



เอกสารอ้างอิง

ภาษาไทย

- กำพล เลาทเพ็ญแสง ,ถนอมพันธ์ ทรงธนศักดิ์ ,เสรี เสนารัตน์ และ  
ไพศิษฐ์ ศิริวิทยากร . Bronchoscopy for surgical  
patients . เชียงใหม่เวชสาร . 23 . (กันยายน 2527)  
: 245-250
- ธงธวัช อนุเคราะห์ และ วรณี โรจนโพธิ์ เอกสารการประชุมเชิงปฏิบัติ  
การเรื่อง เคมีกับมะเร็ง . ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์  
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ,2532 : 121 หน้า
- ประภิต วาทีสาธกกิจ . การส่องหลอดลมด้วยกล้อง ไฟเบอร์ออปติก .  
สารศิริราช . 34 . (พฤศจิกายน 2525) : 901-910
- เพชรรินทร์ ศรีวัฒนกุล . ประโยชน์ของการตรวจหา Carcinoembryonic  
antigen ในผู้ป่วยโรคมะเร็ง . วารสารโรคมะเร็ง . 2 .  
(ตุลาคม-ธันวาคม 2519) : 191-196
- ไพรัช เทพมงคล . ความรู้เรื่องโรคมะเร็ง . ชุมนานะแนวสุขภาพประชาชน .  
สำนักพิมพ์ เมติคัล มีเดีย . 2524 : 208 หน้า
- โมศรี สุทธิจิตต์ . มะเร็งโรคมะเร็งที่เกิดจากโมเลกุล . วารสารวิทยาศาสตร์ .39.  
(กันยายน 2528) : 438-452
- วินิตา บัณฑิต . Histology II . พิมพ์ครั้งที่ 2 . ภาควิชากายวิภาคศาสตร์  
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย . 2530 : 241 หน้า

ภาษาอังกฤษ

- Alvarez-Sala ,J.L. " Usefulness of tumor markers  
in serum and lung lavage " Am. Rev. Respir. Dis. ,  
134(2), 354 , 1986
- \_\_\_\_\_. , R.,Blasce , R., Callol , L., Laguna , R.,  
Alvarez-Sala , J. L. and Gomez de Terroros , F. J.  
" Tumour markers in bronchoalveolar lavage "  
Acta . Oncol. , 28 , 290-1 , 1989
- Auerbach , O., Garfinkel , L., Parks , V.R. "Histologic type  
of lung cancer in relation to smoking habits , year  
of diagnosis and sites of metastasis" Chest , 67 ,  
382-387 , 1975
- Begin , R., Cantin , A., Berthiaume , Y ., Boil cau, R.,  
Bisson , G., Lamoureaux,G., etal "Clinical features  
to stage alveolitis in asbestos workers"  
Am.J.Indust.Med. , 8 ,521-36, 1985
- Bell ,D.Y., J.A., Spock ,A., McLennan ,G. and Hook ,G.E.R.  
" Plasma proteins of the bronchoalveolar surface  
of the lungs of smokers and nonsmokers "  
Am. Rev. Respir. Dis. , 124 , 72-79 , 1981
- Bishop ,M.L., Duben-Von Lauten ,J.L. and Fody ,E.P.  
" Clinical Chemistry " J.B Lippincott ,  
Philadelphia : 181-188 , 357-358 , 1985

- Bjermer ,L., Engstrom-Laurent , A., Lundgren ,R., Rosenhall ,  
L. and Hallgren ,R. " Hyaluronate and type III  
procollagen peptide concentrations in bronchoalveolar  
lavage fluid as markers of disease activity in  
farmer's lung " Br. Med. J. , 295 , 803-806 , 1987
- \_\_\_\_\_. , Engstrom-Laurent , A. and Thunell , A.  
" Hyaluronic acid in bronchoalveolar lavage fluid in  
patients with sarcoidosis : relationship to lavage  
mast cells " Thorax , 42 , 933-938 , 1987
- Braganza , J.M., Butler , E.B. , Fox , H., etal "Ectopic  
production of Salivary type amylase by a  
pseudomesotheliomatous carcinoma of the lung" Cancer,  
41, 1522-1525 , 1978
- Bryant , M.L. , Stoner , G.D. and Metzger , R.P. "Protein -  
bound carbohydrate content of normal and tumorous  
human lung tissue" Biochim. Biophys. Acta. , 343 ,  
226-231 , 1974
- Bradford , M.M " A rapid and sensitive method for the  
quantitation of microgram quantities of protein  
utilizing the principle of protein - dye binding"  
Anal. Biochem. 72 , 248-254 , 1976
- Cantin ,A.M., Fells , G.A., Hubbard , R.C. and Crystal ,  
R.G. " Antioxidant Macromolecules in the Epithelial  
Lining Fluid of the Normal Human Lower Respiratory  
tract " J. Clin. Invest. , 86 , 962-971 , 1990

- Cantin ,A.M., North , S.L., Hubbard , R.G and  
Crystal ,R.G. " Normal alveolar epithelial lining  
fluid contains high levels of Glutathione "  
J. Appl. Physiol. , 63(1) , 152-157 , 1987
- Carney ,D.N., Zweig , M., Ihde , D.C., Cohen , M.H.,  
Makuch , R.W and Gazdar,A.F. "Elevated serum  
Creatine Kinase BB levels in patients with small  
cell lung Cancer " Cancer . Res . , 44 , 5399-  
5403 , 1984
- Chen ,Y.F., Huang , J.K., Liu , S.F., "  $\gamma$  - Glutamyl  
transpeptidase positive cells in esophageal  
abrasive balloon cytology and their clinical  
significance." Chinese. J. Oncol. , 9 , 241-243 ,  
1987
- Cochrane , C.G., Spragg , R.G. , Revax , S.D.,  
Cohen , A.B and McGuire , W.W. " The Presence of  
Neutrophil Elastase and Evidence of Oxidation  
Activity in Bronchoalveolar Lavage Fluid of  
Patients with Adult Respiratory Distress syndrome"  
Am. Rev. Respir. Dis. , 127 , s25 - s27 , 1983
- Cohen , A.B. and Rossi ,M. " Neutrophils in Normal Lungs "  
Am. Rev. Respir. Dis. , 127 , s3 - s9, 1983
- Dalai , F.R and Winsten , S. Clin. Chim. Acta. , 32 ,  
327 - 332 , 1971

- Daniele , R.P., Elias , J.A., Epstein , P.E. and Rossman, M.D. " Bronchoalveolar Lavage : Role in the pathogenesis , Diagnosis , and Management of Interstitial Lung Disease " Ann. Intern. Med. , 102 , 93 - 108 , 1985
- Davis , G.S., Giancola , MS., Costanza, M.C. and Low , R.B " Analyses of sequential bronchoalveolar lavage samples from health human volunteers " Am.Rev.Respir.Dis., 126 , 611 - 616 ,
- Delacroix ,D.L, Marchandise,F.X., Francis,C. and Sibille, Y. "Alpha - 2-macroglobulin, monomeric and polymeric Immunoglobulin M in Bronchoalveolar lavage." Am.Rev.Respir.Dis. , 132,829-835 , 1985
- Diego ,de A. , Compte , L . , Sanchis , J . , Enguidanos, M.J.and Marco , V. " Diagnostic Value of Carcinoembryonic Antigen in Bronchoalveolar Lavage Fluid of Peripheral Lung Cancer , " Chest , 97(3) , 767 , 1990
- DuBois ,R.M. and Clarke ,S.W. " Fibreoptic bronchoscope in diagnosis and management " 1<sup>st</sup> edition ,JB. Lippincott company , 1011-4.22 , 1987
- Dwivedi ,C., Dixit , M., Kumar , S.S., Reddy , H., Semanya , K.A. and Hardy , R.E. " Plasma sialic acid alterations in neoplastic diseases " J.Med. , 18(5-6) , 323-332 , 1987

- Fels , A.O.S. and Cohn , Z.A. " The alveolar macrophage "  
J. Appl. Physiol. , 60(2) , 353-369 , 1986
- Fleisher , M., Wasserstrom , W.R., Schold , S.C. et al  
" Lactic Dehydrogenase isoenzymes in the  
cerebrospinal fluid of patients with systemic  
cancer " Cancer. , 47 , 2654 - 2659 , 1981
- Geddes , D.M. "Clinical investigation of respiratory  
disease."Ed. by T.J.H clark , London, Chapman &  
Hall , 205-217 , 1981
- Gold , P., Shuster , J. and Frudman , S.O. " Carcinoembryonic  
Antigen (CEA) in Clinical Medicine " Cancer. , 42 ,  
1399-1405 , 1978
- Goldstein ,N., Lippmann , M.L., Goldbery , S.K., Fein , A.M.,  
Shapira , B. and Leon , S.A. " Usefulness of tumor  
markers in serum and bronchoalveolar lavage of  
patients undergoing fiberoptic bronchoscopy " Am. Rev. Respir. Dis. , 132 , 60-64 , 1985
- Gropp ,C., Havemann , K. and Lehmann , F.G.  
" Carcinoembryonic antigen and ferritin in Patients  
with lung cancer before and during therapy " Cancer.,  
42 , 2802-2808 , 1978
- Hansen ,H.H. and Hansen , M. " Tumor markers in small cell  
lung cancer " Eur. J. Cancer. Clin. Oncol. ,  
23(11) , 1585-7 , 1987
- Harris ,C.C. " Lung cancer clinical diagnosis and treatment",  
Second edition ,Ed.by Marc J.Straus,Grune & Stratton,  
1-20 , 1983

- Henry ,R.J., Sobel , C., Berkman , S. Anal. Chem. , 92 ,  
149 , 1957
- Holter , J.F., Weiland , J.E., Dacht , E.R., Gadek , J.E.  
and Davis , W.B. " Protein Permeability in the Adult  
Respiratory Distress Syndrome " J. Clin. Invest. ,  
78 , 1513-1522 , 1986
- Hunninghake , G.W., Gadek , J.E., Kawanami , O., Ferrans ,  
V.J. and Crystal , R.G. " Inflammatory and immune  
processes in the human lung in health and disease :  
evaluation by bronchoalveolar lavage "  
Am. J. pathol. , 97 , 149-206 , 1979
- Kaplan ,L.A., Pesce , A.J. " Clinical Chemistry " Chapter 46,  
48, 49, 56, 60, The C.V.Mosby Company, St.louis, 1984
- Khadapkar , S.V. , Sheth , N.A. , Bhide , S.V.  
" Independence of sialic acid levels in normal and  
malignant growth " Cancer.Res. ,35 ,1520-1523,1975
- Krantz ,M.J. and Laferte , S. Molecular Immunology. , 20 ,  
406 , 1983
- Krauss ,S., Macy , S. and Ichiki , A.T. " A study of  
immunoreactive calcitonin (CT), adrenocorticotrophic  
hormone (ACTH) and carcinoembryonic antigen (CEA) in  
lung cancer and other malignancies " Cancer , 47 ,  
2485-92 , 1981
- Krieger ,B., Blinder ,L. and Inchausti ,B.C. " Clinically  
utility of bronchoalveolar lavage in a general  
hospital " Arch. Intern. Med. , 149 , 1605-1607 ,  
1989

- Lentjes , Eef G.W.M. and Backer , E.T. " Increased serum lactate dehydrogenase isoenzyme 1 and macro Creatine Kinase type 2 in a patient with lung cancer " Clin. Chim. Acta. , 168 , 75-79 ,1987
- Lipton ,A. , Harvey , H.A. , Delong , S., et al " Glycoproteins and human cancer" Cancer ,43 , 1766-1771 , 1979
- Lombardi ,C., Tassi , G.F., Pizzocole , G. and Donato , F. " Clinical significance of a multiple biomarker assay in patients with lung cancer " Chest , 97(3) , 639-644 , 1990
- Loos , U., Oehr , P., Genske , F. and Schlack , W. "Diagnostic Value of thee Tumor markers CEA and TPA in Bronchoalveolar lavage fluid" Prax.Klin.Pneumol. 42 ,235-237, 1988
- Lott ,J.A. and Turner K. " Evaluation of Trinder's Glucose Oxidase Method for Measuring Glucose in serum and urine " Clin.Chem. , 21 , 1754-1760 , 1975
- Low ,B.B., Davis ,G. and Giancola , M.S."Biochemical analyses of bronchoalveolar lavage fluids of normal healthy volunteers" Am.Rev.Respir.Dis. , 118,863-75 ,1978
- Macbeth , R.a.L and Bekesi , J.G. "Plasma Glycoproteins in malignant disease" Arch. Surg. , 88 , 633-637 ,1964
- Manly ,K.F., Petrelli , N., Anderson , G.R., Emrich, L.J. , Herrera , L. and Mittelman ,A. " Cancer . Res. , 47 , 6156-6160 , 1987



- Marcy , T.W., Merrill , W.W., Rankin , J.A. and Reynolds ,  
H. Y. " Limitations of Using Urea to Quantify  
Epithelial Lining Fluid Recovered by Bronchoalveolar  
Lavage " Am. Rev. Respir. Dis. , 135 , 1276-1280 ,  
1987
- Martin , P.C. " Amylase - Producing Lung Cancer "  
J . Surg . Oncol. , 21 , 30-32 , 1982
- McGeachin, R.L. and Adams ,M.R. "Serum Amylase and Lung  
cancer" Cancer , 10,497-499,1957
- Mckenzine , C.G., Evans , I.M.A., Hillyard , C.J., Hill , P.,  
Carter , S., Tan, M.K. and MacIntyre , I.  
"Biochemical Markers in Bronchial Carcinoma"  
Br.J. Cancer. ,36 , 700-707 , 1977
- Merrill ,W.W., Goodman , M. , Matthay ,R.A. , Naegel, G.P. ,  
Vandevoorde , J.P , Myl , A.D. and Reynolds, H.Y.  
" Quantitation of Carcinoembryonic Antigen in the  
Lung Lining Fluid of Normal Smokers and Nonsmokers "  
Am. Rev. Respir .Dis , 123 , 29-31 ,1981
- \_\_\_\_\_, Naegel , G.P. , Olchowski , J.J. and Reynolds ,  
H.Y." Immunoglobulin G Subbclass Proteins in Serum  
and Lavage Fluid of Normal Subjects "  
Am. Rev. Respir. Dis. , 131 , 584-587 , 1985
- Miller , E.C. and Miller , J.A. "The metabolism of chemical  
carcinogens to reactive electrophiles and their  
possible mechanisms of action in carcinogenesis In :  
C.E. Searle (ed) : Chemical carcinogens , ACS  
Monograph 173. American Chemical Society . Washington  
DC 737-762 , 1976

- Mordelet - Dambrine , M. , Arnoux ,A. , Stanislas Leguern ,  
G. , Sandron , Chretiein, J. and Huchon , G.  
"Processing of lung lavage fluid causes variability  
in bronchoalveolar cell count" Am. Rev. Respir. Dis.  
130 , 305-6 , 1984
- Morrison , H.M., and Stockley, R.A. "The many uses of  
bronchoalveolar lavage" Br. Med.J. , 296 , 1758,1988
- Muller , T., Marshall , R.J., Cooper, E.H. , Watson, D.A. ,  
Walker , D.A. and Mearns, A.J. "The Role of Serum  
Tumour Markers to Aid the Selection of Lung Cancer  
Patients for Surgery and the Assessment of Prognosis"  
Eur .J. Cancer. Clin. Oncol. , 21(12) , 1461-1466 ,  
1985
- Murray , R.K, Granner , D.K., Mayes , P.A. and Rodwell, V.W.  
"Harper's biochemistry , 21st Edition , Lange medical  
book , Appleton & Lange , Norwalk, Connecticut / San  
Mateo , California , 1988
- Naini , A.B. , Dickerson, J.W.T. and Brown , M.M.  
"Preoperative levels of plasma protein and amino  
acid in esophageal and lung cancer patients"  
Cancer ,62 , 355-360 , 1988
- Nakamura , Y. , Naohiro , T. , Nishide , T. , Emi, M., Horii,  
A., Ogawa , M. ,Mori , T., Kosaki, G., Okabe , T. ,  
et al. "Production of Salivary type - amylase in  
human lung Cancer " Gene , 77 , 107-112 , 1989

- National , Cancer Institute, Cancer statistics , Bangkok,  
Thailand . , 1983
- National Institutes of Health Consensus Development  
Conference Statement. "Carcinoembryonic Antigen : Its  
Role as a Marker in the Management of Cancer "  
Cancer. Res. , 41 , 2017-2018 , 1981
- Nemesanszky , E. and lott , J.A. "Gamma - Glutamyl  
transferase and Its Isoenzymes: Progress and Problems"  
Clin. Chem. , 31(6) , 797-803 , 1985
- Newlands , E.S. "Clinical applications of tumor markers"  
Medical Laboratory Sciences , 44 , 361-370 , 1987
- Nixon , D.W " Colorimetric response to Ehrlich 's reagent  
in plasma from patients with and without cancer "  
Cancer. , 31 , 596 - 599 ,1973
- Otsuki , M., Yuu , H., Maeda , M., et al. " Amylase in the  
lung " Cancer. , 39 , 1656 - 1663 , 1977
- Patel , S., Lott , J.A., " Serum protein electrophoresis " ,  
Clinical Chemistry , Kaplan and Pesce (ed.) ,  
The C.V. Mosby company , St. louis , 1309 - 1319 ,  
1984
- Peterson , B.T. , Idell , S. , Macarthur , C. , Gray, L.D.  
and Cohen , A.B. "A modified Bronchoalveolar Lavage  
Procedure that Allows Measurements of Lung Epithelial  
Lining Fluid Volume" Am. Rev. Respir. Dis. ,141 ,  
314-320 , 1990

- Pushpakom , R., Pattanapanyasat,K. and Bovornkitti, S.  
"Bronchoalveolar T - lymphocytes and subsets in  
pulmonary tuberculosis and bronchogenic carcinoma"  
J.Med.Assoc.Thai. , 73(1) , 1-9 , 1990
- Rankin , J.A., Naegel , G.P. and Reynolds ; H.Y. "Use of  
a central laboratory for analysis of bronchoalveolar  
lavage fluid" Am. Rev. Respir. Dis. , 133 ,186-190 ,  
1986
- Reed , A.H. , Cannon , D.C., Winkelman , J.W. Bahasin ,Y.P.,  
Henry R.T. and Pileggi, V.J. Clin. Chem., 18 , 57 ,  
1972
- Rennard , S.I. , Basset , G. , Lecossier , D. , O'Donnell,  
K.M., Pinkston ,P. , Martin , P.G. and Crystal ,  
R.G " Estimation of Volume of epithelial lining  
fluid recovered by lavage using urea as marker of  
dilution " J. Appl. Physiol. , 60 , 532-8 ,1986
- Reynolds , H.Y. "Bronchoalveolar lavage" Am. Rev. Respir.  
Dis. , 135 , 250-263 , 1987
- \_\_\_\_\_. , and Newball , H.H. "Analysis of proteins and  
respiratory cells obtained from human lungs by  
bronchial lavage" J.Lab.clin.Med. , 84 , 559-573 ,  
1974
- Robbins and Kumar , "Basic pathology" , Fourth edition, W.B.  
Saunders. Company. West Washington Square.  
Philadelphia , 446-451 , 1987

- Saltini , C. , Hance , A.J. , Ferrans, V.J. , Basset ,  
F ., Bitterman, P.B. and Crystal, R.G.  
"Accurate Quantification of cells recovered by  
Bronchoalveolar lavage" Am. Rev.Respir.Dis. , 130 ,  
650-658 ,1984
- Schneeberger , E.E. "Structural basis for some permeability  
properties of the air-blood barrier" Fed. Proc. ,  
37,2471-2478,1978
- Shiraki , R., Kinoshita , M., Wagai , F. and Watanabe , H.  
"Carcinoembryonic antigen (CEA) in the  
Bronchoalveolar lavage fluid from patients with lung  
cancer" Nippon - Kyobu - Shikkan - Gakkai - Zasshi ,  
20(4) ,398-402 , 1982
- Sikorska , H. , Shuster , J. and Gold, P. "Clinical  
Applications of Carcinoembryonic Antigen"  
Cancer detection and prevention . , 12 , 321-355 ,  
1988
- Silver , H.K.B., Rangel, D.M. and Morton , D.L. "Serum sialic  
acid elevations in malignant melanoma patients"  
Cancer , 41 , 1497-1499, 1978
- Smith , R.L. , EL . Sadr , W.M. and Lewis , M.L. "Correlation  
of Bronchoalveolar Lavage cell populations with  
clinical severity of Pneumocystis carinii Pneumonia"  
Chest . , 92(1) , 60-64 , 1988
- \_\_\_\_\_. , Ripps O.S. and Lewis , M.L. "Elevated Lactate  
Dehydrogenase Values in Patients With Pneumocystis  
carinii Pneumonia" Chest , 93(5) ,987-992, 1988

- Stahel , R.A. and Martz . Q. "Prognosis and diagnostic usefulness of serum markers in lung cancer"  
Eur. J. Cancer. Clin. Oncol. , 23(7) , 893-4 ,1987
- Szasz , G : A Kinetic photometric method for serum - Y - glutamyl transpeptidase , Clin. Chem. , 15 : 124-136  
1969
- Turner - Warwick , M.E. and Haslam , P.L "Clinical applications of Bronchoalveolar lavage : An Interim view" Br. J. Dis. Chest. , 80 , 105-121 ,  
1986
- Warr , G.A. , Martin , R.R. , Sharp , P.M. and Rossen , R.D. "Normal Human Bronchial Immunoglobulins and Proteins" Am. Rev. Respir. Dis. , 116 , 25-30 ,1977
- Wong , S.S. , Wu , A. H. B. and Fritsche , H.A. "Reassessment of Creatine Kinase BB as a Marker for cancer of the Prostate , Breast and lung" Clin. Chem. , 33(6) ,  
809-811 , 1987
- Wyder , E.L., Berg , J.W. " Cancer of the lung among nonsmoker. Cancer , 20 , 1161 , 1967



ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ก.

การย้อมเซลล์

โดยวิธี Papanicolaou staining method ประกอบด้วย :

1. การย้อมนิวเคลียส

ใช้วิธีย้อมด้วยสี Hemotoxylin ( แบบ Regressive method ) หลังจากนั้นก็ล้างสีที่มากเกินไปด้วยกรดเกลืออย่างเจือจาง

2. การย้อมซัยโตพลาสซึม

การย้อมซัยโตพลาสซึม เพื่อให้เห็นสีต่างกันและเห็นรูปร่างของเซลล์ในขณะที่เซลล์ซ้อนกันได้ สีที่ใช้ย้อมมี 2 ชนิด

## 2.1 Orange G ( OG - 6 )

ใช้ย้อมซัยโตพลาสซึมของเซลล์บุผิว เม็ดเลือดแดงแบคทีเรียและยีสต์ OG-6 จะทำให้ซัยโตพลาสซึม ติดสีส้มแดง หรือ ส้มอมเหลือง

## 2.2 EA - 50

ใช้ย้อมซัยโตพลาสซึมของเซลล์บุผิว เม็ดเลือดขาว เม็ดเลือดแดง และ histiocyte จะทำให้ซัยโตพลาสซึมติดสีเขียวบนหน้าเงิน

3. การทำให้ใส ( clearing )

เป็นขั้นสุดท้ายของการย้อมสี เป็นการทำให้เซลล์ใส เพื่อว่าเวลาดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงจะผ่านได้ xylene เป็นตัวที่ทำให้เซลล์ใส เมื่อย้อมเสร็จจะแช่ทิ้งไว้ใน xylene จนกว่าจะปิดสไลด์ด้วย cover glass ( mounting )

วิธีการย้อมเซลล์

ก่อนย้อมสี ควรกรองสีทั้งหมดเสียก่อน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Hematoxylin จำเป็นต้องกรองก่อนย้อมทุกครั้ง



### การย้อมทำดังนี้

1. เอาสไลด์ออกจากน้ำยารักษาเซลล์ ( Fixative ) จุ่มน้ำกลั่น 10 ครั้ง
2. ย้อมใน hematoxylin นาน 5 นาที
3. จุ่มในน้ำไหล 10 ครั้ง
4. จุ่มใน 10% Acid alcohol (conc.HCL 10ml ใน95% ethyl alcohol 1000 ml ) 1 ครั้งอย่างรวดเร็ว
5. ล้างด้วยน้ำไหลนาน 3 นาที จนสีที่ย้อมบนสไลด์เปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน
6. จุ่มใน 95% ethyl alcohol 2 ชุด ชุดละ 10 ครั้ง
7. ย้อมใน OG-6 นาน 2 นาที
8. จุ่มใน 95% ethyl alcohol 2 ชุด ชุดละ 10 ครั้ง
9. ย้อมใน EA-50 นาน 2 นาที
10. จุ่มใน 95% ethyl alcohol 2 ชุด ชุดละ 10 ครั้ง
11. จุ่มใน Absolute alcohol 2 ชุด ชุดละ 10 ครั้ง
12. จุ่มสไลด์ลงใน Xylene 2 ชุด ชุดละ 1 ครั้ง แล้วแช่ไว้ใน xylene จนกว่าจะปิดสไลด์

### การปิดสไลด์ด้วย Cover glass (Mounting)

หลังจากย้อมเซลล์เสร็จแล้ว เอาสไลด์ที่แช่ไว้ใน xylene ขึ้นมาปิดด้วย Cover glass โดยใช้ Permount หยดลงบนสไลด์ประมาณ 2 หยด ปิดด้วย Cover glass ขนาด 30x30 มม. หลังจากนั้นวางสไลด์ทิ้งไว้ให้แห้ง หรือ เอาสไลด์ไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 60° c เป็นเวลา 15-20 นาที หรือวางบน hot plate ที่อุณหภูมิพอเหมาะการอบสไลด์ช่วยไม่ให้เกิดฟองอากาศ สีไม่จาง และยังเก็บสไลด์ไว้ได้นานด้วย

## ภาคผนวก ข.

วิธีการวิเคราะห์สารชีวเคมีในน้ำล้างถุงลมและซีรัมการวิเคราะห์โปรตีนในซีรัม

วิธีที่ใช้ : Biuret method

หลักการ: โปรตีนในซีรัมจะเริ่มทำปฏิกิริยากับคอปเปอร์ซัลเฟตในสารละลายที่เป็นด่างให้ คอปเปอร์ (II) ซึ่งจะได้อาร์ประกอบเชิงซ้อนของโปรตีนที่มีสีน้ำเงินม่วง (Biuret reaction) และสามารถวัดค่าได้ จากการอ่านค่า optical density ที่ 550 nm

น้ำยาที่ใช้:

1. เป็น Single reagent ของสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟตใน pH ที่แตกต่างกัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง อยู่ได้นาน 2 ปี
2. Standard protein 3.5 g% , 7.0 g% , 10.5 g% เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-8°C

วิธีทำ :

Tube No.	Test	Blank
1. Color reagent	4.0 ml	4.0ml
2. Serum or standard protein	0.1 ml	-
3. น้ำกลั่น	-	0.1ml

Mix และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที อ่าน OD ที่ 550 nm ใช้ Blank เป็นศูนย์

วิธีคำนวณ : สามารถหาปริมาณของสารตัวอย่างได้โดย การเทียบกับสารมาตรฐาน

ที่มีความแตกต่างกัน 3 ระดับ

การวิเคราะห์โปรตีนในน้ำล้างถุงลม

วิธีที่ใช้ : Dye binding method

หลักการ : โปรตีนในน้ำล้างถุงลมจะรวมตัวกับ Dyed reagent คือ Coomassie Brilliant Blue G-250 ทำให้เกิดสารสีน้ำเงินที่สามารถวัดค่าได้ จากการอ่านค่า optical density ที่ 595 nm.

น้ำยาที่ใช้ :

1. Color Reagent 300 ml เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C มีอายุประมาณ 1 ปีหรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องมีอายุประมาณ 3 เดือน
2. Acid buffer 200 ml เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง อยู่ได้ 1 ปี
3. Standard protein 10 mg% , 20 mg% , 30mg% , เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-8°C

วิธีทำ :

Tube No.	Test	Blank
1. Color Reagent	3ml	3ml
2. Acid Buffer	2ml	2ml
3. น้ำกลั่น	-	0.1 ml
4. สารตัวอย่างหรือสารมาตรฐาน	0.1ml	-

Mix และอ่าน optical density ที่ 595 nm ได้ทันทีโดยใช้ Blank เช็ทศูนย์

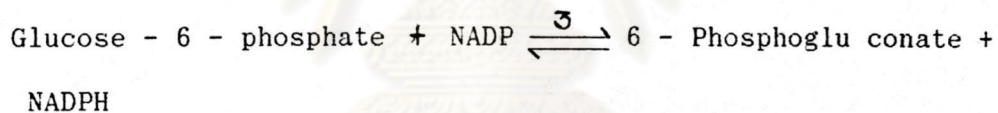
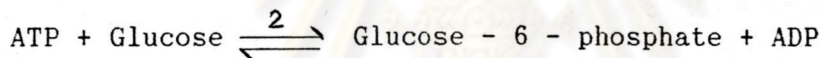
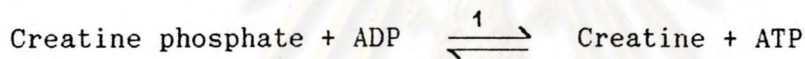
การวิเคราะห์เอนไซม์ในน้ำล้างถงลมและซีรัม

หลักการวิเคราะห์เอนไซม์ Amylase (Dyed substrate method)

Amylase จะย่อย Substrate ที่เป็นสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง Substrate กับ dye ซึ่งจับยึดกันด้วยพันธะ Covalent (เช่น Dyed - Amylopection, Dyed Starch , Dyed Amylose) จะเกิดเป็น Saccharide ที่จะละลายน้ำได้ ซึ่งเป็น Product ที่มีสีน้ำเงินและสามารถวัดค่าได้ จากการอ่านค่า optical density ที่ 642 nm และ ความเข้มข้นของสี จะเป็นปฏิกิริยาโดยตรงกับ activity ของ Amylase

หลักการวิเคราะห์เอนไซม์ Creatine kinase (optimized UV method)

ปฏิกิริยามีดังนี้ :



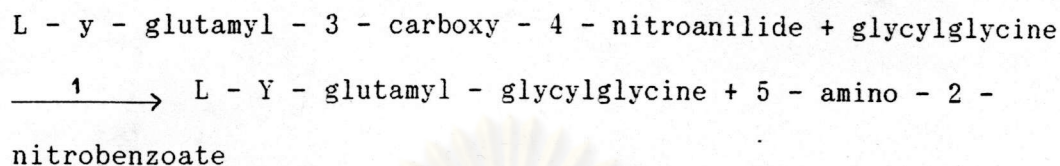
(1= CK , 2=HK , 3= G-6-PDH )

ปฏิกิริยาการวัด Activity ของ Creatine kinase เป็นการหา Activity จากปฏิกิริยาแบบทวนกลับ ( Reverse reaction ) โดยวัดปริมาณของ NADPH ที่ 340 nm และปริมาณของ NADPH จะเป็นปฏิกิริยาโดยตรงกับ Activity ของ Creatine kinase

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หลักการวิเคราะห์เอนไซม์ Gamma glutamyltransferase.

ปฏิกิริยามีดังนี้ :

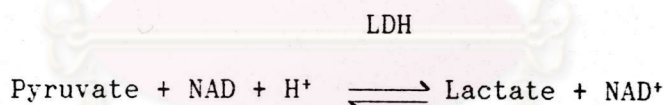


(1= GGT )

ในปฏิกิริยานี้จะใช้ L - Y - Glutamyl - 3 - Carboxy - 4 - nitroanilide และ Glycyglycine เป็น substrate และติดตามการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นนี้จาก product คือ 5 - amino 2 - nitrobenzoate ซึ่งสามารถอ่านค่า optical density ได้ที่ 410 nm.

หลักการวิเคราะห์เอนไซม์ Lactate dehydrogenase และ การแยกไอโซเอนไซม์

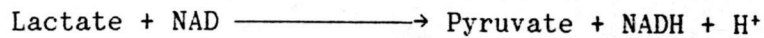
มีปฏิกิริยาดังนี้ :



หลักการวัด Activity ของเอนไซม์ จะใช้วิธีวัดที่รังสี Ultraviolet โดยใช้คุณสมบัติของ NADH ที่ถูกใช้ไปในปฏิกิริยา ซึ่งจะเป็นปฏิกิริยาโดยตรงกับ Activity ของเอนไซม์ Lactate dehydrogenase (LDH)

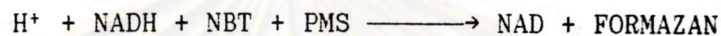
หลักการแยกไอโซเอนไซม์ของ LDH ด้วยวิธี electrophoresis โดยใช้ Cellulose acetate ที่ pH 8.8-9.0 แล้วทำให้เกิดสีด้วย activity staining โดยใช้ Substrate ซึ่งประกอบด้วย lactate , NAD , nitroblue tetrazolium (NBT) และ phenazine methosulfate (PMS) ซึ่ง LDH ไอโซเอนไซม์จะเร่งปฏิกิริยา

## LDH



pH 8.8-9.0

NADH ที่เกิดขึ้นจะถ่ายทอดอิเล็กตรอนไปให้ PMS ซึ่งจะรีดิวซ์ NBT ให้เป็น formazan ซึ่งมีสีม่วงและไม่ละลายน้ำ ทำให้เห็นแถบไอโซเอนไซม์ของ LDH



ความเข้มของแถบสีของไอโซเอนไซม์หาปริมาณได้โดยใช้ Densitometer

การวิเคราะห์สารชีวเคมีชนิดอื่นในน้ำล้างถุงลมและซีรัม

การวิเคราะห์ Glucose

วิธีที่ใช้ : Enzymatic method

หลักการ : Glucose ในสารตัวอย่าง จะถูก oxidize โดยเอนไซม์ glucose oxidase ให้เป็น Gluconate และ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> เอนไซม์ peroxidase จะใช้ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ไป oxidize phenol และ 4 Aminoantipyrene ให้ quinonemine ซึ่งมีสีแดงที่สามารถอ่านค่า optical density ที่ 505 nm.

น้ำยาที่ใช้ :

1. Enzyme Mixture เป็น Lyophilized powder ประกอบด้วย glucose oxidase , Alpha - glucomutarotose, Peroxidase , 4 - Aminoantipyrene

2. Buffer ประกอบด้วย phosphate และ phenol เก็บ Reagent ทั้งสองชนิดไว้ในอุณหภูมิ 2-8° c

3. Standard Glucose 100 mg%, 200 mg%, 300 mg% เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-8° c

วิธีเตรียมน้ำยา :

เทผง Buffer ลงในน้ำกลั่น 500 ml แล้วละลาย enzyme mixture ด้วย buffer แล้วเทกลับลงในขวด Buffer ทำซ้ำอีกสองครั้ง เพื่อให้เอนไซม์ลงไปในขวด Buffer ทั้งหมด เก็บน้ำยาที่เตรียมไว้ที่อุณหภูมิ 2-8°C มีอายุการใช้งานไม่ต่ำกว่า 1 เดือน

วิธีทำ :

Tube No.	Test	Blank
1. Working reagent	3.0 ml	3.0 ml
2. สารตัวอย่างหรือสารมาตรฐาน	-	0.02 ml

Mix , incubate ที่ 37°C 10 นาที อ่าน OD ที่ 505 nm.

การวิเคราะห์ urea nitrogen

วิธีใช้ : Diacetyl monoxime method

หลักการ: เมื่อ Diacetyl monoxime ต้มในสารละลายที่เป็นกรด จะให้ Diacetyl ซึ่งจะรวมตัวกับ UREA ในสารตัวอย่างให้ Condensation product เป็น Diazine derivative ซึ่งมีสีเหลืองและ Diazine derivative นี้จะทำปฏิกิริยากับ thio semicarbazide ต่อไปให้ product สีส้มแดงที่สามารถอ่านค่า optical density ที่ 540 nm ได้

น้ำยาที่ใช้ :

1. Reagent (A) เป็น thiosemi carbazide ในสารละลาย  $H_2PO_4$  และ  $H_3PO_4$
2. Reagent (B) เป็นสารละลายของ Diacetyl Monoxime เก็บ Reagent (A) และ Reagent (B) ไว้ที่อุณหภูมิ 4-8°C จะอยู่ได้ไม่ต่ำกว่า 6 เดือน
3. Standard urea 20mg% , 40mg% , 60mg% เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-8°C

วิธีทำ :

Tube No.	Test	Blank
1. Reagent (A)	3.0 ml	3.0 ml
2. Reagent (B)	3.0 ml	3.0 ml
3. สารตัวอย่างหรือสารมาตรฐาน	0.02 ml	-

Mix และต้มในน้ำเดือด 10 นาที แล้วทำให้เย็นด้วยน้ำเย็น 5 นาที อ่าน OD ที่ 540 nm โดยใช้ Blank เป็นศูนย์ สีที่เกิดจากปฏิกิริยาจะอยู่ได้นาน 30 นาที

การวิเคราะห์ Sialic acid (N - acetylneuraminic acid)

วิธีที่ใช้ : Colorimetric method

หลักการ : Sialic acid ในสารตัวอย่างจะทำปฏิกิริยากับ 4- Dimethylamino - benzaldehyde ใน Ehrlich's reagent ให้สารที่มีสีน้ำตาลแดง ที่สามารถวัดค่า optical density ที่ 565 nm.

น้ำยาที่ใช้ :

1. 0.2 N Sulfuric acid
2. 10% Trichloroacetic acid
3. Ehrlich's reagent (modified)

(เตรียมจาก 5g 4-Dimethylamine - benzaldehyde in 6 NHCL 100ml

เก็บไว้ในขวดแก้วสีชา ที่อุณหภูมิ 2-8°C)

4. Standard N-acetylneuraminic acid 1  $\mu$ mol/ml , 2  $\mu$ mol/ml , 3  $\mu$ mol/ml



วิธีทำ :

	Test	Blank
สารตัวอย่างหรือสารมาตรฐาน	0.5ml	-
0.2 N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5ml	0.5ml
Incubate 80° c นาน 1 ชั่วโมง แล้วทิ้งไว้ให้เย็น		
10 % TCA	1 ml	1 ml
Centrifuge 10 นาที (เฉพาะ serum จะมีตะกอน)		
Supernate	1 ml	1 ml
น้ำกลั่น	1 ml	1 ml
Ehrlich's reagent	1 ml	1 ml

Mix และ Incubate 100°c นาน 30 นาที และอ่าน OD ที่ 565 nm.

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## การวิเคราะห์ CEA ในน้ำล้างถุงลมและซีรัม

### หลักการวิเคราะห์ CEA

ใช้หลักการของ Double antibody sandwich method กล่าวคือ เป็นวิธีการตรวจหา antigen โดยการเคลือบพื้นผิวของ Solid phase ด้วย monoclonal anti - CEA antibody จากนั้นจึงเติมสารตัวอย่างที่ต้องการตรวจหา antigen ลงไปทำปฏิกิริยา แล้งจึงเติม monoclonal anti - CEA antibody ที่ติดสลากรด้วยสารกัมมันตรังสี คือ ไอโอดีน - 125 ลงไปทำปฏิกิริยาอีกชั้นหนึ่ง การหาปริมาณของ CEA ทำได้โดยการนับปริมาณรังสี Gamma ด้วยเครื่อง Gamma Counter ปริมาณของรังสีที่นับได้จะเป็นปริมาณโดยตรงกับปริมาณของ CEA ในสารตัวอย่าง และ อ่านค่าได้จาก standard curve

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## ประวัติผู้เขียน

นางสาวสุภาวดี คนชม เกิดวันที่ 7 พฤษภาคม พ.ศ.2509 จังหวัด กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี ได้รับปริญญาการศึกษาบัณฑิต สาขา วิทยาศาสตร์ - ชีววิทยา จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ วิทยาเขตประสานมิตร เมื่อปี พ.ศ.2531 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์- การแพทย์ ที่จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี พ.ศ.2532



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย