



วัสดุ- อุปกรณ์ และวิธีการศึกษา

1. เกณฑ์ในการคัดเลือกประชากรที่ใช้ศึกษา

1.1 ศึกษาจากผู้ป่วยที่สงสัยมะเร็งเรื้องรังปอด มารับบริการเพื่อตรวจหลอดลมที่หน่วยโรคปอด ภาควิชาอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

1.2 เมื่อดูจากภาพถ่ายรังสีทรวงอก (chest x-ray finding) ของผู้ป่วยที่สงสัยมะเร็งเรื้องรังปอด ต้องปรากฏว่ามีรอยโรค (lesion) ที่ปอดข้างหนึ่งและอีกข้างหนึ่งไม่ปรากฏว่ามีรอยโรค (non-lesion)

1.3 เมื่อทำการส่องกล้องตรวจหลอดลม (bronchoscope finding) ต้องพบว่าท่อหลอดลมไม่ตีบสนิท คือ มีรูกว้างเพียงพอที่สามารถทำการล้างถุงลมได้

2. สถานที่ที่ใช้ในการตรวจ

ทำการส่องกล้องตรวจหลอดลม ผู้ป่วยที่สงสัยมะเร็งเรื้องรังปอดทุกราย ที่หน่วยโรคปอด ภาควิชาอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

3. การเตรียมผู้ป่วยที่ใช้ศึกษา

3.1 ให้ผู้ป่วยงดอาหารและน้ำอย่างน้อย 4-6 ชั่วโมงก่อนทำการตรวจ เพื่อป้องกันการสำลักหรืออาเจียน ซึ่งเป็นสาเหตุให้อาหารไปอุดตันทางเดินหายใจได้

3.2 อธิบายให้ผู้ป่วยเข้าใจถึงรายละเอียดของการตรวจ เพื่อให้ผู้ป่วยจะได้เข้าใจขั้นตอนในการตรวจ ซึ่งจะช่วยให้ลดความกังวลของผู้ป่วยลงและร่วมมือในการตรวจดีขึ้น

3.3 ผู้ป่วยรายที่มีประวัติโรคปอด จะทำการตรวจหาความดันก๊าซในเลือดแดงก่อนส่องกล้อง ถ้าพบว่ามีความดัน ออกซิเจนในเลือดต่ำกว่า 60 mmHg จะให้ออกซิเจนไปด้วยขณะทำการส่องกล้องตรวจหลอดลม

3.4 ผู้ป่วยรายที่มีประวัติโรคหัวใจ จะทำการตรวจคลื่นหัวใจก่อนทำการส่องกล้องตรวจหลอดลม

3.5 ผู้ป่วยรายที่สงสัยว่าจะมีความโน้มเอียงต่อการตกเลือดจะตรวจ จำนวนเกล็ดเลือด และข้อมูลการจับแข็งตัวของหลอดเลือด

3.6 ผู้ป่วยที่ไอเป็นเลือด ควรจะทำการส่องกล้องตรวจในช่วงที่ยังมีการไอเป็นเลือดอยู่ หรือยังมีเลือดติดเสมหะอยู่ จะทำให้โอกาสที่จะพบสาเหตุของการไอเป็นเลือดมีมากขึ้น ยกเว้นในรายที่ไอเป็นเลือดออกมามากครั้งละมากๆ ไม่ควรจะทำเนื่องจากหากเลือดออกมากๆ จะทำให้มีเลือดอยู่เต็มหลอดลม ซึ่งทำให้หาจุดที่เลือดออกได้ยาก และเลือดที่ออกมักจะมีจับตัวเป็นลิ่มและมาอุดปลายกล้องทำให้มองอะไรไม่เห็น นอกจากนี้การทำการส่องกล้องตรวจขณะกำลังไอเป็นเลือดมากๆ นี้ อาจจะทำให้เลือดออกมากขึ้นจากการกระตุ้นให้เกิดการไออย่างรุนแรง

3.7 การให้ยาก่อนการตรวจ

ยาที่ใช้ คือ atropine ขนาด 0.6mg จำนวน 1 หลอดโดยฉีดเข้ากล้ามเนื้อให้กับผู้ป่วยทุกราย ประมาณ 20 ถึง 30 นาที ก่อนการส่องกล้องตรวจหลอดลม เพื่อป้องกัน vasovagal reflex และทำให้สิ่งคัดหลั่งลดลง จากนั้นจึงฉีด glucose 50 cc เข้าเส้นเลือดดำ

3.8 การให้ยาเฉพาะที่

การพ่นยาจะให้ xylocaine 10% ชนิดพ่นฝอยที่บรรจุขวดสีฟ้าจะพ่นบริเวณรอบปาก ลิ้น และลำคอ ที่จะสอดกล้องผ่านแล้วจึงใช้สำลีชุบ xylocaine 4% แต่ละบริเวณ tonsil ให้ตกลงไปในลำคอทั้งซ้ายและขวา จะทราบว่าพ่นยาชาได้ที่แล้วหรือไม่ โดยการถามจากผู้ป่วยจะรู้สึกชาบริเวณลำคอหรือกลืนไม่ค่อยได้ หรือใช้ไม้กดลิ้นแต่ละบริเวณ ลำคอแล้วพบว่า แก้ว รีเฟล็กซ์ หายไป แสดงว่าการพ่นยาชาได้ที่แล้ว

การพ่นยาชาบริเวณลำคองานนี้ นับว่าเป็นสิ่งสำคัญมากเนื่องจาก ถ้าให้ยาชาได้ดีแล้ว จะทำให้การส่องกล้องตรวจทำได้ง่าย และผู้ป่วยสบาย ซึ่งสำคัญมากในการที่จะให้การส่องกล้องตรวจหลอดลมได้ผลดี ในทางตรงกันข้ามถ้าหากรีบทำการส่องกล้องตรวจโดยที่ยังไม่ได้ให้ยาชาเป็นอย่างดีแล้ว การตรวจจะทำได้ยากและทำให้การส่องกล้องตรวจต้องเสียเวลายาวนานขึ้น ผลการส่องตรวจที่ได้ก็จะไม่ดีเท่าที่ควรด้วย

4. การเก็บน้ำล้างถุงลมโดยใช้กล้องส่องหลอดลม : ประกอบด้วย

4.1 วิธีใช้กล้องส่องหลอดลม (flexible fiberoptic bronchoscope , Olympus BF Model 1T20 , Japan) ประกอบด้วยส่วนของตัวกล้องที่สำคัญ 2 ส่วน คือ ส่วนปลายกล้องด้านหนึ่งมีลักษณะเป็นสาย และมีเส้นผ่าศูนย์กลางทั้งหมดประมาณ 5.5 มิลลิเมตร ส่วนนี้ไว้สำหรับส่องลงไปหลอดลม ภายในประกอบด้วยใยแก้วเป็นจำนวนมากมัดรวมกันเพื่อทำหน้าที่ในการนำแสง และใยแก้วเหล่านี้จะถูกห่อหุ้มด้วยแผ่นหนังบางๆ สีดำโดยรอบอีกชั้นหนึ่ง นอกจากนี้ภายในกล้องส่วนนี้ยังมีรูกลวงตลอดสาย ซึ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2 มิลลิเมตร ไว้สำหรับใช้เป็นทางดูดสารน้ำในหลอดลม และใช้ฉีดยาชาวมทั้งใช้สอดหลอดสวนในการเปรงหรือตัดชิ้นเนื้อในหลอดลมและปอดด้วย สำหรับปลายกล้องอีกด้านหนึ่งจะเป็นที่มือจับและมีปุ่มบังคับปลายกล้อง เพื่อให้หัดงอได้ตามมุมที่ต้องการ

จากปลายกล้องด้านที่มีมือจับนี้จะมีสายต่อกับแหล่งกำเนิดแสง ซึ่งแสงจะวิ่งผ่านใยแก้ว ภายในกล้องไปส่องสว่างที่ปลาย ดังแสดงไว้ในรูปที่ 8 และ 9

4.2 เครื่องใช้อื่นๆที่จำเป็นในการทำ ได้แก่

- เครื่องดูด (suction) ซึ่งอาจเป็นชนิดที่ติดกับข้างฝาหรือ ชนิดที่เคลื่อนย้ายได้
- ออกซิเจน มีความจำเป็นต้องใช้กับผู้ป่วยขณะทำการตรวจ ในกรณีผู้ป่วยมีแรงดันออกซิเจนในเลือดต่ำ หรือแม้ผู้ป่วยปกติที่บางครั้ง เกิดอาการหอบขึ้นมาก็ควรให้ออกซิเจนทางท่อจมูกไปพร้อมกับ การทำ

- ยาที่ควรเตรียมไว้เมื่อจำเป็น เช่น น้ำเกลือและสายให้หน้าเกลือ อะครีนาลีน เป็นต้น

4.3 การเก็บน้ำล้างถุงลม

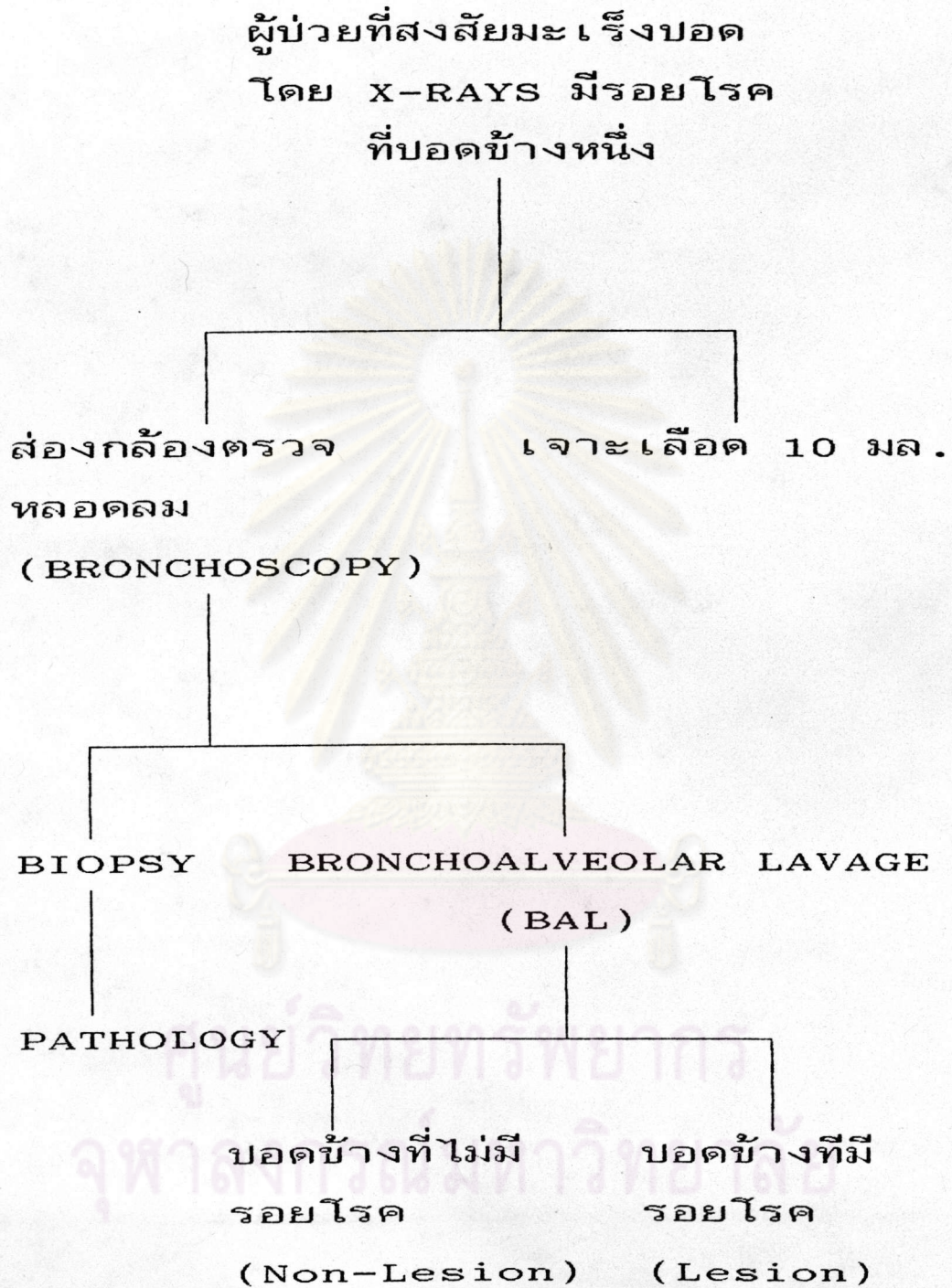
ก่อนทำการส่องกล้องตรวจหลอดลม อายุรแพทย์จะตรวจดูกล้องให้อยู่ในระยะโพกัสก่อน แล้วจึงใช้ xylocaine jelly ทารอบท่อ endotracheal เพื่อการหล่อลื่นและหาขณะที่สอดเข้าทางลำคอของผู้ป่วย (transendotracheal tube) จากนั้นจึงใช้ xylocaine jelly ทารอบตัวกล้อง และสอดใส่กล้องเข้าทางท่อ endotracheal แล้วทำการส่องกล้องผ่านทางปากเข้าสู่หลอดลม ไปยังบริเวณที่มีรอยโรคที่ปรากฏบนภาพถ่ายรังสี แล้วจึงทำการเก็บน้ำล้างถุงลม โดยการฉีดสารละลายน้ำเกลือเข้าไปภายในกล้อง จำนวน 60 มิลลิลิตร แล้วดูดกลับขึ้นมาทันที สารน้ำล้างถุงลมนี้ จะถูกดักเก็บไว้ในขวดแก้ว และนำไป

เก็บไว้ในภาชนะที่มีฝาปิดมิดชิด ซึ่งบรรจุน้ำแข็งอยู่ภายใน เพื่อส่งไปวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการต่อไป

การเก็บน้ำล้างถุงลม จะทำในปอดข้างที่ไม่มีรอยโรคก่อนซึ่งจะทำบริเวณ lingula หรือ right middle lobe ของปอดข้างซ้ายหรือข้างขวา แล้วจึงมาทำในปอดข้างที่มีรอยโรค จากนั้นจึงทำการตัดเนื้อเยื่อ (biopsy) บริเวณที่มีพยาธิสภาพ และส่งไปตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยา เพื่อยืนยันผลการวินิจฉัยว่าผู้ป่วยเป็นมะเร็งปอด นอกจากนี้ผู้ป่วยทุกรายจะได้รับการเจาะเลือดจำนวน 10 มิลลิลิตร เพื่อนำไปปั่นและเก็บซีรัม และส่งไปตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติชีวเคมีต่อไป ดังแสดงไว้ในรูปที่ 7



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

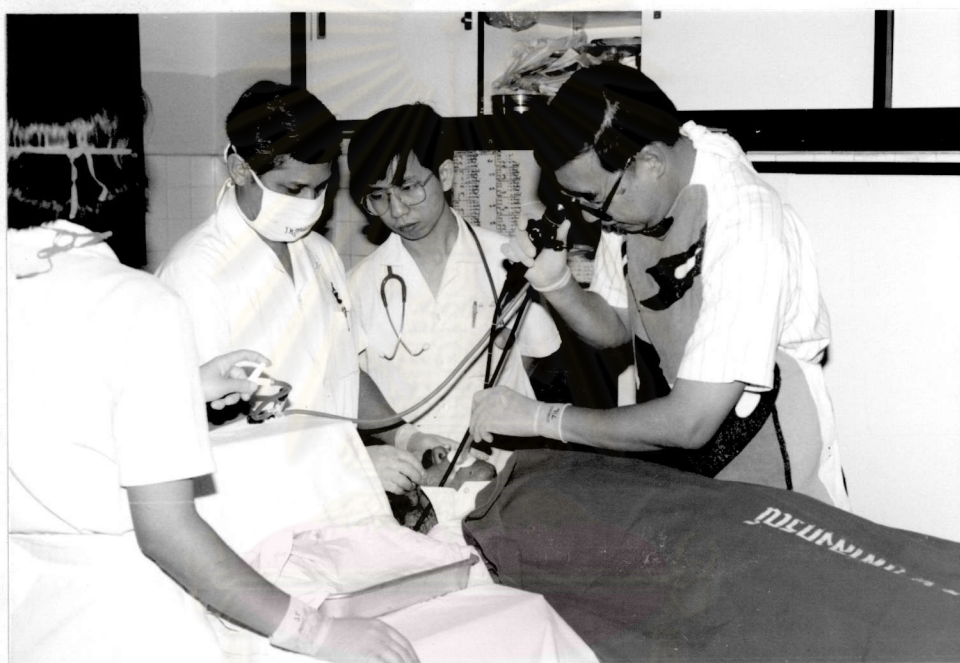


รูปที่ 7 แสดงขั้นตอนการเก็บตัวอย่างน้ำล้างถุงลมและซีรัม



รูปที่ 8 แสดงการจัดวางเครื่องมือเครื่องใช้ในการส่องกล้องตรวจหลอดลม

ศูนย์จักษุวิทยา
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 9 แสดงการส่องกล้องตรวจหลอดลมผู้ป่วย

ศูนย์วิทยุโทรพยาธิกร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษา

5.1 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ทางเซลล์วิทยา

95 % Ethyl alcohol และ Absolute ethyl alcohol A.R.

Hematoxylin solution A.R.

Hydrochloric acid A.R.

Orange G solution (OG-6) A.R.

EA-50 solution A.R.

Xylene A.R.

5.2 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ทางชีวเคมี

Total protein test kit for biuret method (BMLab -
Laboratory)

Total protein test kit for dye binding method (BMLab
Laboratory)

Reagent kit for the determination of alpha-amylase
(Roche ,Switzerland.)

Reagent kit for the determination of gamma glutamyl-
transferase (Automated Analysis for BM/ Hitachi system 704 ,Boehr-
inger Mannheim , West Germany)

Reagent kit for the determination of lactate dehydro-
genase (Wako Pure Chemical Industries ; Ltd , Japan)

Autokit CK-NAC for the determination of creatine kinase
(Wako Pure Chemical Industries ; Ltd, Japan)

Reagent kit for CEA (Gamma Coat M [I-125] CEA
Immunoradiometric Assay Kit ,Clinical Assays , Baxter , USA.)

Reagent set for lactate dehydrogenase isoenzyme elec-
trophoresis (Helana Laboratories , USA.)

Reagent set for the determination of sialic acid

Reagent set for serum proteins eletrophoresis

Blood urea nitrogen test kit, (BMLab Laboratory)

Glucose test kit , (BMLab Laboratory)

5.3 อุปกรณ์ที่ใช้ทางเซลล์วิทยา

Hemocytometer (Counting chamber , AO , USA)

Hand Counter

Light microscope (Olympus , Japan)

Cytocentrifuge (Cytospin , Shandon , USA)

Cytoclip and disposable centrifuge tube (Shandon ,USA.)

Slide with frosted end

Staining jar and rack

Cover glass

5.4 อุปกรณ์ที่ใช้ทางชีวเคมี

Refrigerated centrifuge (Sorvall , USA)

Ultrafiltrator (Standard Cells Model 8010 Amicon ,USA.)

Ultrafiltration membrane (Model PM-10 ,Amicon,USA.)

Electrophoresis apparatus with applicator (Gelman ,USA.)

Titan III Cellulose Acetate Plates ,Model 3024 ,

(Helana Laboratories , USA.)

Spectrophotometer ,Model UV 120-01 (Shimadzu ,Japan.)

Densitometer , Econoscan (Helana Laboratories ,USA.)

Water bath (Gelman Sciences ,USA.)

Vorter mixer (Model Genie II ,USA.)

Centrifuge tube plastic.

6. วิธีการวิเคราะห์


6.1 การวิเคราะห์ทางด้านเซลล์วิทยา

น้ำล้างถุงลมที่ได้จากบอดข้างที่มีรอยโรคและไม่มีรอยโรคของผู้ป่วยมะเร็งปอด จะนำมาวัดปริมาตรทั้งหมดที่ได้ จากนั้นจึงนำมาผ่านการกรองด้วยผ้าก๊อชที่สะอาดสองชั้น เพื่อกรองเอาสิ่งคั่งหลังและก้อนเนื้อเล็กออกไป จากนั้นจึงแบ่งน้ำล้างถุงลมมาจำนวน 1 มิลลิลิตร เพื่อนำไปนับปริมาณ เซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งหมด (total cell count) ด้วยเครื่องนับเม็ดเลือด (hemocytometer) ที่เป็นแผ่นแก้วมาตรฐาน (counting chamber) สำหรับนับเม็ดเลือด น้ำล้างถุงลมที่เหลือทั้งหมดจะนำไปปั่นแยกเซลล์ โดยใช้เครื่อง refrigerated centrifuge ความเร็ว 3,000 rpm นาน 15 นาที จะได้ส่วนของน้ำใส (supernate or cell free lavage) ซึ่งจะเก็บไว้เพื่อทำการวิเคราะห์สารชีวเคมี และส่วนที่เป็นตะกอน (cell pellets) จะถูกนำมาสเมียร์บนสไลด์ โดยใช้เครื่อง cytocentrifuge ความเร็ว 1,000 rpm นาน 10 นาที และนำไปย้อมสีด้วยวิธีของ Papanicolaou เพื่อแยกชนิดของเซลล์เม็ดเลือดขาว (differential cell count) ซึ่งจะนับจำนวนทั้งหมด 300 ตัว แล้วนำมาคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของเม็ดเลือดขาวแต่ละชนิด ได้แก่ alveolar macrophage, neutrophil, lymphocyte และนอกจากนี้ยังได้ตรวจดูเซลล์มะเร็งที่จะสามารถตรวจพบได้ในน้ำล้างถุงลมของผู้ป่วยมะเร็งปอดด้วย.

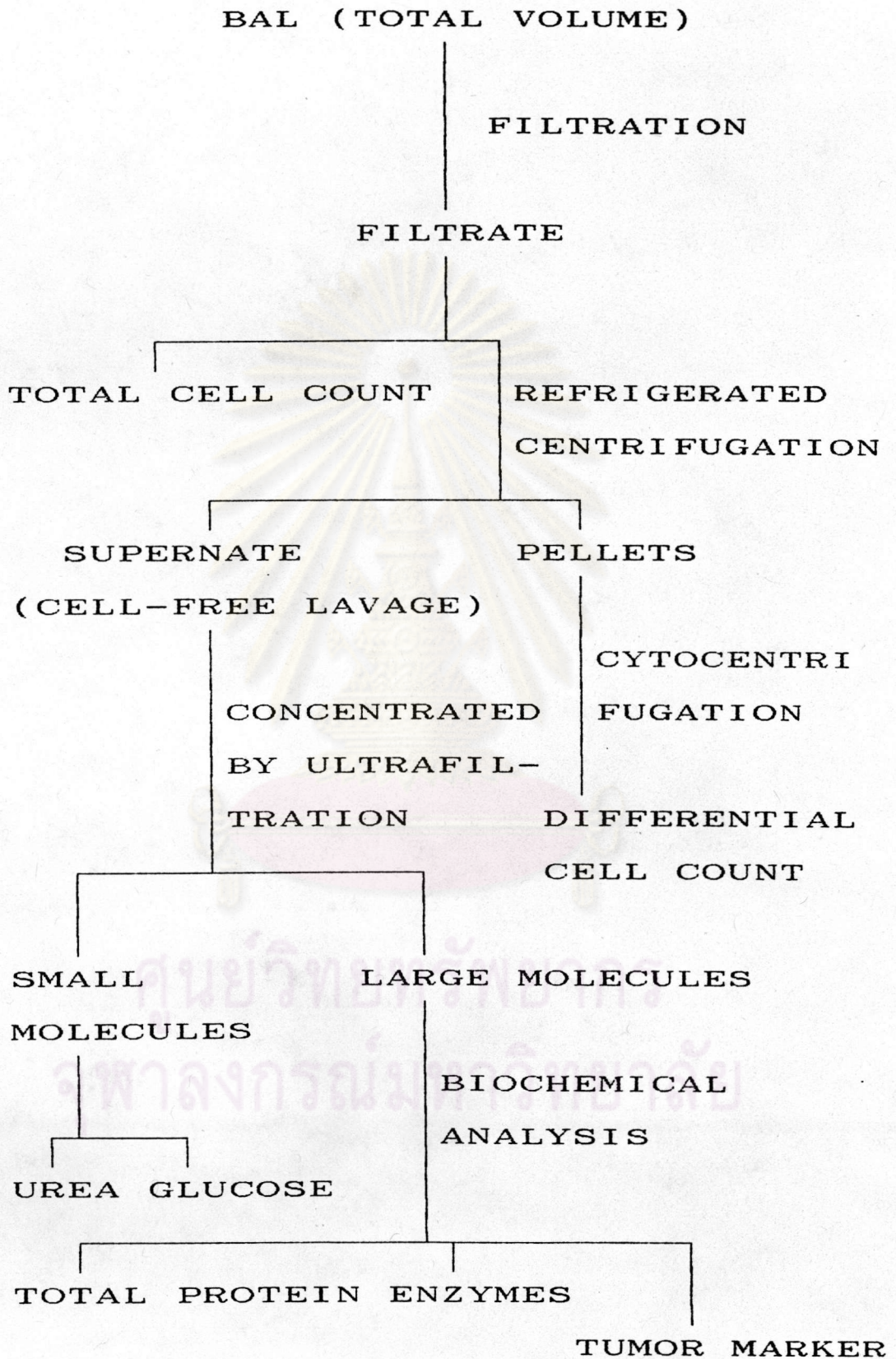
6.2 การวิเคราะห์ทางด้านชีวเคมี

ส่วนของน้ำใสที่ได้จากการปั่นแยก จะนำมาวัดปริมาตรทั้งหมด และนำไปตั้งน้ำออกเพื่อทำให้สารตัวอย่างมีความเข้มข้นขึ้น โดยใช้วิธี ultrafiltration และใช้ ultrafiltration membrane ชนิด PM-10 ซึ่งมีช่อง (pore size) ที่จะให้สารชีวเคมีที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 10,000 ดาลตัน ผ่านไปได้ ดังนั้น สารชีวเคมีในน้ำล้างถุงลมที่มีความเข้มข้นขึ้นจะมีน้ำหนักโมเลกุล มากกว่า 10,000 ดาลตัน ขึ้นไป.

จากนั้นจึงแบ่งน้ำล้างถุงลมและซีรัม ไปตรวจวิเคราะห์เอนไซม์ amylase ,
creatine kinase ,lactate dehydrogenase และ gamma glutamyltransferase
ทันที น้ำล้างถุงลมและซีรัมที่เหลือทั้งหมดจะเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อทำการวิเคราะห์
สารชีวเคมีชนิดอื่นๆ ต่อไปคือ total protein ,CEA ,sialic acid สำหรับส่วนของ
น้ำล้างถุงลมที่มีสารชีวเคมีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 10,000 คาลตันนั้น จะถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ
 -20°C เพื่อนำมาวิเคราะห์ urea nitrogen และ glucose ต่อไป.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 10 แสดงขั้นตอนการวิเคราะห์เซลล์และสารชีวเคมีในน้ำล้างถุงลม

วิธีการวิเคราะห์สารชีวเคมีในน้ำล้างถุงลมและซีรัม

การวิเคราะห์ total protein ในน้ำล้างถุงลมวิเคราะห์โดยวิธี dye binding method (Bradford ,1976) และในซีรัมโดยวิธี biuret method (Henry et al, 1957) การวิเคราะห์ glucose โดยวิธี enzymatic method (Lott , 1975) urea nitrogen และ sialic acid โดยวิธีเคมี (Nixon , 1973)

สำหรับการวิเคราะห์เอนไซม์ในน้ำล้างถุงลมและซีรัม ได้ส่งไปตรวจวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาเวชศาสตร์ชั้นสูติ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ เอนไซม์ amylase วิเคราะห์โดยวิธี dyed substrate method (Dalai and Winsten , 1971) เอนไซม์ creatine kinase และ เอนไซม์ lactate dehydrogenase วิเคราะห์โดยวิธี optimized UV method (Kaplan and Pesce ,1984) เอนไซม์ gamma glutamyl transferase วิเคราะห์โดยวิธี Automate Analysis for BM / Hitachi system 704 (Szasz , 1969)

สำหรับการวิเคราะห์ CEA ในน้ำล้างถุงลมและซีรัม ได้ส่งไปตรวจวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการภาควิชารังสีวิทยา ตึกโภชยานนท์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โดยวิธี immunoradiometric assay (IRMA) (Krantz and Laferte ,1983)

7. การวิเคราะห์ทางสถิติ

7.1 ทางด้านเซลล์วิทยา

โดยการหาค่าเฉลี่ย(mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (SEM) ของ total cell count และ differential cell count รวมทั้งทดสอบความมีนัยสำคัญทางสถิติ ของเซลล์ชนิดต่างๆ ในน้ำล้างถุงลมจากปอดข้างที่มีรอยโรคและไม่มีรอยโรค โดยวิธี paired-t-test

7.2 ทางด้านชีวเคมี

โดยการหาค่าเฉลี่ย (mean)และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (SEM) ของตัวแปรต่างๆ ทั้งในน้ำล้างถุงลมจากปอดข้างที่มีรอยโรคและไม่มีรอยโรครวมทั้งในซีรัม โดยวิธี paired-t-test