

ขาดหน้า 108

การศึกษาทางภูมิคุ้มกันวิทยาของน้ำใน เยื่อหุ้มช่องปอดในผู้ป่วยโรคช่องปอด



นาย วัฒนะ พันธุ์ม่วง

วิทยานิพนธ์ นี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาคตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์

บัณฑิตวิทยาลัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2530

ISBN 974-568-108-3

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

014289

i 10299858

IMMUNOLOGIC STUDY OF PLEURAL FLUID IN PATIENTS
WITH
TUBERCULOUS EFFUSION

Mr. Wattana Panmoung

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science
Inter-Department of Medical Microbiology
Graduate School
Chulalongkorn University

1987

ISBN 974-568-108-3



Thesis Titel Immunologic study of pleural fluid in patients with tuberculous effusion.

By Mr. Wattana Panmoung

Inter-Department Medical microbiology

Thesis Advisor Associate Professor Praphan Phanuphak, M.D., Ph.D.

Thesis Co-advisor Assistant Professor Visith Udompanich, M.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in partial Fulfillment of the Requirements for Master 's Degree.

[Signature] *Vajrabhaya* Dean of the Graduate School
 (Professor Thavorn Vajrabhaya, B.S., Ph.D.)

Thesis Committee

..... *Dilok Yenbutra* Chairman
 (Associate Professor Dilok Yenbutra, M.D.)

..... *Praphan Phanuphak, M.D.* Thesis Advisor
 (Associate Professor Praphan Phanuphak, M.D., Ph.D.)

..... *Visith Udompanich* Thesis Co-advisor
 (Assistant Professor Visith Udompanich, M.D.)

..... *Reutai Sakulramrungs* Member
 (Assistant Professor Reutai Sakulramrungs, M.D., Ph.D.)

..... *[Signature]* Member
 (Henry Wilde, M.D., FACP.)

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาทางภูมิคุ้มกันวิทยาของน้ำในเยื่อหุ้มช่องปอดในผู้ป่วยวัณโรคช่องปอด
ชื่อนิติกร	นาย วัฒนะ พันธุ์วงศ์
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ ประพันธ์ ภานุภาค
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ วิศิษฐ์ อุดมพานิช
สหสาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางการแพทย์
ปีการศึกษา	2529



บทคัดย่อ

ได้ศึกษาเพื่อจำแนกชนิดของ lymphocyte และ lymphocyte subpopulations ในน้ำช่องปอดและในกระแสโลหิตของผู้ป่วยวัณโรคช่องปอด 10 ราย เปรียบเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยที่มีน้ำในช่องปอดจากสาเหตุอื่น เช่น มะเร็งในช่องปอด ฯลฯ 15 ราย ควบคู่กับการดูการทำงานของ เซลล์เหล่านี้ว่าสามารถตอบสนองต่อการถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่จำเพาะของเชื้อวัณโรค เช่น Purified protein derivative (PPD) โดยวิธี lymphocyte transformation และ leukocyte migration inhibition (LIF) ได้ดีเพียงไร? ผลการศึกษาพบว่า mononuclear cell ส่วนใหญ่ในน้ำช่องปอดของผู้ป่วยวัณโรคช่องปอด และของผู้ป่วยมะเร็งในช่องปอด ส่วนใหญ่เป็น T-lymphocyte โดยเฉพาะอย่างยิ่งเป็น T-helper cell จำนวนเปอร์เซ็นต์ของ T-helper cell ในน้ำช่องปอดของผู้ป่วยทั้งสองกลุ่มสูงกว่าในกระแสโลหิตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) ในขณะที่จำนวนเปอร์เซ็นต์ของ T-suppressor cell ในน้ำช่องปอดต่ำกว่าในกระแสโลหิต ($P < 0.005$) ส่งผลให้อัตราส่วนของ T-helper/T-suppressor ของน้ำในช่องปอดของผู้ป่วยทั้งสองกลุ่มสูงกว่าในเลือด ($P < 0.001$) การนับจำนวน T-cell และ T-cell subsets ของน้ำในช่องปอดไม่สามารถจำแนกวัณโรคช่องปอดออกจากสาเหตุอื่นที่มีน้ำในช่องปอดซึ่งมี mononuclear cell เป็นส่วนใหญ่

ส่วนผลการศึกษากิจการงานในหลอดทดลองโดยวิธี lymphocyte transformation test เมื่อกระตุ้นด้วย PPD ของ lymphocyte ในน้ำช่องปอดจากผู้ป่วยวัณโรคพบว่าสูงกว่าผู้ป่วยมะเร็ง ($P < 0.025$) และยิ่งสูงกว่าในกระแสโลหิตของตนเอง ($P < 0.025$) ในทำนองเดียวกับ LIF test ของ lymphocyte ในน้ำช่องปอดและในเลือดจะตอบสนองต่อ PPD สูงกว่ากลุ่มมะเร็งในช่องปอด ผลการทดลองทางภูมิคุ้มกันในหลอดทดลองของ lymphocyte ในน้ำช่องปอดที่มีสาเหตุจากวัณโรคโดยใช้ PPD เป็นแอนติเจน ให้ความสัมพันธ์สูงกับกฎเกณฑ์การวินิจฉัยวัณโรคช่องปอด ด้วยวิธีเพาะเชื้อวัณโรค, พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ และการตอบสนองต่อยาวัณโรค ($P < 0.005$) อย่างไรก็ตามความสัมพันธ์ระหว่าง tuberculin skin test กับการตอบสนองต่อ PPD ในหลอดทดลอง พบว่ามีความสัมพันธ์เฉพาะกับ lymphocyte transformation test ในเลือดเท่านั้น ($r = 0.6$)

การตรวจพบ Free LIF like activity ในน้ำช่องปอดทั้งจากผู้ป่วย
วัณโรคและมะเร็ง แสดงให้เห็นว่ามี lymphocyte ที่จำเพาะต่อแอนติเจนในน้ำช่องปอด
ซึ่งถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนของวัณโรคหรือของมะเร็งเองภายในช่องปอดอยู่แล้ว จึงไม่
สามารถใช้ Free LIF like activity ในน้ำช่องปอดในการช่วยแยกน้ำช่องปอด
ที่มีสาเหตุจากวัณโรคออกจากมะเร็งได้.

Thesis Title Immunologic study of pleural fluid in
 patients with tuberculous effusion.

Name Mr. Wattana Panmoung

Thesis Advisor Associate Professor Praphan Phanuphak,
 M.D.,Ph.D.

Thesis Co-advisor Assistant Professor Visith Udompanich, M.D.

Academic Year 1986



ABSTRACT

Pleural fluid mononuclear cells (PFMC) and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from 10 patients with tuberculous effusion were analysed quantitatively for T-lymphocyte and T-lymphocyte subsets as well as functionally for purified protein derivative (PPD)-induced lymphocyte transformation and inhibition of leukocyte migration. The results were compared with the PFMC and PBMC obtained from 15 patients with carcinomatous effusion. It was found that the majority of the leukocytes in the tuberculous and malignant pleural effusions were T-cells and T helper/inducer cells but quantitative analyses of T cells and T cell subsets in PFMC could not differentiate tuberculous from malignant effusions. And, when compared to the peripheral blood, the T helper/suppressor ratios in PFMC of both tuberculous and nontuberculous effusions were significantly higher than PBMC ($p < 0.001$) due to the increase of helper and decrease of the suppressor T cells ($p < 0.001$ and < 0.005

respectively). A positive specific (PPD-stimulated) lymphocyte transformation test was found only in the tuberculous group whether PBMC or malignant PFMC were used. Similarly, PPD-stimulated inhibition of leukocyte migration was also found only in the PFMC and PBMC of tuberculous patients. Such a good correlation indicates that both the PPD-stimulated lymphocyte transformation test and the PPD-stimulated leukocyte migration inhibition test (LIF) may add to the diagnostic value of the conventional bacteriological, pathological and clinical diagnosis of tuberculous effusion ($p < 0.005$). A positive tuberculin test alone could not be used to differentiate tuberculous from nontuberculous pleural effusions. It was found to statistically correlate well with PPD-stimulated proliferative response of PBMC ($r = 0.6$). Free leukocyte migration inhibition-like factor (LIF) could be demonstrated in the pleural fluids of both tuberculous and malignant pleural effusions which might reflect the in situ interactions between the tuberculous and carcinomatous antigens with the specifically sensitized lymphocytes present in the diseased pleural tissues. Therefore, although it is simpler, free LIF-like activity in pleural effusion cannot be used to differentiate tuberculous from malignant pleural effusions.



ACKNOWLEDGEMENTS

This thesis is a part of research works from Cellular Immunology laboratory, Immunology unit, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University.

I am deeply grateful to Assoc. Prof. Dr. Praphan Phanuphak for his advice, discuss, correct english language and scientific writing style, and give the motivative force throughout this thesis. I am indepted the following persons which whom help this thesis successful.

Ass. Prof. Dr. Visith Udompanich for support the clinical specimens and discuss the clinical data.

The director of Central Chest Hospital, National Cancer Institute and Central Chest Clinic; Ministry of Public Health for allow me to collected the samples from their hospitals.

Dr. Henry Wilde for correct english language and devote to be a member for thesis oral examination.

Mr. Preecha Pathan, the nurses from Chest Clinic ; Chulalongkorn Hospital and from Cental Chest Clinic for take care of pleural fluid from patients.

Mrs. Thasanee Sukosol, Mrs. Suranan Trirawatnpong, Mrs. Pakathip Raynold and Ms. Jitra Ratanawongsiri for their kindly suggest the LIF technique.

My friends, Mr. Winyoo Wongpratum, Mr. Varanchai Chutiwanawong and the older brother, Mr. Niphon Udomsantisuk for their introduce the positive thinking and mind power.

Mrs. Wanida Wongpratum and Ms. Sunee Sirivichayakul for their organize our Cellular Immunology laboratory when I 'm busy or stay abroad.

Furthermore, I thank Prof. Dr. Visith Sitprija; Associate Dean; and Prof. Dr. Yachai Na Songkla ; the former Dean, Fac. of Medicine, Chulalongkorn University, for their support a lot of things for Cellular Immunology Laboratory.

Finally, this work is supported by Rachadapiseksompoch, China Medical Board Foundation.



CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT	ii
ENGLISH ABSTRACT.....	iv
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	viii
LIST OF TABLES.....	ix
LIST OF FIGURES.....	x
ABBREVIATIONS.....	xii
CHAPTER I INTRODUCTION.....	1
CHAPTER II MATERIALS AND METHODS.....	33
CHAPTER III RESULTS.....	62
CHAPTER IV DISCUSSION.....	107
REFERENCES.....	117
APPENDIX I.....	130
APPENDIX II.....	135
CIRRICULUM VITAE.....	147

LIST OF TABLES

Table	Page
1.....	16
2.....	63
3.....	64
4.....	66
5.....	67
6.....	69
7.....	87
8.....	97
9.....	98
10.....	105



LIST OF FIGURES

Figure	page
1.....	37
2.....	38
3.....	45
4.....	46
5.....	46
6.....	47
7.....	56
8.....	57
9.....	61
10.....	70
11.....	71
12.....	72
13.....	73
14.....	75
15.....	76
16.....	77
17.....	78
18.....	79
19.....	80
20.....	82
21.....	83
22.....	84

Figure	Page
23.....	86
24.....	88
25.....	89
26.....	90
27.....	91
28.....	93
29.....	94
30.....	95
31.....	99
32.....	100
33.....	102
34.....	103
35.....	104
36.....	112



ABBREVIATIONS

AFB	=	Acid fast bacilli
B-cells	=	Bursa-derived lymphocytes
β -ray	=	Beta ray
cpm.	=	count per minute
Δ cpm.	=	cpm. of stimulated culture - cpm. of unstimulated culture
CO ₂	=	Carbondioxide gas
Con A	=	concanavalin A
C	=	degree celcius
DW.	=	distillated water
E-RFC	=	E-rosette forming cells
G	=	relative gravitational force
gm.	=	gram
gm%	=	gram per 100 milliliter
hr(s).	=	hour(s)
HEPES	=	(N-2-hydroxythypipenazine-N-2-ethanesulfonic acid)
human AB serum	=	serum from human blood group AB
HBSS	=	Hank 's balance salt solution
IU./ml.	=	International unit per milliliter
Ig G,A,M	=	Immunoglobulin class G, A or M
Ia	=	Immune associated antigen
LIF	=	leukocyte migration inhibitory factor
LAF	=	lymphocyte activating factor

MAF	=	macrophage activating factor factor
MIF	=	macrophage migration inhibitory factor
ml.	=	milliliter
mm.	=	millimeter
mg.	=	milligram
min(s)	=	minute(s)
mg.	=	milligraam
M.I.	=	Migration Index
MNC	=	mononuclear cells
NSE	=	nonspecific esterase staining
Non-TB	=	non-tuberculous group
NSS	=	normal saline solution
N	=	number of samples
OKT4 or OKT8	=	Ortho Kung T-cell surface antigen type 4 or type 8
OT	=	old tuberculin
PPD	=	purified protein derivative
PFMC	=	pleural fluid mononuclear cells
PBMC	=	peripheral blood mononuclear cells
PHA	=	phytohemagglutinin
PMN	=	polymorphonuclear cells
PBS	=	phosphate buffer saline
RPMI 1640	=	Rosewell Park Memorial Institute formular 1640
rpm.	=	round per minute
r	=	regression coefficient

S.I.	=	Stimulation Index
SD	=	standard deviation
SRBC	=	sheep red blood cell
T-cell	=	Thymus derived lymphocytes
TCM	=	tissue culture medium
TC 199	=	tissue culture formular 199
TB	=	tuberculosis
UCi	=	microcurei
Ug.	=	microgram
Ul.	=	microliter
WBC	=	white blood cell count