บทที่ 2

วัสดุและวิธีการศึกษา

<u>ผู้ป่วย</u>

ทำการศึกษา ในผู้ป่วยซึ่งรับไว้รักษา ในหอผู้ป่วยหนัก (Intensive Care Unit) ภาควิชาอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ตั้งแต่เดือนมกราคม 2530 ถึง เดือนธันวาคม 2530 ที่ได้รับการวินิจฉัยแน่นอนว่าถูกงูเห่ากัด จำนวน 18 ราย โดยมี criteria ในการวินิจฉัยดังต่อไปนี้ คือ

1. มีประวัติแน่นอนว่าถูกงูเห่ากัด โดยเห็นตัวงู หรือนำตัวงูมาด้วย

2. มีรอยเขี้ยว (fang marks) ชัดเจน

3. มีอาการ และ/หรืออาการแสดงทางระบบประสาท (systemic effect) เช่น ง่วงนอน ซึม หนังตาตก น้ำลายไหล กลืนลำบาก พูดไม่ชัด หายใจลำบาก จนถึงไม่สามารถหายใจเองได้

4. มีอาการและ/หรือ อาการแสดงเฉพาะที่ (local reaction) เช่น ปวด บวม แดง เป็นจ้ำเขียว (ecchymosis) หรือมีเนื้อตาย

ผู้ป่วยทุกรายได้รับการรักษาดังต่อไปนี้ คือ

1. ให้ Tetanus antitoxin และ/หรือ Tetanus toxoid ฉีดเข้ากล้าม แล้วแต่ประวัติว่าได้รับภูมิคุ้มกันมาก่อนหรือไม่

2. ให้ Cobra antivenom ทางหลอดเลือด โดยคำนวณปริมาณจากขนาดความกว้างของรอยเขี้ยวงู คิดเป็นมิลลิเมตร x 10 ทุก 15 นาที จนกว่าผู้ป่วยจะมีอาการดีขึ้น

3. สังเกตอาการผู้ป่วยอย่างใกล้ชิด ถ้ามีอาการของระบบหายใจล้มเหลว จะให้การรักษาด้วยเครื่องช่วยหายใจ

<u>วิธีการศึกษา</u>

1. บันทึกขนาดและตำแหน่งของรอยเขี้ยวงู รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงเฉพาะที่ที่เกิดขึ้นทุกวัน จนกว่าผู้ป่วยจะออกจากโรงพยาบาล

2. ตัดชิ้นเนื้อที่รอยเขี้ยวงูอันใดอันหนึ่งหลังจากถูกงูเห่ากัด เร็วที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้ โดยใช้ punch biopsy ขนาด 4 มิลลิเมตร ภายใต้วิธีปราศจากเชื้อ (sterile technique) ลึกถึงชั้นไขมันใต้ผิวหนัง หลังจากฉีดยาชาเฉพาะที่ด้วย 2% xylocaine

3. แบ่งชิ้นเนื้อที่ได้ ด้วยใบมีด ออกเป็น 2 ส่วน ส่วนที่หนึ่ง แช่ใน 10% buffered formalin เพื่อส่งตรวจพยาธิสภาพในระดับกล้องจุลทัศน์ธรรมดาโดยย้อมสี Hematoxylin & Eosin ส่วนที่ 2 แบ่งออกเป็น 2 ส่วน

ส่วนแรก แช่เย็นจัดทันทีในน้ำแข็งแห้ง เพื่อส่งตรวจทางพยาธิอิมมูนเรืองแสง อีกส่วนหนึ่งแช่ใน 4% glutaraldehyde ใน phosphate buffer pH 7.4 เพื่อนำไปเตรียมตามขั้นตอนสำหรับศึกษาในระดับกล้องจุลทัศน์อิเลคตรอน

4. การดูแลแผล หลังจากตัดชิ้นเนื้อไปพิสูจน์แล้ว ให้ล้างแผลด้วยน้ำเกลือวันละ 2 ครั้ง และปิดแผล ด้วยผ้าปิดแผล โดยไม่ต้องใช้ยาฆ่าเชื้อหรือยาปฏิชีวนะเฉพาะที่ สังเกตแผลงูกัด ถ้ามีเนื้อตายมากและมีหลักฐานว่ามีการติดเชื้อแบคทีเรียร่วมด้วยอาจต้องให้ยาปฏิชีวนะหรือทำ skin grafting

<u>การเตรียมชิ้นเนื้อเพื่อศึกษาในระดับกล้องจุลทัศน์ธรรมดา (LIGHT MICROSCOPIC STUDY)</u>

ชิ้นเนื้อที่ตัดจากแผลงูเห่ากัด (biopsy specimen) ต้องผ่านการเตรียมตามลำดับขั้นตอน และนำมาย้อมสี Hematoxylin & Eosin เพื่อศึกษาพยาธิสภาพในระดับกล้องจุลทัศน์ธรรมดา ดังต่อไปนี้ คือ

1. <u>FIXATION</u>

เพื่อหยุดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ไปในทางเสื่อมสลาย โดยแช่ใน 10% buffered formalin อย่างน้อย 2 ชั่วโมง

2. <u>DEHYDRATION</u>

ทำชิ้นเนื้อให้แห้งน้ำ โดยแช่ใน ethyl alcohol จากความเข้มข้นต่ำไปหาความเข้มข้นสูงสุด คือ 70% 80% 95% และ absolute alcohol เพื่อให้เข้าไปแทนที่น้ำภายในเซลล์

3. CLEARING

ชิ้นเนื้อที่ทำให้แห้งน้ำแล้ว นำไปแช่ใน xylene ซึ่งมีคุณสมบัติแทนที่ได้ทั้งใน alcohol และในสารละลายที่จะนำชิ้นเนื้อไปฝัง (embedding agent)

4. EMBEDDING

ฝังชิ้นเนื้อ ในสารที่สามารถแข็งตัว (polymerization) ได้เพื่อเป็นโครงร่างสำหรับตัดชิ้นเนื้อให้หนาบางตามความต้องการ สารที่ใช้ คือ paraffin

5. SECTIONING

ตัดชิ้นเนื้อด้วย microtome หนา 5-10 ไมโครเมตร

6. STAINING

แผ่นชิ้นเนื้อที่ตัดได้ นำไปวางบนสไลด์กระจก (glass slide) แล้วนำไปย้อมสี Hematoxylin & Eosin

การเตรียมชิ้นเนื้อเพื่อศึกษาในระดับกล้องจุลทัศน์อิเลคตรอน
(TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPIC STUDY)

การเตรียมชิ้นเนื้อ สำหรับศึกษา ในระดับ กล้องจุลทัศน์อิเลคตรอน มีลำดับขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. FIXATION

แช่ชิ้นเนื้อใน 4% glutaraldehyde 0.1 M ใน buffered formalin pH 7.4 อย่างน้อย 4 ชั่วโมง

2. DEHYDRATION

ทำชิ้นเนื้อให้แห้งน้ำ โดยแช่ใน ethyl alcohol จากความเข้มข้นต่ำไปสู่ความเข้มข้นสูง

3. CLEARING

เตรียมชิ้นเนื้อสำหรับ embedding ใช้ propylene oxide

4. EMBEDDING

ฝังชิ้นเนื้อใน araldite เพื่อเป็นโครงร่าง สำหรับนำไปตัด section

5. SECTIONING

ใช้ ultramicrotome ตัดบาง 600-1000 A

6. STAINING

แผ่นชิ้นเนื้อที่ตัดได้ ให้วางบน grid ที่เคลือบด้วย carbon แล้วย้อมด้วยสารละลายที่มีน้ำหนักไมเลกุลสูงเป็นองค์ประกอบ ได้แก่ urenyl acetate และ lead citrate hydroxide เพื่อให้องค์ประกอบภายในเซลล์จับกับอนุภาคที่หนัก เมื่อถูกลำอิเลคตรอน จะให้ภาพสีดำบนจอเรืองแสงชัดเจน

014443

การเตรียมชิ้นเนื้อเพื่อศึกษาพยาธิอิมมูนเรืองแสง
(DIRECT IMMUNOFLUORESCENT STUDY)

การเตรียมชิ้นเนื้อสำหรับศึกษาพยาธิภูมิคุ้มกันเรืองแสง มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. แช่แข็งชิ้นเนื้อที่อุณหภูมิ -70 เซลเซียส

2. นำชิ้นเนื้อที่แช่แข็ง (frozen tissue) มาตัดด้วย cryostat ที่อุณหภูมิ -20 เซลเซียส ให้ได้ชิ้นเนื้อหนา 4 ไมโครเมตร วางบนสไลด์ 6 แผ่น

3. ย้อมสไลด์แต่ละแผ่นด้วย antihuman (poly) globulin, IgG, IgM, IgA, C3 และ fibrin ตามลำดับ

4. แช่สไลด์ไว้ใน moist chamber ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที

5. ล้างด้วย phosphate buffered saline นาน 30 นาที แล้ว mount ด้วย buffered glycerol

6. อ่านผลโดยใช้กล้อง OLYMPUS microscope ที่ใช้ HBO Mercury Vapour Lamp