การคัดเลือกคิลเลอร์เซลล์ที่ถูกชักนำด้วยไซโตไคน์ต่อภาวะตับอักเสบที่ถูกทำลายโดยระบบภูมิคุ้มกันตัวเองในหนูเมาส์

SELECTION OF CYTOKINE - INDUCED KILLER CELLS ON AUTOIMMUNE HEPATITIS IN MOUSE

วรากร ศรีสันติสุข[1], จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า[1] และ กิติพงศ์ สุนทราภา[2]

[1] ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, chanpen@sc.chula.ac.th

[2] ภาควิชาเภสัชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล, kitipong.soo@mahidol.ac.th

---

บทคัดย่อ

โรคตับอักเสบที่ถูกทำลายโดยระบบภูมิคุ้มกันตัวเองมีสาเหตุเกิดจากภูมิต้านทานทำลายเซลล์ตับโดยตรง ปัจจุบันกลไกการเกิดโรคยังไม่ทราบแน่ชัด อาการของผู้ป่วยโรคตับอักเสบมักจะนำไปสู่โรคตับแข็งและมะเร็งตับ การรักษาโรคนี้ทำโดยการใช้ยากดภูมิคุ้มกันและปลูกถ่ายตับซึ่งจะทำให้เกิดผลข้างเคียง ค่ารักษาโรคสูง และยังมีแนวโน้มที่จะสามารถกลับมาเป็นโรคได้อีก ดังนั้นการรักษาทางเลือกโดยวิธีภูมิคุ้มกันบำบัดจึงถูกนำมาใช้โดยให้เซลล์เข้าสู่ผู้ป่วย การศึกษาที่ผ่านมาแสดงถึงคิลเลอร์เซลล์ที่ถูกชักนำด้วยไซโตไคน์ หรือ เซลล์ทีที่มีคุณสมบัติของเซลล์เพชรฆาตซึ่งมีศักยภาพในการรักษาโรคเกี่ยวกับตับหลายชนิด งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลในเชิงป้องกันของคิลเลอร์เซลล์ที่ถูกชักนำด้วยไซโตไคน์ในหนูเมาส์ โดยเลี้ยงคิลเลอร์เซลล์จากต่อมไทมัสและม้าม ด้วยโพรโทคอลเลี้ยง เติมไซโตไคน์ IFN-g, anti CD-3 ในวันแรกของการเลี้ยงเซลล์ และเติม IL-2 ทุก 2 หรือ 3 วัน จากนั้นนำคิลเลอร์เซลล์ที่ถูกชักนำด้วยไซโตไคน์มาตรวจสอบด้วยเครื่องวิเคราะห์เซลล์อัตโนมัติ พบว่าคิลเลอร์เซลล์ที่ถูกชักนำด้วยไซโตไคน์จากต่อมไทมัสหลังการเลี้ยงมีประสิทธิภาพเพียงพอที่จะนำมาใช้ฉีดเพื่อดูผลต่อภาวะตับอักเสบในหนูเมาส์

คำสำคัญ: โรคตับอักเสบที่ถูกทำลายโดยระบบภูมิคุ้มกันตัวเอง, คิลเลอร์เซลล์ที่ถูกชักนำด้วยไซโตไคน์, ต่อมไทมัส

ABSTRACT

Autoimmune hepatitis (AIH) is a chronic inflammatory disease of liver that the pathogenic mechanisms of AIH have not yet been clarified. All patients with AIH lead to cirrhosis and liver cancer. Presently the best feasible medicines of AIH need aid immunosuppressive medications and liver transplantation which have many side effects, high cost and sustained remission. Thus, immunotherapy is an alternative therapy in which cellular material is injected into a patient. Many previous studies showed cytokine induced killer (CIK) cells, T lymphocytes that have a phenotype of NK cells, have a potential to against several diseases associated with liver. The current research aims to examine protective effects of CIK cells on AIH in mice. CIK cells cultured from thymus and spleen were then used to develope a protocol for generating CIK cells by adding interferon gamma (IFN-g), monoclonal antibody (mAb) against CD3 on day 0 and interleukin-2 (IL-2) every 2 or 3 day then flow cytometry were used to analyze CIK cells. The result suggest that cell from thymus were suitable for this study.

Keywords: Autoimmune Hepatitis, Cytokine - induced killer cells, Thymus

1. บทนำ

โรคตับอักเสบที่ถูกทำลายโดยระบบภูมิคุ้มกันตัวเอง (autoimmune hepatitis: AIH) เป็นโรคตับอักเสบซึ่งเกิดจากระบบภูมิคุ้มกันของตัวเองทำลายเซลล์ตับ โดยการตอบสนองของภูมิต้านทานจะทำให้เกิดการอักเสบที่ตับ ทั้งนี้ไม่ทราบสาเหตุแน่ชัดว่าเกิดขึ้นจากอะไร (Czaja etal., 2016) แต่จากงานวิจัยก่อนหน้านี้เชื่อว่ามีปัจจัยทางด้านพันธุกรรมเข้ามาเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคดังกล่าว ลักษณะของการเกิดโรคคือการเหนี่ยวนำให้เม็ดเลือดขาวชนิด T-cell ของระบบภูมิคุ้มกันภายในร่างกายไปกำจัดเซลล์ตับนำไปสู่กระบวนการอักเสบในตับต่อไป (Vergani et al., 2002; Czaja et al., 2007) โดยกลไกการเกิดโรคจากการศึกษาก่อนหน้านี้จากการกระตุ้นหนูให้เกิดการทำลายเซลล์ตับของตัวเองด้วย Concanavalin A (con A) สารดังกล่าวจะไปกระตุ้นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันบริเวณต่าง ๆ ในร่างกาย และจะส่งสัญญาณการอักเสบ (inflammatory signaling) ไปยัง Kupffer cells ภายในตับโดยจะไปกระตุ้นให้เม็ดเลือดขาวที่ปกติให้เกิดการปลดปล่อยไซโตไคน์ชนิดต่าง ๆ เช่น Tumor necrotic factor (TNF) - a, Interferon (IFN) - g ซึ่งส่งผลให้เกิดการเพิ่มขึ้นของระดับ chemokines, adhesion molecules, tissue factor, endothelin-1 และ inducible nitric oxide synthase (iNOS) นำมาสู่การทำลายเซลล์ตับก่อให้เกิดโรคตับอักเสบในที่สุด (Fujita et al., 2015)

อาการของโรค AIH ที่เห็นได้ชัดเจนที่สุดคือเหนื่อยล้า และอาจมีอาการอย่างอื่น ๆ เกิดร่วมขึ้นได้ เช่น ตับโต , ตัวเหลืองตาเหลือง, คัน, ผื่นตามผิวหนัง, ปวดตามข้อ, มีเส้นฝอยปรากฏตามผิวหนัง ลักษณะเหมือนตาข่ายใยแมงมุมบนผิวหนัง, คลื่นไส้, อาเจียน, เบื่ออาหาร, ปัสสาวะดำ และอุจจาระซีด เป็นสีเทา (Czaja et al., 2005; Kogan et al., 2002; Feld et al., 2005; Kessler et al., 2004) ในผู้ป่วยที่มีอาการหนักแล้ว อาการที่เกิดมักจะเป็นอาการของโรคตับเรื้อรัง โดยจะมีอาการ มีน้ำในช่องท้อง (ascites) มีความรู้สึกนึกคิดสับสน หากเกิดในสตรีเพศ จะไม่มีประจำเดือนเหมือนคนปกติ อาการของคนเป็น AIH จะมีตั้งแต่ลักษณะอาการไม่มากจนกระทั่งถึงรุนแรง และ กว่า 70% เกิดขึ้นในเพศหญิง (Manns etal., 2010) จากการศึกษาพบว่ากว่า 40 % ของผู้ป่วยเป็นโรคที่ไม่ได้รับการรักษาจะเสียชีวิตภายใน 6 เดือน และบ่อยครั้งที่พบว่าผู้ป่วยที่รับการรักษาทันก็จะมีการพัฒนาของโรคไปเป็นโรคตับแข็ง (cirrhosis) หรือพบเลือดออกภายในตับ (hemorrhage) (Mistilis et al., 1968; Soloway et al., 1972) ปัจจุบันการรักษาโรค AIH นั้นเป็นเพียงการชะลอการเกิดโรคหรือป้องกันไม่ให้เกิดการดำเนินไปของโรคจนเป็นโรคตับแข็งและมะเร็งตับ ทำโดยการให้ยาจำพวก คอร์ติโคสเตียรอยด์ ซึ่งออกฤทธิ์ต้านภูมิแพ้ (prednisone) ทำให้บรรเทาอาการในระดับหนึ่งได้ ทั้งนี้กว่า 90 % ของผู้ป่วยที่รักษาด้วย prednisone จะต้องใช้ควบคู่ไปกับยากดภูมิคุ้มกัน (azathioprine, mycophenilate, mofetil หรือ methotrexate) เพื่อที่จะบรรเทาอาการหลังจากการให้สารจำพวก สเตียรอยด์ อย่างไรก็ตามการรักษาด้วย prednisone ในระยะสั้นและระยะยาวมักก่อให้เกิดผลข้างเคียงจากยาได้ เช่น หน้าวงพระจันทร์หรือหน้าสเตียรอยด์, สิว, หลังคอมีไขมันสะสม และเบาหวาน เป็นต้น หรืออาจมีอาการอักเสบเกิดขึ้นเป็นครั้งคราวได้ อย่างไรก็ตามมีการศึกษาและพัฒนายาในกลุ่มเดียวกันคือ budesonide ที่มีผลต่อการอักเสบภายในตับโดยตรงและมีฤทธิ์ข้างเคียงต่ออวัยวะอื่น ๆ น้อยลง ทั้งนี้การศึกษาดังกล่าวก็ยังไม่สามารถที่จะประเมินผลในระยะยาวได้และยังไม่มีการรักษาทางเลือกวิธีใดที่มีประสิทธิภาพในการรักษาโรคนี้ให้หายขาด (Ichai etal., 2007; Manns et al., 2010; Seto, 2015)

คิลเลอร์เซลล์ที่ถูกชักนำด้วยไซโตไคน์ (cytokine – induced killer cell: CIK) คือ เม็ดเลือดขาวชนิด T-cell ที่ผ่านการกระตุ้นด้วย anti - CD3 monoclonal antibody, interleukin (IL)-2, IL-1 และ interferon gamma (IFN-g) โดยการออกฤทธิ์การทำลายของ CIK ไม่ขึ้นสารไกลโคโปรตีนบนผิวเซลล์เป้าหมาย (major histocompatibility complex หรือ MHC) โมเลกุล MHC ในมนุษย์จะเรียกว่า human leukocyte antigen (HLA) (Schmidt-Wolf et al., 1991;

Verneris et al., 2004) จากการศึกษาโรคตับอักเสบโดยใช้เซลล์ CIK นักวิทยาศาสตร์พบว่าเซลล์ CIK ออกฤทธิ์โดยไปยับยั้งการเพิ่มจำนวนไวรัสในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบแบบเรื้อรังได้ดี (Sun et al., 2006) ทั้งในหลอดทดลอง *(in vitro)* และในสัตว์ทดลอง *(in vivo)* เนื่องจากเซลล์ CIK สามารถทำลายเซลล์ผิดปกติหรือมะเร็งโดยไม่ขึ้นกับ MHC (กวิญ ลีละวัฒน์ และคณะ, 2555) จากการศึกษาพบว่าเซลล์ CIK มีการแสดงออกของ CD4 (โมเลกุลโปรตีนบนผิวของ helper T cell หรือ T_H) และ CD8 (โมเลกุลโปรตีนบนผิวของ cytotoxic T cell หรือ T_C) นอกจากนั้นส่วนใหญ่ของเซลล์ CIK จะมีการแสดงออกของ CD3 (โมเลกุลโปรตีนบนผิวของ T cell โดยทั่วไป) และ CD56 (โมเลกุลโปรตีนบนผิวของ natural killer cell หรือ NK) บนผิวเซลล์ นั่นหมายถึงมีการแสดงออกลักษณะทั้ง T-cell และ natural killer (NK) cell ในเซลล์เดียวกัน จากการศึกษาพบว่า เซลล์ CIK ที่ได้จากผู้ป่วยเอง (autologous CIK) มี ความสามารถในการทำลายและยับยั้งการแบ่งตัวของเชื้อไวรัสตับอักเสบในผู้ป่วยมะเร็งตับ (Shi et al., 2009) นอกจากนี้ยังพบว่าในกลุ่มผู้ป่วยบางรายที่ได้รับการรักษาด้วยการใช้เซลล์ CIK ร่วมกับเดนดริติคเซลล์ (dendritic cell) สามารถลดปริมาณสารพันธุกรรมของไวรัส นำมาสู่ความสามารถในการยับยั้งไวรัสของเซลล์ดังกล่าว ในส่วนของโรค AIH ยังไม่มีการศึกษาวิจัยโดยใช้เซลล์ ทั้งนี้โรค AIHเป็นโรคที่เกิดจากเม็ดเลือดขาวของตัวเองซึ่งเป็นเซลล์ปกติ เซลล์ CIK น่าจะไม่สามารถทำลาย และอาจจะเป็นการทำลายเซลล์ตับเพิ่มอีกด้วย จากไซโตไคน์ที่ปล่อยออกมาล้วนมีผลต่อการทำลายเซลล์โดยตรง เช่น IFN-g, Granzyme B และ Perforin จึงเป็นที่น่าสงสัยว่าเซลล์ CIK จะมีบทบาทอย่างไรต่อโรค และหากมีผลช่วยให้พยาธิสภาพของโรคดีขึ้นจะมีกลไกอย่างไรซึ่งเป็นสิ่งที่ต้องค้นหาคำตอบต่อไป

อย่างไรก็ตามการศึกษาเซลล์ CIK ในผู้ป่วย AIH ยังมีน้อยมากทั้งในระดับสัตว์ทดลอง และทางคลินิก ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาและตรวจสอบผลของเซลล์ CIK ต่อโรคตับอักเสบ

2. วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อคัดเลือกเซลล์ที่จะนำศึกษาผลในเชิงป้องกันของคิลเลอร์เซลล์ที่ถูกชักนำด้วยไซโตไคน์ในหนูเมาส์

3. การดำเนินการวิจัย

3.1 สอบสวนเอกสารและขออนุญาตใช้สัตว์ทดลอง

ได้รับการอนุมติจากคณะกรรมการจรรยาบรรณการเลี้ยง การใช้และการผลิตสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อวันที่ 27 ตุลาคม 2559 เลขที่โครงการ 1673020

3.2 สัตว์ทดลอง

ใช้หนูเมาส์ C57BL/6Mlac อายุ 6 ถึง 8 สัปดาห์ น้ำหนักตัว 20 - 25 กรัม จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ทำการเลี้ยงภายใต้ระบบที่ปลอดเชื้อและวงจรการให้แสงสลับแบบ 12 ชั่วโมงสว่างกับ 12 ชั่วโมงมืด (8.00 – 19.00 น.) อุณหภูมิ 22±1 °C ความชื้น 30 – 70 % โดยได้รับน้ำและอาหารอย่างอิสระ (Ad Libitum) จากนั้นทำการแบ่งกลุ่ม (กลุ่มละ 6 ตัว) ดังนี้ 1. กลุ่ม donor 2. กลุ่มที่ได้รับสารและเซลล์ CIK (recipients) เป็นกลุ่มที่ได้รับ Con A และ เซลล์ CIK เพื่อดูผลในเชิงป้องกัน

3.3 การเตรียมและวิเคราะห์เซลล์ CIK จากหนูที่เป็น donor

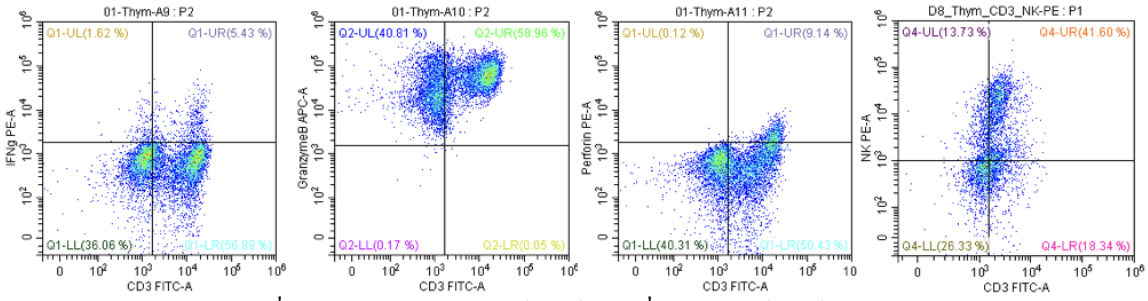
ทำการการุณยฆาตและผ่าตัดหนูแล้วนำต่อมไทมัส (thymus) และม้าม (spleen) ออกมาเพื่อทำการเก็บเม็ดเลือดขาวชนิด T-cell ทำการเลี้ยงเซลล์จนกระทั่งได้จำนวนเซลล์ในจานเลี้ยงจานละ 30 ล้านเซลล์ โดยเลี้ยงในอาหาร

เลี้ยงเซลล์ซึ่งประกอบด้วย 10 % fetal bovine serum (FBS), 100 U/mL penicillin, 100 U/mL streptomycin, 2,000 U/mL IFN-g โดยบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C ในบรรยากาศที่มี 5 % CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะเติม IL-2 และ antiCD3 antibody ที่ความเข้มข้น 1,000 U/mL และ 50 ng/mL ตามลำดับ โดยเติม IL-2 ทุก ๆ 2 ถึง 3 วัน เป็นเวลา 21 วันตามลำดับ ทำการตรวจสอบการเพิ่มของจำนวนเซลล์ CIK ลักษณะที่แสดงออก (phenotype) ของเซลล์ CIK คือ โมเลกุลโปรตีนบนผิวเซลล์ (cluster of differentiation หรือ CD) และเอนไซม์ภายในเซลล์ CIK คือ IFN-g, Ggranzyme B และ Perforin ในวันที่ 21 ก่อนนำมาทดลอง

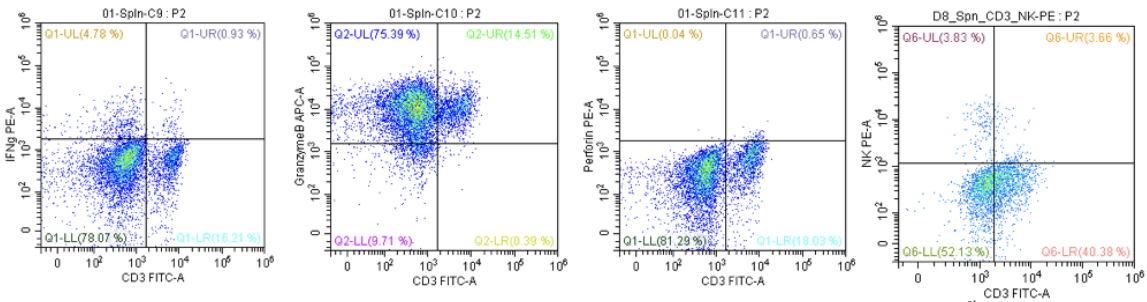
ทำการวิเคราะห์เซลล์โดย นำเซลล์ CIK ที่ได้จากการบ่มแล้วจะถูกย้อมด้วยแอนติบอดีติดสีเพื่อตรวจสอบโปรตีนบนผิวเซลล์คือ CD3 และ NK 1.1 เป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิ 4 °C จากนั้นชะล้างด้วย staining buffer 2 ครั้ง (250 µL ต่อ 1 microwell plate และ 1 mL ต่อ 1 หลอด) ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 500 xg และย้อมด้วย BD Perm/Wash™ buffer ที่มีแอนติบอดีติดสีอยู่เพื่อตรวจสอบไซโตไคน์ภายในเซลล์คือ IFN-g, Granzyme B และ Perforin เป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิ 4 °C ในที่มืด จากนั้นชะล้างด้วย 1x BD Perm/Wash™ buffer 2 ครั้ง (1 mL ต่อ 1 หลอด และ 250 µL ต่อ 1 microwell plate) นอกจากนี้นำเซลล์ไปบ่มด้วย PMA และ ionomycin เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อตรวจสอบค่าของไซโตไคน์เปรียบเทียบกับ โพรโทคอลดั้งเดิม สุดท้ายทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง flow cytometry

4. ผลการวิจัย

1. ผลการวิเคราะห์เซลล์ด้วยเครื่องวิเคราะห์เซลล์อัตโนมัติ (Flow cytometry) พบว่าหลังการเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ได้จากต่อมไทมัส ได้ผลดังนี้ NK1.1 41.60%, IFN-g 5.43%, Granzyme B 58.96% และ Perforin 9.14% ส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ได้จากม้ามได้ผลดังนี้ NK1.1 3.66%, IFN-g 0.93%, Granzyme B 14.51% และ Perforin 0.65%

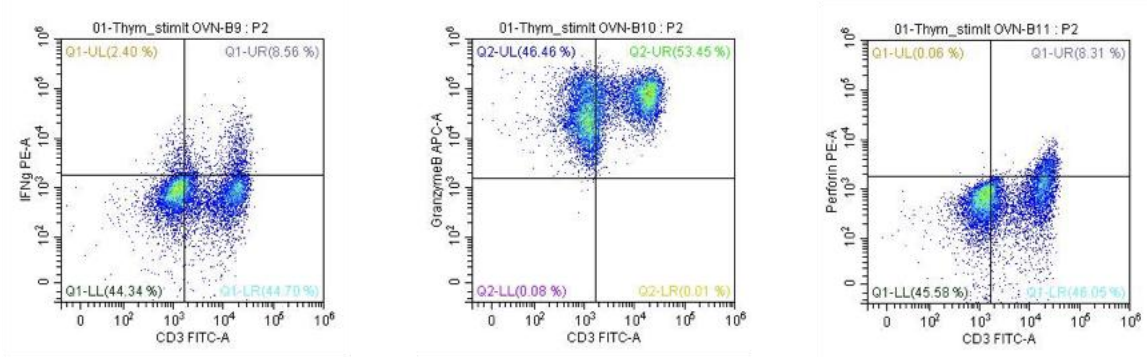


รูปที่ 1 แสดงผลการวิเคราะห์เซลล์ด้วยเครื่องวิเคราะห์เซลล์อัตโนมัติ ของต่อมไทมัส ด้วยโพรโทคอลเลี้ยงเซลล์ 21 วัน



รูปที่ 2 แสดงผลการวิเคราะห์เซลล์ด้วยเครื่องวิเคราะห์เซลล์อัตโนมัติ ของม้ามด้วยโพรโทคอลเลี้ยงเซลล์ 21 วัน

2. ผลการวิเคราะห์ค่าของไซโตไคน์ เปรียบเทียบระหว่างโพรโทคอลดั้งเดิมและโพรโทคอลที่บ่มด้วย PMA และ ionomycin เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าโพรโทคอลที่บ่มด้วย PMA และ ionomycin เป็นเวลา 24 ชั่วโมงได้ค่าต่างๆดังนี้ IFN-g 8.56%, Granzyme B 53.40% และ Perforin 8.31%



รูปที่ 3 แสดงผลการวิเคราะห์เซลล์ด้วยเครื่องวิเคราะห์เซลล์อัตโนมัติ ของม้ามด้วยโพรโทคอลที่บ่มด้วย PMA และ ionomycin เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5. การอภิปรายผล

จากผลการทดลองพบว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวที่นำมาจากต่อมไทมัสและม้าม เมื่อผ่านการเลี้ยงตามโพรโทคอลดั้งเดิมแล้วพบว่า คิลเลอร์เซลล์ที่ได้จากต่อมไทมัสเหมาะสมแก่การนำมาทดลองมากกว่าสอดคล้องกับการทดลองของ Sunita และคณะในปี 2016 (Sunita etal., 2016) ที่ใช้เซลล์เม็ดเลือดขาวจากต่อมไทมัส และจากการบ่มคิลเลอร์เซลล์ด้วย PMA และ ionomycin เป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนที่จะนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องวิเคราะห์เซลล์อัตโนมัติพบว่าค่าต่างๆของไซโตไคน์คือ IFN-g, Granzyme และ Perforin ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่จากผลการทดลองจะเห็นแนวโน้มของค่าของ IFN-g มีค่าสูงขึ้น

6. บทสรุปและข้อเสนอแนะ

จากผลการทดลองสรุปได้ว่า คิลเลอร์เซลล์จากต่อมไทมัส เหมาะสมต่อการนำไปทดลองผลของคิลเลอร์เซลล์ต่อภาวะตับอักเสบในหนูไมซ์มากกว่าคิลเลอร์เซลล์จากม้าม และ คิลเลอร์เซลล์ที่จะนำมาวิเคราะห์เซลล์ด้วยเครื่องวิเคราะห์เซลล์อัตโนมัติควรนำมาบ่มด้วย PMA และ ionomycin เป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนที่จะนำไปวิเคราะห์ เนื่องจากเห็นแนวโน้มของ IFN-g ทั้งนี้ผู้วิจัยมีข้อเสนอแนะว่าควรจะทำการทดลองแบบเดิมซ้ำเพื่อให้เห็นค่าของไซโตไคน์ที่ชัดเจนมากขึ้น

บทความนี้ใช้เป็นส่วนหนึ่งของการสำเร็จการศึกษาในระดับบัณฑิตศึกษา หลักสูตรสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยในครั้งนี้จะเกิดขึ้นไม่ได้หากไม่ได้รับการสนับสนุนจากคณะอาจารย์และทีมนักวิจัยจากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยและ ศิริราชพยาบาล

ขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า อาจารย์ที่ปรึกษาที่ให้คำแนะนำ และคำปรึกษาตลอดการทำงานวิจัย

ขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นายแพทย์ กิติพงศ์ สุนทราภา อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ให้คำแนะนำ และถ่ายทอดประสบการณ์งานทางด้านภูมิคุ้มกันวิทยา

ขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณัฐพจน์ วาฤทธิ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุกัญญา เจริญพร ที่ช่วยให้งานวิจัยผ่านไปได้อย่างดี

ขอบพระคุณ คุณพรรณวดี เปลื้องนุช และคุณพรพิมล เอกอุดมสุข ที่ช่วยเหลือในห้องปฏิบัติการและให้คำแนะนำต่างๆ

ขอบพระคุณ ทุน 72 พรรษา จากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่มอบทุนการศึกษาในระดับบัณฑิตศึกษา

เอกสารอ้างอิง

กวิญ ลีละวัฒน์, โอพาร เปี่ยมกุลวนิช, จีรศักดิ์ วรรณประเสริฐ, สุรเดช หงส์อิง และสุรางค์ ลีละวัฒน. (2555). การศึกษาผลของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ถูกกระตุ้นด้วยสารซัยโตคายด์ให้เป็นคิลเลอร์เซลล์ซีไอเค (CIK) เพื่อใช้รักษาร่วมกับการผ่าตัดในผู้ป่วยโรคมะเร็งทางเดินน้ำดี (Cholangiocarcinoma). *วารสารสำนักการแพทย์ทางเลือก,* 5(2), 38–56.

Czaja, A. J. (2005). Diverse manifestations and evolving treatments of autoimmune hepatitis. *Minerva Gastroenterol e Dietologlica, 51*(4), 313–333.

Czaja, A. J. (2007). Autoimmune hepatitis. Part A: Pathogenesis. *Expert Review of Gastroenterology and Hepatology, 1*(1), 113–128.

Czaja, A. J. (2016). Diagnosis and management of autoimmune hepatitis: Current status and future directions. *Gut and Liver, 10*(2), 177–203.

Feld, J. J., H. Dinh, T. Arenovich, V. A. Marcus, I. R. Wanless and E. J. Heathcote (2005). Autoimmune hepatitis: Effect of symptoms and cirrhosis on natural history and outcome. *Hepatology, 42*(1), 53–62.

Fujita, T., K. Soontrapa, Y. Ito, K. Iwaisako, C. S. Moniaga, M. Asagiri, M. Majima and S. Narumiya (2016). Hepatic stellate cells relay inflammation signaling from sinusoids to parenchyma in mouse models of immune-mediated hepatitis. *Hepatology, 63*(4), 1325–1339.

Ichai, P., J. C. Duclos-Vallee, C. Guettier, S. B. Hamida, T. Antonini, V. Delvart, F. Saliba, D. Azoulay, D. Castaing and D. Samuel (2007). Usefulness of corticosteroids for the treatment of severe and fulminant forms of autoimmune hepatitis. *Liver Transplantation, 13*(7), 996–1003.

Kessler, W.R., O. W. Cummings, G. Eckert, N. Chalasani, L. Lumeng and P. Y. Kwo (2004). Fulminant hepatic failure as the initial presentation of acute autoimmune hepatitis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology, 2*(7), 625–631.

Manns M.P., M. Woynarowski, W. Kreisel, Y. Lurie, C. Rust, E. Zuckerman, M. J. Bahr, R. Günther, R. W. Hultcrantz, U. Spengler, A. W. Lohse, F. Szalay, M. Färkkilä, M. Pröls and C.P. Strassburg (2010). Budesonide induces remission more effectively than prednisone in a controlled trail of patients with autoimmune hepatitis. *Gastroenterology, 139*(4), 1198-1206.

Mistilis, S. P., A. P. Skyring and C. R. Blackburn (1968). Natural history of active chronic hepatitis. I. Clinical features, course, diagnostic criteria, morbidity, mortality and survival. *Australasian Annals of Medicine, 17*(3) 214–223.

Schmidt-Wolf I.G., R. S.Negrin, H. P. Kiem, K. G. Blume and I. L. Weissman (1991). Use of a SCID mouse/human lymphoma model to evaluate cytokine-induced killer cells with potent antitumor cell activity. *Journal of Experimental Medicine, 174*(1), 139–149.

Shi, M., J. Fu, F. Shi, B. Zhang, Z. Tang, L. Jin, Z. Fan, Z. Zhang, L. Chen, H. Wang, G. K. Lau and F. S. Wang (2009). Transfusion of autologous cytokine-induced killer cells inhibits viral replication in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Clinical Immunology, 132*(1), 43–54.

Soloway, R. D., W. H. Summerskill, A. H. Baggenstoss, M. G. Geall, G. L. Gitnick, I. R. Elveback and L. J. Schoenfield (1972). Clinical, biochemical, and histological remission of severe chronic active liver disease: a controlled study of treatments and early prognosis. *Gastroenterology, 63*(5), 820–833.

Sun J., Y. Gao, H.S. Chen, S.X. Wang, R.B. Li, D. Jiang, L. Wei and Y. Wang (2006). Transfusion of multi-factors activated immune cells as a novel treatment for patients with chronic hepatitis B. *Journal of Clinical Virology, 35*(1), 26–32.

Vergani, D., K. Choudhuri, D. P. Bogdanos and G. Mieli-Vergani (2002). Pathogenesis of autoimmune hepatitis. *Clinical Liver Disease, 6*(3), 727–737.

Verneris M.R., M. Karami, J. Baker, A. Jayaswal and R.S. Negrin (2004). Role of NKG2D signalling in the cytotoxicity of activated and expanded CD8+ T cells. *Blood, 103*(8), 3065–3072.