยชั้นวุ้นในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้มข้นวุ้น 0.5-2.0 % โดยปริมาตรวุ้นที่ปิดทับต้องส่งเสริมการเจริญของเซลล์ดี จากนั้นวางชิ้นวัสดุบนวุ้น และบ่มวัสดุกับเซลล์แล้วเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการย้อมเซลล์ด้วย neutral red ประเมินลักษณะของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์หัวกลับ อย่างไรก็ตาม อาจย้อมเซลล์ด้วย neutral red ก่อนเททับด้วยชั้นวุ้นได้ เพื่อเป็นการประเมินถึงความสมบูรณ์ของเซลล์ก่อนวางวัสดุทดสอบได้ ซึ่งกรณีนี้จะต้องระวังระบบการเลี้ยงเซลล์ ไม่ให้แสงไปทำลายเซลล์จากการเกิด photoactivation ของสีย้อม ในการประเมินความเป็นพิษตามตารางที่ 2.10 ซึ่งค่าระดับความเป็นพิษของตัวอย่างต้องไม่มากกว่า 2 จึงถือเป็นที่ยอมรับว่าตัวอย่างไม่เป็นพิษและสามารถนำไปใช้งานได้ (Li et al., 2015)

ตารางที่ 2. 10 ระดับความเป็นพิษจากการทดสอบด้วยวิธี direct contact และ agar diffusion (International Organization for Standardization, 2009)

ระดับ	ความเป็นพิษ	ลักษณะที่พบ
0	ไม่เป็นพิษ	ไม่พบวงใสจากการตายของเซลล์รอบๆวัสดุและใต้วัสดุ
1	พิษน้อย	พบความเสียหายหรือการตายของเซลล์เล็กน้อยภายใต้วัสดุ
2	พิษอย่างอ่อน	พบวงใสจากการตายของเซลล์เป็นวงจำกัดภายใต้วัสดุ
3	พิษปานกลาง	พบวงใสจากการตายของเซลล์เลยขอบวัสดุน้อยกว่า 1 cm
4	พิษมาก	พบวงใสจากการตายของเซลล์เลยขอบวัสดุมากกว่า 1 cm

การใช้ถุงบรรจุโลหิตมีโอกาสที่เกิดการสัมผัสของสารจากถุงบรรจุโลหิตหรือผลิตภัณฑ์โลหิตที่อาจมีผลกระทบต่อผู้รับโลหิต ดังนั้นจึงควรมีการตรวจสอบความเป็นพิษของถุงบรรจุโลหิตที่อาจมีการชะของสารออกมา ซึ่งก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้รับโลหิต หรือผลิตภัณฑ์โลหิต จึงกำหนดให้การตรวจสอบความเป็นพิษเฉียบพลัน 3 วิธีดังที่ได้กล่าวมาข้างต้น อย่างไรก็ตาม การรับโลหิต หรือผลิตภัณฑ์โลหิต อาจก่อให้เกิดความเสียหายที่อาจส่งผลจากการรับโลหิตที่มีระยะการเก็บที่เวลานาน รวมถึงความถี่ที่ได้รับโลหิต หรือผลิตภัณฑ์โลหิต ในที่นี้จึงได้กำหนดแนวทางการ

ประเมินความเป็นพิษที่อาจเกิดจากการชะของสารที่ช่วงเวลาของการเก็บโลหิต หรือผลิตภัณฑ์โลหิต ด้วยการทำ colony formation assay และตรวจสอบโอกาสที่ก่อให้เกิดความเสียหายจากการรับโลหิต หรือผลิตภัณฑ์โลหิต ที่มีผลต่อสารพันธุกรรมของเซลล์

2.3.1.2 การทดสอบความเป็นพิษเรื้อรัง-กึ่งเรื้อรัง จากสภาวะจำลองการใช้จริง

1. Colony formation assay (CFA) เป็นแนวทางวิธีการทดสอบในการประเมินความเป็นพิษของเซลล์ของประเทศญี่ปุ่น สำหรับวัสดุและอุปกรณ์การแพทย์ ในลักษณะของเซลล์ที่มีจำนวนเซลล์น้อยๆ ให้เจริญให้เป็นโคโลนีขนาดใหญ่ ในสภาวะที่มีสารสกัดตัวอย่างที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ บ่มให้เซลล์เจริญนาน 8-14 วัน จากนั้นทำการตรึงและย้อมโคโลนีที่เกิดขึ้นด้วย canoy fixative และ crystal violet ตามลำดับ แล้วนับจำนวนโคโลนีเพื่อคำนวณหา plating efficiency ซึ่งเซลล์ที่มีการเจริญจนมี plating efficiency มากกว่า 70 % ของอาหารเลี้ยงเซลล์ จัดได้ว่าสารทดสอบที่ระดับความเข้มข้นนั้นๆไม่เป็นพิษต่อเซลล์ โดยในงานวิจัยนี้ได้ประยุกต์ใช้ CFA ในการดูผลกระทบระยะยาว (chronic) ของสารตัวอย่างทดสอบที่มีต่อเซลล์ โดยการถ่ายเลี้ยงเซลล์จากการทำ CFA ครั้งที่ 1 มาประเมินความเป็นพิษด้วยวิธี CFA เป็นครั้งที่ 2 อย่างไรก็ตาม การย้อมเซลล์จากการทำ CFA ครั้งที่ 1 เพื่อทำการถ่ายเลี้ยงต่อนี้ จะย้อมเซลล์ด้วย neutral red เพื่อคงความมีชีวิตของเซลล์เพื่อให้ถ่ายเลี้ยงต่อได้ (International Organization for Standardization, 2009)

2. การประเมินความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม (genotoxicity assay) เป็นส่วนที่ 3 ของมาตรฐาน ISO 10993 เป็นการทดสอบเกี่ยวกับความปลอดภัยของมนุษย์ ในด้านความเสี่ยงที่ก่อให้เกิดผลกระทบร้ายแรง และไม่สามารถย้อนกลับได้ เช่น โรคมะเร็ง หรือความผิดปกติที่จะเกิดขึ้นในรุ่นถัดไป ที่อาจส่งผลให้เกิดความผิดปกติของสารพันธุกรรม ด้วยการตรวจสอบองค์ประกอบของสารที่เป็นสารประกอบในอุปกรณ์ทางการแพทย์ที่ถูกชะออกมาต่อสารพันธุกรรมของเซลล์ อย่างไรก็ตามการตรวจสอบความเสียหายของสารทดสอบต่อพันธุกรรม สามารถทำได้หลายวิธี เช่น comet assay และ micronuclei assay ซึ่ง micronuclei assay เป็นวิธีการทดสอบความเสียหายของสารพันธุกรรมของเซลล์ที่อาจส่งผลกระทบต่อเซลล์ลูก จึงมีบทบาทในการประเมินความเสี่ยงต่อสารพันธุกรรมของเซลล์ได้ชัดเจนกว่า ในวิธีนี้จะทดสอบด้วยการบ่มเซลล์กับสารทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นบ่มต่อในสภาวะที่มี cytochalasin B ในช่วงเวลาวงจรเซลล์เพื่อให้เซลล์ลูกที่เกิดขึ้น ยังไม่มีการแบ่งเซลล์ ส่งผลให้ได้เซลล์ที่มี 2 นิวเคลียส หรือ binucleated cells ซึ่งกรณีที่เซลล์มีการแบ่งตัวปกติโดยไม่มีความเสียหายต่อสารพันธุกรรม ก็จะพบเพียงการเกิด binucleated cells แต่กรณีที่สารพันธุกรรมมีความเสียหายจากสารตัวอย่างทดสอบในระหว่างการจำลองสารพันธุกรรม (DNA) หรือเกิดการแตกหักของสาย DNA จะทำให้พบลักษณะของนิวเคลียสขนาดเล็ก (micronuclei) ใน binucleated cells โดยในการประเมินความเสี่ยงต่อสารพันธุกรรม ต้อง

พิจารณาถึงปัจจัยการเมทาบอริซึม กระบวนการทางเภสัชจลนศาสตร์ และกระบวนการซ่อมแซมสารพันธุกรรม ซึ่งจะมีความแตกต่างกันไปในเซลล์เพาะเลี้ยงและสารพันธุกรรม(International Organization for Standardization, 2003); (Fenech, 2000); (Organisation for Economic Cooperation and Development, 1997)

2.3.2 การศึกษาความเป็นพิษของอุปกรณ์การแพทย์

ถุงบรรจุโลหิตจัดเป็นอุปกรณ์ทางการแพทย์ที่ต้องมีการทดสอบความปลอดภัยทางชีวภาพต่อเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยวิธีต่างๆ ในปี 2011 Mazda ทำการตรวจสอบควบคุมคุณภาพสำหรับถุงบรรจุโลหิตและการลดลงของเม็ดเลือดขาวของสภากาชาดญี่ปุ่นตามเกณฑ์ของสภากาชาดญี่ปุ่น ที่มีการตรวจสอบการยอมรับของถุงบรรจุโลหิตและสารละลาย ทางด้านกายภาพ เคมี และชีวภาพ แล้วพบว่า ถุงบรรจุโลหิตให้ผลการตรวจสอบคุณภาพเป็นไปตามข้อกำหนดและกฎหมายของประเทศญี่ปุ่น (Mazda, 2011)

ปรีชา และทวีทรัพย์ (2558) ได้ทำการทดสอบความเป็นพิษของตัวอย่างวัสดุทางการแพทย์ด้วยวิธี agar diffusion method โดยประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงของภาชนะพลาสติกสำหรับบรรจุผลิตภัณฑ์เภสัชปราศจากเชื้อ ซึ่งพลาสติกที่บรรจุเภสัชภัณฑ์ต้องไม่ทำให้คุณภาพเภสัชภัณฑ์ที่บรรจุเปลี่ยนแปลงไป ไม่เกิดผลข้างเคียงของเภสัชภัณฑ์นั้น รวมทั้งภาชนะพลาสติกต้องไม่ปลดปล่อยสารปนเปื้อนที่เป็นพิษออกมา และก่อให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพ ไม่ดูดซึมโมเลกุลหรืออิออนของสารต่างๆในเภสัชภัณฑ์ ซึ่งในการทดลองได้ตรวจสอบการปลดปล่อยสารที่เป็นพิษต่อเซลล์ ด้วยวิธี agar diffusion ด้วยการวางวัสดุบนชั้นวุ้นเหนือแผ่นเซลล์ เทียบกับ direct contact ที่ให้เซลล์สัมผัสกับวัสดุโดยตรง และบ่มนาน 24 ชั่วโมง พบว่าทั้ง 2 วิธีให้ผลความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงของวัสดุเหมือนๆกัน ทั้งนี้อาจเป็นเพราะวัสดุทดสอบเป็นพลาสติกชนิด ที่มีน้ำหนักมาก (high density) โดยต่างมีผลความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ระดับ 1 ที่พบเซลล์มีรูปร่างผิดปกติอยู่เฉพาะภายใต้ชิ้นวัสดุทดสอบ ส่วนวัสดุ PVC ที่ทดสอบไม่พบความเป็นพิษ (ระดับ 0) ทั้งในวิธี direct contact และ agar diffusion (ปวีณา เจริญสิทธิ์ & ทวีทรัพย์ ชัยสมบูรณ์พันธ์, 2558)

Pant และคณะ (2011) ทำการประเมินความเป็นพิษของวัสดุชีวภาพทางการแพทย์ที่เป็นขวดบรรจุเภสัชภัณฑ์ในสภาวะหลอดทดลอง ของตัวอย่าง 4 แบบที่มีการสกัดตัวอย่างด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ แล้วบ่มเซลล์กับสารสกัดจากพลาสติกทางการแพทย์นาน 1 ชั่วโมง ก่อนเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัม และตรวจดูการเจริญเป็นโคโลนีจากเซลล์ 2000 เซลล์ พบว่าสารตัวอย่างแสดงการยังยั้งการเจริญ การรอดชีวิต และการเกิดโคโลนีของเซลล์ L929 ได้ ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากโลหะ Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Zn ที่เกิดการชะออกจากวัสดุตามปริมาณการตรวจวิเคราะห์โลหะที่มีค่าเกินมาตรฐาน (Pant et al., 2011)

Van Tienhove และคณะ (2006) ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน 3 ชนิด คือ L929, McCoy cell line ที่เลี้ยงในอาหาร Dulbecco's modified Eagles culture ที่มีกลูโคสสูงและมี glutamax ที่เสริมด้วย 5% non-essential amino acid และ HaCaT cell line ที่เลี้ยงในอาหาร DMEM ที่เสริมด้วย sodium pyruvate และ pyridoxine 0.11 g/L และ L-glutamine 0.2 mol/L ซึ่งอาหารที่เลี้ยงเซลล์ทั้ง 2 แบบนี้ต้องมีการเสริมด้วย penicillin-streptomycin (100 U/ml) และ fetal calf serum 10% (FCS) โดยการใช้วัสดุ PVC และ Low Density Polyethylene (LDPE) เป็นแบบจำลองในการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยการสกัดวัสดุด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มี FCS ที่เวลา 24 ชั่วโมง อุณหภูมิ 0 °C, 37 °C, และ 70 °C และที่เวลา 48 ชั่วโมงและ 72 ชั่วโมง อุณหภูมิ 37 °C แล้วบ่มสารสกัดกับเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นวัดความมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay พบว่า สารสกัดวัสดุตัวอย่าง PVC ที่มี DEHP (2:1) (PVC-Exp) ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ L929 และ HaCaT แม้ว่าจะเพิ่มเวลาเป็น 72 ชั่วโมงหรืออุณหภูมิเป็น 70 °C ก็ตาม สำหรับการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธีการสัมผัสโดยตรงของวัสดุ ซึ่งแบ่งการทดสอบออกเป็น 2 แบบ คือ แบบที่ใส่เซลล์บนวัสดุทดสอบแล้วบ่มเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าวัสดุตัวอย่าง PVC-Exp ลดกิจกรรมการทำงานของเซลล์เมื่อเทียบกับสภาวะที่ไม่มีตัวอย่างทดสอบ และแบบที่วางวัสดุทดสอบบนผิวเซลล์ที่ผ่านการบ่มเลี้ยงมาแล้ว 24 ชั่วโมง แล้วบ่มเลี้ยงต่ออีก 24 ชั่วโมง พบว่าวัสดุทดสอบ PVC-Exp ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ในการลดกิจกรรมการทำงานของเซลล์ทั้ง 3 ชนิด (Van Tienhoven et al., 2006)

Bicalho และคณะ (2016) ศึกษาผลของสารเติมแต่งพลาสติก (Plasticizers) ของถุงบรรจุโลหิต ที่มีผลต่ออัตราการบวมของเซลล์เม็ดเลือดแดง 3 ชนิด คือ di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) 1, 2-cyclohexane-dicarboxylic acid diisononyl ester (DINCH) และ n-butyryl-tri-n-hexyl citrate (BTHC) ในสภาวะที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบไขมันของถุงบรรจุ โดยการเตรียมเซลล์เม็ดเลือดแดงเข้มข้นจากโลหิตรวมแบบ buffy coat (top/bottom) ในถุงบรรจุโลหิตแบบ PVC/DEHP จากนั้นแบ่งออกเป็น 3 ส่วน ใส่ในถุงบรรจุโลหิตแต่ละแบบ (PVC/DEHP, PVC/DINCH และ PVC/BTHC) จำนวน 2 ซ้ำ แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 2–6 °C และ เก็บตัวอย่างในวันที่ 5, 21, 35, และ 42 ของการเก็บ พบว่า ความคงตัวของเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงมีความแตกต่างกันในแต่ละชนิดของสารเติมแต่งพลาสติก ซึ่งเซลล์เม็ดเลือดแดงที่บรรจุในถุงที่มี BTHC เป็นสารเติมแต่ง มีการป้องกันที่ต่ำกว่ามาก ขณะเดียวกันเซลล์เม็ดเลือดแดงที่บรรจุในถุงที่มี DEHP และ DINCH ให้ผลการป้องกันต่อการบวมของเยื่อหุ้มเซลล์ แรงดันออสโมติก และการสูญเสียฮีโมโกลบินได้ดี (Bicalho et al., 2016)

Vidal และคณะ (2009) ได้ทำการศึกษาประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพของอุปกรณ์การแพทย์ชนิดต่างๆในประเทศบราซิล 3 ชนิด แล้วทดสอบด้วยวิธีการแพร่ผ่านชั้นวุ้น (agar

diffusion cytotoxicity assay) จากการใช้เซลล์ L-929 mammalian fibroblast cells เป็นแบบจำลองในการทดสอบ ซึ่งการทดสอบด้วยวิธี การแพร่ผ่านชั้นวุ้น (agar diffusion cytotoxicity assay) นี้เป็นการป้องกันเซลล์เพาะเลี้ยงไม่ให้เกิดความเสียหายจากแรงกลได้ ในขณะเดียวกันก็ยังช่วยให้สารเคมีจากตัวอย่างถูกชะและแพร่กระจายออกมาได้ เนื่องจากตัวอย่างอุปกรณ์การแพทย์มีหลายชนิดและมีปัจจัยที่ส่งผลต่อวัสดุที่แต่ต่างกัน ทั้งองค์ประกอบของพอลิเมอร์ กระบวนการผลิต และสารเติมแต่ง โดยถุงบรรจุโลหิตซึ่งผลิตจากพลาสติก PVC ที่มี DEHP เป็นสารเติมแต่ง เป็นตัวอย่างหนึ่งที่ถูกเลือกนำมาทดสอบ ซึ่งมีการเก็บตัวอย่างตั้งแต่ปี 2000-2007 พบว่าผลความเป็นพิษของถุงบรรจุโลหิตที่นำมาทดสอบนี้แสดงค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ลดลงในช่วงที่เก็บตัวอย่าง และเป็นการเพิ่มเปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างที่ระดับความเป็นพิษที่ 0 ให้มีปริมาณตัวอย่างเพิ่มขึ้น ซึ่งแสดงถึงระบบการผลิตอุปกรณ์การแพทย์ที่มีคุณภาพดีขึ้น (Vidal et al., 2009)

ตามที่องค์การอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข ประเทศสหรัฐอเมริกา ส่วนแรงงานและสวัสดิภาพแรงงานของประเทศญี่ปุ่น ได้ชี้ให้เห็นถึงผลความเสี่ยงของสาร di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) ที่ปล่อยออกมาจากอุปกรณ์ทางการแพทย์ที่ผลิตจาก polyvinyl chloride (PVC) Inoue และคณะ จึงได้ประเมินและวิเคราะห์ระดับที่มีโอกาสสัมผัสของ di (2-ethylhexyl) phthalate DEHP และ mono(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) จากถุงบรรจุโลหิต โดยใช้ liquid chromatography–electrospray mass spectrometry (LC-MS) ในการวิเคราะห์ตัวอย่างผลิตภัณฑ์บรรจุโลหิต จากหน่วยกาชาดประเทศญี่ปุ่น พบว่าระดับของ DEHP อยู่ในช่วง 1.8 ถึง 83.2 μg/ml และ MEHP อยู่ในช่วง 0.1 ถึง 9.7 μg/ml ซึ่งเมื่อเวลาการเก็บที่นานขึ้นระดับของ DEHP และ MEHP ก็จะเพิ่มขึ้น โดยพบ DEPH ในถุงบรรจุโลหิตรวมในระดับที่สูงที่สุดคือ 83.2 μg/ml เมื่อเทียบกับถุงบรรจุอื่น ดังนั้นจากการวิเคราะห์นี้แสดงให้เห็นว่ามนุษย์มีโอกาสได้รับ DEHP ที่ปลดปล่อยออกมาจากถุงบรรจุโลหิตในระดับสูงสุดที่ 0.7 mg/kg weight/time (Inoue et al., 2005)

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีวิจัย

3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี

3.1.1 เครื่องมือ

3.1.1.1 กล้องจุลทรรศน์ (Light microscope, Olympus)

3.1.1.2 กล้องจุลทรรศน์ รุ่น BX_51/BX_52 (Olympus)

3.1.1.3 เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง

3.1.1.4 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Balance Sartorius, Presica)

3.1.1.5 เครื่องนึ่งความดันไอ (Autoclave, Tommy)

3.1.1.6 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge, Universal 32R Hettich CENTRIFUGEN)

3.1.1.7 เครื่องผสมสาร (Vortex mixer, TECHNE)

3.1.1.8 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter, Ultra basic)

3.1.1.9 เครื่องอบความร้อนแห้ง (Hot air oven, Binder)

3.1.1.10 ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 °C (Deep freezer, Electrolux)

3.1.1.11 ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิและคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2 Incubator, NuAire)

3.1.1.12 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow Class II, NuAire)

3.1.1.13 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath, SPC group digital heat)

3.1.1.14 Autometic pipette ขนาด 20 100 200 และ 1000 µl (Gilson)

3.1.1.15 Hemacytometer (Levy Ultra Plane)

3.1.1.16 Microcentrifuge (Eppendrof)

3.1.1.17 Micro plate reader (TECAN AUSTRIA Gmbh)

3.1.1.18 Multichannel pipette (Biopette)

3.1.2 วัสดุอุปกรณ์และเครื่องแก้ว

3.1.2.1 ขวด Duran	Schott
3.1.2.2 เข็มและหลอดฉีดยา	Nipro
3.1.2.3 ชุดกรองอาหาร	Corning
3.1.2.4 ตัวกรองขนาด 0.22 µM	Corning
3.1.2.5 ปิเปต และบีกเกอร์ขนาดต่างๆ	Pyrex

3.1.2.6 หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 15 ml	Corning
3.1.2.7 Cover slip	Menzel
3.1.2.8 Tissue culture flask ขนาด 25 และ 75 cm^2	Corning
3.1.2.9 12 well culture plate	Corning
3.1.2.10 24 well culture plate	Corning
3.1.2.11 96 well culture plate	Corning

3.1.3 สารเคมี

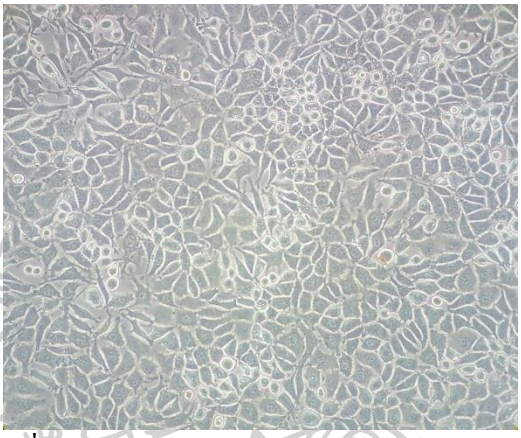
3.1.3.1 Agar	FMC
3.1.3.2 Colchicine	Sigma
3.1.3.3 Cytochalasin B	Sigma
3.1.3.4 Dimethyl Sulfoxide (DMSO)	Amresco
3.1.3.5 EDTA (ethylene diamine tetra-acetic acetate	Fluka
3.1.3.6 Fetal bovine serum	HyClone
3.1.3.7 Giemsa	Merck
3.1.3.8 Mimimum essential medium (MEM)	Gibco
3.1.3.9 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)	Invitrogen
3.1.3.10 Neutral Red	Fluka
3.1.3.11 Phosphate buffer saline (PBS, Ca^{2+}, Mg^{2+} Free)	Sigma
3.1.3.12 Trypan blue	Gibco
3.1.3.13 Trypsin	Amresco
3.1.3.14 ZDEC (polyurethane film containing 0.1 % zinc diethyldithiocabamate)	Hatano
3.1.3.15 Zinc acetate	Ajax

3.2 เซลล์ที่ใช้ในงานวิจัยและการเพาะเลี้ยง

L929 (mouse fibroblast cell line)

ลักษณะ adherent cell line

เลี้ยงในอาหาร minimum essential medium (MEM) ที่เสริมด้วย 10 % Fetal bovine serum (FBS) อัตราการถ่ายเลี้ยง 1:10



รูปที่ 3. 1 ลักษณะการเกาะแผ่ของเซลล์ L929

3.3 ตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย

ถุงบรรจุโลหิตที่ถูกใช้ในการประเมินความปลอดภัยในงานวิจัยนี้ เป็นถุงบรรจุโลหิต PVC ที่มี DEHP เป็นสารเติมแต่งชนิด 4 ถุงในหนึ่งยูนิต (Quadruple Blood Bag) จากแหล่งผลิตที่แตกต่างกัน 3 แห่ง ได้แก่ เวียดนาม อินเดีย และญี่ปุ่น

3.4 ระเบียบวิธีวิจัย

3.4.1 การทดสอบความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน (Acute toxicity) ต่อความมีชีวิตของเซลล์ L929

การทดสอบความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน (Acute toxicity) ที่ใช้ทดสอบในงานวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 3 แบบ คือ agar diffusion direct contact และ MEM elution เป็นจำนวน 3 ซ้ำ เพื่อให้ได้ข้อมูลความเสี่ยงความเป็นพิษฉับพลันจากถุงบรรจุเลือดที่มาจากวัสดุ และการละลายให้สารออกมา โดยการเตรียมตัวอย่างนั้น ต้องตัดถุงบรรจุโลหิตในสภาวะปลอดเชื้อให้มีขนาดประมาณ 5 mm x 5 mm (25 mm^2)

3.4.1.1 การทดสอบความเป็นพิษแบบ Agar diffusion

เลี้ยงเซลล์ L929 ความหนาแน่น 3×10^5 cell/ml ปริมาตร 10 ml ในจานเลี้ยงเซลล์ บ่มที่ตู้บ่มบรรยากาศ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้เป็น monolayer จากนั้นย้อมเซลล์ด้วย neutral red เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วล้างสีส่วนเกินด้วย PBS จากนั้นเทอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มี phenol red และมีวุ้นความเข้มข้น 1% ลง บนชั้นเซลล์ปริมาตร 8 ml หรือให้มีความหนาของชั้นวุ้นประมาณ 2-3 mm รอให้อาหารวุ้นแข็งตัวแล้ววางชิ้นวัสดุที่ตัดจากถุงทั้ง 4 ถุงของแต่ละยูนิต ที่ผลิตจากแหล่งผลิตประเทศเวียดนาม อินเดีย และญี่ปุ่น และวัสดุที่เป็นตัวควบคุมบวก ZDEC (polyurethane film containing 0.1 % zinc diethyldithiocabamate) และตัวควบคุมลบ Teflon จากนั้นบ่มในตู้บ่มบรรยากาศ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วประเมินความเป็นพิษของเซลล์ จากสัณฐานและการแตกของเซลล์ เป็นค่า 5 ระดับ ตั้งแต่ 0-4 ดังตารางที่ 3.1

3.4.1.2 การทดสอบความเป็นพิษแบบ Direct contact

เลี้ยงเซลล์ L929 ความหนาแน่น 1.5×10^5 cell/ml ปริมาตร 1 ml ในถาดเลี้ยงเซลล์ 24 หลุม บ่มที่ตู้บ่มบรรยากาศ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงให้เป็น monolayer แล้วทำการวางชิ้นวัสดุที่ตัดจากถุงทั้ง 4 ถุงของแต่ละยูนิต ที่ผลิตจากแหล่งผลิตประเทศเวียดนาม อินเดีย และญี่ปุ่น และวัสดุที่เป็นตัวควบคุมบวก ZDEC (polyurethane film containing 0.1 % zinc diethyldithiocabamate) และตัวควบคุมลบ Teflon บ่มในตู้บ่มบรรยากาศ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วย้อมเซลล์ด้วย neutral red เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นประเมินความเป็นพิษของเซลล์ จากสัณฐานและการตายของเซลล์ เป็นค่า 5 ระดับ ตั้งแต่ 0-4 ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3. 1 ระดับความเป็นพิษจากการทดสอบด้วยวิธี direct contact และ agar diffusion

ระดับ	ความเป็นพิษ	ลักษณะที่พบ
0	ไม่เป็นพิษ (none)	ไม่พบวงใสจากการตายของเซลล์รอบๆวัสดุและใต้วัสดุ
1	พิษน้อยมาก (slight)	พบความเสียหายหรือการตายของเซลล์เล็กน้อยภายใต้วัสดุ
2	พิษน้อย (mild)	พบวงใสจากการตายของเซลล์เป็นวงจำกัดภายใต้วัสดุ
3	พิษปานกลาง (moderate)	พบวงใสจากการตายของเซลล์เลยขอบวัสดุน้อยกว่า 1 cm
4	พิษมาก (severe)	พบวงใสจากการตายของเซลล์เลยขอบวัสดุมากกว่า 1 cm

3.4.1.3 การทดสอบความเป็นพิษแบบ MEM elution

เลี้ยงเซลล์ L929 ความหนาแน่น 1.3×10^5cell/ml ปริมาตร 0.1 ml ในถาดเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม บ่มที่ตู้บ่มบรรยากาศ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37 ˚C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือให้เซลล์เกาะพื้นที่ระดับความหนาแน่นเกือบ confluence แล้วแทนที่อาหารเลี้ยงเซลล์ด้วย อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการสกัดจากวัสดุของถุงบรรจุโลหิตแต่ละถุงของทั้ง 3 แหล่งผลิต ที่อัตราส่วนตัวอย่างต่ออาหารสกัด 1 g/ 5 ml (หรือสูงสุดที่สกัดได้) ในตู้บ่มบรรยากาศ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37 ˚C นาน 24 ชั่วโมง แล้วเจือจางให้ได้ระดับความเข้มข้น 0.05 0.1 และ 0.2 g/ml ใส่ในหลุมเลี้ยงเซลล์ จากนั้นบ่มที่ตู้บ่มบรรยากาศ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37 ˚C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบลักษณะพิษที่มีต่อรูปร่างสัณฐานตามตารางที่ 3.2 และความมีชีวิตของเซลล์ด้วย MTT assay เทียบกับเซลล์ในชุดควบคุมบวก Zinc acetate ที่ความเข้มข้น 8 mg/l และชุดควบคุมที่เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์

ตารางที่ 3. 2 การประเมินระดับความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง

ระดับความเป็นพิษ	ปฏิกิริยา (reactivity)	สภาพของเซลล์เนื้อเยื่อ (conditions of cell culture)
0	ไม่เป็นพิษ (none)	เซลล์แผ่เป็นชั้นเดียว มีเม็ดอินทราไซโทพลาสมิก (intracytoplasmic granule) กระจายอยู่ในเซลล์ปกติ ไม่พบการแตกทำลายของเซลล์
1	พิษน้อยมาก (slight)	เซลล์มีลักษณะกลม ใกล้หลุดออกจากพื้นผิว ไม่เกินร้อยละ 20 อาจพบการแตกทำลายของเซลล์ได้บ้าง
2	พิษน้อย (mild)	เซลล์มีลักษณะกลม ไม่เกินร้อยละ 50 อาจพบการแตกทำลายของเซลล์แต่ไม่รุนแรง และไม่พบช่องว่างระหว่างเซลล์ชั้นเดียว
3	พิษปานกลาง (moderate)	เซลล์มีลักษณะกลมหรือพบการแตกทำลายของเซลล์ ไม่เกินร้อยละ 70
4	พิษอย่างรุนแรง (severe)	การทำลายของเซลล์ชั้นเดี่ยวเกือบทั้งหมดหรือทั้งหมด

3.4.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ที่มีผลแบบเรื้อรัง ด้วยวิธี subchronic toxicity และ chronic toxicity

สกัดสารตัวอย่างจากถุงบรรจุโลหิตในรูปแบบการจำลองสภาวะการใช้จริง โดยการใส่อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มี 5% ซีรัม (MEM + 5% FBS) ปริมาตร 450 ml เข้าไปยังถุง collection bag (CPD bag) ในระหว่างที่ใส่อาหารเข้าไปในถุงนี้ต้องมีการโยกถุงไปมา เพื่อให้สารละลาย CPD ภายในถุงที่มีปริมาตร 63 ml ผสมรวมกับอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์อย่างสม่ำเสมอ ซึ่งสารละลาย CPD นี้จะเป็นสารที่ช่วยป้องกันการแข็งตัวของเลือด จากนั้นทำการถ่ายสารละลายผสมจากถุง CPD bag ตามปริมาณอัตราส่วนขององค์ประกอบโลหิตที่ได้หลังจากการปั่นเหวี่ยง ซึ่งประกอบไปด้วยเซลล์เม็ดเลือดแดงประมาณ 45% และเกล็ดเลือดที่ละลายอยู่ในของเหลวที่เรียกว่า พลาสมา ซึ่งคิดเป็น 55% ของโลหิตทั้งหมด โดยถ่ายสารละลายผสมจากถุง CPD bag ปริมาตร 270 ml ซึ่งคาดการณ์ว่าเป็นปริมาตรของน้ำเลือดที่มีเกล็ดเลือดไปยังถุงบรรจุเกล็ดเลือด (Platelet bag) และถ่ายสารละลายผสมอีก 220 ml ซึ่งจากถุง CPD bag ไปยังถุงบรรจุเม็ดเลือดแดง (AS-5 bag หรือ SAG-M-2 bag) ให้ผสมกับสารละลาย AS-5 หรือ SAG-M-2 ปริมาตร 100 ml โดยสารละลาย AS-5 หรือ SAG-M-2 จะทำหน้าที่เป็นสารที่ช่วยคงความมีชีวิตและกิจกรรมภายในของเซลล์เม็ดเลือดแดง แล้วเก็บถุงเกล็ดเลือดและถุงเม็ดเลือดแดงตามสภาวะและเวลาของการใช้งานจริง โดยถุงเกล็ดเลือดเก็บที่อุณหภูมิ 22±2 °C เป็นเวลา 5 วัน โดยทำการเก็บตัวอย่างสารละลายจากถุงเกล็ดเลือดในวันที่ 3 และ 5 ของการเก็บมาตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ และสำหรับถุงเม็ดเลือดแดงมีสภาวะการเก็บที่อุณหภูมิ 4±2 °C เป็นเวลา 42 วัน จะทำการเก็บตัวอย่างสารละลายภายในถุงในวันที่ 30 และวันที่ 42 ของสภาวะการเก็บมาตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ จากนั้นนำสารตัวอย่างไปทดสอบกับเซลล์ L929 ในวิธีต่างๆทั้ง subchronic toxicity และ chronic toxicity เพื่อให้ได้ข้อมูลพิษจากการใช้งานถุงบรรจุโลหิตจริง ของถุงบรรจุเกล็ดเลือดและถุงบรรจุเม็ดเลือดแดง ที่มาจากการได้รับผลิตภัณฑ์ 1 ครั้ง และ มากกว่า 1 ครั้ง

3.4.2.1 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์แบบ subchronic toxicity

เลี้ยงเซลล์ L929 ความหนาแน่น 1.3×10^5 cell/ml ปริมาตร 0.1 ml ในถาดเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม บ่มที่ตู้บ่มบรรยากาศ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือให้เซลล์เกาะพื้นที่ระดับความหนาแน่นเกือบ confluence แล้วแทนที่อาหารเลี้ยงเซลล์เดิมด้วยสารสกัดเจือจางที่ระดับ 0.1 0.2 และ 1 เท่าของสารสกัดจากถุงบรรจุเกล็ดเลือดและถุงบรรจุเม็ดเลือดแดง จากนั้นบ่มที่ตู้บ่มบรรยากาศ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบลักษณะพิษที่มีต่อรูปร่างสัณฐานและความมีชีวิตของเซลล์ด้วย MTT assay เทียบกับเซลล์ในชุดควบคุมบวก Zinc acetate ที่ความเข้มข้น 8 mg/l และชุดควบคุมที่เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์

3.4.2.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ที่มีผลเรื้อรัง subchronic toxicity ด้วย Colony formation assay

เลี้ยงเซลล์ L929 ความหนาแน่น 100 cell/หลุม ในถาดเลี้ยงเซลล์ 12 หลุม บ่มที่ตู้บ่มบรรยากาศ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37 ˚C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใส่สารทดสอบที่ระดับการเจือจาง 1:1000, 1:100, 1:50, 1:10 และ 1 เท่าของสารสกัด เทียบกับสารมาตรฐานที่ให้ผลบวก บ่มเซลล์ที่ตู้บ่มบรรยากาศ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37 ˚C เป็นเวลานาน 2 สัปดาห์ เพื่อตรวจสอบความสามารถเจริญเป็นโคโลนี เมื่อเซลล์ได้รับการสัมผัสกับสารทดสอบเป็นเวลานาน จากนั้นบ่มเซลล์ในถาดเลี้ยงกับสีย้อม neutral red ในสภาวะปลอดเชื้อเป็นเวลา 4 ชั่วโมง เพื่อประเมินความเป็นพิษของสารต่อเซลล์ที่อาจส่งผลต่อเนื่องถึงความสามารถเจริญของเซลล์ เมื่อครบเวลาล้างสีส่วนเกินออกด้วย PBS และนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วเพื่อลดความเสียหายที่จะเกิดขึ้นกับเซลล์ แล้วหาค่า plating efficiency ดังสมการ % Plating efficiency = (colony of sample /colony of control) x 100 ซึ่งจะได้ผลของ sub-chronic toxicity จากการใช้ถุงเลือด 1 ครั้ง จากนั้นทำการถ่ายเลี้ยงเซลล์จากขั้นของ sub-chronic มาทำการเพาะเลี้ยงและทดสอบเช่นเดิม เพื่อให้ได้ผลของ Chronic toxicity จากการใช้ถุงเลือดซ้ำเป็นครั้งที่ 2

3.4.3 การทดสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม ด้วย Micronucleus test

เตรียมเซลล์ L929 ให้มีความเข้มข้นเริ่มต้น 1×10^4 cell/ml ในถาดเลี้ยงเซลล์ 24 หลุม ที่มี cover slide บ่มที่ตู้บ่มบรรยากาศ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37 ˚C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นแทนที่อาหารเลี้ยงเซลล์เดิมด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ที่มีสารสกัดทดสอบความเข้มข้นเจือจาง 1: 10 เพื่อดูผลของสารตกค้างในสภาวะการใช้งานปกติ ต่อพิษทางพันธุกรรมของเซลล์ และตัวควบคุมลบ บ่มนาน 24 ชั่วโมง เทียบกับตัวควบคุมบวก (colchicine) ที่ระดับความเข้มข้น 0.08 µg/ml ซึ่งเป็นสารมาตรฐานที่ก่อการกลายพันธุ์ที่บ่มกับเซลล์เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดูดอาหารทดสอบออก แล้วล้างด้วย PBS และเติมอาหารที่มี Cytochalacin-B ความเข้มข้น 3 µg/ml ในปริมาตร 1 ml/หลุม นำไปบ่มต่อใน ตู้บ่มบรรยากาศ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37 ˚C เป็นเวลา 40 ชั่วโมง เพื่อให้ Cyt-B ยับยั้งการแบ่ง cytoplasm ของเซลล์ จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกและล้างด้วย PBS แล้วเติม 0.0075 M KCl ปริมาตร 0.5 ml/หลุม ทิ้งไว้นาน 5 นาที และตรึงเซลล์ด้วย Fixative (acetic acid : methanol, 3:1) ในสภาวะเย็นนาน 10 นาที ทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นย้อมด้วย 10% Giemsa เป็นเวลา 10-15 นาที แล้วล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่น นำสไลด์ไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X โดยนับจำนวนเซลล์ที่มีนิวเคลียส 1-4 นิวเคลียสต่อจำนวนเซลล์ทั้งหมด และจำนวน micronuclei (MN) ต่อ 1000 binucleus cells และบันทึกความผิดปกติของนิวเคลียสที่พบตามวิธีของ Michael (2000) โดย micronucleus ต้องมีขนาด 1/3- 1/9 เมื่อเปรียบเทียบกับขนาดของนิวเคลียสหลัก และต้องติดสีเข้ม

ในระดับเดียวกับนิวเคลียส โดยต้องแยกออกเป็นอิสระจากนิวเคลียส แล้วคำนวณหา % MN frequency per 1,000 binucleus, Nuclear Division Index (NDI) และ Fold ดังสมการ

$$\% \text{ MN frequency per 1000 binucleus cells} = \frac{NM \times 100}{1000\ BN\ cells}$$

$$\text{NDI} = \frac{\mathrm{M}(1)+2\mathrm{M}(2)+3\mathrm{M}(3)+4\mathrm{M}(4)}{N}$$

$$\text{Fold} = \frac{MN(test)}{MN(control)}$$

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพของตัวอย่างถุงบรรจุโลหิตตามมาตรฐานของความปลอดภัยทางชีวภาพอุปกรณ์การแพทย์ครั้งนี้ เป็นถุงบรรจุโลหิตที่ผลิตจากแหล่งการผลิตในประเทศเวียดนาม อินเดีย และญี่ปุ่น โดยเป็นถุงบรรจุโลหิตแบบชนิดที่มี 4 ถุง (Quadruple Blood Bag) ทำจากวัสดุพอลิเมอร์ชนิด PVC ที่มีสารเติมแต่ง DEHP (di (2-ethylhexyl) phthalate) เพื่อให้ถุงบรรจุโลหิตมีความยืดหยุ่น โดยใน 1 ชุด (ยูนิต) ของถุงบรรจุโลหิตประกอบไปด้วยถุงย่อยจำนวน 4 ถุง ได้แก่ primary bag หรือ collection bag (CPD bag) และ satellite bag 3 ถุง (Red blood cell bag 1 ถุง และ Platelet bag 2 ถุง สำหรับถุงบรรจุโลหิตที่ผลิตจากประเทศเวียดนามและอินเดีย หรือเป็น Platelet bag 1 ถุง กับ satellite bag ขนาดเล็ก 1 ถุง สำหรับถุงบรรจุโลหิตที่ผลิตจากประเทศญี่ปุ่น) ซึ่งถุง primary bag จากทั้ง 3 แหล่งผลิตมีสารละลาย CPD (citrate phosphate dextrose) ปริมาตร 63 ml ที่ทำหน้าที่ป้องกันการแข็งตัวและรักษาสภาพของโลหิต ซึ่งมีองค์ประกอบของสารเคมีดังตารางที่ 4.1 และถุง satellite bag ที่ใช้สำหรับบรรจุเม็ดเลือดแดงของชุดถุงบรรจุโลหิตที่ผลิตจากประเทศเวียดนามและญี่ปุ่น มีสารละลายเสริมประสิทธิภาพเม็ดเลือดแดงปริมาตร 100 ml ที่ชื่อว่า AS-5 หรือที่ผลิตจากประเทศอินเดียมีสารละลาย SAG-M-2 โดยสารละลายเสริมประสิทธิภาพเม็ดเลือดแดงทั้ง 2 ชื่อนี้มีองค์ประกอบทางเคมีไม่แตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 4.2 ซึ่งทำหน้าที่ในการรักษาสภาพความมีชีวิตและกิจกรรมของเซลล์เม็ดเลือดแดง และตัวอย่างถุงบรรจุโลหิตที่ใช้ศึกษานี้ผ่านการทำปลอดเชื้อด้วยไอน้ำร้อน และในส่วนของสารละลายต้องปลอดจากสารพิษโดยมีชุดถุงบรรจุโลหิตที่ผลิตจากประเทศญี่ปุ่นบรรจุอยู่ในกล่องพลาสติกปิดฟิล์มใสด้านบน ซึ่งเมื่อมีการเปิดผนึกฟิล์มไม่ควรเก็บไว้นานเกิน 30 วัน เพื่อป้องกันการสูญเสียความชื้น สำหรับถุงบรรจุโลหิตที่ผลิตจากประเทศเวียดนามและอินเดีย มีการบรรจุอยู่ในถุงพลาสติกย่อยแล้วบรรจุในถุงอลูมิเนียมฟลอยด์ปิดสนิท ซึ่งเมื่อมีการเปิดใช้งานแล้วไม่ควรเก็บไว้นานเกิน 15 วัน

ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบทางเคมีของสารละลาย CPD

Each volume (ml) CPD Solution Contains	Vietnam	India	Japan
	100 ml	100 ml	63 ml
Citric Acid (anhydrate*, monohydrate**)USP	0.327**	0.327**	0.188*
Sodium Citrate (dihydrate) USP	2.630	2.630	1.66
Monobasic Sodium Phosphate (dihidrate) USP	0.251	0.251	0.14
Dextrose (anhydrous*, monohydrate**) USP	2.320*	2.320*	1.61**

ตารางที่ 4.2 องค์ประกอบทางเคมีของสารละลาย AS-5/ SAG-M-2

Each 100 ml AS-5/ SAG-M-2 Solution Contains	Vietnam	India	Japan
Sodium Chloride USP	0.877	0.877	0.877
Adenine USP	0.030	0.030	0.030
Dextrose (anhydrous*, monohydrate**) USP	0.818*	0.900**	0.900**
Mannitol USP	0.525	0.525	0.525

4.1 การทดสอบความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน (Acute toxicity) ต่อความมีชีวิตของเซลล์ L929

การตรวจสอบความเป็นพิษแบบเฉียบพลันของถุงบรรจุโลหิตที่มีการผลิตจากประเทศเวียดนาม อินเดีย และญี่ปุ่น ในการศึกษานี้แบ่งการทดสอบออกเป็น 3 วิธี คือ agar diffusion, direct contact และ MEM elution ตามมาตรฐานความปลอดภัยทางชีวภาพของอุปกรณ์การแพทย์ (ISO 10993-5) ซึ่งถุงบรรจุโลหิตชนิด 4 ถุง (Quadruple Blood Bag) จะต้องแยกตัดแต่ละชนิดถุง เพื่อเอาวัสดุตัวอย่างถุงบรรจุโลหิตไปตรวจสอบ โดยแยกออกได้เป็น CPD bag, AS-5 หรือ SAG-M-2 bag, Platelet I bag และ Platelet II bag เมื่อแยกตัวอย่างถุงแล้วจะตัดวัสดุของถุงตัวอย่างดังกล่าวภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ โดยไม่ควรชะล้างวัสดุ ซึ่งจะตัดให้มีขนาดประมาณ 25 mm^2 หลังจากที่ตัดถุงบรรจุโลหิตแต่ละส่วนแล้ว จะแบ่งส่วนหนึ่งมาทดสอบโอกาสการปนเปื้อนที่อาจเกิดขึ้นจากการตัดด้วยการนำตัวอย่างใส่ลงในอาหารเหลวของ tryptose phosphate broth และ thioglycollate broth เพื่อทดสอบการปนเปื้อนจุลินทรีย์ พบว่าหลังจากที่มีการบ่มชิ้นวัสดุตัวอย่างกับอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์เป็นเวลา 14 วันแล้วไม่พบการเกิดการปนเปื้อนจุลินทรีย์ที่ทำให้มีลักษณะขุ่นของอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ในทั้ง 2 ชนิดอาหาร จากตัวอย่างหรือการตัด แสดงถึงถุงบรรจุโลหิตมีความปลอดเชื้อดีและเทคนิคการตัดตัวอย่างไม่มีผลให้เกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในตัวอย่าง

ในการตรวจสอบความเป็นพิษแบบเฉียบพลันของถุงบรรจุโลหิตด้วยวิธี agar diffusion ตัวอย่างถุงบรรจุโลหิตของแต่ละแหล่งผลิตที่มีตัดแยกออกเป็นส่วนของแต่ละถุงให้มีขนาดประมาณ 25 mm^2 ถูกนำไปวางบนชั้นวุ้นที่อยู่เหนือผืนเซลล์ที่ผ่านการย้อมด้วย neutral red ให้เซลล์มีชีวิตติดสีแดง และเมื่อเทชั้นวุ้นทับผืนเซลล์ พบว่าเซลล์ยังคงมีสีแดงอยู่ แสดงถึงวิธีการเทวุ้นและวุ้นที่ใช้ไม่ส่งผลต่อความมีชีวิตของเซลล์ L929 และเมื่อวางตัวอย่างบนชั้นวุ้น สารจากวัสดุตัวอย่างจะเกิดการชะออกของสารจากชิ้นตัวอย่างและแพร่ผ่านชั้นวุ้นไปยังเซลล์เพาะเลี้ยง L929 ซึ่งในสภาวะการทดสอบได้มีการทำเทียบผลความเป็นพิษของตัวอย่างที่มีต่อเซลล์กับตัวควบคุมเชิงบวกที่เป็น ZDEC (polyurethane film containing 0.1 % zinc diethyldithiocabamate) และตัวควบคุมเชิงลบที่เป็น Teflon แล้วประเมินความเป็นพิษจากการเกิดวงใสที่เกิดจากการปล่อยสีย้อม neutral red

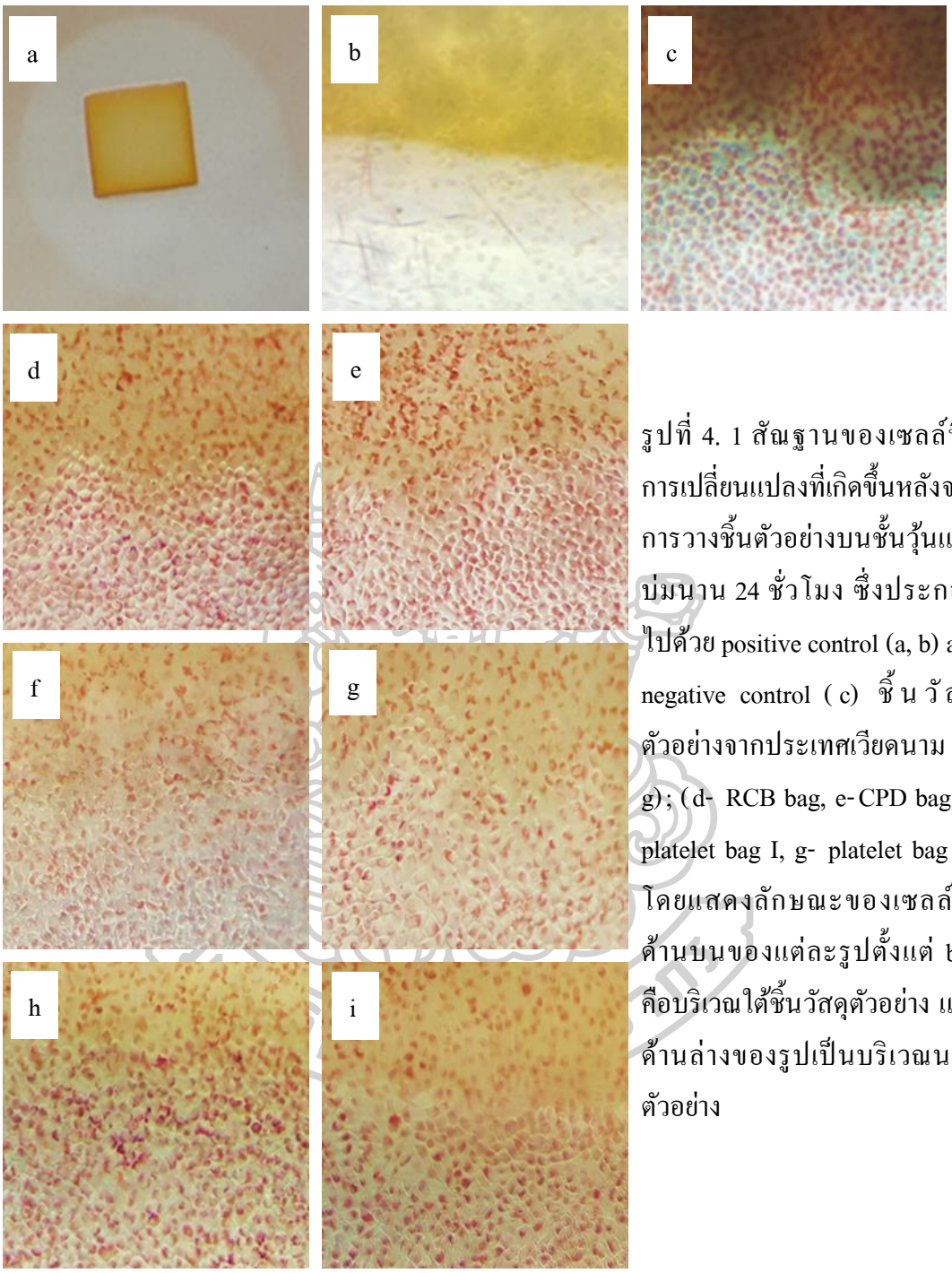
ออกมา ซึ่งหากเซลล์เกิดความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์จะส่งผลให้เยื่อหุ้มเซลล์เสียสภาพ และทำให้สี neutral red ที่ถูกกักไว้ในไลโซโซมถูกปลดปล่อยออกมาในปริมาณมากหรือน้อย ตามสภาวะความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์ และผลการตรวจสอบจะนำไปเทียบตามเกณฑ์ระดับความเป็นพิษในตารางที่ 3.1 ของมาตรฐาน ISO 10993-5 (International Organization for Standardization, 2009) ผลการศึกษาพบว่าวัสดุควบคุมเชิงลบมีความเป็นพิษต่อเซลล์ใน ระดับ 0 (ไม่เป็นพิษ) คือไม่มีการเกิดบริเวณใสโดยรอบหรือภายใต้วัสดุและเซลล์ยังคงความเป็นกระสวยและติดสีแดง ส่วนวัสดุควบคุมเชิงบวกมีความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับ 3 (พิษปานกลาง) คือเกิดวงใสรอบวัสดุไม่เกิน 1 เซนติเมตร ซึ่งผลที่ได้จากการทดสอบมีระยะการเกิดวงใสระหว่าง 0.446-0.481 เซนติเมตร ขณะที่วัสดุทดสอบจากตัวอย่างถุงบรรจุโลหิตทั้ง 4 ถุง มีระดับความเป็นพิษอยู่ในระดับ 1 (พิษน้อยมาก) คือมีความเสียหายของเซลล์บางส่วนภายใต้ชิ้นวัสดุทดสอบ ดังแสดงในตารางที่ 4.3 และจากการประเมินลักษณะสัณฐานของเซลล์ L 929 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ในสภาวะต่างๆได้แสดงดังรูปที่ 4.1 คือ เซลล์ภายใต้วัสดุควบคุมเชิงบวกมีการเกิดลักษณะเป็นวงใสรอบชิ้นวัสดุ จากการปลดปล่อย neutral red ภายในเซลล์ออกมา เนื่องจากความผิดปกติของเยื่อหุ้มเซลล์ เซลล์ยังมีลักษณะหดกลม สูญเสียคุณสมบัติการเกาะแผ่กับพื้นผิว ดังรูปที่ 4.1 (a-b) ส่วนตัวควบคุมเชิงลบให้ผลที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ โดยเซลล์มีลักษณะสัณฐานของเซลล์ที่เป็นกระสวย เกาะพื้นผิวคงเดิมและมีการติดสีแดงของ neutral red ที่หนาแน่นอย่างเห็นได้ชัดทั้งภายใต้และโดยรอบของชิ้นวัสดุ ดังรูปที่ 4.1(c) แต่สำหรับตัวอย่างถุงบรรจุโลหิตทั้ง 4 ถุง พบว่าตัวอย่างวัสดุทดสอบมีความเป็นพิษต่อเซลล์เพียงระดับต่ำๆ ดังที่เห็นได้ว่ามีบางเซลล์มีความเสียหายเกิดขึ้นหลังจากที่ได้สัมผัสกับสารของตัวอย่างที่ได้ชะผ่านชั้นวุ้นไปสู่เซลล์ อย่างไรก็ตามเซลล์ที่เสียหายมีเป็นเพียงส่วนน้อยเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ยังคงความมีชีวิตอยู่ภายใต้ชิ้นวัสดุทดสอบ โดยเซลล์ยังคงลักษณะกระสวย เกาะพื้นผิวคงเดิมรวมทั้งมีการติดสีแดงของ neutral red ที่หนาแน่นอย่างเห็นได้ชัด ดังรูปที่ 4.1 (d-o)

การประเมินความปลอดภัยด้วยวิธี agar diffusion สำหรับอุปกรณ์การแพทย์นั้น ปวีณา เจริญสิทธิ์ และทวีทรัพย์ ชัยสมบูรณ์พันธ์ (2558) ได้ใช้วิธีนี้ในการประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงของภาชนะพลาสติกสำหรับบรรจุผลิตภัณฑ์เภสัชปราศจากเชื้อ (ปวีณา เจริญสิทธิ์ & ทวีทรัพย์ ชัยสมบูรณ์พันธ์, 2558) ขณะที่ Vidal และคณะ (2009) ได้ใช้วิธีนี้ในการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของอุปกรณ์การแพทย์ที่ทำจากยางพาราและ PVC - polyvinyl chloride ที่มีในประเทศบราซิล ซึ่งมีการเก็บตัวอย่างตั้งแต่ปี 2000-2007 ด้วย ซึ่งวิธี agar diffusion นี้เป็นการป้องกันเซลล์เพาะเลี้ยงไม่ให้เกิดความเสียหายจากแรงกล ในขณะเดียวกันก็ยังช่วยให้สารเคมีจากตัวอย่างถูกชะและแพร่กระจายออกมาได้ (Vidal et al., 2009) นอกจากนี้ Lönnroth (2005) ได้ใช้วิธี Agar Diffusion ในตรวจสอบความเป็นพิษของถุงมือทางการแพทย์ที่ทำจากยางพาราธรรมชาติ ยาง

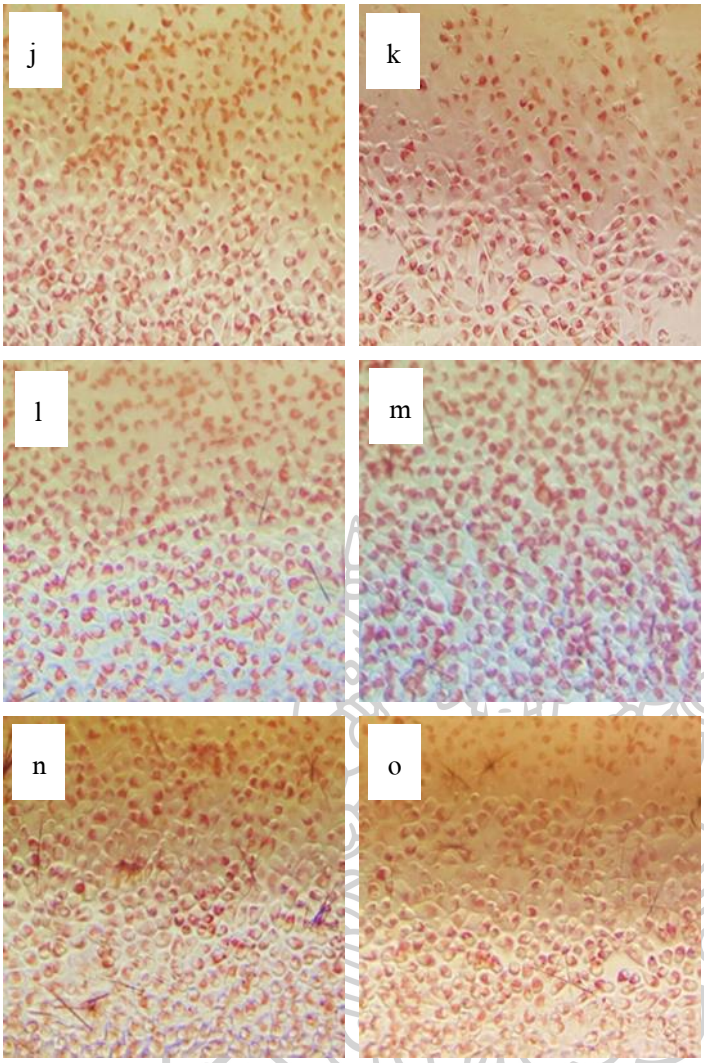
สังเคราะห์ และพอลิเมอร์สังเคราะห์ด้วย (Lönnroth, 2005) เห็นได้ว่าวิธีนี้เป็นที่นิยม และยอมรับสำหรับใช้ในการวิเคราะห์ความปลอดภัยของอุปกรณ์การแพทย์ได้

ตารางที่ 4. 3 แสดงค่าการเกิดวงใสและระดับที่ประเมินความเป็นพิษด้วยวิธี Agar diffusion โดยตัวอักษร (a, b) ที่แตกต่างกันในแต่ละชุดข้อมูลหมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) (จำนวน 3 ซ้ำ)

ตัวอย่าง		Zone (cm)	Grade-Reactivity
Vietnam	Negative control	0^{a}	0-ไม่เป็นพิษ
	Positive control	0.452 ± 0.003^{b}	3-พิษปานกลาง
	RBC Bag	0^{a}	1-พิษน้อยมาก
	Collection Bag	0^{a}	1-พิษน้อยมาก
	Platelet Bag	0^{a}	1-พิษน้อยมาก
	Platelet II Bag	0^{a}	1-พิษน้อยมาก
India	Negative control	0^{a}	0-ไม่เป็นพิษ
	Positive control	0.446 ± 0.012^{b}	3-พิษปานกลาง
	RBC Bag	0^{a}	1-พิษน้อยมาก
	CPD Bag	0^{a}	1-พิษน้อยมาก
	Platelet I Bag	0^{a}	1-พิษน้อยมาก
	Platelet II Bag	0^{a}	1-พิษน้อยมาก
Japan	Negative control	0^{a}	0-ไม่เป็นพิษ
	Positive control	0.481 ± 0.087^{b}	3-พิษปานกลาง
	RBC Bag	0^{a}	1-พิษน้อยมาก
	Collection Bag	0^{a}	1-พิษน้อยมาก
	Platelet Bag	0^{a}	1-พิษน้อยมาก
	Satellite Bag	0^{a}	1-พิษน้อยมาก



รูปที่ 4. 1 สัณฐานของเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นหลังจากการวางชิ้นตัวอย่างบนชั้นวุ้นและบ่มนาน 24 ชั่วโมง ซึ่งประกอบไปด้วย positive control (a, b) and negative control (c) ชิ้นวัสดุตัวอย่างจากประเทศเวียดนาม (d-g); (d- RCB bag, e-CPD bag, f-platelet bag I, g- platelet bag II) โดยแสดงลักษณะของเซลล์ ที่ด้านบนของแต่ละรูปตั้งแต่ b-g คือบริเวณใต้ชิ้นวัสดุตัวอย่าง และด้านล่างของรูปเป็นบริเวณนอกตัวอย่าง



รูปที่ 4. 1 (ต่อ) สัณฐานของเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นหลังจากการวางชิ้นตัวอย่างบนชั้นวุ้นและบ่มนาน 24 ชั่วโมง ซึ่งประกอบไปด้วย ชิ้นวัสดุตัวอย่างจากประเทศอินเดีย (h-k); (h-RCB bag, i- CPD bag, j- platelet bag I, k- platelet bag II), และชิ้นวัสดุตัวอย่างจากประเทศญี่ปุ่น (l-o); (l- RCB bag, m- CPD bag, n- platelet bag I, o-satellite bag) โดยแสดงลักษณะของเซลล์ ที่ด้านบนของแต่ละรูปตั้งแต่ h-o คือบริเวณใต้ชิ้นวัสดุตัวอย่าง และด้านล่างของรูปเป็นบริเวณนอกตัวอย่าง

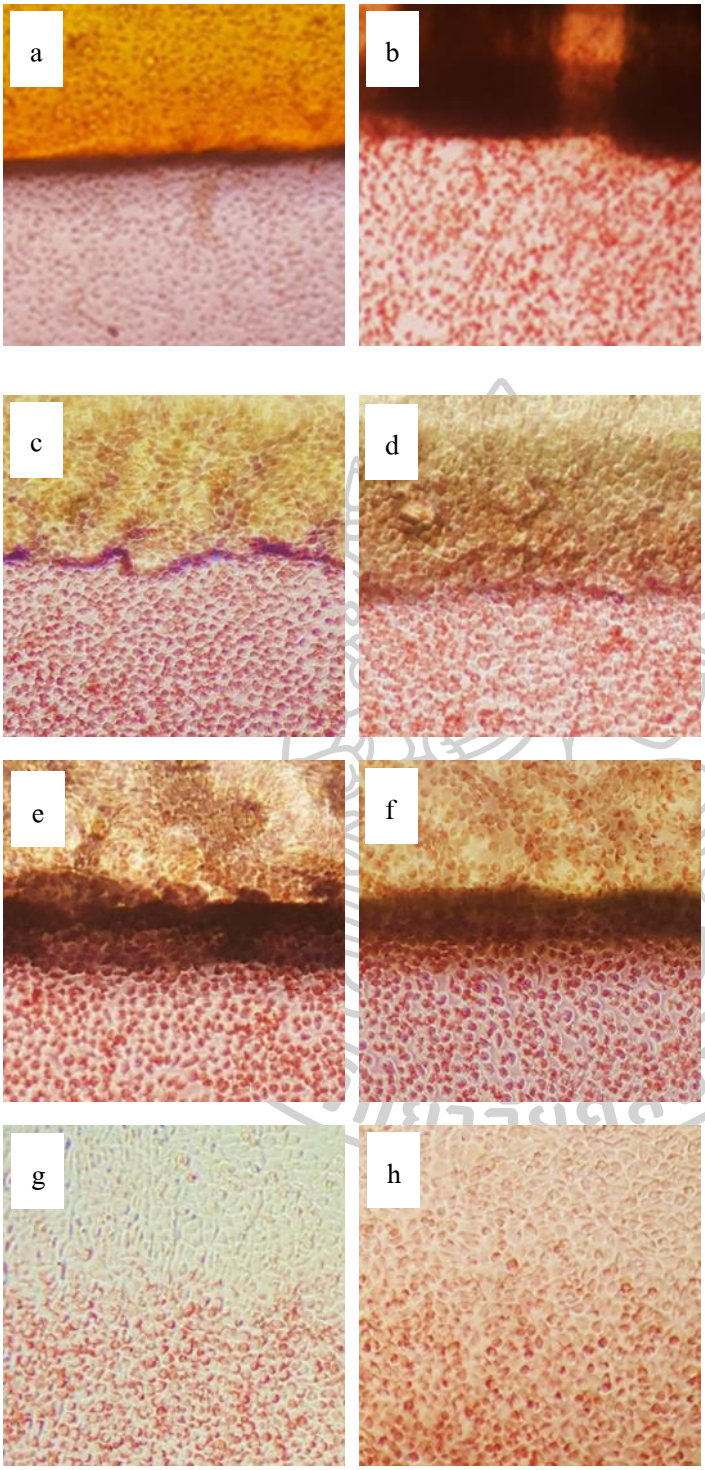
การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันด้วยวิธีการสัมผัสโดยตรง (Direct contact) ของตัวอย่างถุงบรรจุโลหิตต่อเซลล์ L929 ทำเพื่อให้แน่ใจถึงผลความปลอดภัยของวัสดุถุงเลือด กรณีที่ไม่มีการชะออกของสารจากถุงตัวอย่าง โดยตัดวัสดุถุงบรรจุโลหิตขนาดประมาณ 25 mm^2 แล้ววางบนผิวหน้าเซลล์ที่แช่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 0.75 ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นย้อมเซลล์ด้วย neutral red โดยมีการเทียบผลความเป็นพิษของตัวอย่างที่มีต่อเซลล์กับตัวควบคุมเชิงบวกที่เป็น ZDEC (polyurethane film containing 0.1 % zinc diethyldithiocabamate) และตัวควบคุมเชิงลบที่เป็น Teflon ด้วยการประเมินความเป็นพิษของการเกิดวงใสที่เซลล์ไม่ติดสีย้อมของ neutral red จากความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์และประเมินระดับความเป็นพิษตามตารางที่ 3.1 ของมาตรฐาน ISO 10993-5 (International Organization for Standardization, 2009) ได้ผลดังตารางที่ 4.4 พบว่าวัสดุควบคุมเชิงบวกมีระดับความเป็นพิษอยู่ในระดับที่ 4 (พิษมาก) คือ เซลล์โดยรอบและภายใต้วัสดุมี

การตายอย่างเห็นได้ชัดจนเกิดเป็นวงใสรอบวัสดุควบคุมเชิงบวกไปจนถึงขอบของหลุมที่มากกว่า 1 เซนติเมตร วัสดุควบคุมเชิงลบและวัสดุทดสอบถุงบรรจุโลหิตทั้ง 4 ถุง มีระดับความเป็นพิษอยู่ในระดับที่ 2 (พิษน้อย) เนื่องจากภายใต้ชิ้นวัสดุทดสอบมีลักษณะของเซลล์ที่ไม่ติดสี neutral red แต่ภายนอกชิ้นวัสดุเซลล์ L929 มีการติดสีของ neutral red อย่างชัดเจน จึงสามารถระบุได้ว่าวัสดุทดสอบจากถุงบรรจุโลหิตมีระดับความเป็นพิษที่จำกัดอยู่ภายใต้ชิ้นวัสดุนั้นๆ โดยลักษณะสัณฐานของเซลล์ที่ถูกประเมินภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสดงดังภาพที่ 4.2 พบว่า เซลล์ในหลุมที่มีตัวควบคุมเชิงบวก เซลล์มีลักษณะหดกลมและสูญเสียการเกาะแผ่ และไม่ติดสีย้อมของ neutral red จากความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์ที่เกิดจากตัวควบคุมเชิงบวก ดังรูปที่ 4.2 (a) ขณะที่เซลล์ที่อยู่ใต้ชิ้นวัสดุควบคุมเชิงลบและวัสดุทดสอบถุงบรรจุโลหิตทั้ง 4 ถุง มีลักษณะเป็นกระสวยอยู่ แต่เซลล์ไม่มีการ uptake neutral red เข้าไปภายในเซลล์เมื่อเทียบกับเซลล์ที่อยู่ภายนอกชิ้นวัสดุ อาจเป็นเพราะเซลล์มีการตายอย่างฉับพลันจากสารที่ชะออกจากวัสดุแล้วมีผลให้เซลล์ตาย โดยสารหรือภาวการณ์กดทับของวัสดุ อาจส่งผลให้เซลล์ที่สัมผัสวัสดุ ไม่ติดสีย้อม ขณะที่เซลล์ภายนอกวัสดุ ยังคงติดสีย้อมดี ดังรูปที่ 4.2 (b-n)

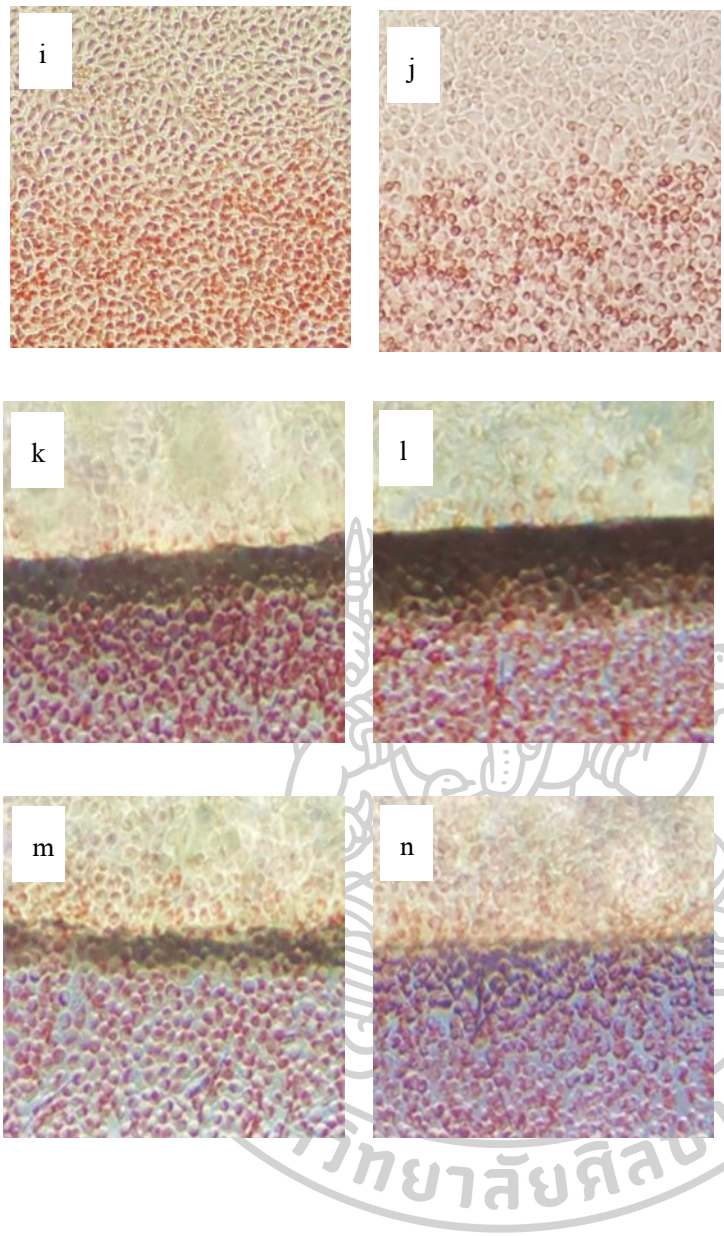
การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันด้วยวิธีการสัมผัสโดยตรงหรือ Direct contact ถือเป็นวิธีหนึ่งในการประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ตาม ISO: 10993-5 ซึ่ง Van Tienhoven และคณะ (2006) ได้เลือกวิธีนี้ในการประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ของวัสดุ polyethylene ที่มีความหนาแน่นต่ำและ polyvinylchloride ที่เป็นตัวแทนของวัสดุที่มีการใช้งานในทางการแพทย์ ซึ่งวัสดุที่ตรวจสอบจำเป็นต้องมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ และไม่มีผลกระทบต่อผู้ป่วย (Van Tienhoven et al., 2006)

ตารางที่ 4. 4 แสดงค่าการเกิดวงใสและระดับที่ประเมินความเป็นพิษด้วยวิธี Direct contact โดยตัวอักษร (a, b) ที่แตกต่างกันในแต่ละชุดข้อมูลหมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) (จำนวน 3 ซ้ำ)

ตัวอย่าง		Zone (cm)	Grade-Reactivity
Vietnam	Negative control	0	2-พิษน้อย
	Positive control	>1	4-พิษมาก
	RBC Bag	0	2-พิษน้อย
	Collection Bag	0	2-พิษน้อย
	Platelet Bag	0	2-พิษน้อย
	Platelet II Bag	0	2-พิษน้อย
India	Negative control	0	2-พิษน้อย
	Positive control	>1	4-พิษมาก
	RBC Bag	0	2-พิษน้อย
	Collection Bag	0	2-พิษน้อย
	Platelet Bag	0	2-พิษน้อย
	Small Bag	0	2-พิษน้อย
Japan	Negative control	0	2-พิษน้อย
	Positive control	>1	4-พิษมาก
	RBC Bag	0	2-พิษน้อย
	Collection Bag	0	2-พิษน้อย
	Platelet Bag	0	2-พิษน้อย
	Satellite Bag	0	2-พิษน้อย



รูปที่ 4. 2 สัณฐานของเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นหลังจากการวางชิ้นตัวอย่างบนผิวหน้าเซลล์โดยตรงและบ่มนาน 24 ชั่วโมง ซึ่งประกอบไปด้วย positive control (a) and negative control (b) ชิ้นวัสดุตัวอย่างจากประเทศเวียดนาม (c-f); (c- RCB bag, d- CPD bag, e- platelet bag I, f- platelet bag II),ชิ้นวัสดุตัวอย่างจากประเทศอินเดีย (g-h); (g- RCB bag, h-CPD bag) โดยแสดงลักษณะของเซลล์ ที่ด้านบนของแต่ละรูปตั้งแต่ a-h คือบริเวณใต้ชิ้นวัสดุตัวอย่าง และด้านล่างของรูปเป็นบริเวณนอกตัวอย่าง

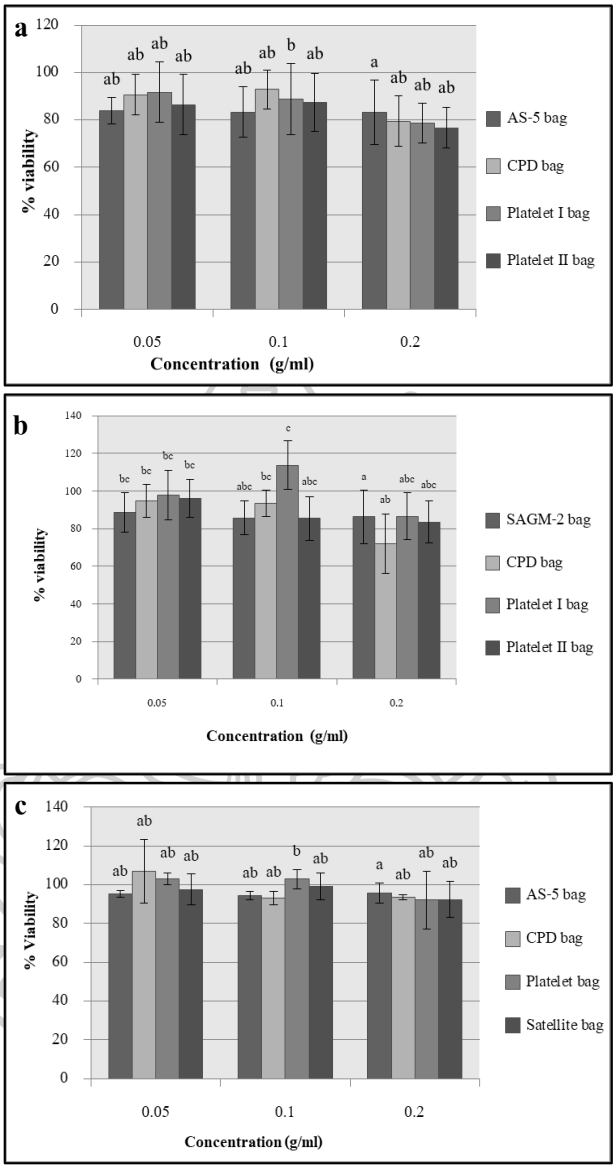


รูปที่ 4. 2 (ต่อ) สัณฐานของเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นหลังจากการวางชิ้นตัวอย่างบนผิวหน้าเซลล์โดยตรงและบ่มนาน 24 ชั่วโมง ซึ่งประกอบไปด้วยชิ้นวัสดุตัวอย่างจากประเทศอินเดีย (i-j); (i-platelet bag I, j-platelet bag II), และชิ้นวัสดุตัวอย่างจากประเทศญี่ปุ่น (k-n); (k- RCB bag, l- CPD bag, m- platelet bag I, n- satellite bag) โดยแสดงลักษณะของเซลล์ ที่ด้านบนของแต่ละรูปตั้งแต่ i-n คือบริเวณใต้ชิ้นวัสดุตัวอย่าง และด้านล่างของรูปเป็นบริเวณนอกตัวอย่าง

การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันด้วยวิธีการ MEM elution ของวัสดุถุงบรรจุโลหิตด้วยการสกัดสารจากถุงบรรจุโลหิตด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM ที่มีซีรัม 5% ในอัตราส่วนตัวอย่าง 1 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเซลล์ 5 ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำสารสกัดที่ได้มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ L929 ด้วยวิธี MTT assay เทียบกับตัวควบคุมบวกที่เป็น Zinc Acetate ความเข้มข้น 8 mg/l ตามมาตรฐาน มอก 1298-2555 (กระทรวงอุตสาหกรรม, 2555) ซึ่งเฉพาะเซลล์ที่มีชีวิตหลังจากได้รับสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างกันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะมีกระบวนการเมตาบอลิซึมในไมโตคอนเดรียของเอนไซม์ไมโตคอนเดรียดีไฮโดรจีเนส (mitochondrial dehydrogenase) ที่สามารถเปลี่ยนสารละลาย MTT ให้เป็นผลึก formazan ที่มีสีม่วงได้ ดังนั้นผลึก formazan ที่เกิดขึ้นจึงเป็นสัดส่วนโดยตรงของเซลล์ที่มีชีวิต ซึ่งผลความเป็นพิษของวัสดุถุงบรรจุโลหิตถุงต่างๆจะถูกแปรผลออกมาให้อยู่ในรูปเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเซลล์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆของสารสกัด แสดงดังรูปที่ 4.3 โดยสารสกัดของถุงบรรจุโลหิตทั้ง 4 ถุง (RCB bag, CPD bag, platelet I bag, และ satellite bag หรือ platelet II bag) ที่ระดับความเข้มข้น 0.05 0.1 และ 0.2 g/ml ให้ค่าเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเซลล์ที่มากกว่า 70% โดยเซลล์ที่ได้รับสารสกัดจากทุกตัวอย่างมีความมีชีวิตของเซลล์ที่ไม่แตกต่างกัน และจากการประเมินลักษณะสัณฐานของเซลล์ภายหลังจากที่ได้รับสารสกัดจากตัวอย่างก่อนบ่มกับสารละลาย MTT แสดงดังรูปที่ 4.4 ซึ่งจากการประเมินความเป็นพิษตามตารางที่ 3.2 พบว่าสารสกัดจาก CPD bag ของทุกแหล่งผลิตมีความเป็นพิษระดับ 2 (พิษน้อย) เซลล์มีลักษณะกลม ใกล้หลุดออกจากพื้นผิวไม่เกินร้อยละ 50 อาจพบการแตกทำลายของเซลล์แต่ไม่รุนแรง และไม่พบช่องว่างระหว่างเซลล์ที่แผ่เป็นชั้นเดียวดังรูปที่ 4.4 (a, e, i) และสารสกัดจากถุง satellite bag ของทุกแหล่งผลิตมีความเป็นพิษระดับ 1 (พิษน้อยมาก) ที่ให้เซลล์มีลักษณะกลม ใกล้หลุดออกจากพื้นผิว ไม่เกินร้อยละ 20 และอาจพบการแตกทำลายของเซลล์ได้บ้าง อย่างไรก็ตามการหดกลมของเซลล์ที่พบนี้อาจเกิดจากกระบวนการแบ่งตัวของเซลล์ที่ยังไม่สมบูรณ์ ทำให้เซลล์ยังไม่เกาะแผ่ที่พื้นผิวดังรูปที่ 4.4 (b-c, f-h, j-l) ดังนั้นการวิเคราะห์ความมีชีวิตด้วยวิธี MTT assay จึงให้ผลที่ชัดเจนกว่าการพิจารณาจากเซลล์สัณฐาน ซึ่งผลจาก MTT assay สามารถระบุได้ว่าวัสดุถุงบรรจุโลหิตไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของวัสดุ PVC ที่มี DEHP เป็นสารเติมแต่งนั้น Van Tienhove และคณะ (2006) ศึกษาความเป็นพิษของ PVC ที่มี DEHP และ Low Density Polyethylene ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน 3 ชนิดคือ L929, McCoy cell line และ HaCaT cell line ที่ใช้เป็นแบบจำลองในการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยวัดความมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay จาก

การสกัดวัสดุด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ พบว่าสารสกัดวัสดุตัวอย่าง PVC ที่มี DEHP (2:1) (PVC-Exp)ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ L929 และ HaCaT



รูปที่ 4. 3 ค่าความมีชีวิตของเซลล์ที่วิเคราะห์ด้วย MTT assay ในการตรวจสอบแบบ MEM elution ของเซลล์ที่บ่มกับสารสกัดวัสดุถุงบรรจุโลหิตส่วนต่างๆ จากประเทศเวียดนาม (a) อินเดีย (b) และญี่ปุ่น (c) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยตัวอักษร (a, b) ที่แตกต่างกันในแต่ละชุดข้อมูลหมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) (จำนวน 3 ซ้ำ)

รูปที่ 4. 4 สัณฐานของเซลล์หลังจากที่บ่มกับสารสกัดวัสดุถุงบรรจุโลหิตส่วนต่างๆ ของตัวอย่างประเทศเวียดนาม (a-CPD, b-RCB bag, c-Platelet bag, d-Satellite bag), อินเดีย (e-RBC Bag, f-CPD Bag, g-Platelet I Bag, h-Platelet II Bag) , และญี่ปุ่น (i-RBC Bag, j-CPD Bag, k-Platelet I Bag , l-Platelet II Bag) ที่ระดับความเข้มข้น 0.2 g/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

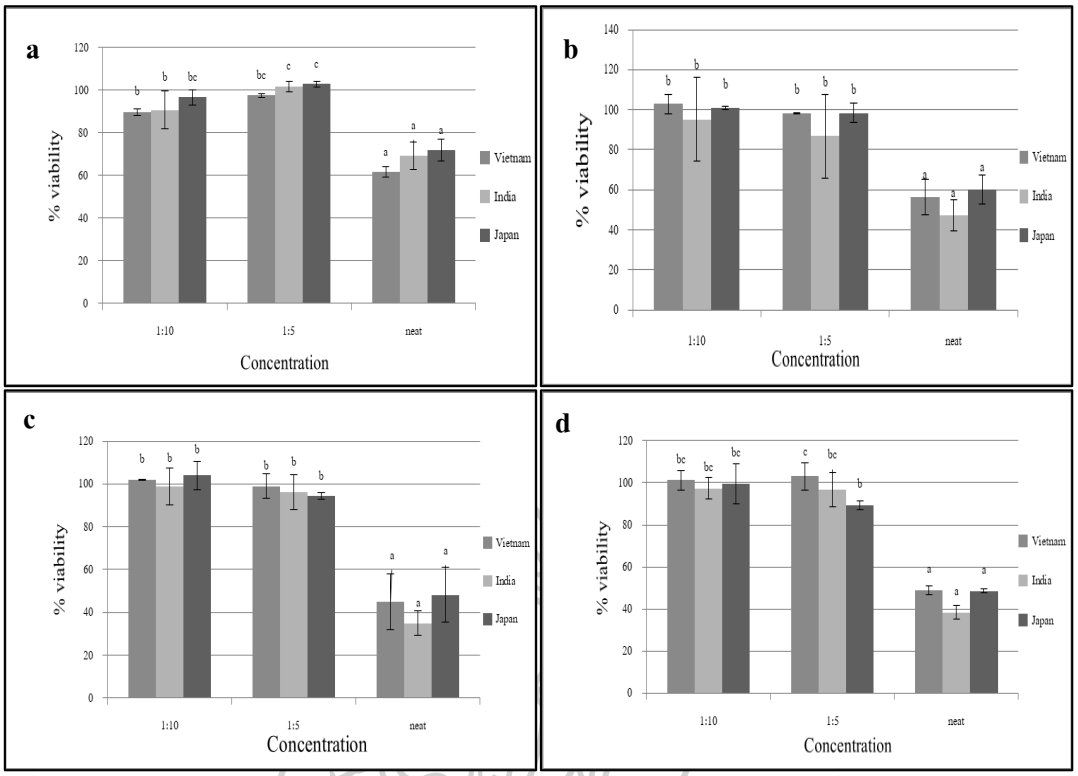
4.2 การทดสอบความเป็นพิษแบบกึ่งเรื้อรัง (Sub-chronic toxicity) และแบบเรื้อรัง (Chronic toxicity) ต่อความมีชีวิตของเซลล์ L929

การใช้งานถุงบรรจุโลหิตที่ทำจากวัสดุพอลิเมอร์ชนิด PVC ที่มีสารเติมแต่ง DEHP (di (2-ethylhexyl) phthalate) อาจมีการชะออกมาของสารที่มีผลต่อโลหิตและผู้รับโลหิต ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาผลความเป็นพิษของถุงบรรจุโลหิตแบบชนิด 4 ถุง ที่มีแหล่งผลิตจากประเทศเวียดนาม อินเดีย และญี่ปุ่น ในรูปแบบการจำลองสภาวะการใช้งานจริง โดยการใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 5% ซีรัม (MEM + 5% FBS) ปริมาตร 450 ml ซึ่งใช้เป็นตัวแทนของโลหิตเข้าไปยังถุง collection bag (CPD bag) โดยในระหว่างที่ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์เข้าไปในถุง ต้องโยกถุงไปมา เพื่อให้สารละลาย CPD ภายในถุงที่มีปริมาตร 63 ml ผสมรวมกับอาหารเลี้ยงเซลล์อย่างสม่ำเสมอ ซึ่งสารละลาย CPD นี้เป็นสารที่ช่วยป้องกันการแข็งตัวของโลหิต จากนั้นทำการถ่ายสารละลายผสมจากถุง CPD bag ตามปริมาณอัตราส่วนขององค์ประกอบโลหิตที่ได้หลังจากการปั่นเหวี่ยง ซึ่งประกอบไปด้วยเซลล์เม็ดเลือดแดงประมาณ 45% และเกล็ดเลือดที่ละลายอยู่ในของเหลวที่เรียกว่าพลาสมา ซึ่งคิดเป็น 55% ของโลหิตทั้งหมด โดยถ่ายสารละลายผสมจากถุง CPD bag ปริมาตร 270 ml ซึ่งคาดการณ์ว่าเป็นปริมาตรของน้ำเลือดที่มีเกล็ดเลือดไปยังถุงบรรจุเกล็ดเลือด (Platelet bag) และถ่ายสารละลายผสมอีก 220 ml ซึ่งจากถุง CPD bag ไปยังถุงบรรจุเม็ดเลือดแดง (AS-5 bag หรือ SAG-M-2 bag) ให้ผสมกับสารละลาย AS-5 หรือ SAG-M-2 ปริมาตร 100 ml โดยสารละลาย AS-5 หรือ SAG-M-2 จะทำหน้าที่เป็นสารที่ช่วยคงความมีชีวิตและกิจกรรมภายในของเซลล์เม็ดเลือดแดง จากนั้นเก็บถุงบรรจุเกล็ดเลือดและถุงบรรจุเม็ดเลือดแดงที่ตามสภาวะและเวลาของการใช้งานจริง โดยถุงบรรจุเกล็ดเลือดเก็บที่อุณหภูมิ 22±2 °C เป็นเวลา 5 วัน ซึ่งในการศึกษานี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างสารละลายจากถุงบรรจุเกล็ดเลือดในวันที่ 3 และ วันที่ 5 ของการเก็บมาทำการตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ และสำหรับถุงบรรจุเม็ดเลือดแดงมีสภาวะการเก็บที่อุณหภูมิ 4±2 °C เป็นเวลา 42 วัน ซึ่งจะทำการเก็บตัวอย่างสารละลายภายในถุงในวันที่ 30 และวันที่ 42 ของสภาวะการเก็บ นำมาตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยวิธี sub-chronic assay ด้วยการวัดความมีชีวิตของเซลล์ L929 หลังจากที่ได้รับสารตัวอย่างจากถุงบรรจุเกล็ดเลือด และถุงบรรจุเม็ดเลือดแดง และย้อมด้วย MTT assay พบว่า เซลล์ที่ได้รับสารจากถุงบรรจุเกล็ดเลือดที่เวลาการเก็บตัวอย่าง 3 วันและ 5 วัน ที่ความเข้มข้นเจือจาง 1:10 และ 1:5 เท่า แสดงความมีชีวิตของเซลล์ที่มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ แสดงดังรูปที่ 4.5 (a-b) และถุงบรรจุเม็ดเลือดแดงที่ระยะเวลาการเก็บตัวอย่าง 30 วันและ 42 วัน ที่ความเข้มข้นเจือจาง 1:10 และ 1:5 แสดงความมีชีวิตที่มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกันกับถุงบรรจุเกล็ดเลือด แสดงดังรูปที่ 4.5 (c-d) ซึ่งการทดสอบได้ใช้ความเข้มข้นตัวอย่างในสภาวะเจือจาง เนื่องจากในการรับโลหิตหรือส่วนประกอบของโลหิตในแต่ละครั้งนั้น เมื่อโลหิตหรือ

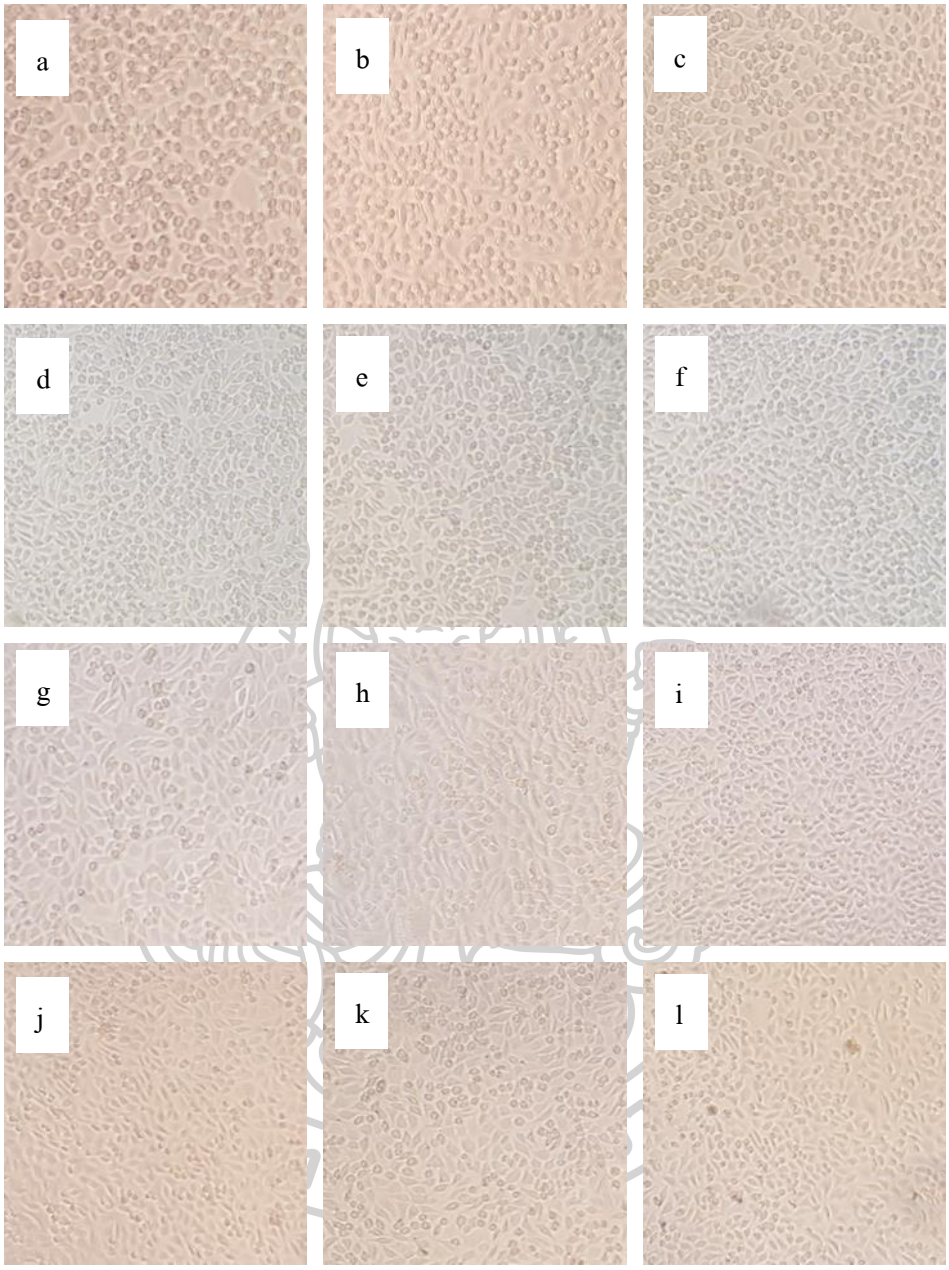
ส่วนประกอบของโลหิตจากถุงบรรจุเข้าสู่ร่างกาย จะเกิดการเจือจางด้วยของเหลวภายในระบบการหมุนเวียนโลหิตของร่างกาย โดยอัตราการเจือจางนั้นจะขึ้นอยู่กับปริมาณโลหิตภายในร่างกาย ซึ่งจะมีอยู่ที่ 70 มิลลิลิตรต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัว (งานธนาคารเลือด, 2011) จึงทำให้การรับโลหิตหรือส่วนประกอบของโลหิต ในแต่ละครั้งมีการเจือจาง ที่ 1:10 หรือมากกว่า อย่างไรก็ตาม การเจือจางที่ 1:5 เท่า ก็ยังแสดงความมีชีวิตของเซลล์ที่ไม่แตกต่างกับการเจือจางที่ 1:10 เท่า

การประเมินลักษณะสัณฐานของเซลล์ภายหลังจากที่ได้รับสารละลายตัวอย่างก่อนบ่มกับสารละลาย MTT แสดงดังรูปที่ 4.6 ซึ่งจากการประเมินความเป็นพิษตามตารางที่ 3.2 พบว่า เซลล์ L929 ที่ได้รับสารตัวอย่างเข้มข้น จากถุงบรรจุเกล็ดเลือดที่ระยะเวลาการเก็บตัวอย่าง 3 วันและ 5 วัน และจากถุงบรรจุเม็ดเลือดแดงที่ระยะเวลาการเก็บตัวอย่าง 30 วันและ 42 วัน แสดงความเป็นพิษระดับ 3 (พิษปานกลาง) โดยเซลล์มีลักษณะกลมหรือพบการแตกทำลายของเซลล์ ไม่เกินร้อยละ 70 แต่เมื่อเจือจางสารละลายตัวอย่างด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ 1:10 เท่า และ 1:5 เท่า แสดงความเป็นพิษของตัวอย่างจากทั้ง 3 แหล่งผลิตที่ระดับ 1 (พิษน้อยมาก) โดยเซลล์มีลักษณะกลม ใกล้หลุดออกจากพื้นผิว ไม่เกินร้อยละ 20 อาจพบการแตกทำลายของเซลล์บ้าง ซึ่งเซลล์โดยส่วนใหญ่ยังคงลักษณะกระสวย และมีการเกาะแผ่ปกติ

มหาวิทยาลัยศิลปากร

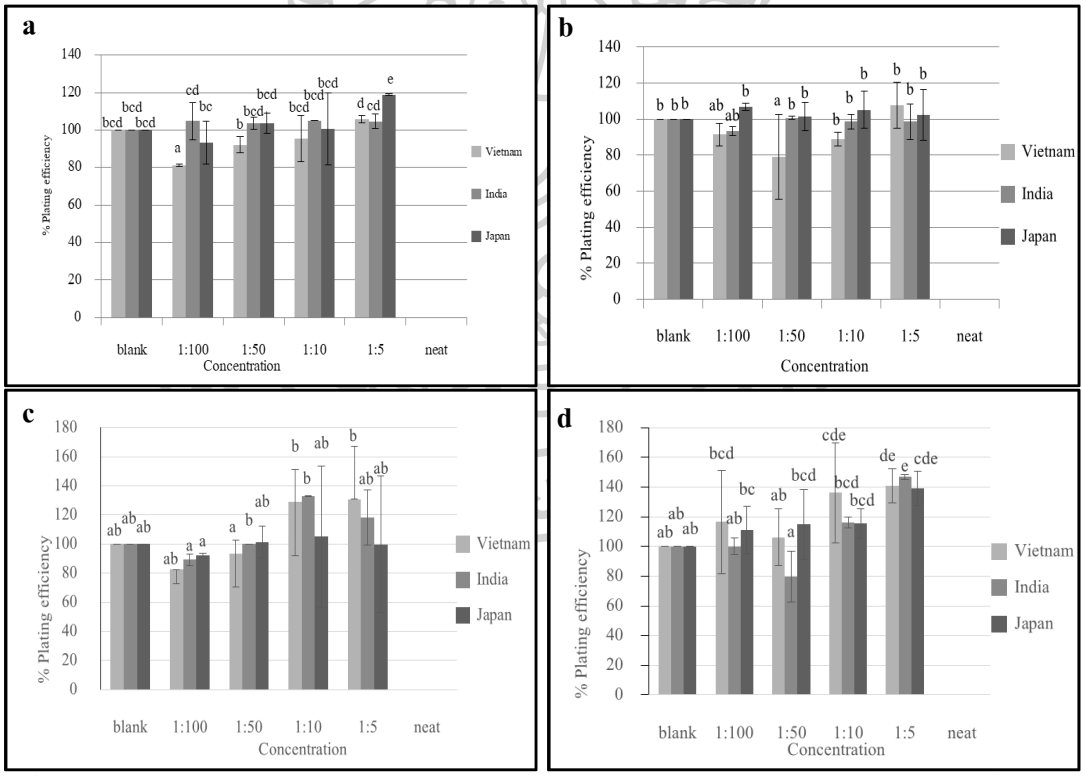


รูปที่ 4. 5 ความมีชีวิตของเซลล์ (%) จากสารละลายผสมจากถุงเกล็ดเลือดที่เวลาการเก็บ 3 วัน (a) และ 5 วัน (b) และถุงเม็ดเลือดแดงที่เวลาการเก็บ 30 วัน (c) และ 42 วัน (d) ที่สภาวะบ่มนาน 24 ชั่วโมงโดยตัวอักษร (a, b) ที่แตกต่างกันในแต่ละชุดข้อมูลหมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P< 0.05$) (จำนวน 3 ซ้ำ)



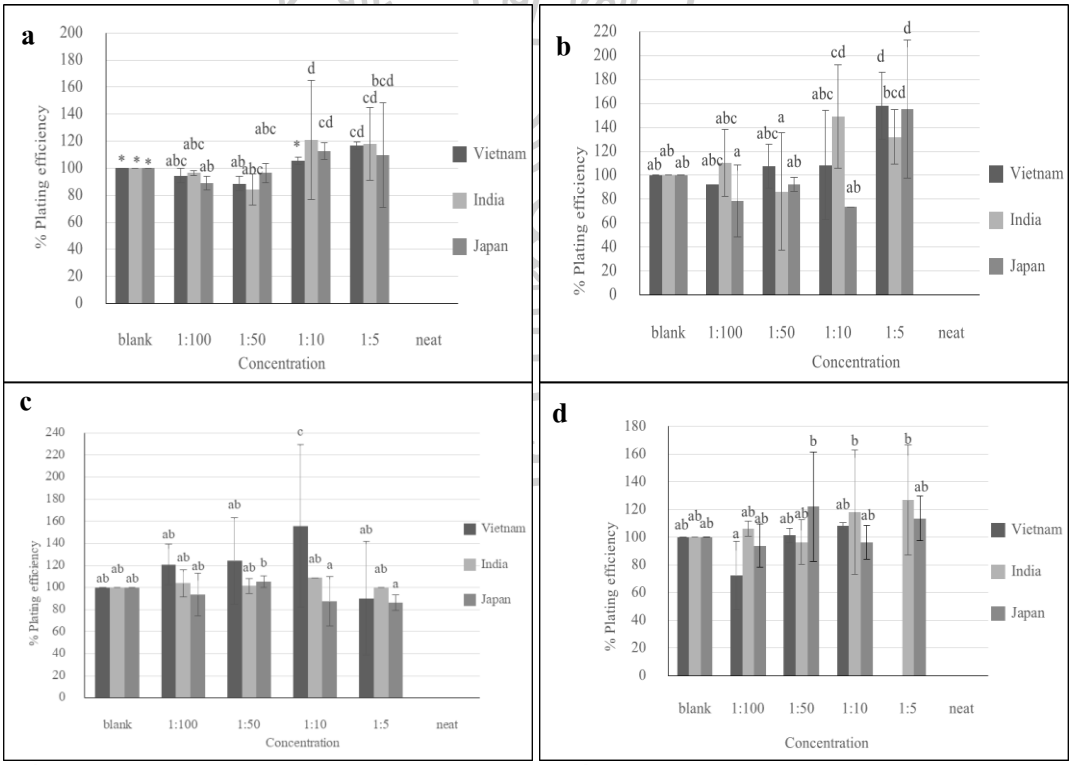
รูปที่ 4. 6 ลักษณะสัณฐานของเซลล์หลังจากบ่มกับสารละลายผสมความเข้มข้น 1:5 เท่า ที่สภาวะการบ่ม 24 ชั่วโมง จากถุงเกล็ดเลือดที่เวลาการเก็บ 3 วัน (a-c; a: Vietnam, b: India, and c: Japan) กับ 5 วัน (d-f; d: Vietnam, e: India, and f: Japan) และถุงเม็ดเลือดแดงที่เวลาการเก็บ 30 วัน (g-i; g: Vietnam, h: India, and i: Japan) กับ 42 วัน (j-l; j: Vietnam, k: India, and l: Japan)

สำหรับการตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ แบบ chronic toxicity ด้วยวิธี Colony forming assay โดยเลือกระดับความเข้มข้นของการเจือจางของสารจากถุงบรรจุเกล็ดเลือดและถุงบรรจุเม็ดเลือดแดงตามที่เจือจางในการวัดความมีชีวิตของเซลล์ข้างต้น และเจือจางเพิ่มอีก 2 ระดับคือ 1:100 และ 1:50 เท่า พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นของการเจือจางของสารจากถุงบรรจุเกล็ดเลือดทุกระดับให้ค่าการฟื้นตัวของเซลล์เดี่ยว L929 จำนวน 100 เซลล์ในการเจริญเป็นโคโลนีหลังจากได้รับสารเป็นเวลา 14 วันเทียบกับเซลล์เดี่ยว L929 ที่ไม่ได้รับสาร ซึ่งค่า % Plating efficiency ที่ได้มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 3 และวันที่ 5 ของการเก็บถุงบรรจุเกล็ดเลือด ดังแสดงในรูปที่ 4.7 (a-b) สำหรับค่าการฟื้นตัวของเซลล์หลังจากได้รับสารจากถุงบรรจุเม็ดเลือดแดงที่ทุกระดับความเข้มข้นของการเจือจางมีค่ามากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับถุงบรรจุเกล็ดเลือด ดังแสดงในรูปที่ 4.7 (c-d) ซึ่งสอดคล้องกับมาตรฐาน ISO 10993-5 ที่กำหนดว่าสารทดสอบไม่เป็นพิษต่อเซลล์ เมื่อมีค่า % Plating efficiency ของการทดสอบที่มากกว่า 70% เมื่อเทียบกับตัวควบคุมลบที่เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์



รูปที่ 4. 7 %Plating efficiency ของเซลล์หลังจากที่ได้รับสารละลายผสมจากถุงเกล็ดเลือดที่เวลาการเก็บ 3 วัน (a) และ 5 วัน (b) และถุงเม็ดเลือดแดงที่เวลาการเก็บ 30 วัน (c) และ 42 วัน (d) เป็นครั้งที่ 1 โดยตัวอักษร (a, b, c, d, e) ที่แตกต่างกันในแต่ละชุดข้อมูลหมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) (จำนวน 3 ซ้ำ)

ในการทำ Colony forming assay ในครั้งที่ 1 จะย้อมโคโลนีด้วย neutral red ในการนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น โดยต้องนับจำนวนโคโลนีอย่างรวดเร็ว ซึ่งจะยังคงสภาพความมีชีวิตของเซลล์ เพื่อนำมาถ่ายเลี้ยงต่อและทำการศึกษาความเป็นพิษแบบ chronic toxicity ต่อเช่นเดียวกับการทำ Colony forming assay ในครั้งที่ 1 เพื่อดูผลเรื้อรังที่อาจเกิดขึ้นหลังจากที่ได้รับสารจากถุงบรรจุเกล็ดเลือดและถุงบรรจุเม็ดเลือดแดงซ้ำเป็นครั้งที่ 2 เพื่อศึกษาโอกาสความเสี่ยงในการรับสารที่ถูกชะจากถุงบรรจุโลหิตจากการใช้งานซ้ำ พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นของการเจือจางของสารจากถุงบรรจุเกล็ดเลือด และถุงบรรจุเม็ดเลือดแดงทุกระดับให้ค่าการฟื้นตัวของเซลล์เดี่ยว L929 จำนวน 100 เซลล์ในการเจริญเป็นโคโลนีหลังจากได้รับสารเป็นเวลา 14 วันเทียบกับเซลล์เดี่ยว L929 ไม่ได้รับสาร ซึ่งได้ค่า % Plating efficiency ที่มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ดังแสดงในรูปที่ 4.8 (a-d) ผลที่ได้แสดงความไม่เป็นพิษของตัวอย่าง ซึ่งสอดคล้องกับมาตรฐาน ISO 10993-5 ที่กำหนดว่าสารทดสอบไม่เป็นพิษต่อเซลล์เมื่อมีค่า % Plating efficiency ของการทดสอบที่มากกว่า 70% เมื่อเทียบกับตัวควบคุม ในการทดสอบแบบ Colony forming assay



รูปที่ 4. 8 %Plating efficiency ของเซลล์หลังจากที่ได้รับสารละลายผสมจากถุงเกล็ดเลือดที่เวลาการเก็บ 3 วัน (a) และ 5 วัน (b) และถุงเม็ดเลือดแดงที่เวลาการเก็บ 30 วัน (c) และ 42 วัน (d) เป็นครั้งที่ 2 โดยตัวอักษร (a, b, c, d, e) ที่แตกต่างกันในแต่ละชุดข้อมูลหมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) (จำนวน 3 ซ้ำ)

บรรจุภัณฑ์ที่ผลิตจากวัสดุ polyvinylchloride (PVC) ที่มี plasticizers ในการทำให้บรรจุภัณฑ์ที่ได้มีความยืดหยุ่น ซึ่งมีการใช้งานทางการแพทย์นั้น มีรายงานการชะของสาร plasticizers จากตัวบรรจุภัณฑ์สู่สารละลายที่บรรจุอยู่ได้ เมื่อบรรจุภัณฑ์นั้นได้รับความร้อนหรือในสภาวะการหมุนวนของสารละลายที่เกิดจากการเขย่าหรือการกวน โดย Wong และ Firor (2017) ได้รายงานการวิเคราะห์สารประกอบที่สามารถสกัด/ชะออก จากชุดบรรจุภัณฑ์พลาสติกชนิด 4 ถุง ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย Dichloromethane หรือ hexane อย่างใดอย่างหนึ่ง แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย GC/MSD Systems ซึ่งพบว่าจากการวิเคราะห์มี PVC additives และ plasticizers ถูกชะออกมา (Wong & Firor, 2017) ขณะที่ Loff และคณะ (2000) ศึกษาปริมาณการชะของ plasticizers จาก PVC Infusion Lines ที่มีการใช้งานกับทารกด้วยวิธี gas chromatography/mass spectrometry ของตัวอย่างที่มีการผ่านของ Fresh frozen plasma (FFP), platelet rich plasma (PRP), และ packed red blood cells (PRBC) เข้าไปใน PVC Infusion Lines พบว่า PRBC PRP และ FFP ปริมาตร 20 ml มีปริมาณ DEHP อยู่ 144- 608 µg, 928 µg และ 552-8108 µg ตามลำดับ (Loff et al., 2000) นอกจากนี้ Takehisa และคณะ (2005) ได้ศึกษาการปลดปล่อย DEHP จากหลอดและแผ่น plasticized PVC โดยการสกัดด้วย polysorbate 80 (Tween 80) ซึ่งปริมาณ DEHP จะมีปริมาณการสะสมที่สูงขึ้น เมื่อมีการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิ และการปลดปล่อยของ DEHP จากหลอด PVC จะขึ้นอยู่กับสภาวะของ PVC และการกระจายตัวของ DEHP ใน PVC (Takehisaa et al., 2005) จากข้อมูลการศึกษาสารที่ถูกชะออกจากตัวอย่างวัสดุ PVC จะเห็นได้ว่ามีการชะออกของสาร แต่ตัวอย่างที่ศึกษาอาจให้ปริมาณสารชะออกที่เป็นพิษต่อเซลล์ในระดับต่ำ ซึ่งสามารถระบุได้ว่าวัสดุถุงบรรจุโลหิตมีความปลอดภัยต่อการใช้งาน

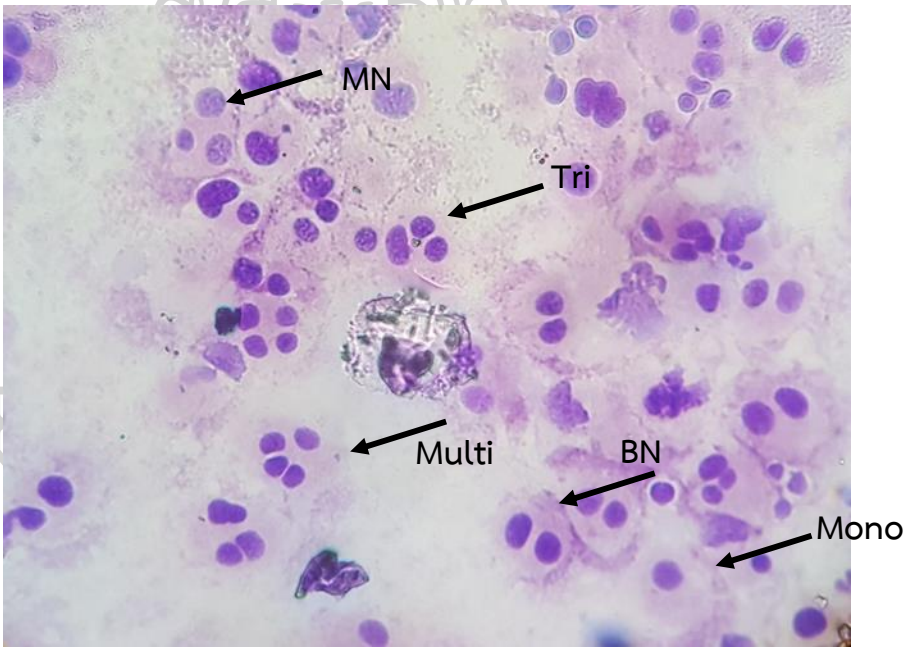
4.3 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม (Genotoxicity) ของถุงบรรจุโลหิตจากสภาวะจำลองการใช้งานจริง

การใช้งานถุงบรรจุโลหิตที่ทำจากวัสดุพอลิเมอร์ชนิด PVC ที่มีสารเติมแต่ง DEHP (di (2-ethylhexyl) phthalate) อาจมีการชะออกมาของสารที่มีผลต่อโลหิต ซึ่งในงานวิจัยนี้ศึกษาผลความเป็นพิษของถุงบรรจุโลหิตแบบชนิด 4 ถุงจากแหล่งผลิตของประเทศ เวียดนาม อินเดีย และญี่ปุ่น ในรูปแบบการจำลองสภาวะการใช้งานจริง โดยการใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 5% ซีรัม (MEM + 5% FBS) ปริมาตร 450 ml เข้าไปยังถุง collection bag (CPD bag) ในระหว่างที่ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์เข้าไปในถุงต้องมีการโยกถุงไปมา เพื่อให้สารละลาย CPD ภายในถุงที่มีปริมาตร 63 ml ผสมรวมกับอาหารเลี้ยงเซลล์อย่างสม่ำเสมอ ซึ่งสารละลาย CPD นี้จะเป็นสารที่ช่วยป้องกันการแข็งตัวของโลหิต จากกนั้นทำการถ่ายสารละลายผสมจากถุง CPD bag ปริมาตร 270 ml ไปยังถุงบรรจุเกล็ด

เลือด (Platelet bag) และสารละลายอีก 220 ml จากถุง CPD bag ก็ทำการถ่ายต่อไปยังถุงบรรจุเม็ดเลือดแดง (AS-5 bag หรือ SAG-M-2 bag) ให้ผสมกับสารละลาย AS-5 หรือ SAG-M-2 ปริมาตร 100 ml โดยสารละลาย AS-5 หรือ SAG-M-2 จะทำหน้าที่เป็นสารที่ช่วยคงความมีชีวิตและกิจกรรมภายในของเซลล์เม็ดเลือดแดง จากนั้นเก็บถุงบรรจุเกล็ดเลือดและถุงบรรจุเม็ดเลือดแดงตามสภาวะและเวลาของการใช้งานจริง โดยถุงบรรจุเกล็ดเลือดเก็บที่อุณหภูมิ 22±2 °C เป็นเวลา 5 วัน โดยทำการเก็บตัวอย่างสารละลายจากถุงบรรจุเกล็ดเลือดในวันที่ 3 และ วันที่ 5 ของการเก็บมาทำสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม และสำหรับถุงบรรจุเม็ดเลือดแดงมีสภาวะการเก็บที่อุณหภูมิ 4±2 °C เป็นเวลา 42 วัน ซึ่งจะทำการเก็บตัวอย่างสารละลายภายในถุงในวันที่ 30 และวันที่ 42 ของสภาวะการเก็บ มาทำการตรวจสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของเซลล์ด้วยวิธี micronuclei assay ซึ่งการเกิด micronuclei (MN) อาจเกิดจากความเสียหายของโครโมโซมหรือเกิดจากการสูญเสีย centromere หรือเกิดจากความบกพร่องของเซลล์จากการแบ่งตัวที่เกิดจากเส้นใย spindle ซึ่งสามารถใช้ตรวจสอบความเสียหายของสารพันธุกรรมที่ส่งต่อไปยังเซลล์ลูกได้ โดยตรวจสอบจากสภาวะที่เซลล์มีสองนิวเคลียส (binucleated cells) ซึ่ง MN จะเกิดขึ้นในขณะที่เซลล์แบ่งตัวประมาณหนึ่งรอบครึ่งของวัฏจักรเซลล์ ดังนั้นการใช้ cytochalasin B ในการยับยั้งการแบ่งไซโตพลาซึมกับเซลล์ที่ผ่านวัฏจักรเซลล์หรือมีการจำลองดีเอ็นเอ จะทำให้เห็นเซลล์อยู่ในระยะที่มีสองนิวเคลียสที่สามารถเห็น MN ที่เกิดขึ้นในเซลล์ได้ดี และสามารถระบุถึงความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมได้ (กิตติมา บุตรจันทร์, 2557)

ในงานวิจัยนี้ใช้เซลล์ L929 เป็นแบบจำลองในการศึกษา โดยเลี้ยงเซลล์บน cover slip และบ่มกับสารตัวอย่างที่ระดับการเจือจาง 1:10 เท่า เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำ cover slip มาตรึงด้วย Fixative (acetic acid : methanol, 3:1) แล้วย้อมด้วย 10% Giemsa นับจำนวนเซลล์ที่เกิด MN ใน 1000 BN cells ตามลักษณะในรูปที่ 4.9 เทียบกับตัวควบคุมบวกที่เป็น colchicine พบว่า เซลล์ L929 ที่ได้รับตัวอย่างสารละลายจากถุงบรรจุเกล็ดเลือด ที่เวลาของการเก็บ 3 และ 5 วัน และถุงบรรจุเม็ดเลือดแดง ที่เวลาของการเก็บที่ 30 และ 42 วัน แล้วประเมิน NDI (nuclear division index), % MN/1000 BN cells และ Fold ของการเกิด micronucleus โดยค่า NDI เป็นค่าที่บ่งบอกถึงจำนวนครั้งการแบ่งตัวของเซลล์และใช้ประเมินความไม่เป็นพิษของการทดสอบได้ โดยหากเซลล์ในสภาวะทดสอบมีค่า NDI มากกว่า 1 แสดงว่าเซลล์ที่ศึกษาอยู่ในระหว่างการแบ่งเซลล์ และสารไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ในการทดลองนี้ได้ค่า NDI อยู่ระหว่าง 1.508-1.816 แสดงถึงเซลล์มีการแบ่งตัวเข้าสู่ cell cycle และโอกาสของการรับสารในระหว่างการแบ่งตัวของเซลล์จะมีผลต่อสารพันธุกรรมที่

สามารถใช้ประเมินพิษต่อสารพันธุกรรมด้วยการหาความถี่การเกิด MN ใน BN cells ซึ่งผลการประเมินแสดงดังตารางที่ 4.3 โดยสารจากถุงบรรจุเกล็ดเลือด และถุงบรรจุเม็ดเลือดแดง จากทั้ง 3 แหล่งผลิตที่สภาวะจำลองการใช้งานจริง แสดงค่า % MN/1000 BN cells ในระดับที่น้อยกว่าตัวควบคุมบวก และเมื่อพิจารณาค่า Fold ที่เป็นค่า total MN/1000 BN cells ของสภาวะทดสอบเทียบกับตัวควบคุมลบ ก็ให้ผลเช่นเดียวกัน คือมีค่าที่น้อยกว่าตัวควบคุมบวกของทุกๆตัวอย่าง จึงเป็นไปได้ว่าการจำลองสภาวะการใช้งานจริงถุงบรรจุโลหิตที่ทำจากวัสดุพอลิเมอร์ชนิด PVC ที่มีสารเติมแต่ง DEHP (di (2-ethylhexyl) phthalate) มีความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมในระดับต่ำๆ หรืออาจไม่เป็นเป็นพิษ



รูปที่ 4. 9 ลักษณะการเกิด Mononucleus (Mono), Binucleus (BN), Micronucleus (MN), Trinucleus (Tri) และ Multinucleus (Multi) จากการทดสอบผลความเป็นพิษต่อพันธุกรรมของถุงบรรจุโลหิตแบบชนิด 4 ถุงจากแหล่งผลิตของประเทศเวียดนาม อินเดีย และญี่ปุ่น ในรูปแบบการจำลองสภาวะการใช้งานจริง

ตารางที่ 4. 5 สรุปผลการทดสอบ Micronucleus test ของตัวอย่างถุงบรรจุโลหิตจากแหล่งผลิตของประเทศเวียดนาม อินเดีย และญี่ปุ่น โดยตัวอักษร (a, b, c) ที่แตกต่างกันในแต่ละชุดข้อมูลหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) (จำนวน 3 ซ้ำ)

Condition		NDI	% MN/1000 BN cells	Fold
platelet 3 day storage	Negative	1.602	3.530±1.187^{ab}	1.000
	Positive	1.756	8.959±0.635^{c}	2.538
	Vietnam	1.758	6.179±1.283^{bc}	1.751
	India	1.789	2.278±0.495^{a}	0.645
	Japan	1.692	1.537±0.526^{a}	0.435
platelet 5 day storage	Negative	1.508	2.846±0.403^{b}	1.000
	Positive	1.678	7.219±1.332^{c}	2.537
	Vietnam	1.650	0.874±0.641^{a}	0.307
	India	1.576	1.643±0.338^{ab}	0.577
	Japan	1.679	1.796±0.542^{ab}	0.631
RBC 30 day storage	Negative	1.681	3.038±0.589^{b}	1.000
	Positive	1.635	6.679±0.476^{d}	2.198
	Vietnam	1.801	4.102±0.117^{c}	1.350
	India	1.753	1.536±0.790^{a}	0.506
	Japan	1.747	1.703±0.325^{a}	0.561
RBC 42 day storage	Negative	1.816	2.656±1.997^{a}	1.000
	Positive	1.738	6.296±1.556^{b}	2.370
	Vietnam	1.781	0.948±0.791^{a}	0.357
	India	1.726	1.985±0.087^{a}	0.747
	Japan	1.753	1.685±0.087^{a}	0.634

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

5.1.1 การศึกษาความเป็นพิษที่มีผลต่อความมีชีวิตของเซลล์ L929 ของวัสดุตัวอย่างถุงบรรจุโลหิตของบริษัทหนึ่งที่มีแหล่งการผลิตในประเทศเวียดนาม อินเดีย และญี่ปุ่น เป็นถุงบรรจุโลหิตแบบชนิดที่มี 4 ถุง (Quadruple Blood Bag) ทำจากวัสดุพอลิเมอร์ชนิด PVC ที่มีสารเติมแต่ง DEHP ด้วยวิธี agar diffusion, direct contact และ MEM elution พบว่า ตัวอย่างถุงบรรจุโลหิตมีความเป็นพิษอยู่ที่ระดับ 1 (พิษน้อยมาก) ในการทดสอบแบบ agar diffusion ซึ่งเซลล์บางส่วนภายใต้ชิ้นตัวอย่างเกิดความเสียหาย และมีความเป็นพิษอยู่ที่ระดับ 2 (พิษน้อย) ในการทดสอบแบบ direct contact เซลล์ภายใต้ชิ้นวัสดุเกิดความเสียหาย และการทดสอบแบบ MEM elution พบสารสกัดจากวัสดุถุงบรรจุโลหิต มีความเป็นพิษอยู่ที่ระดับ 1 (พิษน้อยมาก) เมื่อเทียบกับตัวควบคุมบวกของ Zinc acetate ที่พบความเป็นพิษระดับ 4 (พิษมาก) ดังนั้นจากผลการทดสอบ acute toxicity ในทั้ง 3 วิธีสามารถระบุได้ว่าตัวอย่างถุงบรรจุโลหิตจากทั้ง 3 แหล่งผลิตมีความปลอดภัยทางชีววิทยาตามมาตรฐาน ISO 10993-5 หรือ มอก.1298-2555

5.1.2 การศึกษาผลความเป็นพิษของถุงบรรจุโลหิต ในรูปแบบการจำลองสภาวะการใช้งานจริง โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ซึ่งเป็นตัวแทนของโลหิตผ่านเข้าไปในระบบของการใช้งาน แล้วตรวจสอบความเป็นพิษด้วยการวัดความมีชีวิตของเซลล์ L929 หลังจากที่ได้สัมผัสตัวอย่าง ตามอัตราที่สามารถถูกเจือจางด้วยระบบไหลเวียนโลหิตภายในร่างกาย พบว่าค่าความมีชีวิตของเซลล์ที่สัมผัสสารที่มีการเจือจางที่ 1:5 เท่า และ 1:10 เท่าของสารจากถุงบรรจุเกล็ดเลือดและถุงบรรจุเม็ดเลือดแดง ให้ค่าความมีชีวิตของเซลล์ที่มากกว่า 70% และวิธี colony forming assay เซลล์เมื่อนำมาสัมผัสสารสกัดจากถุงเป็นครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 ต่อเนื่องกันยังคง %Plating efficiency ที่มากว่า 70% ซึ่งสอดคล้องกับมาตรฐาน ISO 10993-5 ที่กำหนดว่าสารทดสอบไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เมื่อมีค่า % Plating efficiency ของการทดสอบที่มากกว่า 70% เมื่อเทียบกับตัวควบคุม ในการทดสอบแบบ Colony forming assay

5.1.3 การศึกษาผลความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของถุงบรรจุโลหิตจากสภาวะจำลองการใช้งานจริง ด้วยวิธี micronuclei assay พบว่าสารทดสอบจากถุงบรรจุเกล็ดเลือดและถุงบรรจุเม็ดเลือดแดงที่ระดับการเจือจาง 1:10 เท่า มีค่า % MN/1000 BN cells และ Fold ของการเกิด micronucleus ที่น้อยกว่าตัวควบคุมบวกที่เป็น colchicine ซึ่งแสดงระดับความเป็นพิษในระดับที่ค่อนข้างน้อย แสดงถึงการจำลองสภาวะการใช้งานจริงถุงบรรจุโลหิตที่ทำจากวัสดุพอลิเมอร์ชนิด

PVC ที่มีสารเติมแต่ง DEHP (di (2-ethylhexyl) phthalate) มีความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมในระดับต่ำๆ หรืออาจไม่เป็นเป็นพิษ

5.1.4 ความเป็นพิษของถุงบรรจุโลหิตจากแหล่งผลิตประเทศเวียดนาม อินเดีย และญี่ปุ่น แสดงระดับความเป็นพิษที่แตกต่างกัน โดยตัวอย่างถุงบรรจุโลหิตจากประเทศเวียดนามแสดงความเป็นพิษมากที่สุด สังเกตได้จากลักษณะสัณฐานของเซลล์ที่มีการหดกลม เมื่อได้สัมผัสกับตัวอย่างทดสอบ และทั้งนี้ยังมีความถี่ในการเกิด micronuclei มากกว่าตัวอย่างที่ผลิตจากประเทศอินเดียและญี่ปุ่น แต่ระดับความเป็นพิษที่ปรากฏนี้อยู่ในระดับความปลอดภัยที่ยอมรับให้มีการใช้งานได้ ตามมาตรฐาน ISO 10993-5

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 อุณหภูมิของวุ้นที่ใช้ศึกษาความเป็นพิษแบบเฉียบพลันด้วยวิธี agar diffusion และน้ำหนักวุ้นเป็นปัญหาในการศึกษาได้ จึงควรย้อมเซลล์ที่ศึกษาด้วย neutral red ก่อนเททับด้วยวุ้นเพื่อประเมินความมีชีวิตในเบื้องต้นจากเทคนิคได้

5.2.2 ผลของการศึกษาความเป็นพิษจากการจำลองสภาวะการใช้งานจริงของถุงบรรจุโลหิต ที่มีต่อค่าความมีชีวิตของเซลล์ L 929 เป็นเพียงการใช้อาหารเลี้ยงเซลล์จำลองเป็นโลหิตรวม อาจจะแสดงผลความเป็นพิษที่ไม่ชัดเจน และอาจทดสอบกับโลหิตแทน

5.2.3 การศึกษาความเป็นพิษแบบกึ่งเรื้อรัง-เรื้อรัง ด้วยวิธี colony forming assay ซึ่งต้องมีการศึกษาต่อในสภาวะที่มีการสัมผัสกับสารครั้งที่ 2 จำต้องมีการถ่ายเลี้ยงเซลล์ไปศึกษาต่อ จึงย้อมโคโลนีในการทำ colony forming assay ในครั้งแรกด้วย neutral red เพื่อคงความมีชีวิตของเซลล์ และต้องตรวจนับจำนวนโคโลนีอย่างรวดเร็ว รวมทั้งการทำ trysinization ถ่ายเลี้ยงเซลล์ก็ต้องไม่ทำให้เซลล์บาดเจ็บ

5.2.4 การประเมินความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมด้วยวิธี micronuclei assay เป็นการดูความเสียหายของสารพันธุกรรมที่ส่งต่อไปยังรุ่นถัดไป เพื่อให้ง่ายต่อการศึกษาผลที่เกิดขึ้นจึงศึกษาเซลล์เพาะเลี้ยงบนแผ่น cover slip ซึ่งสภาวะการศึกษาต้องแน่ใจว่าเซลล์มีการแบ่งตัวเข้าสู่วัฏจักรเซลล์ และสารทดสอบไม่ก่อผลเป็นพิษต่อความมีชีวิตของเซลล์ จึงควรใช้ความเข้มข้นสารทดสอบในระดับที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ และมีการย้อมเซลล์ที่ดี ซึ่งใช้ 0.0075 M KCl ในการทำให้เซลล์เต่งและตรึงเซลล์ด้วย Fixative (acetic acid : methanol, 3:1) ในสภาวะเย็นนาน 10 นาที ทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นย้อมด้วย 10% Giemsa จะทำให้เห็นนิวเคลียสได้ชัดเจนในการวิเคราะห์ binucleated cell และ micronucleus

5.2.5 การประเมินความเป็นพิษทางชีวภาพของถุงบรรจุโลหิต ควรมีการประเมินด้วยวิธี agar diffusion direct contact และ MEM elusion เป็นอย่างน้อย ซึ่งเป็นวิธีตามมาตรฐาน ISO 10993-5 อย่างไรก็ตาม เพื่อให้ได้ข้อมูลความเป็นพิษที่ครบถ้วน ควรทำการตรวจสอบตามวิธีต่างๆที่ได้มีการทำดังวิทยานิพนธ์นี้

รายการอ้างอิง

Ausman, R. K., & Bellamy, D. (1984). Problems and Resolutions in the Development of the Flexible Plastic Blood Container The American Journal of Surgery, 148(5), 559-561.

Bicalho, B., Serrano, K., dos Santos Pereira, A., Devine, D. V., & Acker, J. P. (2016). Blood Bag Plasticizers Influence Red Blood Cell Vesiculation Rate without Altering the Lipid Composition of the Vesicles. Transfus Med Hemother, 43, 19–26.

Bigham, K. J. (2017). Biocompatibility of Plastics. Retrieved from

Biomerics. (2011). Biomerics Biocompatibility Guide Retrieved from

Booth, C., & Allard, S. (2017). Blood transfusion. Medicine, 45(4), 244-250.

Debdatta, B., & Rajendra, K. (2014). Overview of blood components and their preparation Indian Journal of Anaesthesia, 58(5), 529–537.

Deepak, C., & Umesh, U. (2010). STUDIES ON PVC BLOOD BAG FORMULATION USING A NEW PLASTICIZER. Retrieved from http://polymerprojecttopics.blogspot.com/2010/08/pvc-blood-bag.html

Derek, N. (2013). Handbook of Transfusion Medicine. United Kingdom: United Kingdom Blood Services.

Docherty, S. M. (2012). Heamatology and transfusion science Biomedical Sciences: John wiley & Sons.

Fenech, M. (2000). The in vitro micronucleus technique Mutation Research, 455

81–95.

Inoue, K., Kawaguchi, M., Yamanaka, R., Higuchi, T., Ito, R., Saito, K., & Nakazawa, H. (2005). Evaluation and analysis of exposure levels of di(2-ethylhexyl) phthalate from blood bags. Clinica Chimica Acta, 358, 159–166.

International Organization for Standardization. (2003). ISO 10993 Biological evaluation of medical devices In ISO 10993-3 Tests for genotoxicity, carcinogenicity and reproductive toxicity

International Organization for Standardization. (2009). ISO:10993 Biological evaluation of medical devices In ISO 10993-5 Tests for in vitro cytotoxicity

International Organization for Standardization. (2016). ISO:10993 Biological evaluation of medical devices In ISO 10993-1 Evaluation and testing within a risk management process.

Iverson, A., Kim, S., & Sojiphan, K. (2004). Materials Selection Analysis: Bag for Viable Blood Storage. Materials Science(318).

Li, W., Zhou, J., & Xu, Y. (2015). Study of the in vitro cytotoxicity testing of medical devices (Review) BIOMEDICAL REPORTS, 3, 617-620.

Loff, S., Kabs, F., Witt, K., Sartoris, J., Mandl, B., Niessen, K. H., & Waag, K. L. (2000). Polyvinylchloride Infusion Lines Expose Infants to Large Amounts of Toxic Plasticizers. Journal of Pediatric Surger, 35(12), 1775-1781.

Lönnroth, E. C. (2005). Toxicity of Medical Glove Materials: A Pilot Study. International Journal of Occupational Safety and Ergonomics (JOSE), 11(22), 131-139.

Mazda, T. (2011). Centralized quality control inspections for blood bags and leukocyte reduction at the Japanese Red Cross Society. ISBT Science Series(6), 404-407.

Organisation for Economic Cooperation and Development. (1997). Guidelines for the Testing of Chemicals. In Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test.

Pant, A., Agarwal, A., Sharma, V., & Seth, P. (2011). In vitro cytotoxicity evaluation of plastic biomedical devices. Human & Experimental Toxicology(20), 412-417.

Prowse, C. V., Korte, D. d., Hess, J. R., & Van der Meer, P. F. (2014). Commercially available blood storage containers. Vox Sanguinis(106), 1-13.

PVCMed Alliance. (2016). PVC enabled a revolution in healthcare. Retrieved from http://pvcmed.org/pvc-in-healthcare/pvc-medical-devices

Srinivas, S. (2016). Blood bags and its anticoagulants. Retrieved from https://www.slideshare.net/SowmyaSrinivas5/blood-bags-and-its-anticoagulants-68774206

Stig, L. (2008). blood bags – a pilot case to stimulate eco-innovation within the healthcare sector. Retrieved from Sweden:

Takehisaa, H., Naokoa, E., Masahikoa, S., Katsuhideb, T., Moriyukic, O., Keizohc, S., Toshioa, O. (2005). Release behavior of diethylhexyl phthalate from the polyvinyl-chloride tubing used for intravenous administration and the plasticized PVC membrane Journal of Pharmaceutics 297, 30-37.

Van Tienhoven, E. A. E., Korbee, D., Schipper, L., Verhaean, H. W., & De Jong, W. H. (2006). In vitro and in vivo (cyto)toxicity assay using PVC and LDPE as model materials. Biomedical Materials Research, 78A(1), 175-182.

Vidal, M. N. P., Aiub, C., Abrantes, S., & Zamith, H. P. S. (2009). Evaluation of Brazilian medical devices using agar diffusion cytotoxicity assay REVISTA BRASILEIRA DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA, 31(2), 84-87.

Wong, D. M., & Firor, R. L. (2017). Analysis of Extractable/Leachable Compounds From Plastic Intravenous Bag Sets Using GC/MSD Systems. from Agilent Technologies

มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมภาชนะพลาสติกปราศจากเชื้อสำหรับบรรจุโลหิตและส่วนประกอบของโลหิต, 1298, 4449 Stat. (2555).

กิตติมา บุตรจันทร์. (2557). การศึกษาผลของสารสกัดรำข้าวดำและรำข้าวแดงต่อดีเอ็นเอของเซลล์มะเร็งผิวหนังที่ถูกทำลายด้วยรังสี UVA. (มหาบัณฑิต), ศิลปากร, บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร.

คณะกรรมการเครื่องมือแพทย์. (2559). ถุงบรรจุโลหิตมนุษย์. In.

งานธนาคารเลือด. (2011). หน้าที่ของโลหิตและส่วนประกอบโลหิต. Retrieved from http://www.med.cmu.ac.th/hospital/blbank/2011/index.php?option=com_content&view=article&id=147:2011-10-07-14-52-15&catid=122&Itemid=591

นรินทร์ กิจเกรียงไกรกุล. (2555). น้ำยากันโลหิตแข็งและน้ำยาเสริมสำหรับเก็บเม็ดโลหิตแดง. วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต, 22(1), 51-58.

ปวีณา เจริญสิทธิ์, & ทวีทรัพย์ ชัยสมบูรณ์พันธ์. (2558). การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงของภาชนะพลาสติกสำหรับบรรจุผลิตภัณฑ์เภสัชปราศจากเชื้อโดยวิธี Agar Diffusion. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์(1), 46-53.

ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย. (2015). มาตรฐานธนาคารเลือดและการบริการโลหิต. In. กรุงเทพฯ: ห้างหุ้นส่วนจำกัด อุดมศึกษา.

สัญญา ร้อยสมมุติ. (2555). หัวใจและการไหลเวียนเลือด. In โครงสร้างหลักการและไฟฟ้าของหัวใจ.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ชัยวัฒน์ ฤทธิ์สุข
วัน เดือน ปี เกิด	23 กรกฎาคม 2535
สถานที่เกิด	นนทบุรี
วุฒิการศึกษา	พ.ศ. 2553 สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนศรีบุณยานนท์ อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี พ.ศ. 2557 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม พ.ศ. 2558 ศึกษาต่อในระดับปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม
ที่อยู่ปัจจุบัน	12/3 หมู่ 11 ตำบลบางแม่นาง อำเภอบางใหญ่ จังหวัดนนทบุรี 11140
ผลงานตีพิมพ์	พ.ศ. 2560 Safety Assessment of Blood Bags Using Animal Cell Culture (poster presentation and proceeding). The National and International Graduate Research Conference 2017, March 10. Khon Kaen University, Thailand

มหาวิทยาลัยศิลปากร