

ผลของการเก็บเม็ดเลือดแดงต่อการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง การแตกของเม็ดเลือดแดง ระดับของเมทฮีโมโกลบิน และความเปราะของเม็ดเลือดแดง

The Effects of Storage on Red Blood Cell Acidity, Hemolysis, Methemoglobin Level and Osmotic Fragility

ชนสาร ศิริรัตน์, สุชา จุลสำลี, ดวงมณี แสนมัน, นนทยา ทางเรือ, กาญจนา ศิริรัตน์*

คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ สมุทรปราการ 10540

Tanasan Sirirat, Sucha Chulsomlee, Duangmanee Sanmun, Nonthaya Tangrua, Kanjana Sirirat*

Faculty of Medical Technology, Huachiew Chalermprakiet University, Samutprakan 10540

*Corresponding author, e-mail: kanjana.sirir@gmail.com

บทคัดย่อ

เซลล์เม็ดเลือดแดงมีหน้าที่ขนส่งออกซิเจนไปยังเนื้อเยื่อและอวัยวะต่าง ๆ ของร่างกาย ซึ่งในระหว่างการเก็บรักษาทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เม็ดเลือดแดง การวิจัยครั้งนี้การวิจัยเชิงทดลองในห้องปฏิบัติการมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นกรด-ด่างด้วยเครื่องวัดค่ากรด-ด่างแบบดิจิทัล การแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงด้วยวิธีด้วยการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ระดับเมทฮีโมโกลบินด้วยการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 และ 630 นาโนเมตร และความเปราะของเซลล์เม็ดเลือดแดงด้วยวิธีการทดสอบความเปราะของเซลล์เม็ดเลือดแดงต่อแรงดันออสโมติก ในตัวอย่างเซลล์เม็ดเลือดแดงที่เก็บด้วยสารกันเลือดแข็งชนิด CPDA-1 จากกลุ่มอาสาสมัครที่มีสุขภาพดี ไม่มีโรคประจำตัว มีอายุระหว่าง 20 ถึง 45 ปี จำนวน 30 ราย โดยเก็บรักษาภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7, 14 และ 21 วัน และทำการวิเคราะห์ผลโดยใช้สถิติเชิงวิเคราะห์ One-way ANOVA ผลการศึกษาพบว่าในวันที่ 7 มีค่าความเป็นกรด-ด่างลดลง และมีค่าความเปราะของเซลล์เม็ดเลือดแดงสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) นอกจากนี้พบว่าระดับฮีโมโกลบินอิสระ และระดับเมทฮีโมโกลบิน มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในวันที่ 14 ที่ค่า p เท่ากับ 0.02 และ 0.00 ตามลำดับ ผลการศึกษาในครั้งนี้สรุปได้ว่าเม็ดเลือดแดงที่ถูกเก็บในสารกันเลือดแข็งชนิด CPDA-1 จะเกิดการเปลี่ยนแปลงทั้งความเป็นกรด-ด่าง การแตกของเม็ดเลือดแดง ระดับเมทฮีโมโกลบิน และความเปราะของเซลล์เม็ดเลือดแดง ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลศึกษาเพิ่มเติม และประกอบการพิจารณาเลือกใช้ส่วนประกอบโลหิตชนิดเม็ดเลือดแดงอัดแน่นที่เหมาะสมกับผู้ที่ต้องการได้รับ นอกจากนี้ยังเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาวิจัยด้านความคงตัวของเยื่อหุ้มเซลล์และภาวะความเสียหายจากออกซิเดชันในกระบวนการเก็บเลือด เพื่อการพัฒนาวิธีการเก็บรักษาเลือดในห้องปฏิบัติการต่อไป

คำสำคัญ: เซลล์เม็ดเลือดแดง ซีพีดีเอ-วัน ความเปราะของเซลล์เม็ดเลือดแดง เมทฮีโมโกลบิน

Abstract

Red blood cells play a crucial role in transporting oxygen to various tissues and organs of the body. During storage, changes occur within red blood cells. This experimental laboratory research aimed to study the acidity using a pH meter, hemolysis by measuring absorbance at 540 nm, methemoglobin level by measuring absorbance at 500 and 630 nm, and red blood cells fragility using the osmotic fragility test with CPDA-1 as anticoagulant. Samples were collected in CPDA-1 anticoagulant tubes from 30 healthy volunteers aged between 20 and 45 years, with no underlying health conditions. All samples were stored at 4 °C and analyzed on days 7, 14, and 21. Data were analyzed using one-way ANOVA. The results showed that on the 7th day, there was a decrease in acidity levels and a statistically significant increase in osmotic fragility on day 7 (p -value < 0.01). Additionally, free hemoglobin and methemoglobin levels showed statistically significant increases on day 14 with p -values of 0.02 and 0.0, respectively. In conclusion, red blood cells stored with CPDA-1 exhibit changes in acidity, hemolysis, methemoglobin levels, and osmotic fragility. These findings provide valuable supplementary information for consideration when selecting appropriate packed red blood cell for transfusion. Moreover, the study contributes to a better understanding of red blood cell membrane stability and oxidative damage during storage, which may be relevant for hematological research and the development of improved preservation techniques in clinical laboratory practice.

Keywords: red blood cell, CPDA-1, osmotic fragility, methemoglobin

บทนำ

เซลล์เม็ดเลือดแดง (Red blood cells, RBCs) ทำหน้าที่ขนส่งออกซิเจนไปยังเนื้อเยื่อและอวัยวะต่าง ๆ ของร่างกาย โดยในกระแสเลือดคนปกติจะมีเซลล์เม็ดเลือดแดงประมาณ 5 ล้านเซลล์ต่อไมโครลิตร กระบวนการสร้างเซลล์เม็ดเลือดแดงเกิดที่ไขกระดูก และจะมีการสูญเสียนิวเคลียสและอแกเนลล์อื่น ๆ ไปในระหว่างการเจริญเติบโต ส่งผลให้เซลล์เม็ดเลือดแดงไม่สามารถสังเคราะห์โปรตีนขึ้นใหม่ได้ตลอดอายุขัย 120 วัน⁽¹⁻³⁾ ในทางเวชศาสตร์การบริการโลหิต ส่วนประกอบโลหิตที่จะนำมาเตรียมเป็นเม็ดเลือดแดงชนิดเข้มข้น (Packed red cell หรือ PRC) นิยมใช้ Citrate phosphate dextrose adenine-1 (CPDA-1) เป็นสารกันเลือดแข็งทำให้สามารถเก็บไว้ได้นานถึง 35 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส^(4,5) แต่อย่างไรก็ตามในระหว่างการเก็บรักษา เซลล์เม็ดเลือดแดงจะมีการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี อันเนื่องมาจากกระบวนการเมแทบอลิซึม (Metabolism) ที่สำคัญ เช่น ระดับ ATP ที่ลดลง⁽⁶⁾ ซึ่งส่งผลต่อการทำงานของ Na^+/K^+ -ATPase pump ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ ความสามารถในการเปลี่ยนรูปร่างของเซลล์เม็ดเลือดแดง (Deformability) รวมทั้งการเพิ่มขึ้นของความเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidative stress)⁽⁷⁾ ซึ่งมีผลกระทบต่อความอยู่รอดของเม็ดเลือดแดงขณะเก็บรักษาอีกด้วย โดยการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้มักพบมากขึ้นตาม

ระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษา^(5,8,9) ดังนั้นในงานเวชศาสตร์การบริการโลหิตจำเป็นต้องมีระบบการติดตามอายุเลือดและบริหารจัดการตามหลัก First In First Out (FIFO) เพื่อให้มีเลือดที่มีคุณภาพพร้อมใช้และลดการสูญเสียจากการหมดอายุ โดยจะพิจารณาจ่ายผลิตภัณฑ์เม็ดเลือดแดงชนิดเข้มข้นที่มีอายุการเก็บรักษามากให้แก่ผู้ป่วยก่อน

สารกันเลือดแข็งในเวชศาสตร์การบริการโลหิต มีความสำคัญอย่างยิ่งในการรักษาคุณภาพของส่วนประกอบโลหิตระหว่างการเก็บรักษา และได้รับการพัฒนาขึ้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการเก็บรักษาเม็ดเลือดแดง โดยสารละลายแต่ละชนิดมีคุณสมบัติเฉพาะที่ส่งผลต่อระยะเวลาการเก็บรักษาและคุณภาพของเลือด เช่น CPD, CPDA-1, SAGM และ ACD โดย CPD (Citrate-Phosphate-Dextrose) สามารถเก็บรักษาเลือดได้นาน 21 วัน แต่พบว่าคุณภาพของเลือดมีการเสื่อมสภาพอย่างต่อเนื่องตามระยะเวลาที่เก็บ ต่อมามีการพัฒนา CPDA-1 โดยเพิ่มอะดีนีนเข้าไป ทำให้สามารถยืดระยะเวลาการเก็บรักษาได้นานถึง 35 วัน ส่วน SAGM (Saline-Adenine-Glucose-Mannitol) มีคุณสมบัติเพื่อรักษาระดับ 2,3-DPG ระหว่างการเก็บรักษา สำหรับ ACD (Acid-Citrate-Dextrose) เป็นสารละลายที่พัฒนาขึ้นในระยะแรก สามารถเก็บรักษาเม็ดเลือดแดงได้นาน 21 วัน ซึ่งเป็นพื้นฐานในการพัฒนา CPD และ CPDA-1 ในเวลาต่อมา⁽¹⁰⁾ แม้จะมีการพัฒนาน้ำยากันเลือดแข็งที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น อย่างไรก็ตาม การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีและคุณสมบัติทางกายภาพของเม็ดเลือดแดงระหว่างการเก็บรักษายังคงมีความสำคัญต่อการพัฒนาคุณภาพการบริการโลหิตอย่างยิ่ง การศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของเม็ดเลือดแดงเข้มข้นระหว่างการเก็บรักษา มีความสำคัญต่อการพัฒนาแนวปฏิบัติที่เหมาะสมในงานธนาคารเลือด เนื่องจากการจ่ายผลิตภัณฑ์เม็ดเลือดแดงชนิดเข้มข้นที่มีอายุการเก็บรักษามากตามหลัก FIFO อาจส่งผลให้เกิดผลข้างเคียงไม่พึงประสงค์ต่อผู้ป่วย โดยร่างกายจะตรวจพบความผิดปกติและเกิดกระบวนการกำจัดเม็ดเลือดแดงออกจากกระแสเลือดอย่างรวดเร็วทั้งภายในกระแสเลือดผ่านกระบวนการ Intravascular hemolysis และนอกกระแสเลือดโดยระบบ Reticuloendothelial system (RES) ในตับและม้าม (Extravascular hemolysis)^(9,11-13) ซึ่งส่งผลให้ประสิทธิภาพของการให้เลือดลดลง เกิดภาวะแทรกซ้อนจากการแตกของเม็ดเลือดแดง และผู้ป่วยอาจต้องได้รับเลือดบ่อยครั้งขึ้น การศึกษานี้จึงมุ่งเน้นการติดตามการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยสำคัญ ได้แก่ ความเป็นกรด-ด่าง การแตกของเม็ดเลือดแดง ระดับของเมทฮีโมโกลบิน และความเปราะบางของเม็ดเลือดแดงที่เก็บในน้ำยา CPDA-1 ที่ระยะเวลาต่าง ๆ เพื่อนำไปพัฒนาแนวปฏิบัติในการเก็บรักษาเม็ดเลือดแดงเข้มข้นและประเมินความเสี่ยงของผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นกับผู้ป่วย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาผลของการเก็บเซลล์เม็ดเลือดแดงที่เก็บด้วยสารกันเลือดแข็งชนิด CPDA-1 ภายใต้อุณหภูมิต่ำต่อความเป็นกรด-ด่าง การแตกของเม็ดเลือดแดง ระดับของเมทฮีโมโกลบิน และความเปราะบางของเม็ดเลือดแดง

วิธีดำเนินการวิจัย

การเก็บตัวอย่าง ทำการเจาะเก็บเลือดจากหลอดเลือดดำจากอาสาสมัครที่มีสุขภาพดี ไม่มีโรคประจำตัว มีอายุระหว่าง 20 ถึง 45 ปี และสามารถเข้าร่วมการวิจัยในช่วงเวลาที่ดำเนินการจำนวน 30 ราย โดยเก็บในสารกันเลือดแข็งชนิด CPDA-1 ปริมาตรทั้งหมด 30 มิลลิลิตร การวิจัยนี้ได้รับการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ เลขที่ อ.1252/2565

การเตรียมส่วนประกอบเม็ดเลือดแดงเข้มข้น (packed red cell หรือ PRCs)

1. นำเลือดครบส่วน (Whole blood) มาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง C-28A (BOECO, Germany) ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกส่วนพลาสมา เม็ดเลือดขาว และเกล็ดเลือดที่ปนอยู่ในเม็ดเลือดแดง
2. ปรับความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดงให้มีค่าความเข้มข้นร้อยละ 80 ด้วยน้ำยา CPDA-1 โดยใช้อัตราส่วนของเม็ดเลือดแดงเข้มข้น 2 มิลลิลิตรต่อ CPDA-1 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเตรียมเป็นเม็ดเลือดแดงเข้มข้นจำนวน 4 หลอด และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ให้มีอายุ 1, 7, 14 และ 21 วัน และเมื่อครบกำหนดตามระยะเวลาการเก็บแล้วจะนำมาทดสอบการเป็นกรดต่าง การแตกของเม็ดเลือดแดง ระดับของเมทฮีโมโกลบิน และความเปราะของเม็ดเลือดแดงต่อไป

การวัดค่า pH ของเม็ดเลือดแดงเข้มข้น ทำการวัดค่า Extracellular pH ด้วยเครื่อง pH meter รุ่น Cyberscan pH500 (Eutech Instruments, USA) ในตัวอย่างเม็ดเลือดแดงเข้มข้นที่มีอายุครบ 1, 7, 14 และ 21 หลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การวัดการแตกของเม็ดเลือดแดง (Free hemoglobin) ทำการวัดระดับของฮีโมโกลบินในส่วนใสด้านบนของเม็ดเลือดแดงเข้มข้น ด้วยวิธี Cyanmethemoglobin โดยนำสารละลาย Drabkin's reagent 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมตัวอย่างส่วนใสด้านบนของเม็ดเลือดแดงเข้มข้น 20 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer รุ่น Genesys 10S UV-VS (Thermo Fisher Scientific, USA)⁽¹⁴⁾

การวัดระดับเมทฮีโมโกลบิน (Methemoglobin, metHb)^(15,16)

1. ทำการวัดระดับ metHb โดยทำให้เม็ดเลือดแดงแตกด้วยการเติมสารละลาย 5% Triton X-100 ปริมาตร 6 มิลลิลิตร ผสมกับเม็ดเลือดแดงเข้มข้นปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ตั้งไว้นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เม็ดเลือดแดงแตกอย่างสมบูรณ์ จากนั้นเติม 0.1 M phosphate buffer saline ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นแยกส่วนใสด้านบนด้วยความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที
2. เตรียมหลอดทดลองจำนวน 4 หลอด ได้แก่ A, B, C และ D โดยหลอด A จะใส่น้ำกลั่นปริมาตร 500 ไมโครลิตร และ 0.4 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน สำหรับใช้เป็น blank ของหลอด B
3. หลอด B ทำการผสมน้ำกลั่นปริมาตร 500 ไมโครลิตร และส่วนใสที่แยกเก็บไว้ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นวัดความยาวคลื่นที่ 630 นาโนเมตร บันทึกค่าการดูดกลืนแสงเป็น OD1
4. หลอด C ทำการใส่ 4% $K_3(FeCN)_6$ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และเติม 0.4 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน สำหรับใช้เป็น blank ของหลอด D
5. หลอด D ทำการใส่ 4% $K_3(FeCN)_6$ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และส่วนใสที่แยกเก็บไว้ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที วัดความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร และจดบันทึกเป็น OD3
6. เติม 5% KCN ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ลงไปในหลอด A และ B ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที นำหลอด B วัดความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร แล้วบันทึกเป็น OD2 โดยใช้หลอด A เป็น blank
7. เติม 5% KCN ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ลงไปในหลอด C และ D ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที นำหลอด D วัดความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร แล้วบันทึกเป็น OD4 โดยใช้หลอด C เป็น blank
8. คำนวณหาระดับของ metHb ดังสมการที่ 1

$$\text{สมการที่ 1} \quad \% \text{Mhb} = \frac{[(OD1 - OD2) / (OD3 - OD4)] \times 100 \%}{}$$

การทดสอบความเปราะของเม็ดเลือดแดง (osmotic fragility test) นำเม็ดเลือดแดงเข้มข้นมาทดสอบความเปราะของเม็ดเลือดแดงโดยผสมเม็ดเลือดแดงเข้มข้นปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในสารละลายน้ำเกลือที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 0%, 0.2%, 0.4%, 0.6% และ 0.9% ที่มีปริมาตร 5 มิลลิตร และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำการปั่นแยกส่วนใสด้านบนด้วยความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร แล้วนำมาคำนวณหาอัตราร้อยละการแตกของเม็ดเลือดแดง ดังสมการที่ 2

$$\text{สมการที่ 2 \% hemolysis} = (\text{OD ที่วัดได้} / \text{OD ของหลอดที่มี 0\% NaCl}) \times 100$$

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป GraphPad prism version 9.0 เพื่อวิเคราะห์ผลของการเก็บเม็ดเลือดแดงต่อการเปลี่ยนแปลงค่า pH การแตกของเม็ดเลือดแดง ระดับของ metHb และความเปราะของเม็ดเลือดแดงที่ถูกเก็บไว้ในน้ำยากันเลือดแข็งชนิด CPDA-1 โดยใช้สถิติเชิงวิเคราะห์ One-way ANOVA กำหนดนัยสำคัญทางสถิติระดับที่ค่าความเชื่อมั่นเท่ากับร้อยละ 95

ผลการวิจัย

ข้อมูลทั่วไปของกลุ่มตัวอย่าง อาสาสมัครผู้ที่มีสุขภาพดีจำนวน 30 ราย แบ่งเป็นเพศชายจำนวน 4 ราย และหญิงจำนวน 26 ราย อายุระหว่าง 20 ถึง 45 ปี (เฉลี่ย 22.80 ± 5.70 ปี) โดยพบว่าค่าเฉลี่ยของพารามิเตอร์ทางโลหิตวิทยา อยู่ในเกณฑ์ปกติ ได้แก่ WBC $6.94 \pm 1.50 \times 10^3/\mu\text{L}$, RBC $5.00 \pm 0.50 \times 10^6/\mu\text{L}$, Hb 13.30 ± 1.20 g/dL, Hct $41.20 \pm 3.60\%$, MCV 84.40 ± 3.70 fL, MCH 27.70 ± 0.90 pg, MCHC 33.20 ± 0.30 g/dL, RDW-CV $13.60 \pm 1.30\%$ และ PLT $298 \pm 65.80 \times 10^3/\mu\text{L}$ เมื่อแยกตามเพศพบว่าเพศชายมีค่า Hb และ Hct สูงกว่าเพศหญิง ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงข้อมูลพื้นฐานทางโลหิตวิทยาของอาสาสมัครจำนวน 30 ราย

Characteristics	Mean (SD)									
	Age (yrs)	WBC ($10^3/\mu\text{L}$)	RBC ($10^6/\mu\text{L}$)	Hb (g/dL)	Hct (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	RDW-CV (%)	PLT ($10^3/\mu\text{L}$)
Total (n=30)	22.80 (5.70)	6.94 (1.50)	5.00 (0.50)	13.30 (1.20)	41.20 (3.60)	84.40 (3.70)	27.70 (0.90)	33.20 (0.30)	13.60 (1.30)	298 (65.80)
Male (n=4)	26.50 (9.70)	6.19 (1.00)	5.45 (0.40)	15.40 (0.70)	46.60 (2.00)	85.70 (1.90)	28.30 (1.00)	33.50 (0.20)	12.60 (0.40)	273.80 (39.80)
Female (n=26)	22.30 (4.90)	7.05 (1.60)	4.93 (0.40)	13.00 (0.90)	40.30 (3.00)	84.20 (3.90)	27.70 (0.90)	33.20 (0.30)	13.70 (1.30)	301.20 (68.80)

WBC: white blood cell count; RBC: red blood cell count; Hb: hemoglobin; Hct: percent hematocrit; MCV: mean corpuscular volume; MCH: mean corpuscular hemoglobin; MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration; RDW-CV: Red Blood Cell Distribution Width-CV; PLT: platelet count.

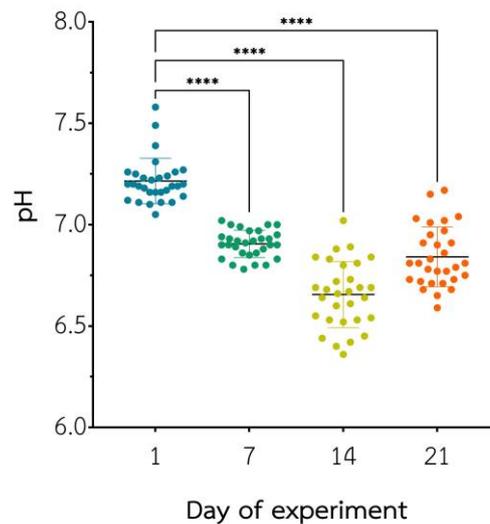
ค่า pH ของเซลล์เม็ดเลือดแดงเข้มข้น ผลการตรวจวัดค่า pH ในตัวอย่างเม็ดเลือดแดงเข้มข้นที่ถูกเก็บไว้ในน้ำยากันเลือดแข็งชนิด CPDA-1 ที่มีอายุ 1, 7, 14 และ 21 วัน มีค่า pH เฉลี่ยเท่ากับ 7.22 ± 0.11 , 6.91 ± 0.07 ,

6.66±0.16 และ 6.84±0.15 ตามลำดับ พบว่ามีค่า pH ในวันที่ 7, 14 และ 21 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเม็ดเลือดแดงเข้มข้นที่มีอายุครบ 1 วัน ($p < .001$) ดังแสดงในตารางที่ 2 และรูปที่ 1

ตารางที่ 2 แสดงการเปลี่ยนแปลงของค่า pH, free hemoglobin, metHb และความเปราะของเม็ดเลือดแดงที่เก็บรักษาในน้ำยา CPDA-1 เป็นเวลา 21 วัน

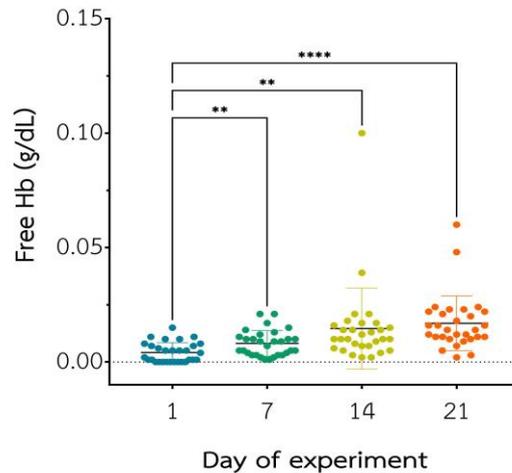
Parameters	Day of experiment							
	1		7		14		21	
	Mean (SD)	p-value	Mean (SD)	p-value	Mean (SD)	p-value	Mean (SD)	p-value
pH	7.22 (.11)	-	6.91 (.07)	<.001	6.66 (0.16)	<.001	6.84 (0.15)	<.001
Free Hemoglobin (g/dL)	0.004 (.004)	-	0.008 (.005)	.0014	0.015 (0.017)	.0040	0.017 (0.011)	<.001
MetHb (%)	0.319 (.237)	-	0.374 (.224)	ns	0.511 (0.226)	.0226	0.709 (0.268)	<.001
Osmotic fragility test:								
Percent of hemolysis (%)								
0.0% NaCl	100.00 (.00)	-	100.00 (.00)	ns	100.00 (.00)	ns	100.00 (.00)	ns
0.2% NaCl	97.56 (3.27)	-	97.67 (1.82)	ns	97.92 (1.69)	ns	97.86 (1.61)	ns
0.4% NaCl	87.23 (10.81)	-	87.20 (12.19)	ns	88.48 (8.05)	ns	92.85 (4.42)	ns
0.6% NaCl	0.78 (.63)	-	3.64 (1.37)	ns	12.40 (5.52)	<0.0001	19.62 (7.79)	<.001
0.9% NaCl	0.00 (.00)	-	1.06 (.55)	<0.0001	1.97 (1.05)	<0.0001	2.48 (1.17)	<.001

ns: not-significant ($p > 0.05$)



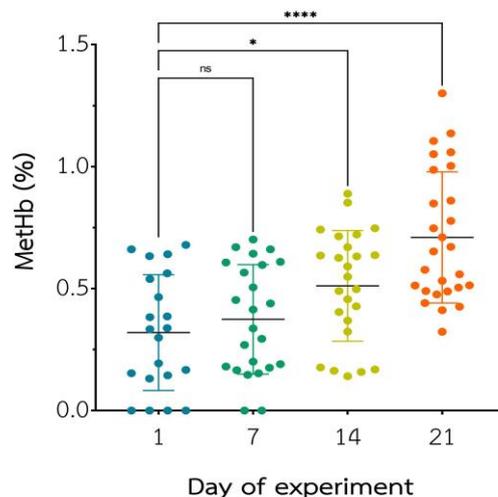
รูปที่ 1 แสดงการเปลี่ยนแปลงระดับความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของเม็ดเลือดแดงเข้มข้นที่เก็บรักษาในน้ำยา CPDA-1 ที่ระยะเวลา 1, 7, 14 และ 21 วัน พบว่าค่า pH มีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < .001$) เมื่อเทียบกับวันแรกของการเก็บรักษา โดยการลดลงของค่า pH นี้สัมพันธ์กับระยะเวลาในการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้น (ns: $p > .05$, *: $p \leq .05$, **: $p < .01$, ***: $p < .001$ และ ****: $p < .0001$)

การแตกของเม็ดเลือดแดง ผลการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ถูกเก็บไว้ในน้ำยากันเลือดแข็งชนิด CPDA-1 มีค่าเฉลี่ย free hemoglobin ในตัวอย่างเม็ดเลือดแดงเข้มข้นที่มีอายุ 1, 7, 14 และ 21 วัน เท่ากับ 0.004 ± 0.004 , 0.008 ± 0.005 , 0.015 ± 0.017 และ 0.017 ± 0.011 ตามลำดับ และพบว่าในวันที่ 21 มีค่าสูงกว่าวันที่ 1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < .001$) ดังแสดงใน ตารางที่ 2 และรูปที่ 2



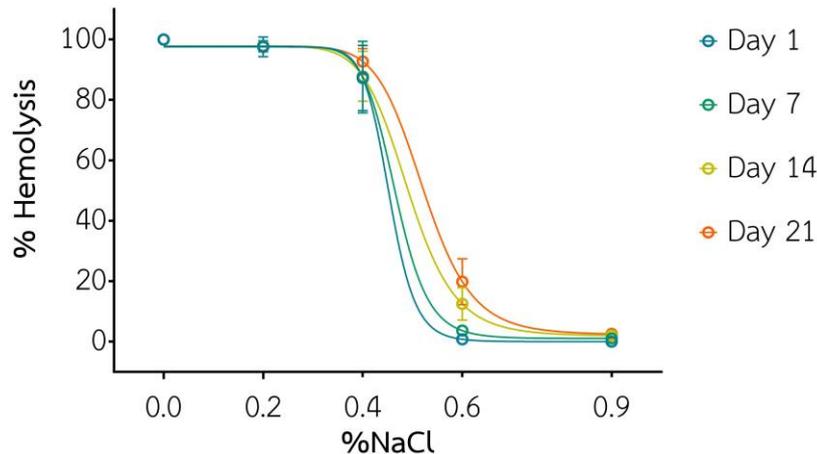
รูปที่ 2 แสดงระดับฮีโมโกลบินอิสระ (Free Hb) ในเม็ดเลือดแดงเข้มข้นที่เก็บรักษาในน้ำยา CPDA-1 ที่ระยะเวลา 1, 7, 14 และ 21 วัน พบว่าระดับ Free Hb มีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < .01$ และ $p < .0001$) เมื่อเทียบกับวันแรกของการเก็บรักษา ซึ่งบ่งชี้ถึงการแตกของเม็ดเลือดแดงที่เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเก็บรักษา (ns: $p > .05$, *: $p < .05$, **: $p < .01$, ***: $p < .001$ และ ****: $p < .0001$)

ระดับของ metHb พบว่าเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีอายุ 14 และ 21 วัน มีระดับ metHb สูงกว่าวันที่ 1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า $p = .022$ และ $< .001$ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2 และรูปที่ 3



รูปที่ 3 แสดงระดับเมทฮีโมโกลบิน (metHb) ในเม็ดเลือดแดงเข้มข้นที่เก็บรักษาในน้ำยา CPDA-1 ที่ระยะเวลา 1, 7, 14 และ 21 วัน พบการเพิ่มขึ้นของระดับ metHb อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับวันแรกของการเก็บรักษา ($p < .05$ และ $p < .0001$) ซึ่งแสดงถึงการเกิดออกซิเดชันของฮีโมโกลบินที่เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเก็บรักษา (ns: $p > .05$, *: $p < .05$, **: $p < .01$, ***: $p < .001$ และ ****: $p < .0001$)

ความเปราะบางของเซลล์เม็ดเลือดแดง พบว่าเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีอายุ 14 และ 21 วัน ในสารละลาย น้ำเกลือที่มีความเข้มข้น 0.60% มีร้อยละการแตกของเม็ดเลือดแดงที่สูงกว่าเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีอายุ 1 วัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < .05$) และเมื่อทำการเปรียบเทียบร้อยละการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงใน สารละลายน้ำเกลือที่มีความเข้มข้น 0.90% พบว่าเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีอายุ 7, 14 และ 21 วัน มีค่าสูงกว่าเซลล์เม็ด เลือดแดงที่มีอายุ 1 วัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < .05$) ดังแสดงในตารางที่ 2 และรูปที่ 4



รูปที่ 4 กราฟแสดงความเปราะบางของเม็ดเลือดแดงที่เก็บรักษาในน้ำยา CPDA-1 ที่ระยะเวลา 1, 7, 14 และ 21 วัน พบว่าความเปราะบางของเม็ดเลือดแดงมีความสัมพันธ์กับระยะเวลาการเก็บรักษา ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงต่อภาวะแรงดันออสโมติกตามระยะเวลาการเก็บรักษา

สรุปและอภิปรายผล

เซลล์เม็ดเลือดแดงมีอายุประมาณ 120 วัน โดยภายในเซลล์จะมีฮีโมโกลบินอยู่ประมาณ 270 ล้านโมเลกุล คุณสมบัติเด่นนี้สะท้อนถึงหน้าที่สำคัญของเซลล์เม็ดเลือดแดง ในการรักษาสมดุลของออกซิเจนภายในร่างกาย โดยทำหน้าที่ขนส่งออกซิเจนจากปอดไปยังเซลล์ต่าง ๆ ทั่วร่างกาย และยังเป็นแหล่งของธาตุเหล็กร้อยละ 66 ทั้งหมดในร่างกายมนุษย์ เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการทางชีวเคมีจะส่งผลกระทบต่อการศึกษาของเซลล์เม็ดเลือดแดง ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ถูกเก็บรักษาไว้^(17,18)

จากผลการศึกษาการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่เก็บไว้เป็นเวลา 7, 14 และ 21 วัน พบว่ามีปริมาณ Free hemoglobin เพิ่มขึ้นตั้งแต่วันที่ 7, 14 และ 21 (0.008 ± 0.005 , 0.015 ± 0.01 และ 0.017 ± 0.011 g/dL ตามลำดับ) และมีระดับของ metHb เพิ่มขึ้นในวันที่ 14 และ 21 ($0.511 \pm 0.226\%$ และ $0.709 \pm 0.268\%$ ตามลำดับ) ซึ่งสอดคล้องกับศึกษาของ Mustafa และ Hadwan ในปี ค.ศ. 2020⁽¹⁹⁾ ที่พบว่าเม็ดเลือดแดงที่เก็บด้วย CPD-SAGM และวัดการแตกของเม็ดเลือดแดงในวันที่ 1, 14 และ 28 พบว่าการแตกของเม็ดเลือดแดงเพิ่มสูงขึ้นในวันที่ 14 และ 28 ส่วนระดับของ metHb ทำการตรวจวัดในวันที่ 1 และ 28 พบว่ามีระดับ metHb เพิ่มขึ้นในวันที่ 28 และสอดคล้องกับการศึกษาของ Tzounakas และคณะ ในปี ค.ศ. 2021 พบว่าการเพิ่มขึ้นของ Free hemoglobin และ Reactive oxygen species (ROS) ในเซลล์เม็ดเลือดแดงที่เก็บไว้ตั้งแต่วันที่ 14, 28 และ 42⁽²⁰⁾ แต่ปริมาณ

Free hemoglobin ในการศึกษานี้มากกว่าการศึกษาของ พันทิรา ตันเถียร และคณะ⁽²¹⁾ อาจเนื่องมาจากวิธีที่ใช้ตรวจวัดแตกต่างกัน และการศึกษาเป็นการเก็บตัวอย่างในทดลอง และเก็บในแนวตั้ง ไม่ได้อยู่ในถุงเก็บเลือดตามสถานการณ์ที่ปฏิบัติจริง และเพื่อเสริมข้อมูลจากการศึกษาก่อนหน้านี้ การศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการวัดการแตกของเม็ดเลือดแดงและระดับของ metHb ในช่วงวันที่ 7 และ 14 เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ครอบคลุมยิ่งขึ้นเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในระยะเวลาการเก็บรักษาเซลล์เม็ดเลือดแดง ซึ่งอาจช่วยให้เกิดความเข้าใจที่ดีขึ้นเกี่ยวกับกระบวนการเสื่อมสภาพของเซลล์เม็ดเลือดแดงและนำไปสู่การพัฒนาวิธีการเก็บรักษาเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น ทั้งนี้กระบวนการออกซิเดชันของฮีโมโกลบินมีความสัมพันธ์กับการแตกของเม็ดเลือดแดงในวันที่ 7 และการเพิ่มขึ้นของ metHb ในวันที่ 14 ของการเก็บรักษา โดย Ferrous ion (Fe^{2+}) ที่ช่วยให้ Deoxygenated Hb จับกับออกซิเจนจะถูกเปลี่ยนเป็น Ferric ion (Fe^{3+}) ผ่านการทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ (Free radical) เช่น Hydroxyl radical (OH^{\bullet}) ที่เกิดจากปฏิกิริยา Fenton ของ Free hemoglobin จากการแตกของเม็ดเลือดแดง ส่งผลให้เกิด metHb และความเสียหายต่อโครงสร้างเม็ดเลือดแดงเพิ่มขึ้น⁽²²⁾ แต่เซลล์เม็ดเลือดแดงมีเอนไซม์ Reductase ที่ทำหน้าที่เปลี่ยน metHb ให้กลับมาอยู่ในรูปของ Hemoglobin แต่กระบวนการดังกล่าวจะลดลงเมื่อเซลล์เม็ดเลือดแดงอยู่ภายใต้สภาวะอุณหภูมิต่ำ (Hypothermic storage conditions) ประกอบกับความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายเพิ่มขึ้น ปรากฏการณ์นี้ส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของ metHb และ Superoxide anion⁽²⁾ ซึ่งผลการศึกษานี้ปริมาณ Free hemoglobin ยังอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ตามแนวทางของ FDA ที่กำหนดให้มีการแตกของเม็ดเลือดแดงไม่เกิน 1% หรือมีระดับของ Free hemoglobin ในช่วง 0.20 – 2.00 g/dL เพื่อความปลอดภัยของผู้รับเลือด⁽²³⁾

ภายในเซลล์เม็ดเลือดแดงมีการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่สำคัญหลายชนิด โดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ที่ถูกเปลี่ยนมาจาก superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$) ด้วย Superoxide dismutase (SOD) สามารถทำปฏิกิริยากับ Oxyhemoglobin เพื่อสร้าง Ferryl (Fe^{IV}) hemoglobin^(24,25) โดย Ferryl hemoglobin และ OH^{\bullet} มีความไวต่อปฏิกิริยาสูง และสามารถออกซิไดซ์เอนไซม์และไขมันได้ ซึ่งส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางเคมีแบบย้อนกลับและไม่ย้อนกลับของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่เก็บรักษาไว้ ทั้งในส่วนของโปรตีนโครงสร้าง เช่น โปรตีน Ankyrin และ Spectrin โปรตีนที่ทำหน้าที่เฉพาะเจาะจง เช่น โปรตีน Band 320 และ Hemoglobin รวมไปถึงเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึม⁽²⁶⁻²⁸⁾ การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นดังกล่าวนี้ทำให้สูญเสียความยืดหยุ่นและการรักษารูปร่างของเซลล์เม็ดเลือดแดง⁽²⁹⁾ นอกจากนี้ยังสูญเสียความสมดุลของ Potassium ion (K^+) ระหว่างภายในและภายนอกเซลล์เม็ดเลือดแดง ดังนั้นกระบวนการออกซิเดชันที่เกิดขึ้นจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระหว่างพื้นที่ผิวและปริมาตรของเซลล์เม็ดเลือดแดง กล่าวคือจะมีการเพิ่มขึ้นของ Osmotic fragility โดยในการศึกษาครั้งนี้พบว่าเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีอายุ 14 และ 21 วัน ในสารละลายน้ำเกลือที่มีความเข้มข้น 0.60% และเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีอายุ 7, 14 และ 21 วัน ในสารละลายน้ำเกลือที่มีความเข้มข้น 0.90% มีร้อยละการแตกของเม็ดเลือดแดงที่สูงกว่าเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีอายุ 1 วัน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Mustafa I. และ Hadwan T. ในปี ค.ศ.2020 และ Zhong R และคณะ ในปี ค.ศ. 2021^(19,30) ส่วนค่า pH ลดลงในวันที่ 7, 14 และ 21 (6.91 ± 0.07 , 6.66 ± 0.16 และ 6.84 ± 0.15 ตามลำดับ) ซึ่งต่ำกว่าการศึกษาของ พันทิรา ตันเถียร และคณะ⁽²¹⁾ ซึ่งการลดลงของค่า pH อาจเกิดจากการสะสม lactic acid จากกระบวนการ Glycolysis และทำให้การทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างพลังงานและสารต้านอนุมูลอิสระบกพร่องไป^(31,32) ถึงแม้ว่าจะเก็บด้วย CPDA-1 ที่มีค่า pH ในช่วง 5-6 ซึ่งลดการทำงานของเอนไซม์

ในกระบวนการ Glycolysis, pentose phosphate pathway (PPP) และ Rapoport-Luebering shunt แล้วก็ตาม อีกทั้งยังมีการลดลงของ 2,3-DPG ที่ทำหน้าที่ในการปล่อยออกซิเจนไปยังเนื้อเยื่อต่าง ๆ ด้วย^(2,30,33) นอกจากนี้การแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงได้รับอิทธิพลจากหลายปัจจัย โดยเฉพาะการทำงานของเอนไซม์ ATPase ซึ่งมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ เมื่ออุณหภูมิลดต่ำลง เช่น ที่ 4 องศาเซลเซียส จะส่งผลให้เกิดการเสียสมดุลของไอออนโพแทสเซียม (K^+) และโซเดียม (Na^+) ทั้งภายในและภายนอกเซลล์เม็ดเลือดแดง ซึ่งส่งผลกระทบต่อความสมบูรณ์และการทำงานของเซลล์ การเสียสมดุลนี้มีสาเหตุหลักมาจากการเปลี่ยนแปลงการทำงานของปั๊ม $Na^+-K^+-ATPase$ ซึ่งมีความสำคัญอย่างยิ่งในการรักษาความต่างของความเข้มข้นของไอออนระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์⁽³⁴⁾

สรุปการศึกษารั้ครั้งนี้ พบว่าการเก็บรักษาเซลล์เม็ดเลือดแดงในน้ำยากันเลือดแข็งชนิด CPDA-1 ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่สำคัญหลายประการ ได้แก่ การลดลงของค่า pH การเพิ่มขึ้นของการแตกของเม็ดเลือดแดง ระดับ metHb และความเปราะของเซลล์เม็ดเลือดแดง โดยปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวคือสภาวะการจับเก็บ ทั้งในด้านทิศทางการวางในแนวตั้ง การเก็บในหลอดทดลอง และระยะเวลาในการเก็บรักษา ซึ่งมีผลต่อค่าพารามิเตอร์ทางชีวเคมีของเซลล์^(35,36) การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้อาจเป็นผลมาจากกระบวนการออกซิเดชันที่เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการเก็บรักษา และอาจส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการขนส่งออกซิเจน อย่างไรก็ตาม ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับผลของการเก็บรักษาเซลล์เม็ดเลือดแดงในสภาวะต่าง ๆ เพื่อให้เข้าใจถึงกลไกการเปลี่ยนแปลงได้อย่างชัดเจนยิ่งขึ้น

ข้อจำกัดของการวิจัย

การวิจัยในครั้งนี้มีข้อจำกัดสำคัญ ได้แก่ ขนาดตัวอย่างที่ใช้มีจำนวน 30 ราย ซึ่งอาจไม่เพียงพอในการสะท้อนความหลากหลายของประชากรทั่วไป อีกทั้งกลุ่มตัวอย่างทั้งหมดเป็นอาสาสมัครที่มีสุขภาพดี อาจไม่สามารถแทนกลุ่มประชากรที่มีภาวะทางคลินิกได้อย่างครอบคลุม นอกจากนี้การศึกษามุ่งเน้นเพียงเม็ดเลือดแดงที่เก็บรักษาในน้ำยา CPDA-1 เท่านั้น จึงไม่สามารถเปรียบเทียบผลการเปลี่ยนแปลงกับน้ำยาชนิดอื่นที่มีใช้ในงานบริการโลหิต เช่น SAGM หรือ AS-1 ได้ และยังมีข้อจำกัดด้านระยะเวลาการศึกษา ซึ่งศึกษาการเปลี่ยนแปลงเพียงถึง 21 วันจากระยะเวลาการเก็บรักษาที่สามารถยืดได้ถึง 35 วันตามข้อกำหนดของ CPDA-1 อาจทำให้ไม่ครอบคลุมต่อผลการเปลี่ยนแปลงที่อาจเกิดขึ้นในระยะท้ายของการเก็บ

ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษารั้ต่อไป ควรเพิ่มจำนวนตัวอย่างให้มากขึ้นเพื่อเพิ่มความแม่นยำของผลการวิจัย และควรพิจารณารวมกลุ่มตัวอย่างที่มีลักษณะแตกต่างกัน เช่น ผู้ที่มีอายุมากกว่า 45 ปี เพื่อประเมินความแตกต่างในการตอบสนองต่อการเก็บรักษาเลือด นอกจากนี้ควรศึกษาเปรียบเทียบผลการเปลี่ยนแปลงของเม็ดเลือดแดงในน้ำยากันเลือดแข็งชนิดอื่น ๆ ที่ใช้ในปัจจุบัน รวมถึงขยายช่วงเวลาในการติดตามผลไปจนถึง 35 วัน เพื่อประเมินคุณภาพเม็ดเลือดแดงตลอดช่วงอายุการเก็บรักษา ทั้งนี้เพื่อเป็นข้อมูลประกอบการพัฒนาแนวปฏิบัติในการจัดเก็บและจ่ายผลิตภัณฑ์เม็ดเลือดแดงชนิดเข้มข้นที่เหมาะสมและปลอดภัยยิ่งขึ้น รวมถึงเป็นข้อมูลเกี่ยวกับความคงตัวของเยื่อหุ้มเซลล์และภาวะความเสียหายจากออกซิเดชันในกระบวนการเก็บเลือด

เอกสารอ้างอิง

1. Thiagarajan P, Parker CJ, Prchal JT. How do red blood cells die?. *Front Physiol.* 2021;12:655393. doi:10.3389/fphys.2021.655393.
2. Yoshida T, Prudent M, D'alessandro A. Red blood cell storage lesion: causes and potential clinical consequences. *Blood Transfus.* 2019;17(1):27-52. doi:10.2450/2019.0217-18.
3. McMahon TJ. Red blood cell deformability, vasoactive mediators, and adhesion. *Front Physiol.* 2019;10:1417. doi:10.3389/fphys.2019.01417.
4. Mustafa I, Al Marwani A, Mamdouh Nasr K, Abdulla Kano N, Hadwan T. Time dependent assessment of morphological changes: leukodepleted packed red blood cells stored in SAGM. *Biomed Res Int.* 2016;2016:4529434. doi:10.1155/2016/4529434.
5. Cancelas JA, Dumont LJ, Maes LA, Rugg, N, Herschel L, Whitley PH, et al. Additive solution-7 reduces the red blood cell cold storage lesion. *Transfusion.* 2015;55(3):491-8. doi:10.1111/trf.12867.
6. Himbert S, Qadri SM, Sheffield WP, Schubert P, D'Alessandro A, Rheinstädter MC. Blood bank storage of red blood cells increases RBC cytoplasmic membrane order and bending rigidity. *PLoS One.* 2021;16(11):e0259267. doi:10.1371/journal.pone.0259267.
7. Barshtein G, Pajic-Lijakovic I, Gural A. Deformability of stored red blood cells. *Front Physiol.* 2021;12:722896. doi:10.3389/fphys.2021.722896.
8. Yurkovich JT, Zielinski DC, Yang L, Paglia G, Rolfsson O, Sigurjonsson OE, et al. Quantitative time-course metabolomics in human red blood cells reveal the temperature dependence of human metabolic networks. *J Biol Chem.* 2017;292(48):19556-64. doi:10.1074/jbc.M117.804914.
9. Bruun-Rasmussen P, Kragh Andersen P, Banasik K, Brunak S, Johansson PI. Intervening on the storage time of RBC units and its effects on adverse recipient outcomes using real-world data. *Blood.* 2022;139(25):3647-54. doi:10.1182/blood.2022015892.
10. Hess JR. An update on solutions for red cell storage. *Vox Sang [Internet].* 2006 Jul 1;91(1):13–9. doi:org/10.1111/j.1423-0410.2006.00778.x.
11. Kanas T, Lanteri MC, Page GP, Guo Y, Endres SM, Stone M, et al. Ethnicity, sex, and age are determinants of red blood cell storage and stress hemolysis: results of the REDS-III RBC-Omics study. *Blood Adv.* 2017;1(15):1132-41. doi:10.1182/bloodadvances.2017004820.

12. Nemkov T, Stephenson D, Earley EJ, Keele GR, Hay A, Erickson C, et al. Biological and genetic determinants of glycolysis: Phosphofructokinase isoforms boost energy status of stored red blood cells and transfusion outcomes. *Cell Metab.* 2024;36(9):1979-97.e13. doi:10.1016/j.cmet.2024.06.007.
13. Ng MSY, David M, Middelburg RA, Ng ASY, Suen JY, Tung JP, et al. Transfusion of packed red blood cells at the end of shelf life is associated with increased risk of mortality - a pooled patient data analysis of 16 observational trials. *Haematologica.* 2018;103(9):1542-8. doi:10.3324/haematol.2018.191932.
14. Diana L, Krishnan V, Pooja S, Manikandan V. Evaluation of the colorimetric cyanmethemoglobin method and the automatic hematology analyzer for hemoglobin estimation. *SALT J Sci Res Healthc.* 2021;1(1):17-27. doi:10.56735/saltjsrh.ms2101011727.
15. Sato K. Methemoglobin. In: Suzuki O, Watanabe K, editors. *Drugs and Poisons in Humans: A Handbook of Practical Analysis* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2005. p. 655-7. Available from: https://doi.org/10.1007/3-540-27579-7_72.
16. Triapirux U, Na-ek P, Kitthipongvivat C, Chalajit S. Methemoglobin and sulfhemoglobin levels in students of Walailak University. *Walailak J Sci Technol* [internet]. 2008 [cited 2023 Sep 9];5(2):173-80. Available from: <https://wjst.wu.ac.th/index.php/wjst/article/view/87>. (in Thai)
17. Orbach A, Zelig O, Yedgar S, Barshtein G. Biophysical and biochemical markers of red blood cell fragility. *Transfus Med Hemother.* 2017;44(3):183-7. doi:10.1159/000452106.
18. D'Alessandro A, Fu X, Kanas T, Reisz JA, Culp-Hill R, Guo Y, et al. Donor sex, age and ethnicity impact stored red blood cell antioxidant metabolism through mechanisms in part explained by glucose 6-phosphate dehydrogenase levels and activity. *Haematologica.* 2021;106(5):1290-302. doi:10.3324/haematol.2020.246603.
19. Mustafa I, Hadwan TAQ. Hemoglobin oxidation in stored blood accelerates hemolysis and oxidative injury to red blood cells. *J Lab Physicians.* 2020;12(4):244-9. doi:10.1055/s-0040-1721156.
20. Tzounakas VL, Anastasiadi AT, Drossos PV, Karadimas DG, Valsami SI, Stamoulis KE, et al. Sex-related aspects of the red blood cell storage lesion. *Blood Transfus.* 2021;19(3):224-36. doi:10.2450/2020.0141-20.
21. Tanthien P, Bunvisuthi P, Wongwaiwaroj S, Jithavech P. Properties of blood stored in CPDA-1 blood bag manufactured by the National Blood Centre, Thai Red Cross Society. *J Hematol Transfus Med.* 2000;10:191-8. (in Thai)
22. Zhao Z. Hydroxyl radical generations form the physiologically relevant Fenton-like reactions. *Free Radic Biol Med.* 2023;208:510-5. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2023.09.013.

23. Tomar A, Kushwaha N, Asthana B, Kumar S, Sharma S. Blood transfusion-related change in circulating plasma-free hemoglobin levels and its impact on microvascular oxygenation: a prospective, observational study. *Glob. J. Transfus. Med.* 2023;8(2):139-45. doi:10.4103/gjtm.gjtm_89_22.
24. Alayash AI. Hemoglobin oxidation reactions in stored blood. *Antioxidants (Basel)*. 2022;11(4):747. doi:10.3390/antiox1104074724.
25. Alayash AI, Wilson MT. Hemoglobin can act as a (pseudo)-peroxidase in vivo. what is the evidence?. *Front Mol Biosci.* 2022;9:910795. doi:10.3389/fmolb.2022.910795.
26. D'Alessandro A, D'Amici GM, Vaglio S, Zolla L. Time-course investigation of SAGM-stored leukocyte-filtered red blood cell concentrates: from metabolism to proteomics. *Haematologica.* 2012;97(1):107-15. doi:10.3324/haematol.2011.051789.
27. Tavazzi B, Amorini AM, Fazzina G, Di Pierro D, Tuttobene M, Giardina B, et al. Oxidative stress induces impairment of human erythrocyte energy metabolism through the oxygen radical-mediated direct activation of AMP-deaminase *J Biol Chem.* 2001;276(51):48083-92. doi:10.1074/jbc.M101715200.
28. Wither M, Dzieciatkowska M, Nemkov T, Strop P, D'Alessandro A, Hansen KC. Hemoglobin oxidation at functional amino acid residues during routine storage of red blood cells. *Transfusion.* 2016;56(2):421-6. doi:10.1111/trf.13363.
29. Barshtein G, Pajic-Lijakovic I, Gural A. Deformability of stored red blood cells. *Front Physiol.* 2021;12:722896. doi:10.3389/fphys.2021.722896.
30. Zhong R, Han D, Wu X, Wang H, Li W, He Z, et al. An Evaluation of morphological changes and deformability of suspended red blood cells prepared using whole blood with different hemoglobin levels of Tibetans. *Transfus Med Hemother.* 2021;48(4):210-9. doi:10.1159/000513319.
31. Hess JR. Measures of stored red blood cell quality. *Vox Sang.* 2014;107(1):1-9. doi:10.1111/vox.12130.
32. Chaves NA, Alegria TGP, Dantas LS, Netto LES, Miyamoto S, Domingos CRB, et al. Impaired antioxidant capacity causes a disruption of metabolic homeostasis in sickle erythrocytes. *Free Radic Biol Med.* 2019;141:34-46. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2019.05.034.
33. McMahon TJ, Darrow CC, Hoehn BA, Zhu H. Generation and export of red blood cell ATP in health and disease. *Front Physiol.* 2021;12:754638. doi:10.3389/fphys.2021.754638.
34. Chaudhary R, Katharia R. Oxidative injury as contributory factor for red cells storage lesion during twenty eight days of storage. *Blood Transfus.* 2012;10(1):59-62. doi:10.2450/2011.0107-10.

35. Balasubramanyam P, Basavarajegowda A, Hanumanthappa N, Ram A, Negi VS. Storage Lesions after Irradiation: comparison between blood stored in Citrate Phosphate Dextrose Adenine and Saline Adenine Glucose Mannitol. *Glob. J. Transfus. Med.* 2022;7(2):12-8. doi:10.4103/gitm.gitm_4_22.
36. Öhlinger T, Müllner EW, Fritz M, Werning M, Baron-Stefaniak J, Jungbauer C, et al. Storage of packed red blood cells impairs an inherent coagulation property of erythrocytes. *Front. Physiol.* 2022;13 :1021553. doi:10.3389/fphys.2022.1021553.