

การศึกษาผลของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ถูกกระตุ้นด้วยสารซัยโตไคน์ให้เป็นคิลเลอร์เซลล์ซีไอเค (CIK) เพื่อใช้รักษา ร่วมกับการผ่าตัดในผู้ป่วยโรคมะเร็งทางเดินน้ำดี (Cholangiocarcinoma)

The effects of Cytokine-induced killer cells in the treatment of cholangiocarcinoma

หัวหน้าโครงการ

ดร.นายแพทย์กวิญ สิละวัฒน์

งานศัลยศาสตร์ โรงพยาบาลราชวิถี

ผู้ร่วมดำเนินการวิจัย

นายแพทย์โอฬาร เปี่ยมกุลวนิช

บริษัท วินเซลล์ จำกัด

นายแพทย์จිරศักดิ์ วรรณประเสริฐ

งานศัลยศาสตร์ โรงพยาบาลราชวิถี

นายแพทย์สุรเดช หงส์อิง

ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี

ดร.ภญ.สุรางค์ สิละวัฒน์

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต

1. ความเป็นมา / หลักการและเหตุผล

โรคมะเร็งทางเดินน้ำดี (cholangiocarcinoma) เป็นโรคมะเร็งที่ก่อตัวขึ้นจากเซลล์เยื่อของผนังทางเดินน้ำดี (cholangiocyte) ในอดีตโรคมะเร็งทางเดินน้ำดีเป็นโรคที่เกิดเฉพาะถิ่น (local disease) แต่ปัจจุบันอุบัติการณ์ของโรคมะเร็งทางเดินน้ำดีทั่วทั้งโลกกำลังเพิ่มสูงขึ้น เช่นในประเทศอังกฤษพบว่ามีอุบัติการณ์ของโรคมะเร็งทางเดินน้ำดีเพิ่มขึ้นถึง 16 เท่า ในปี ค.ศ.1971-2001 และเพิ่มขึ้นร้อยละ 120 ในสหรัฐอเมริกา ในปี ค.ศ.1976-2000 (1) สำหรับในประเทศไทยพบว่ามีโรคมะเร็งตับและมะเร็งทางเดินน้ำดีถูกจัดอยู่ใน 5 อันดับแรกของสาเหตุการตายทั้งหมด โดยในปี ค.ศ.2004 พบผู้ป่วยเสียชีวิตถึง 28,000 ราย (2)

การรักษาโรคมะเร็งทางเดินน้ำดีให้ได้ผล (curative treatment) ในปัจจุบันมีเพียงการรักษาด้วยการผ่าตัดเท่านั้น อย่างไรก็ตามพบว่าผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาโดยการผ่าตัด มีไม่ถึงร้อยละ 30 ของผู้ป่วยโรคมะเร็งทางเดินน้ำดีทั้งหมดที่มารับการรักษา ในขณะที่ผู้ป่วยมากกว่าร้อยละ 70 ของผู้ป่วยโรคมะเร็งทางเดินน้ำดี มักมีการลุกลามของโรคแล้วทำให้ไม่สามารถรับการรักษาโดยการผ่าตัดได้ พบว่าอัตราการรอดชีวิตที่ 5 ปีของผู้ป่วยโรคมะเร็งทางเดินน้ำดีชนิด intrahepatic cholangiocarcinoma อยู่ที่ร้อยละ 20-43% ส่วนชนิดขั้วตับ (hilar cholangiocarcinoma) อยู่ที่ร้อยละ 20-40 (1, 3) ผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาโดยการ

ผ่าตัดส่วนใหญ่มักประสบปัญหาการเป็นซ้ำของโรคหลังการผ่าตัด พบว่าการใช้การรักษาร่วม (neoadjuvant or adjuvant therapy) ด้วยการฉายแสง หรือให้ยาเคมีบำบัด เพื่อเพิ่มระยะเวลารอดชีวิตรวม (overall survival) ในผู้ป่วยโรคมะเร็งทางเดินน้ำดียังได้ผลไม่ดีเท่าที่ควร ในปัจจุบันยาเคมีบำบัดที่เป็นมาตรฐานสำหรับโรคมะเร็งทางเดินน้ำดีระยะลุกลามคือ gemcitabine⁽⁴⁾ ร่วมกับยาเคมีบำบัดชนิดอื่นเช่น 5-FU หรือ oxaliplatin จากการทบทวนบทความทางวิชาการเกี่ยวกับการรักษาโรคมะเร็งทางเดินน้ำดีระยะลุกลามด้วย gemcitabine ทั้งการให้เป็นยาเดี่ยว และการให้ร่วมกับยาเคมีบำบัดชนิดอื่น การศึกษาทางคลินิกที่ให้ gemcitabine เป็นยาเดี่ยว ผู้ป่วยมีการตอบสนอง (objective response) ร้อยละ 0-36 สามารถควบคุมโรคให้คงที่ (stable disease) ร้อยละ 13-15 ระยะเวลาที่โรคกำเริบ (time to progression) 2-10.7 เดือน และระยะเวลารอดชีวิตโดยรวม overall survival) 4-14 เดือน ในขณะที่การใช้ gemcitabine ร่วมกับยาเคมีบำบัดอื่น ได้แก่ 5-FU, mitomycin, oxaliplatin, capecitabine, cisplatin, docetaxel และ irinotecan พบว่ามีการตอบสนองร้อยละ 9.3-64 สามารถควบคุมโรคให้คงที่ 9.3-53 ระยะเวลาที่โรคกำเริบ 3-10 เดือน แต่ระยะเวลารอดชีวิตรวมยังเป็นเพียง 4.7-18 เดือน โดยที่การศึกษาทั้งหมด ส่วนใหญ่ยังเป็นการศึกษาทางคลินิกระยะที่ 2 (clinical trial phase II)⁽⁵⁻⁷⁾ เห็นได้ว่า การรักษาโรคมะเร็งทางเดินน้ำดีระยะลุกลามด้วยการให้ยาเคมีบำบัดยังได้ผลไม่ดีเท่าที่ควร ดังนั้นการศึกษาเพื่อพัฒนายาใหม่ เพื่อนำมารักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งทางเดินน้ำดี จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง

ปัจจุบันมีรายงานถึงการรักษาโรคมะเร็งด้วยวิธีกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Immunotherapy) โดยใช้เซลล์ Cytokine – induced killer (CIK) ซึ่งเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ผ่านการกระตุ้นด้วย anti-CD3 monoclonal antibody, interleukin (IL)-2, IL-1 และ interferon gamma (IFN- γ) การออกฤทธิ์ของคิลเลอร์เซลล์ซีไอเคไม่ขึ้นกับ major histocompatibility complex (MHC) บนเซลล์เป้าหมาย (non-major histocompatibility complex-restricted cytotoxic lymphocytes) นักวิทยาศาสตร์พบว่าคิลเลอร์เซลล์ซีไอเคออกฤทธิ์ทำลายเซลล์มะเร็งได้ดี ทั้งในหลอดทดลอง (in vitro) และ ในสัตว์ทดลอง (in vivo) จากการศึกษาพบว่าคิลเลอร์เซลล์ CIK มีการแสดงออกของ CD4 และ CD8 นอกจากนั้นส่วนใหญ่ของคิลเลอร์เซลล์ซีไอเคจะมีการแสดงออกของ CD3 และ CD56 บนผิวเซลล์ จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าคิลเลอร์เซลล์ซีไอเคมีความสามารถในการทำลายเซลล์มะเร็งถึง 73 เท่า เมื่อเทียบกับ Lymphokine activated killer cells (LAK) เนื่องจากคิลเลอร์เซลล์ซีไอเคสามารถทำลายเซลล์มะเร็งโดยไม่ขึ้นกับ MHC

จากการศึกษาพบว่า CIK เซลล์สามารถออกฤทธิ์ได้ดีต่อเซลล์มะเร็งที่มีการแสดงออกของ antigen มาก ได้แก่ มะเร็งตับ, มะเร็งปอด, มะเร็งลำไส้ใหญ่, มะเร็งเต้านม, มะเร็งรังไข่, มะเร็งเม็ดเลือดขาว, มะเร็งผิวหนังชนิด melanoma, มะเร็งไต และมะเร็งต่อมไทรอยด์⁽⁸⁻³⁵⁾

จนถึงปัจจุบันมีการวิจัยทางคลินิก (Clinical trial) ถึงการใช้คิลเลอร์เซลล์ซีไอเคในผู้ป่วยโรคมะเร็งหลายชนิด ได้แก่ ผู้ป่วยโรคมะเร็งต่อมไทรอยด์ชนิด Hodgkin และ nonhodgkin จากผลการศึกษา พบว่า ปริมาณ CIK เซลล์ที่ฉีดเข้าผู้ป่วย มีจำนวน $1 \times 10^9 - 1 \times 10^{10}$ เซลล์ต่อครั้ง ไม่พบผลแทรกซ้อนหลังฉีด^(21, 31) การศึกษาในผู้ป่วยโรคมะเร็งตับชนิด hepatocellular carcinoma (เป็นการศึกษา Phase III Randomized Controlled Trial; RCT) การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า การให้คิลเลอร์เซลล์ซีไอเคมีประโยชน์ในการเพิ่มภูมิคุ้มกัน และลดการเป็นซ้ำในผู้ป่วยโรคมะเร็งตับชนิด HCC⁽³¹⁾ (ดูข้อมูลในทบทวนวรรณกรรม) การศึกษาในผู้ป่วยโรคมะเร็งกระเพาะอาหาร ระยะลุกลาม (ระยะที่ 4) ที่ได้รับยาเคมีบำบัด (เป็นการศึกษา Phase III Randomized Controlled Trial; RCT) พบว่ากลุ่มที่ได้ยาเคมีบำบัดร่วมกับคิลเลอร์เซลล์ซีไอเคมีระดับ Tumor marker (MG7-Ag, CA 72-4, CA 19-9 และ CEA) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ อีกทั้งยังมีสถานะภูมิคุ้มกัน, คุณภาพชีวิต และผลการรักษาระยะต้น ดีกว่าผู้ป่วยที่ได้รับยาเคมีบำบัดเพียงอย่างเดียว⁽¹⁵⁾ และ การศึกษาในผู้ป่วยโรคมะเร็งปอดชนิด non-small cell lung cancer (เป็นการศึกษา Phase III Randomized Controlled Trial; RCT) การศึกษานี้สรุปได้ว่า การให้ยาเคมีบำบัดร่วมกับคิลเลอร์เซลล์ซีไอเคมีประโยชน์ต่อผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิด non small cell มากกว่าผู้ป่วยที่ได้ยาเคมีบำบัดเพียงอย่างเดียว⁽³³⁾

สำหรับโรคมะเร็งทางเดินน้ำดี (Cholangiocarcinoma) เมื่อเร็ว ๆ นี้ Wongkajornslip A และคณะ ได้ทดสอบผลของคิลเลอร์เซลล์ซีไอเคต่อ cholangiocarcinoma cells และในหนูในหลอดทดลอง SCID และพบว่าคิลเลอร์เซลล์ซีไอเคสามารถยับยั้ง cholangiocarcinoma cells ได้ดี อย่างไรก็ตาม จนกระทั่งปัจจุบันนี้ ยังไม่มีการศึกษาทางคลินิกเกี่ยวกับการใช้คิลเลอร์เซลล์ซีไอเคเพื่อการรักษาโรคมะเร็งทางเดินน้ำดี ดังนั้นการศึกษานี้จึงมุ่งที่จะศึกษาการใช้คิลเลอร์เซลล์ซีไอเคในผู้ป่วยโรคมะเร็งทางเดินน้ำดี โดยขั้นต้นผู้วิจัยวางแผนที่จะศึกษาถึงความปลอดภัยในผู้ป่วยที่ได้รับคิลเลอร์เซลล์ซีไอเคเป็นสำคัญ

บทบรรณานุกรม (Review literatures)

ในปี 2004 Shi M และคณะ ได้รายงานการศึกษา ระยะที่ 1 (phase I) ของการใช้ CIK ในผู้ป่วยโรคมะเร็งตับ ชนิด Hepatocellular carcinoma ผู้วิจัยได้เก็บเม็ดเลือดขาวชนิด mononuclear จากเส้นเลือดดำส่วนปลาย (Peripheral blood mononuclear cell; PBMC) จากผู้ป่วยโรคมะเร็งตับ HCC จำนวน 13 ราย แล้วนำมากระตุ้นด้วย interferon (IFN)-r, antibody ต่อ CD3 และ interlen-2 จากนั้นนำมาฉีดกลับเข้าสู่ผู้ป่วยในวันที่ 14 ผลการศึกษาพบว่า ปริมาณ PBMC ที่ได้จากผู้ป่วยก่อนและหลังฉีด CIK เป็นเวลา 10 วัน จาก 33.5%, 7.7% เป็น 36.6% ($P < 0.05$), 18.9% ($P < 0.05$) ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า หลังการให้ CIK ผู้ป่วยมีอาการดีขึ้น มีความอยากอาหาร (appetite) ดีขึ้น การนอนหลับดีขึ้น ขนาดเนื้องอกลดลงในผู้ป่วย 3 คน ส่วนอาการข้างเคียงที่พบ คือ ผู้ป่วยส่วนใหญ่จะมีไข้ 6 ชม. หลังการฉีดเซลล์ซีไอเค (อุณหภูมิ $37.5-40^{\circ}\text{C}$) เป็นอยู่ประมาณ 6-8 ชม. ไม่มีอาการแทรกซ้อนอื่น เช่น ที่ดับและไต ผู้วิจัยสรุปการให้การรักษาด้วย CIK เซลล์ มีความปลอดภัย และมีประสิทธิภาพ⁽⁸⁾

ในปี 2005 Leemhuis T ได้รายงานการศึกษาทางคลินิก ระยะที่ 1 ของการใช้เซลล์ซีไอเคเซลล์ที่ได้จากผู้ป่วยเอง เพื่อการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งต่อมน้ำเหลือง ชนิด Hodgkin และ non-Hodgkin จำนวน 9 ราย จากผลการศึกษาในหลอดทดลอง พบว่า การทำลายเซลล์มะเร็ง (B-cell ; OCI-Ly8) ที่อัตราส่วน 40:1 ปริมาณ CIK เซลล์ที่ฉีดเข้าผู้ป่วย มีจำนวน $1 \times 10^9 - 1 \times 10^{10}$ เซลล์ต่อครั้ง ไม่พบผลแทรกซ้อนทันทีหลังฉีด มีผู้ป่วย 2 ราย มีการตอบสนองบางส่วน และผู้ป่วยอีก 2 ราย มีระยะของโรคคงที่ ผู้วิจัยสรุปว่าเซลล์ซีไอเคมีประโยชน์ในการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งต่อมน้ำเหลือง ที่มีโอกาสกลับเป็นซ้ำหลังการรักษาด้วยเคมีบำบัด⁽²¹⁾

ในปี 2008 Weng DS และคณะ ทำการศึกษาชนิด Randomized Controlled Trail ในผู้ป่วยมะเร็งตับชนิด hepatocellular carcinoma จำนวน 85 ราย ที่ได้รับการรักษาด้วยการให้เคมีบำบัดร่วมกับสารกันเส้นเลือดแดงตับ (Transarterial chemoembolization) ร่วมกับการใช้ความร้อนจากคลื่นวิทยุทำลายเนื้องอก (radiofrequency ablation) โดยแบ่งผู้ป่วยเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ได้รับเซลล์ซีไอเคและที่ไม่ได้เซลล์ซีไอเค ผลการศึกษาพบว่า การเป็นซ้ำที่ 18 เดือน ในผู้ป่วยที่ได้รับเซลล์ซีไอเคเท่ากับ 15.6% ในขณะที่ผู้ป่วยที่ไม่ได้เซลล์ซีไอเคเท่ากับ 40% ($P < 0.05$) การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการให้เซลล์ซีไอเคมีประโยชน์ในการเพิ่มภูมิคุ้มกันและลดการเป็นซ้ำในผู้ป่วยโรคมะเร็งตับชนิด HCC⁽³¹⁾

ในปี 2006 Jiang D และคณะ ได้รายงานการศึกษาวิจัยทางคลินิก ในผู้ป่วยโรคมะเร็งกระเพาะอาหาร ระยะลุกลาม (ระยะที่ 4) ที่ได้รับยาเคมีบำบัด จำนวน 57 ราย ผู้ป่วยดังกล่าวถูกแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ได้ยาเคมีบำบัดร่วมกับเซลล์ซีไอเคด้วย มีระดับ Tumor marker (MG7-Ag, CA 72-4, CA 19-9 และ CEA) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ อีกทั้งยังมีสถานะภูมิคุ้มกัน, คุณภาพชีวิต และผลการรักษาระยะต้น ดีกว่าผู้ป่วยที่ได้รับยาเคมีบำบัดเพียงอย่างเดียว⁽¹⁵⁾

ปี 2008 Wu C และคณะ ได้ทำการศึกษาชนิด Randomized controlled trail เพื่อดูผลของการให้ยาเคมีบำบัดร่วมกับการให้เซลล์ซีไอเคในผู้ป่วยโรคมะเร็งปอด ชนิด non small cell ที่ไม่สามารถผ่าตัดรักษาได้ โดยการศึกษาทำในผู้ป่วย 59 คน แบ่งเป็น 2 กลุ่ม กลุ่ม A ได้ยาเคมีบำบัดอย่างเดียว (docetaxel และ cisplatin) ส่วนผู้ป่วยกลุ่ม B ได้ยาเคมีบำบัดร่วมกับเซลล์ซีไอเค ผลการศึกษาพบว่าภูมิคุ้มกันในผู้ป่วย (host immune function) และคุณภาพชีวิต (Quality of life, QOL) ในผู้ป่วยที่ได้ยาเคมีบำบัดร่วมกับ เซลล์ซีไอเคดีขึ้นมากกว่าผู้ป่วยที่ได้ยาเคมีบำบัดอย่างเดียว โดยอัตราการควบคุมโรค (disease control rate, DCR) ในผู้ป่วยกลุ่ม B ดีกว่ากลุ่ม A (89.7% VS 65.5% $p: 0.030$) ระยะเวลาโรคกำเริบ (Time to progression) ในผู้ป่วยกลุ่ม A 4.67 เดือน กลุ่ม B 6.65 เดือน และผู้ป่วยกลุ่ม B มีระยะเวลารอดชีพโดยรวม (overall survival) ดีกว่ากลุ่ม B อย่างมีนัยสำคัญ ($p: 0.029$) ไม่พบผลแทรกซ้อนรุนแรงในผู้ป่วยที่ได้รับเซลล์ซีไอเค การศึกษานี้สรุปได้ว่า การให้ยาเคมีบำบัดร่วมกับเซลล์ซีไอเคมีประโยชน์ต่อผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิด non small cell มากกว่าผู้ป่วยที่ได้ยาเคมีบำบัดเพียงอย่างเดียว (33)

ปี 2009 Olivoso P และคณะ ได้ทำการวิจัยคลินิก ระยะเริ่มต้น (pilot clinical trial) โดยให้เซลล์ซีไอเคซึ่งได้จากเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยเอง (autologous CIK) แก่ผู้ป่วยโรคมะเร็งต่อมน้ำเหลืองที่ไม่ตอบสนองต่อยาเคมีบำบัด (refractory lymphoma) และผู้ป่วยโรคมะเร็งที่เป็นก้อน (solid) ที่มีการกระจาย (metastasis) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อการศึกษาความเป็นไปได้ที่จะเพิ่มจำนวนเซลล์ซีไอเคให้เพียงพอในผู้ป่วยที่ได้รับยาเคมีบำบัด และศึกษาผลแทรกซ้อนในผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยเซลล์ซีไอเคในผู้ป่วย 12 ราย (6 รายเป็น lymphoma, 5 รายเป็นมะเร็งที่โตระยะ 4 และ 1 รายเป็นมะเร็งตับชนิด hepatocellular carcinoma) ผลการศึกษาพบว่า ผู้ป่วยได้รับเซลล์ซีไอเคเฉลี่ย 28×10^9 เซลล์

(6-61 x 10⁹ เซลล์) ผู้ป่วยมีผลข้างเคียงน้อย มีผู้ป่วย 3 ราย ได้ผลตอบสนองแบบสมบูรณ์ (complete response) และผู้ป่วย 2 ราย มีโรคคงที่ เมื่อติดตามผู้ป่วยไป โดยเฉลี่ย 33 เดือน (9-44 เดือน) โดยสรุปแล้ว การศึกษาระยะเริ่มต้น (preliminary data) นี้แสดงให้เห็นว่า การรักษาด้วย คีลเลอร์เซลล์ซีไอเคมีความปลอดภัย และช่วยเสริมภูมิคุ้มกัน โดยเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่ทำหน้าที่ในระบบภูมิคุ้มกัน (effector immune cells)⁽²⁵⁾

ในปี 2009 Hui D และคณะ ได้รายงานการศึกษา ชนิด Randomized Controlled Trail ในผู้ป่วยมะเร็งตับ ชนิด hepatocellular carcinoma ที่ได้รับการศึกษาด้วยการผ่าตัดให้หายขาด (radical resection) ผู้วิจัยได้คัดเลือกผู้ป่วยจำนวน 127 ราย หลังจากทำการผ่าตัดมะเร็งแบบ radical resection ได้แบ่งผู้ป่วยแบบสุ่ม (randomization) ดังกล่าวออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 จำนวน 41 คน ได้รับคีลเลอร์เซลล์ซีไอเค 3 ครั้ง, กลุ่มที่ 2 จำนวน 43 คน ได้รับคีลเลอร์เซลล์ซีไอเค 6 ครั้ง และกลุ่มที่ 3 จำนวน 43 ราย ไม่ได้รับการรักษาเพิ่มเติม ผลการศึกษา

พบว่า (disease Free survival) ในผู้ป่วยกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 ดีกว่ากลุ่มที่ 3 อย่างมีนัยสำคัญ (p : 0.001 และ 0.004) การศึกษานี้สรุปได้ว่า การให้คีลเลอร์เซลล์ซีไอเค หลังการผ่าตัดรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งตับ HCC อาจช่วยป้องกันการเป็นซ้ำหลังการรักษาได้

ปี 2009 Wongkajornslip A และคณะ ได้ทดสอบผลของคีลเลอร์เซลล์ซีไอเคต่อ cholangiocarcinoma cells และในหนูในหลอดทดลอง SCID และพบว่าคีลเลอร์เซลล์ซีไอเคสามารถยับยั้ง cholangiocarcinoma cells ได้ดีที่สุดเมื่อคีลเลอร์เซลล์ซีไอเคถูกเลี้ยงร่วมกับ dendritic cells (DCs) โดยสามารถตรวจพบ Tumor infiltrating คีลเลอร์เซลล์ซีไอเคในเนื้อเยื่อมะเร็งได้ตั้งแต่วันที่ 2-14 หลังรักษา การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าคีลเลอร์เซลล์ซีไอเค น่าจะเป็นตัวเลือกที่ดี ที่จะใช้ในการศึกษาทางคลินิก เพื่อรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งทางเดินน้ำดี อย่างไรก็ตาม จนกระทั่งปัจจุบันนี้ ยังไม่มีการศึกษาทางคลินิกเกี่ยวกับการใช้คีลเลอร์เซลล์ซีไอเคเพื่อการรักษาโรคมะเร็งทางเดินน้ำดี

2. วัตถุประสงค์ของการศึกษา

2.1 วัตถุประสงค์หลัก

- ศึกษาความปลอดภัยของการใช้เซลล์เม็ดเลือดขาว คีลเลอร์เซลล์ซีไอเค(ได้จากผู้ป่วย; autologous) เพื่อการรักษาร่วมในผู้ป่วยโรคมะเร็งทางเดินน้ำดี

- ศึกษาปริมาณ CD3+CD56+ ในผู้ป่วยก่อนและหลังการรักษา

2.2 วัตถุประสงค์รอง

- ศึกษาอัตราการรอดชีวิตโดยรวม
- ศึกษาระยะเวลาก่อนที่โรคลุกลาม (TTP)*
- ศึกษาระดับ CEA และ CA19-9 ในผู้ป่วยก่อนและหลังการรักษา

*ตามข้อกำหนดขององค์การอาหารและยาเกี่ยวกับ

การสิ้นสุดการศึกษา (Study Endpoint) คำนิยามของ TTP คือ ระยะเวลาจากการรักษาจนถึงระยะเวลาที่มีหลักฐานว่าโรคลุกลาม ในการศึกษา TTP เป็นระยะเวลาจากการเริ่มรักษาถึงจุดสิ้นสุดการศึกษาซึ่งหมายถึง

- มีหลักฐานยืนยันว่าโรคลุกลามมากขึ้น โดยใช้ข้อกำหนดของ RECIST

- การเสียชีวิตจากสาเหตุใดๆ

- วันสิ้นสุดการศึกษา (censoring date)

- วันสุดท้ายที่มีการประเมินขนาดเนื้องอก ก่อนที่ผู้ป่วยจะได้รับการรักษาโรคมะเร็งวิธีอื่น หรือ

- วันสุดท้ายที่ผู้ป่วยมาตามนัด ก่อนที่จะหยุดการติดตามการรักษา

- วันสิ้นสุดการศึกษาที่กำหนดโดยผู้วิจัย

3. รูปแบบของการศึกษา

3.1 ภาพรวมของรูปแบบการศึกษาและการให้ยา

เป็นการศึกษาทางคลินิกระยะที่ 2 ในโรงพยาบาลราชวิถี ของการใช้คิลเลอร์เซลล์ซีไอเคเพื่อใช้รักษาโรคมะเร็งทางเดินน้ำดี (Cholangiocarcinoma) ในระยะเริ่มต้นที่สามารถรักษาโดยการผ่าตัดเอาเนื้องอกออกทั้งหมด (R0) หรือเหลือเนื้องอกขนาดไม่เกิน 1 เซนติเมตร (R1)

3.1.1 นัดพบแพทย์

ผู้ป่วยที่เข้าร่วมโครงการจะได้รับเอกสารชี้แจงข้อมูลการวิจัย และคำอธิบายโดยละเอียดเกี่ยวกับขั้นตอนการวิจัยที่เกี่ยวข้องสิทธิและสิ่งที่ผู้ป่วยต้องปฏิบัติขณะเข้าร่วมการวิจัย ตลอดจนข้อดีและข้อเสียเมื่อได้รับยาวิจัย ผู้ป่วยมีโอกาสได้สอบถามและมีเวลามากเพียงพอในการตัดสินใจเข้าร่วมโครงการ ทั้งนี้ ขั้นตอนการขอคำยินยอมจากผู้ป่วยดังกล่าวอาจเกิดขึ้นก่อนนัดพบแพทย์ครั้งถัดไป ดังนั้นผู้ป่วยที่ต้องการเข้าร่วมโครงการจะลงชื่อ วันที่ และบันทึกเวลาใน “เอกสารยินยอมเข้าร่วมการวิจัย” ก่อนที่จะเริ่มขั้นตอนการวิจัย ผู้ป่วยที่เข้าร่วมโครงการทุกคน จะได้รับสำเนาเอกสารชี้แจงข้อมูลการวิจัยและเอกสารยินยอมที่ลงชื่อและวันที่แล้วเก็บไว้กับตัวเอง 1 ชุด

หากแพทย์ผู้วิจัยไม่ใช่แพทย์ผู้รักษาผู้ป่วยเป็นประจำ แพทย์ผู้วิจัยควรแจ้งให้แพทย์ผู้รักษาผู้ป่วยเป็นประจำทราบ ว่าผู้ป่วยได้เข้าร่วมโครงการวิจัย และอนุญาตให้ผู้ป่วยเข้าร่วมโครงการวิจัยได้

3.1.2 ขั้นตอนการเตรียมยาวิจัย

ผู้ป่วยที่เข้าร่วมการศึกษาจะถูกเจาะเลือดจากเส้นเลือดดำส่วนปลาย ปริมาณ 50 ซีซี (3 ซ่อนโตะ) เลือดจะถูกเก็บอยู่ในหลอดทดลองที่บรรจุสารละลายป้องกันเลือดแข็งตัว (heparin) ทำการแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด mononuclear cells (human PBMC) โดยใช้ Ficoll เมื่อทำการแยกแล้วทำการเพาะเลี้ยง human PBMC ในสารละลาย In vivo media ทำการเติม IFN- γ 1000U/ml ในวันที่ 1 หลังจากทำการบ่มที่ 37 $^{\circ}$ C ใน 5% CO $_2$ incubator เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการเติม anti-CD3 100 ng/ml, IL-2 1000 U/ml และ IL-1 α 1000 U/ml จากนั้นทำการบ่มที่ 37 $^{\circ}$ C ใน 5% CO $_2$ incubator ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี IL-2 1000 U/ml ต่อจำนวนเซลล์ 3x10 6 cells/ml ทุกๆ 3 วัน ทำการเก็บเซลล์ (harvested cells) หลังจากบ่มเป็นเวลา 21 วัน ทำการล้างด้วย normal

saline อย่างน้อย 3 ครั้ง และ เติมสารละลาย (resuspend) normal saline 100 ml ที่มี 0.2% human serum albumin โดยสารละลายทุกชนิดที่ใช้จะใช้สารละลายระดับที่ใช้ในมนุษย์ (clinical grade) ทำการตรวจวัดปริมาณ CD3, CD8 และ CD56 จากเซลล์ที่ได้ซึ่งต้องมีปริมาณของ CD3, CD8 และ CD56 เพิ่มขึ้น 100 เท่า จากเริ่มต้น ซึ่งขั้นตอนทั้งหมดนี้จะถูกจัดทำในห้องปฏิบัติการที่ปราศจากเชื้อ ภายใต้การควบคุมของสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช: NSTDA) นอกจากนั้น จะมีการเก็บตัวอย่างบางส่วนของเซลล์เพาะเลี้ยง เพื่อส่งตรวจหาการปนเปื้อนของแบคทีเรีย โดยห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลราชวิถี

หลังวันที่ 26 ผู้ป่วยจะได้รับคิลเลอร์เซลล์ซีไอเค (ที่ได้จากเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยเอง: Autologous CIK) จำนวน 1 x 10 9 – 1 x 10 10 เซลล์⁽¹³⁻¹⁵⁾ ฉีดทางเส้นเลือดดำเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทุก 4 สัปดาห์ 4 ครั้ง (ในวันที่ 1, 29, 57 และ 85) ทุกครั้งที่ฉีดผู้ป่วยจะได้รับการรักษาแบบผู้ป่วยใน อย่างน้อย 1 วันโดยผู้วิจัย (ผ่านทุนจากโรงพยาบาลราชวิถี) จะรับผิดชอบค่าใช้จ่ายที่เกิดขึ้นทั้งหมด โดยมีการเฝ้าระวังผลแทรกซ้อนที่อาจเกิดขึ้นได้หลังการฉีดคิลเลอร์เซลล์ซีไอเค ในระหว่างการรักษาผู้ป่วยจะได้รับการตรวจวัดระดับอุณหภูมิและสัญญาณชีพของร่างกายทุก 4-6 ชม. วัดระดับ CBC, LFT, CEA, CA19-9, CD3, CD8, และ CD56 ในกระแสเลือด ร่วมกับการตรวจทางรังสีวินิจฉัย (CT-scan หรือ MRI) ทุก 2 เดือน

การศึกษาสิ้นสุดลงเมื่อเกิดสถานการณ์ต่อไปนี้

1. มีหลักฐานว่าโรคลุกลามมากขึ้น
2. ผู้ป่วยไม่สามารถทนต่อพิษของคิลเลอร์เซลล์ซีไอเคได้
3. ผู้ป่วยเสียชีวิต
4. ผู้ป่วยไม่สนใจ ผู้ป่วยไม่มาตามนัด หรือผู้ป่วยขอถอนตัว

3.2 ข้อพิจารณาด้านความปลอดภัย

3.2.1 ผลข้างเคียงหลังฉีด CIK

จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า ผลข้างเคียงของการฉีดคิลเลอร์เซลล์ซีไอเคไม่รุนแรง ผู้ป่วยส่วนใหญ่มีเพียงอาการไข้ (37.5-39 $^{\circ}$ C) เท่านั้น ดังนั้นการศึกษานี้จึงมุ่งเน้น

ไปที่ ขั้นตอนการเตรียมคิลเลอร์เซลล์ซีไอเคในห้องปฏิบัติการ การให้ปราศจากการปนเปื้อน (contamination) โดยกระบวนการเตรียมคิลเลอร์เซลล์ซีไอเคจะใช้สารละลายทุกชนิดในระดับที่มีการรับรองว่าสามารถใช้ในมนุษย์ได้ (clinical grade) และจะถูกทำในห้องปฏิบัติการระดับ class 10000 ควบคุมโดยสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช: NSTDA) นอกจากนี้ จะมีการเก็บตัวอย่างบางส่วนของเซลล์เพาะเลี้ยง เพื่อส่งตรวจหาการปนเปื้อนของแบคทีเรีย โดยห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลราชวิถี ในผู้ป่วยทุกคน

3.2.2 การดูแลอาสาสมัครหลังฉีดคิลเลอร์เซลล์ซีไอเค

ทุกครั้งที่ฉีดคิลเลอร์เซลล์ซีไอเคผู้ป่วยจะได้รับการรักษาแบบผู้ป่วยในอย่างน้อย 1 วันโดยผู้วิจัยจะรับผิดชอบค่าใช้จ่ายที่เกิดขึ้นทั้งหมด โดยมีการเฝ้าระวังผลแทรกซ้อน

ที่อาจเกิดขึ้นได้หลังการฉีดคิลเลอร์เซลล์ซีไอเค ในระหว่างการรักษาผู้ป่วยจะได้รับการตรวจวัดระดับอุณหภูมิและสัญญาณชีพของร่างกายทุก 4-6 ชม วัดระดับ CBC, LFT, CEA, CA19-9, CD3, CD8, และ CD56 ในกระแสเลือด ร่วมกับการตรวจทางรังสีวินิจฉัย (CT-scan หรือ MRI) ทุก 2 เดือน หากตรวจพบว่ามีไข้ก็จะรักษาด้วยการให้ยา Paracetamol หรือหากให้ยา Paracetamol เป็นเวลา 2 วันแล้วไม่ดีขึ้นก็จะพิจารณาให้ยาปฏิชีวนะ ร่วมกับการตรวจค้นการติดเชื้อในกระแสโลหิต หากตรวจพบว่ามีหลักฐานของการติดเชื้อจะให้ยาตามความไวและความจำเพาะของเชื้อนั้นๆต่อไป

3.2.3 จำนวนผู้ป่วยที่จะเข้ารับการรักษาในแบบการศึกษา

ผู้ป่วยทั้งสิ้น 10 คนที่สมัครเข้าร่วมในการศึกษานี้

4. ประชากรในการศึกษา

4.1 ประชากรเป้าหมาย

เป็นผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยทางคลินิกหรือทางพยาธิสภาพว่าเป็นโรคมะเร็งทางเดินน้ำดี (Cholangiocarcinoma) ระยะเริ่มต้นและสามารถรักษาโดยการผ่าตัดเอาเนื้องอกออกทั้งหมด (R0) หรือเหลือเนื้องอกขนาดไม่เกิน 1 เซนติเมตร (R1)

4.2 ข้อกำหนดของผู้ป่วยในการเข้าร่วมหรือการคัดออกจากการศึกษา

เพื่อที่จะเข้าร่วมในการศึกษา ผู้ป่วยจะต้องมีข้อกำหนดดังต่อไปนี้

เกณฑ์การคัดเลือกเข้าร่วมการศึกษา (Inclusion criteria)

1. อายุ 18 – 60 ปี ทั้งชายและหญิง
2. ได้รับวินิจฉัยจากการพิสูจน์ชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา (Histology) ว่าเป็นโรคมะเร็งทางเดินน้ำดี (Cholangiocarcinoma)
3. ได้รับการผ่าตัดเนื้องอกออกได้หมดหรือหลงเหลืออยู่ขนาดไม่เกิน 1 เซนติเมตร
4. KPS: มากกว่า 70 และคาดว่าจะมีชีวิตอยู่ยาวนานกว่า 3 เดือน (life expectancy)
5. หน้าที่การทำงานของอวัยวะที่สำคัญ และไขกระดูกทำงานปกติ (Neutrophil > 1.5x10⁹/L, PLT > 75x10⁹/L

, AST, ALT < 5 UNL (Upper Normal Limit) TB < 5 UNL, INR < 1.5)

6. ผู้ป่วยสมัครใจเข้าร่วมโครงการโดยลงนามในเอกสารยินยอมโดยได้รับการบอกกล่าว (Informed consent form)

เกณฑ์การคัดเลือกผู้ป่วยออกจากการศึกษา (Exclusion criteria)

1. ผู้ป่วยได้รับการรักษาด้วยยารักษาโรคมะเร็งชนิดอื่นพร้อมกัน รวมถึง interferon และยาสมุนไพร ซึ่งได้รับการรับรองจากสถาบันของท้องถิ่น ในการใช้เป็นยารักษาโรคมะเร็ง ภายใน 12 เดือน ก่อนเข้าร่วมการวิจัย
2. หญิงตั้งครรภ์หรือหญิงให้นมบุตรหรือหญิงที่มีโอกาสตั้งครรภ์และไม่ได้มีการคุมกำเนิดอย่างเหมาะสม
3. มีประวัติการเป็นโรคมะเร็งชนิดอื่น ยกเว้นโรคผิวหนังชนิด Basal cell ที่รักษาหายแล้ว หรือโรค Carcinoma in – situ ของปากมดลูกที่รักษาหายแล้ว
4. มีการแพร่กระจายของโรคมะเร็งไปยังสมอง และมีสติไม่สมบูรณ์
5. มีโรคหรือสภาวะรุนแรงอื่นๆ (โรคติดเชื้อ, โรคหัวใจที่เป็นอยู่แล้ว, รวมถึงภาวะหัวใจวาย, อาการเจ็บหน้าอกแบบ stable และ unstable angina เป็นต้น)

5. การติดตามผล

5.1 ระยะเวลาการติดตามผล (follow-up phase)

ผู้ป่วยทุกรายจะถูกติดตามผลทุก 2 เดือน จนกระทั่งเสียชีวิตหรือจนกระทั่งการศึกษาสิ้นสุด การยุติการศึกษาจะตัดสินใจด้วยความเห็นที่สอดคล้องกันของผู้วิจัยและผู้ป่วยที่เข้าร่วมโครงการ

ในการติดตามผลจะเก็บข้อมูลต่างๆดังนี้ การรอดชีวิตที่ 1 ปี, สุขภาพโดยรวม, คุณภาพชีวิต, การประเมินเนื้องอก, ความปลอดภัย

5.2 การตรวจสอบเบื้องต้นสำหรับการคัดเลือกผู้ป่วยเข้าในการศึกษา และแบบฟอร์มการตรวจสอบ (screening examination and eligibility screening form)

จะต้องได้รับใบยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยที่ลงลายมือชื่อเรียบร้อยแล้วจากผู้ป่วย ก่อนที่ผู้ป่วยจะถูกดำเนินการการรักษาใดๆในการศึกษา

การบันทึกการตรวจสอบเบื้องต้น จะต้องบันทึกในเอกสารของผู้ป่วยทุกรายอย่างสมบูรณ์เพื่อนำไปพิจารณาการเข้าร่วมในการศึกษา ซึ่งจะต้องถูกบันทึกโดยผู้ดำเนินการวิจัยหรือผู้ได้รับมอบหมาย ผู้ป่วยที่ได้รับการพิจารณาเข้าร่วมการศึกษา รวมถึงผู้ป่วยที่ไม่เข้าเกณฑ์การศึกษา จะต้องถูกบันทึกการตรวจสอบ โดยจะบันทึกชื่อผู้ป่วย, ที่อยู่ และการติดต่อ โดยเป็นความลับ

5.2.1 ขั้นตอนการตรวจสอบเบื้องต้นสำหรับการคัดเลือกผู้ป่วยเข้าในการศึกษา

- การประเมินก้อนเนื้องอก (ด้วย contrast CT หรือ MRI) จะต้องทำภายใน 2 สัปดาห์ ก่อนการคัดเลือก

- การประเมินจะต้องทำภายใน 7 วัน ก่อนการคัดเลือกโดยเก็บข้อมูลต่างๆดังนี้ ข้อมูลผู้ป่วย, ประวัติทางการแพทย์, ประวัติการเป็นโรคมะเร็งและการรักษา การรักษาและโรคที่เป็นร่วม และการตรวจสอบการตั้งครรภ์ (ตามความเหมาะสม), ความสูง, น้ำหนัก, สัญญาณชีพและการตรวจร่างกายทั่วไป, KPS scale, การตรวจเลือด (รวมถึงการตรวจ albumin, total bilirubin, glucose, potassium, sodium, calcium, creatinine clearance)

5.3 การประเมินทางคลินิก

วัตถุประสงค์หลักของการประเมิน คือ การพิจารณาความปลอดภัยในการใช้ยา, และ ปริมาณ CD3, CD56 ใน

เลือดของผู้ป่วยก่อนและหลังการรักษา

วัตถุประสงค์รอง คือ การพิจารณาคุณภาพชีวิต ค่าระยะเวลาก่อนการลุกลามของโรคมะเร็งหรือการเสียชีวิต (TTP), อัตราการตอบสนองต่อยา, และค่าการรอดชีวิตโดยรวม (OS) ซึ่งค่าการรอดชีวิตโดยรวม (OS) หมายถึง ระยะเวลาระหว่างการคัดเลือกถึงการเสียชีวิตของผู้ป่วย หรือไม่ สามารถติดตามผลได้

ความปลอดภัยของการใช้ยาจะถูกประเมินจากอัตราการเกิดภาวะไม่พึงประสงค์หลังตามการรักษาด้วยคิเลอร์ เซลล์ซีไอเคใน ช่วง 48 ชั่วโมงแรก และ 7 วันหลังให้ยา จากนั้นจะประเมินทุกๆ 1 เดือน เป็นเวลา 1 ปี การประเมินภาวะไม่พึงประสงค์จะประเมินด้วย EORTC QLQ C-30 หลังการคัดเลือกโดยพิจารณาถึงระยะเวลาที่เต็มลดลง 10 แต้ม, จำนวนแต้มของ EORTC QLQ C-30 และมีค่า KPS ดีขึ้น คุณภาพชีวิตจะถูกประเมินไปพร้อมกับการประเมินเนื้องอกระหว่างการรักษาและการติดตามผลแต่ละครั้ง

การตรวจวินิจฉัยด้วยการฉายภาพรังสี (CT scan หรือ MRI และ X-ray) สำหรับการประเมินทุกครั้งของผู้ป่วยทุกราย จะต้องทำด้วยวิธีเดียวกันตลอดการศึกษา การทำ CT scan จะต้องใช้ทั้ง i.v. contrast และ oral contrast ในกรณีที่ผู้ป่วยสามารถใช้วิธีนี้ได้

5.4 การประเมินทางห้องปฏิบัติการ

การทดสอบทางห้องปฏิบัติการทุกชนิดระหว่างการรักษา จะต้องบันทึกผลในแบบฟอร์ม CRF

- CEA, CA19-9 (ต้องทำไปพร้อมกับการประเมินเนื้องอก)

- การนับจำนวนเม็ดเลือดขาวรวมถึง neutrophils/granulocytes, จำนวนเม็ดเลือดแดง, ฮีโมโกลบิน, hematocrit และเกล็ดเลือด

- การตรวจ total bilirubin, เอนไซม์ AST, ALT, alkaline phosphatase, albumin, glucose, potassium, sodium, calcium, creatinine

- การตรวจสอบการตั้งครรภ์ (เมื่อมีข้อบ่งชี้ทางคลินิก)

- การตรวจ CD3, CD8, CD56 ใน PBMC จะทำการตรวจโดยใช้ Flow cytometer

5.5 ระยะเวลาติดตามผล

ระยะเวลาติดตามผลเริ่มขึ้นเมื่อสิ้นสุดระยะการรักษา ผู้ป่วยจะถูกติดตามผล ทุกๆ 2 เดือน +/- 1 สัปดาห์ ในการติดตามผลจะต้องบันทึกตัวชี้วัด (ตารางที่ 7, ข้อ 5.2) ดังนี้

- สำหรับผู้ที่ไม่มีความรุนแรงในระหว่างการรักษา การประเมินก่อนมะเร็งด้วย contrast CT scan หรือ MRI จะต้องทำในการติดตามผลแต่ละครั้ง เพื่อหาค่าระยะเวลาก่อน

การลุกลามของโรคมะเร็งหรือการเสียชีวิต (TTP)

- การตรวจสอบการรอดชีวิต ถ้าผู้ป่วยไม่สามารถมารับการรักษาเพื่อติดตามผลได้ให้สอบถามทางโทรศัพท์หรือทางไปรษณีย์ ซึ่งในกรณีนี้การติดต่อจะต้องมีการบันทึกในเอกสารที่เหมาะสมโดยผู้วิจัย

- คุณภาพชีวิตและสัญญาณชีพ รวมถึง KPS จะต้องถูกประเมินในการติดตามผลแต่ละครั้ง

6. สูตรที่ใช้ในการรักษา

6.1 ขนาดของยา และแผนการให้ยา

6.1.1 การบรรจุและฉลาก

ผู้สนับสนุนการวิจัยจะทำการบรรจุและติดฉลาก คิลเลอร์เซลล์ซีไอเคที่ใช้ในการศึกษา

ขนาดของคิลเลอร์เซลล์ซีไอเคจะคำนวณโดยใช้ 109-1010 เซลล์/ครั้ง

7. ระยะเวลาการรักษา

ผู้ป่วยจะได้รับคิลเลอร์เซลล์ซีไอเคทุก 4 สัปดาห์ การรักษาจะต่อเนื่อง 4 ครั้งหรือจนกระทั่งเกิดเหตุการณ์ใดๆ ต่อไปนี้

- พบการลุกลามของโรค
- ผู้ป่วยไม่สามารถทนต่อคิลเลอร์เซลล์ซีไอเคได้
- เสียชีวิต
- ผู้ป่วยถอนตัว หรือไม่ได้รับการติดตามผล

ผลการศึกษา

ผลการศึกษาจากหลอดทดลอง

1) ปริมาณ เซลล์ที่มี CD56+/CD3+

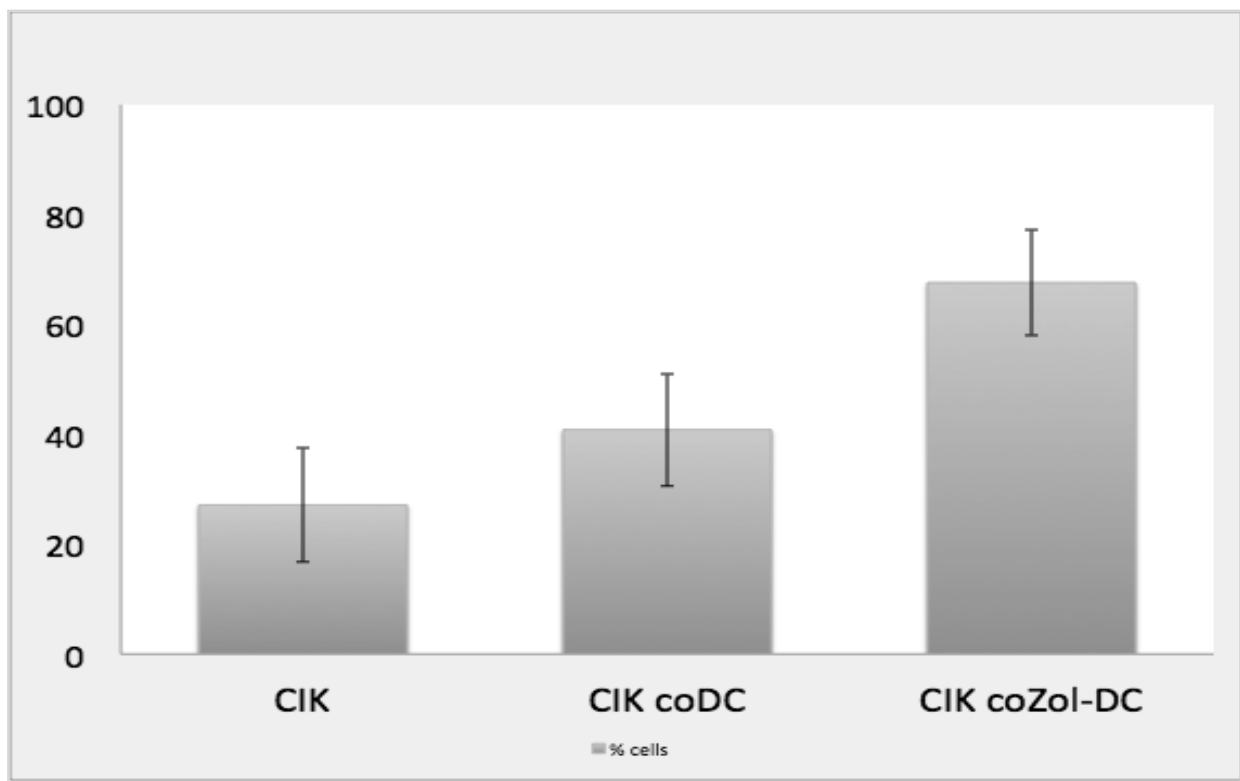
ภายหลังการเลี้ยง PBMC เพื่อให้เจริญไปเป็น CIK ในสภาวะปกติ สภาวะที่ได้รับการกระตุ้นด้วย dendritic cells และ สภาวะที่ได้รับการกระตุ้นด้วย dendritic cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย zoledronate acid เมื่อนำเซลล์ที่ได้ไปตรวจหาปริมาณ เซลล์ที่มี CD56+/CD3+ พบว่า การเลี้ยง PBMC เพื่อให้เจริญไปเป็น CIK ในสภาวะที่ได้รับการกระตุ้นด้วย

dendritic cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย zoledronate acid มีปริมาณ เซลล์ที่มี CD56+/CD3+ มากกว่าเซลล์ที่ถูกเลี้ยงในสภาวะปกติ และสภาวะที่ได้รับการกระตุ้นด้วย dendritic cells อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$; ANOVA) (ตารางที่ 1 และรูปที่ 1)

ตารางที่ 1 ปริมาณ เซลล์ที่มี CD56+/CD3+ ภายหลังการเลี้ยง PBMC เพื่อให้เจริญไปเป็น CIK ในสภาวะปกติ (CIK) สภาวะที่ได้รับการกระตุ้นด้วย dendritic cells (CIK coDC) และ สภาวะที่ได้รับการกระตุ้นด้วย dendritic cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย zoledronate acid (CIK coZol-DC) จากการตรวจจากเซลล์ทั้งหมดจำนวน 4.8×10^8 เซลล์

สภาวะเซลล์	การทดลองครั้งที่ 1	การทดลองครั้งที่ 2	การทดลองครั้งที่ 3
	CD56+/CD3+ (%)	CD56+/CD3+ (%)	CD56+/CD3+ (%)
CIK	35.9	29.8	15.7
CIK coDC	52.14	32.14	38.2
CIK coZol-DC	77	68	57.8

รูปที่ 1 ปริมาณ เซลล์ที่มี CD56+/CD3+ ภายหลังการเลี้ยง PBMC เพื่อให้เจริญไปเป็น CIK ในสภาวะปกติ (CIK) สภาวะที่ได้รับการกระตุ้นด้วย dendritic cells (CIK coDC) และ สภาวะที่ได้รับการกระตุ้นด้วย dendritic cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย zoledronate acid (CIK coZol-DC)

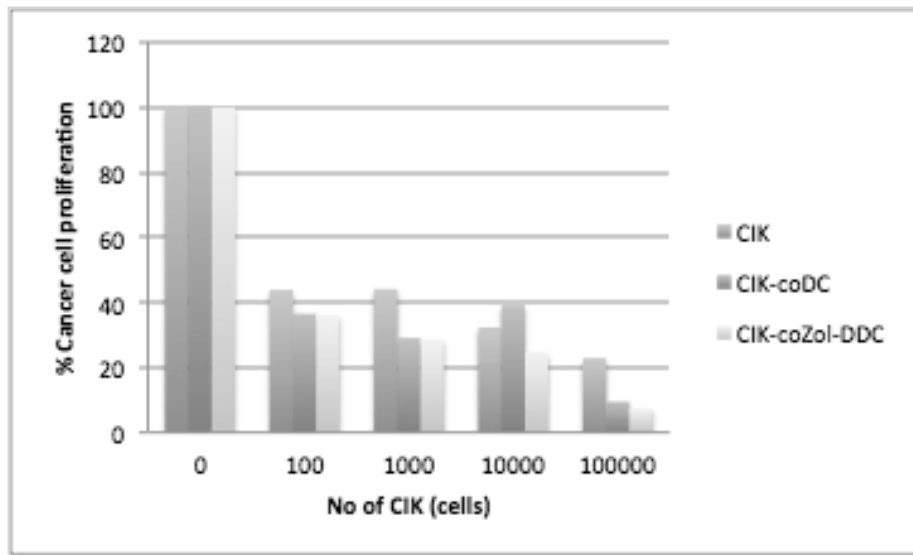


ผลการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งทางเดินน้ำดี ของ CIK

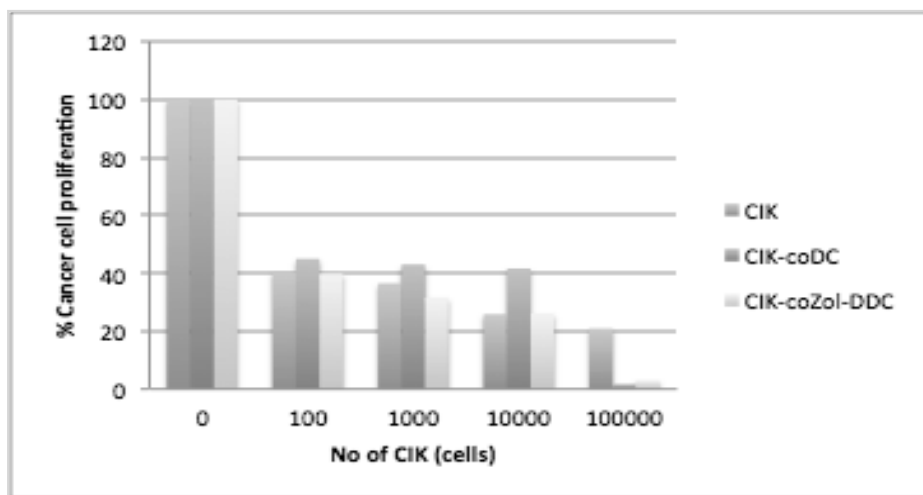
เซลล์มะเร็งทางเดินน้ำดี KKU100, KKUM213 และ RMCCA1 จำนวน 15,000 เซลล์ ถูกเลี้ยงร่วมกับ CIK ในสภาวะปกติ สภาวะที่ได้รับการกระตุ้นด้วย dendritic cells และ สภาวะที่ได้รับการกระตุ้นด้วย dendritic cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย zoledronate acid เป็นเวลา 24 ชม จากนั้นนำมาตรวจวัดการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งทางเดินน้ำดีด้วยวิธี BrDU assay ตามที่กล่าวไว้ในส่วนของวิธีการทดลอง พบว่า CIK ในสภาวะปกติ สภาวะที่ได้รับการกระตุ้นด้วย dendritic cells และ สภาวะที่ได้รับการกระตุ้นด้วย

dendritic cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย zoledronate acid สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งทางเดินน้ำดี โดยความสามารถในการยับยั้งการแบ่งตัวในแต่ละสภาวะ ขึ้นกับปริมาณ CIK ที่ใช้ และยังพบว่า CIK สภาวะที่ได้รับการกระตุ้นด้วย dendritic cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย zoledronate acid สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งทางเดินน้ำดีได้ดีกว่าสภาวะอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$; ANOVA) (รูปที่ 2A-C)

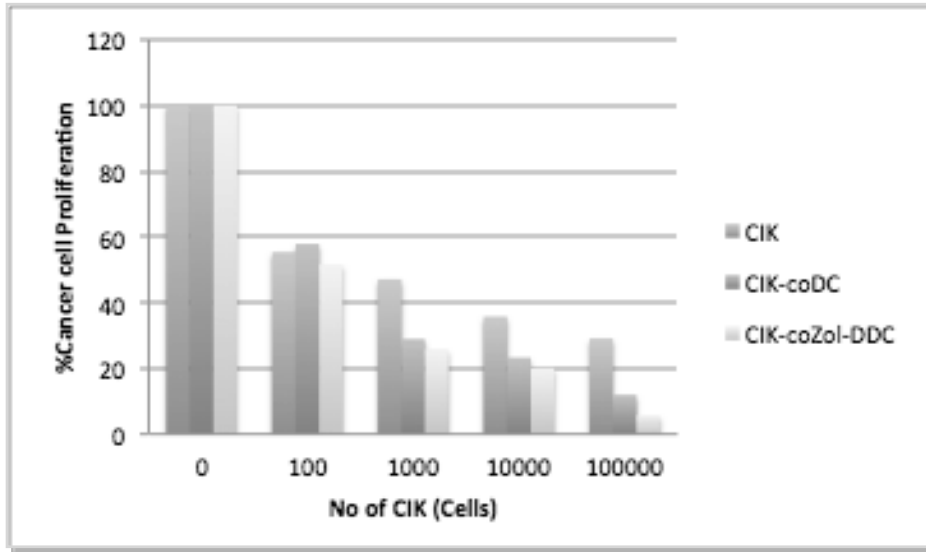
รูปที่ 2A ระดับการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งทางเดินน้ำดี KKU100 เมื่อเลี้ยงร่วมกับ CIK ในสภาวะปกติ (CIK) สภาวะที่ได้รับการกระตุ้นด้วย dendritic cells (CIK coDC) และ สภาวะที่ได้รับการกระตุ้นด้วย dendritic cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย zoledronate acid (CIK coZol-DC)



รูปที่ 2B ระดับการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งทางเดินน้ำดี KKUM213 เมื่อเลี้ยงร่วมกับ CIK ในสภาวะปกติ (CIK) สภาวะที่ได้รับการกระตุ้นด้วย dendritic cells (CIK coDC) และ สภาวะที่ได้รับการกระตุ้นด้วย dendritic cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย zoledronate acid (CIK coZol-DC)



รูปที่ 2C ระดับการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งทางเดินน้ำดี RMCCA1 เมื่อเลี้ยงร่วมกับ CIK ในสภาวะปกติ (CIK) สภาวะที่ได้รับการกระตุ้นด้วย dendritic cells (CIK coDC) และ สภาวะที่ได้รับการกระตุ้นด้วย dendritic cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย zoledronate acid (CIK coZol-DC)

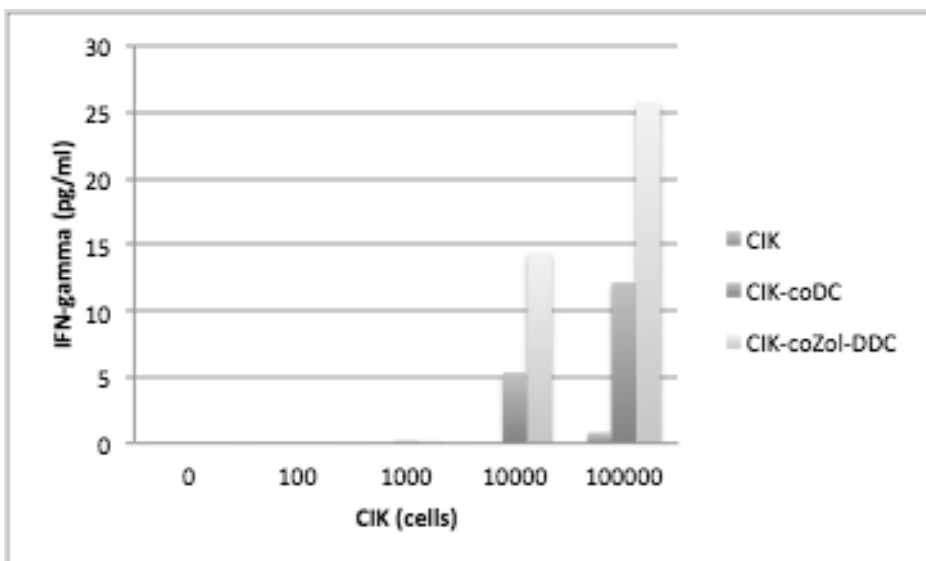


ระดับ IFN-gamma ที่วัดได้จาก culture media ที่เลี้ยง CIK

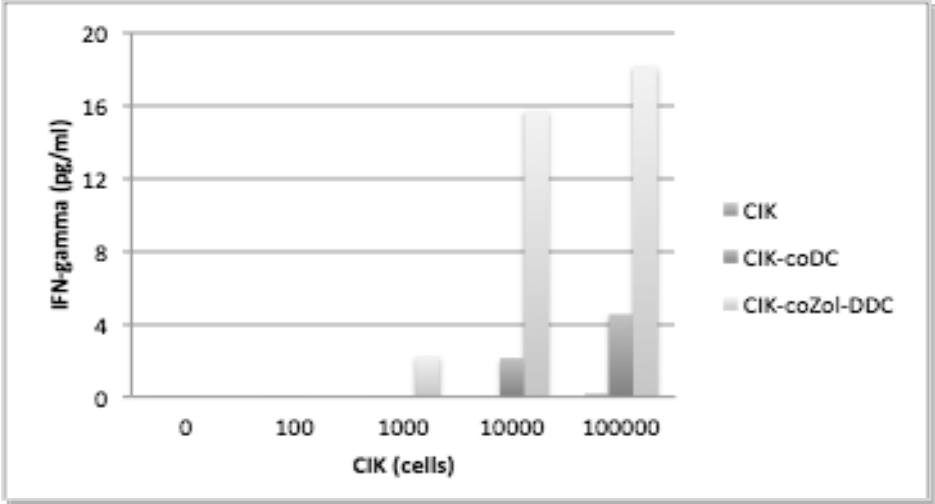
เซลล์มะเร็งทางเดินน้ำดี KKU100, KKUM213 และ RMCCA1 จำนวน 15,000 เซลล์ ถูกเลี้ยงร่วมกับ CIK ในสภาวะปกติ สภาวะที่ได้รับการกระตุ้นด้วย dendritic cells และ สภาวะที่ได้รับการกระตุ้นด้วย dendritic cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย zoledronate acid เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นนำ culture media ที่เลี้ยงเซลล์มาตรวจวัดปริมาณ IFN-gamma ด้วยวิธี ELISA assay

ผลการทดลองพบว่า ปริมาณ IFN-gamma ในแต่ละสภาวะ ขึ้นกับปริมาณ CIK ที่ใช้ และยังพบว่า culture media ที่เลี้ยงเซลล์ CIK สภาวะที่ได้รับการกระตุ้นด้วย dendritic cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย zoledronate acid มีปริมาณ IFN-gamma มากกว่าสภาวะอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$; ANOVA) (รูปที่ 3 A-C)

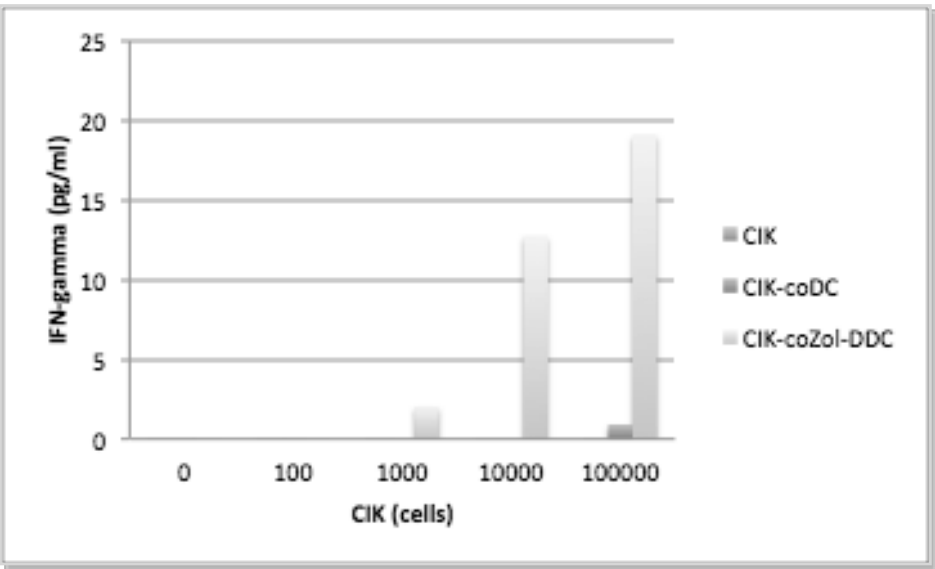
รูปที่ 3A ปริมาณ IFN-gamma ที่ได้จาก culture media จาก CIK ในสภาวะปกติ (CIK) สภาวะที่ได้รับการกระตุ้นด้วย dendritic cells (CIK coDC) และ สภาวะที่ได้รับการกระตุ้นด้วย dendritic cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย zoledronate acid (CIK coZol-DC) ที่เลี้ยงร่วมกับ เซลล์มะเร็งทางเดินน้ำดี KKU100



รูปที่ 3B ปริมาณ IFN-gamma ที่ได้จาก culture media จาก CIK ในสภาวะปกติ (CIK) สภาวะที่ได้รับการกระตุ้นด้วย dendritic cells (CIK coDC) และ สภาวะที่ได้รับการกระตุ้นด้วย dendritic cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย zoledronate acid (CIK coZol-DC) ที่เลี้ยงร่วมกับ เซลล์มะเร็งทางเดินน้ำดี KKUM213



รูปที่ 3C ปริมาณ IFN-gamma ที่ได้จาก culture media จาก CIK ในสภาวะปกติ (CIK) สภาวะที่ได้รับการกระตุ้นด้วย dendritic cells (CIK coDC) และ สภาวะที่ได้รับการกระตุ้นด้วย dendritic cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย zoledronate acid (CIK coZol-DC) ที่เลี้ยงร่วมกับ เซลล์มะเร็งทางเดินน้ำดี RMCCA1



ผลการศึกษากทางคลินิก

ภายหลังได้รับการอนุมัติให้ทำวิจัย จากคณะกรรมการจริยธรรมของโรงพยาบาลราชวิถี และจากกระทรวงสาธารณสุข ได้ทำการคัดเลือกผู้ป่วยที่มีคุณสมบัติเหมาะสม เข้าร่วมการวิจัย ตั้งแต่เดือน มกราคม ถึงเดือน ธันวาคม พ.ศ. 2554 พบว่ามีผู้ป่วยโรคมะเร็งทางเดินน้ำดี จำนวน 5 ราย ได้รับการผ่าตัดเพื่อรักษาโรคมะเร็งทางเดินน้ำดี เข้าร่วมงานวิจัย เป็นผู้ชาย 4 ราย และผู้หญิง 1 ราย อายุระหว่าง 55 - 60 ปี โดยผู้ป่วย 3 รายมีการกระจายของมะเร็งสู่ต่อมน้ำเหลือง 1 รายมีการตรวจพบเซลล์มะเร็งที่ขอบตบหลังผ่าตัด และ 1 รายมีการกระจายของมะเร็งสู่เส้นประสาท

ผู้ป่วยทั้ง 5 รายได้รับการรักษาด้วย CIK ภายหลังการผ่าตัด โดยผู้ป่วย 3 รายได้รับ CIK ครบทั้ง 4 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 1-2 เดือน ในขณะที่ผู้ป่วย 1 ราย ได้รับ CIK เพียง 1 ครั้ง รายละเอียดของผู้ป่วยแต่ละรายที่เข้าร่วมการวิจัย ที่ดังนี้

ผู้ป่วยรายที่ 1

ผู้ป่วยชายไทยคู่ อายุ 59 ปี ได้รับการวินิจฉัยเป็นมะเร็งทางเดินน้ำดีชนิดภายในตับ (Intrahepatic cholangiocarcinoma) ได้รับการผ่าตัดเมื่อ กุมภาพันธ์ 2554 ภายหลังการผ่าตัด ผลทางพยาธิวิทยาพบว่ามีเซลล์มะเร็งกระจายตัวสู่เส้นประสาท จึงได้รับการคัดเลือกเข้าร่วมโครงการวิจัย ผู้ป่วยได้รับการรักษาด้วย CIK จำนวน 4 ครั้ง

ครั้งที่ 1 ทำการเก็บเลือดผู้ป่วยจำนวน 50 มล. เมื่อ 18 มี.ค. 2554 แยกเม็ดเลือดขาวและนำไปกระตุ้นด้วย cytokine ภายหลังการกระตุ้นพบว่า เซลล์เม็ดเลือดขาวเพิ่มจำนวนจาก 28.5×10^6 เซลล์เป็น 1368×10^6 เซลล์ เมื่อพิจารณาเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด CD56+/3+ (CIK) พบว่ามีปริมาณ 54.8% ของเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งหมด จากการตรวจตัวอย่างสารละลาย CIK ไม่พบว่ามีแบคทีเรียหรือเชื้อรา ผู้ป่วยได้รับการพักในโรงพยาบาลเมื่อ 12 เม.ย. 2554 เพื่อรับ CIK เข้าทางเส้นเลือดดำส่วนปลาย พบว่า ภายหลังการฉีด CIK ผู้ป่วยมีไข้ต่ำๆ (37.5 C) เมื่อได้รับยา paracetamol อาการไข้ลดลง ผู้ป่วยสามารถออกจากโรงพยาบาลได้ในวันถัดมา โดยไม่มีภาวะแทรกซ้อนรุนแรง

ครั้งที่ 2 ทำการเก็บเลือดผู้ป่วยจำนวน 50 มล. เมื่อ 26 เม.ย. 2554 แยกเม็ดเลือดขาวและนำไปกระตุ้นด้วย cytokine ภายหลังการกระตุ้นพบว่า เซลล์เม็ดเลือดขาวเพิ่มจำนวนจาก 29.4×10^6 เซลล์เป็น $7,552 \times 10^6$ เซลล์ เมื่อพิจารณาเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด CD56+/3+ (CIK) พบว่ามีปริมาณ 81.9% ของเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งหมด

จากการตรวจตัวอย่างสารละลาย CIK ไม่พบว่ามีแบคทีเรียหรือเชื้อรา ผู้ป่วยได้รับการพักในโรงพยาบาลเมื่อ 26 พ.ค. 2554 เพื่อรับ CIK เข้าทางเส้นเลือดดำส่วนปลาย พบว่า ภายหลังการฉีด CIK ผู้ป่วยไม่มีภาวะแทรกซ้อนรุนแรง

ครั้งที่ 3 ทำการเก็บเลือดผู้ป่วยจำนวน 50 มล. เมื่อ 26 พ.ค. 2554 แยกเม็ดเลือดขาวและนำไปกระตุ้นด้วย cytokine ภายหลังการกระตุ้นพบว่า เซลล์เม็ดเลือดขาวเพิ่มจำนวนจาก 30.0×10^6 เซลล์เป็น 1334.4×10^6 เซลล์ เมื่อพิจารณาเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด CD56+/3+ (CIK) พบว่ามีปริมาณ 54.8% ของเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งหมด จากการตรวจตัวอย่างสารละลาย CIK ไม่พบว่ามีแบคทีเรียหรือเชื้อรา ผู้ป่วยได้รับการพักในโรงพยาบาลเมื่อ 21 ก.ค. 2554 เพื่อรับ CIK เข้าทางเส้นเลือดดำส่วนปลาย พบว่า ภายหลังการฉีด CIK ผู้ป่วยมีไข้ต่ำๆ (37.5 C) เมื่อได้รับยา paracetamol อาการไข้ลดลง ผู้ป่วยสามารถออกจากโรงพยาบาลได้ในวันถัดมา โดยไม่มีภาวะแทรกซ้อนรุนแรง

ครั้งที่ 4 ทำการเก็บเลือดผู้ป่วยจำนวน 50 มล. เมื่อ 24 ส.ค. 2554 แยกเม็ดเลือดขาวและนำไปกระตุ้นด้วย cytokine ภายหลังการกระตุ้นพบว่า เซลล์เม็ดเลือดขาวเพิ่มจำนวนจาก 50.0×10^6 เซลล์เป็น 2822.4×10^6 เซลล์ เมื่อพิจารณาเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด CD56+/3+ (CIK) พบว่ามีปริมาณ 74.2% ของเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งหมด จากการตรวจตัวอย่างสารละลาย CIK ไม่พบว่ามีแบคทีเรียหรือเชื้อรา ผู้ป่วยได้รับการพักในโรงพยาบาลเมื่อ 12 ก.ย. 2554 เพื่อรับ CIK เข้าทางเส้นเลือดดำส่วนปลาย พบว่า ภายหลังการฉีด CIK ผู้ป่วยไม่มีภาวะแทรกซ้อนรุนแรง

การติดตามภายหลังการรักษา

ผู้ป่วยได้รับการตรวจด้วย CT scan ช่องท้องส่วนบน และเจาะเลือดเพื่อวัดระดับ CEA และ CA 19 9 จากผลการตรวจทาง CT scan ไม่ปรากฏการกลับเป็นซ้ำของโรค และระดับ CEA และ CA 19 9 อยู่ในเกณฑ์ปกติ ประเมิน physical status (PST) ได้เท่ากับ 0 ตลอดการรักษา จากการติดตามผู้ป่วยล่าสุด เมื่อ มี.ค. 2555 ผู้ป่วยยังมีสุขภาพแข็งแรง สามารถใช้ชีวิตตามปกติ

ผู้ป่วยรายที่ 2

ผู้ป่วยชายไทยคู่ อายุ 59 ปี ได้รับการวินิจฉัยเป็นมะเร็งทางเดินน้ำดีชนิดภายในตับ (Intrahepatic cholangiocarcinoma) ได้รับการผ่าตัดเมื่อ มี.ค. 2554 ภายหลังการผ่าตัด ผลทางพยาธิวิทยาพบว่ามีเซลล์มะเร็งกระจายตัวสู่ต่อมน้ำเหลือง จึงได้รับการคัดเลือกเข้าร่วมโครงการวิจัย ผู้ป่วยได้รับการรักษาด้วย CIK จำนวน 4 ครั้ง

ครั้งที่ 1 ทำการเก็บเลือดผู้ป่วยจำนวน 50 มล. เมื่อ 15 มี.ค. 2554 แยกเม็ดเลือดขาวและนำไปกระตุ้นด้วย cytokine ภายหลังการกระตุ้นพบว่า เซลล์เม็ดเลือดขาวเพิ่มจำนวนจาก 20.0×10^6 เซลล์เป็น 1939.2×10^6 เซลล์ เมื่อพิจารณาเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด CD56+/3+ (CIK) พบว่ามีปริมาณ 88.1% ของเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งหมด จากการตรวจตัวอย่างสารละลาย CIK ไม่พบว่ามีแบคทีเรียหรือเชื้อรา ผู้ป่วยได้รับการพักในโรงพยาบาลเมื่อ 5 เม.ย. 2554 เพื่อรับ CIK เข้าทางเส้นเลือดดำส่วนปลาย พบว่า ภายหลังการฉีด CIK ผู้ป่วยมีไข้ต่ำๆ (37.5 C) เมื่อได้รับยา paracetamol อาการไข้ลดลง ผู้ป่วยสามารถออกจากโรงพยาบาลได้ในวันถัดมา โดยไม่มีภาวะแทรกซ้อนรุนแรง

ครั้งที่ 2 ทำการเก็บเลือดผู้ป่วยจำนวน 50 มล. เมื่อ 26 เม.ย 2554 แยกเม็ดเลือดขาวและนำไปกระตุ้นด้วย cytokine ภายหลังการกระตุ้นพบว่า เซลล์เม็ดเลือดขาวเพิ่มจำนวนจาก 22.0×10^6 เซลล์เป็น $8,818.0 \times 10^6$ เซลล์ เมื่อพิจารณาเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด CD56+/3+ (CIK) พบว่ามีปริมาณ 75.3% ของเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งหมด จากการตรวจตัวอย่างสารละลาย CIK ไม่พบว่ามีแบคทีเรียหรือเชื้อรา ผู้ป่วยได้รับการพักในโรงพยาบาลเมื่อ 19 พ.ค. 2554 เพื่อรับ CIK เข้าทางเส้นเลือดดำส่วนปลาย พบว่า ภายหลังการฉีด CIK ผู้ป่วยไม่มีภาวะแทรกซ้อนรุนแรง

ครั้งที่ 3 ทำการเก็บเลือดผู้ป่วยจำนวน 50 มล. เมื่อ 12 ก.ค. 2554 แยกเม็ดเลือดขาวและนำไปกระตุ้นด้วย cytokine ภายหลังการกระตุ้นพบว่า เซลล์เม็ดเลือดขาวเพิ่มจำนวนจาก 40.0×10^6 เซลล์เป็น 2937.6×10^6 เซลล์ เมื่อพิจารณาเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด CD56+/3+ (CIK) พบว่ามีปริมาณ 68.2% ของเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งหมด จากการตรวจตัวอย่างสารละลาย CIK ไม่พบว่ามีแบคทีเรียหรือเชื้อรา ผู้ป่วยได้รับการพักในโรงพยาบาลเมื่อ 3 ส.ค. 2554 เพื่อรับ CIK เข้าทางเส้นเลือดดำส่วนปลาย พบว่า ภายหลังการฉีด CIK ผู้ป่วยมีไข้ต่ำๆ (37.5 C) เมื่อได้รับยา paracetamol อาการไข้ลดลง ผู้ป่วยสามารถออกจากโรงพยาบาลได้ในวันถัดมา โดยไม่มีภาวะแทรกซ้อนรุนแรง

ครั้งที่ 4 ทำการเก็บเลือดผู้ป่วยจำนวน 50 มล. เมื่อ 9 ส.ค. 2554 แยกเม็ดเลือดขาวและนำไปกระตุ้นด้วย cytokine ภายหลังการกระตุ้นพบว่า เซลล์เม็ดเลือดขาวเพิ่มจำนวนจาก 33.4×10^6 เซลล์เป็น 1670.4×10^6 เซลล์ เมื่อพิจารณาเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด CD56+/3+ (CIK) พบว่ามีปริมาณ 50.3% ของเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งหมด จากการตรวจตัวอย่างสารละลาย CIK ไม่พบว่ามีแบคทีเรียหรือเชื้อรา ผู้ป่วยได้รับการพักในโรงพยาบาลเมื่อ 12 ก.ย. 2554 เพื่อรับ CIK เข้าทางเส้นเลือดดำส่วนปลาย พบว่า ภายหลังการฉีด CIK ผู้ป่วยไม่มีภาวะแทรกซ้อนรุนแรง

การติดตามภายหลังการรักษา

ผู้ป่วยได้รับการตรวจด้วย CT scan ช่องท้องส่วนบน และเจาะเลือดเพื่อวัดระดับ CEA และ CA 19-9 จากผลการตรวจทาง CT scan ไม่ปรากฏการกลับเป็นซ้ำของโรค และระดับ CEA และ CA 19 9 อยู่ในเกณฑ์ปกติ ประเมิน physio status (PST) ได้เท่ากับ 0 ตลอดการรักษา จากการติดตามผู้ป่วยล่าสุด เมื่อ มี.ค. 2555 ผู้ป่วยยังมีสุขภาพแข็งแรง สามารถใช้ชีวิตตามปกติ]

ผู้ป่วยรายที่ 3

ผู้ป่วยหญิงไทยคู่ อายุ 56 ปี ได้รับการวินิจฉัยเป็นมะเร็งทางเดินน้ำดีชนิดขั้ว (Hilar cholangiocarcinoma) ได้รับการผ่าตัดเมื่อ มี.ค 2554 ภายหลังการผ่าตัด ผลทางพยาธิวิทยาพบว่ามีเซลล์มะเร็งกระจายตัวไปยังต่อมน้ำเหลือง จึงได้รับการคัดเลือกเข้าร่วมโครงการวิจัย ผู้ป่วยได้รับการรักษาด้วย CIK จำนวน 4 ครั้ง

ครั้งที่ 1 ทำการเก็บเลือดผู้ป่วยจำนวน 50 มล. เมื่อ 29 มี.ค. 2554 แยกเม็ดเลือดขาวและนำไปกระตุ้นด้วย cytokine ภายหลังการกระตุ้นพบว่า เซลล์เม็ดเลือดขาวเพิ่มจำนวนจาก 27.2×10^6 เซลล์เป็น 2918.4×10^6 เซลล์ เมื่อพิจารณาเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด CD56+/3+ (CIK) พบว่ามีปริมาณ 59.5% ของเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งหมด จากการตรวจตัวอย่างสารละลาย CIK ไม่พบว่ามีแบคทีเรียหรือเชื้อรา ผู้ป่วยได้รับการพักในโรงพยาบาลเมื่อ 26 เม.ย. 2554 เพื่อรับ CIK เข้าทางเส้นเลือดดำส่วนปลาย พบว่า ภายหลังการฉีด CIK ผู้ป่วยมีไข้ต่ำๆ (37.5 C) เมื่อได้รับยา paracetamol อาการไข้ลดลง ผู้ป่วยสามารถออกจากโรงพยาบาลได้ในวันถัดมา โดยไม่มีภาวะแทรกซ้อนรุนแรง

ครั้งที่ 2 ทำการเก็บเลือดผู้ป่วยจำนวน 50 มล. เมื่อ 26 เมย 2554 แยกเม็ดเลือดขาวและนำไปกระตุ้นด้วย cytokine ภายหลังการกระตุ้นพบว่า เซลล์เม็ดเลือดขาวเพิ่มจำนวนจาก 28.5×10^6 เซลล์เป็น 3283.0×10^6 เซลล์ เมื่อพิจารณาเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด CD56+/3+ (CIK) พบว่ามีปริมาณ 54.5% ของเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งหมด จากการตรวจตัวอย่างสารละลาย CIK ไม่พบว่ามีแบคทีเรียหรือเชื้อรา ผู้ป่วยได้รับการพักในโรงพยาบาลเมื่อ 6 มิย. 2554 เพื่อรับ CIK เข้าทางเส้นเลือดดำส่วนปลาย พบว่า ภายหลังการฉีด CIK ผู้ป่วยไม่มีภาวะแทรกซ้อนรุนแรง

ครั้งที่ 3 ทำการเก็บเลือดผู้ป่วยจำนวน 50 มล. เมื่อ 2 ส.ค. 2554 แยกเม็ดเลือดขาวและนำไปกระตุ้นด้วย cytokine ภายหลังการกระตุ้นพบว่า เซลล์เม็ดเลือดขาวเพิ่มจำนวนจาก 28.0×10^6 เซลล์เป็น 2035.6×10^6 เซลล์ เมื่อพิจารณาเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด CD56+/3+ (CIK)

พบว่าปริมาณ 57.1% ของเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งหมด จากการตรวจตัวอย่างสารละลาย CIK ไม่พบว่ามีแบคทีเรียหรือเชื้อรา ผู้ป่วยได้รับการพักในโรงพยาบาลเมื่อ 31 ส.ค. 54 เพื่อรับ CIK เข้าทางเส้นเลือดดำส่วนปลาย พบว่า ภายหลังการฉีด CIK ผู้ป่วยมีไข้ต่ำๆ (37.5 C) เมื่อได้รับยา paracetamol อาการไข้ลดลง ผู้ป่วยสามารถออกจากโรงพยาบาลได้ในวันถัดมา โดยไม่มีภาวะแทรกซ้อนรุนแรง

ครั้งที่ 4 ทำการเก็บเลือดผู้ป่วยจำนวน 50 มล. เมื่อ 31 ส.ค. 2554 แยกเม็ดเลือดขาวและนำไปกระตุ้นด้วย cytokine ภายหลังการกระตุ้นพบว่า เซลล์เม็ดเลือดขาวเพิ่มจำนวนจาก 28.0×10^6 เซลล์เป็น 2059.8×10^6 เซลล์ เมื่อพิจารณาเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด CD56+/3+ (CIK) พบว่ามีปริมาณ 72.8 % ของเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งหมด จากการตรวจตัวอย่างสารละลาย CIK ไม่พบว่ามีแบคทีเรียหรือเชื้อรา ผู้ป่วยได้รับการพักในโรงพยาบาลเมื่อ 29 ก.ย. 2554 เพื่อรับ CIK เข้าทางเส้นเลือดดำส่วนปลาย พบว่า ภายหลังการฉีด CIK ผู้ป่วยไม่มีภาวะแทรกซ้อนรุนแรง

การติดตามภายหลังการรักษา

ผู้ป่วยได้รับการตรวจด้วย CT scan ช่องท้องส่วนบน และเจาะเลือดเพื่อวัดระดับ CEA และ CA 19-9 จากผลการตรวจทาง CT scan ไม่ปรากฏการกลับเป็นซ้ำของโรค และระดับ CEA และ CA 19 9 อยู่ในเกณฑ์ปกติ ประเมิน physical status (PST) ได้เท่ากับ 0-1 ตลอดการรักษา อย่างไรก็ตามจากการติดตามผู้ป่วย เมื่อ ธ.ค. 2554 พบว่าผู้ป่วยเสียชีวิตจากการติดเชื้อในเยื่อหุ้มหัวใจ ภายหลังเข้าพักในโรงพยาบาลด้วยภาวะไข้สูง เหนื่อย อ่อนเพลียมาก การตรวจด้วย echocardiogram พบน้ำในเยื่อหุ้มหัวใจ

ผู้ป่วยรายที่ 4

ผู้ป่วยชายไทยคู่ อายุ 60 ปี ได้รับการวินิจฉัยเป็นมะเร็งทางเดินน้ำดีชนิดขั้วตับ (Hilar cholangiocarcinoma) ได้รับการผ่าตัดเมื่อ มี.ค. 2554 ภายหลังการผ่าตัดผลทางพยาธิวิทยาพบว่า มีเซลล์มะเร็งกระจายตัวไปยังเนื้อตับที่เหลือ จึงได้รับการคัดเลือกเข้าร่วมโครงการวิจัย ผู้ป่วยได้รับการรักษาด้วย CIK จำนวน 1 ครั้ง

ครั้งที่ 1 ทำการเก็บเลือดผู้ป่วยจำนวน 50 มล. เมื่อ 10 มี.ค. 2554 แยกเม็ดเลือดขาวและนำไปกระตุ้นด้วย cytokine ภายหลังการกระตุ้นพบว่า เซลล์เม็ดเลือดขาวเพิ่มจำนวนจาก 24.2×10^6 เซลล์เป็น 2352.0×10^6 เซลล์ เมื่อพิจารณาเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด CD56+/3+ (CIK) พบว่ามีปริมาณ 71.8% ของเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งหมด จากการตรวจตัวอย่างสารละลาย CIK ไม่พบว่ามีแบคทีเรียหรือเชื้อรา ผู้ป่วยได้รับการพักในโรงพยาบาลเมื่อ 1 เม.ย. 2554 เพื่อรับ CIK เข้าทางเส้นเลือดดำส่วนปลาย พบว่า ภายหลัง

การฉีด CIK ผู้ป่วยมีไข้ต่ำๆ (37.5 C) เมื่อได้รับยา paracetamol อาการไข้ลดลง ผู้ป่วยสามารถออกจากโรงพยาบาลได้ในวันถัดมา โดยไม่มีภาวะแทรกซ้อนรุนแรง

การติดตามภายหลังการรักษา

ผู้ป่วยได้รับการตรวจด้วย CT scan ช่องท้องส่วนบน และเจาะเลือดเพื่อวัดระดับ CEA และ CA 19-9 จากผลการตรวจทาง CT scan เมื่อ พ.ค. 2554 ไม่ปรากฏการกลับเป็นซ้ำของโรค และระดับ CEA และ CA 19 9 อยู่ในเกณฑ์ปกติ ประเมิน physical status (PST) ได้เท่ากับ 0 อย่างไรก็ตามผู้ป่วย ไม่ได้กลับเข้ารับรักษาตัวต่อเนื่องจากมีอาการปวดหลัง จำเป็นต้องรักษาตัวที่โรงพยาบาลในต่างจังหวัด จึงไม่สามารถประเมินผู้ป่วยต่อได้

ผู้ป่วยรายที่ 5

ผู้ป่วยชายไทยคู่ อายุ 55 ปี ได้รับการวินิจฉัยเป็นมะเร็งทางเดินน้ำดีชนิดในตับ (Peripheral cholangiocarcinoma) ได้รับการผ่าตัดเมื่อ ก.ค. 2554 ภายหลังการผ่าตัด ผลทางพยาธิวิทยาพบว่า มีเซลล์มะเร็งกระจายตัวไปยังต่อมน้ำเหลือง จึงได้รับการคัดเลือกเข้าร่วมโครงการวิจัย ผู้ป่วยได้รับการรักษาด้วย CIK จำนวน 2 ครั้ง

ครั้งที่ 1 ทำการเก็บเลือดผู้ป่วยจำนวน 50 มล. เมื่อ 26 ส.ค. 2554 แยกเม็ดเลือดขาวและนำไปกระตุ้นด้วย cytokine ภายหลังการกระตุ้นพบว่า เซลล์เม็ดเลือดขาวเพิ่มจำนวนจาก 40.0×10^6 เซลล์เป็น 4883.2×10^6 เซลล์ เมื่อพิจารณาเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด CD56+/3+ (CIK) พบว่ามีปริมาณ 42.1% ของเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งหมด จากการตรวจตัวอย่างสารละลาย CIK ไม่พบว่ามีแบคทีเรียหรือเชื้อรา ผู้ป่วยได้รับการพักในโรงพยาบาลเมื่อ 15 ก.ย. 2554 เพื่อรับ CIK เข้าทางเส้นเลือดดำส่วนปลาย พบว่า ภายหลังการฉีด CIK ผู้ป่วยมีไข้ต่ำๆ (37.5 C) เมื่อได้รับยา paracetamol อาการไข้ลดลง ผู้ป่วยสามารถออกจากโรงพยาบาลได้ในวันถัดมา โดยไม่มีภาวะแทรกซ้อนรุนแรง

ครั้งที่ 2 ทำการเก็บเลือดผู้ป่วยจำนวน 50 มล. เมื่อ 15 ก.ย. 2554 แยกเม็ดเลือดขาวและนำไปกระตุ้นด้วย cytokine ภายหลังการกระตุ้นพบว่า เซลล์เม็ดเลือดขาวเพิ่มจำนวนจาก 20.5×10^6 เซลล์เป็น 3763.0×10^6 เซลล์ เมื่อพิจารณาเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด CD56+/3+ (CIK) พบว่ามีปริมาณ 61.9% ของเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งหมด จากการตรวจตัวอย่างสารละลาย CIK ไม่พบว่ามีแบคทีเรียหรือเชื้อรา ผู้ป่วยได้รับการพักในโรงพยาบาลเมื่อ 5 ต.ค. 2554 เพื่อรับ CIK เข้าทางเส้นเลือดดำส่วนปลาย พบว่า ภายหลังการฉีด CIK ผู้ป่วยไม่มีภาวะแทรกซ้อนรุนแรง

การติดตามภายหลังการรักษา

ผู้ป่วยได้รับการตรวจด้วย CT scan ช่องท้องส่วนบน และเจาะเลือดเพื่อวัดระดับ CEA และ CA 19-9 จากผลการตรวจทาง CT scan เมื่อ ตค 2554 ไม่ปรากฏการกลับเป็นซ้ำของโรค และระดับ CEA และ CA 19 9 อยู่ใน

เกณฑ์ปกติ ประเมิน physical status (PST) ได้เท่ากับ 0 อย่างไรก็ตามผู้ป่วย ไม่ได้กลับเข้ารับรักษาตัวต่อเนื่องจากปัญหาทุกภัยเมื่อปลายปี 2554 จึงไม่สามารถประเมินผู้ป่วยต่อได้

วิเคราะห์ผลการทดลอง

มะเร็งทางเดินน้ำดีเป็นมะเร็งที่เกิดจากเซลล์เยื่อบุของท่อทางเดินน้ำดี หากคิดจากมะเร็งที่เกิดขึ้นจากตับจะพบว่ามีร้อยละ 10 ถึง 25 เป็นมะเร็งท่อทางเดินน้ำดี ส่วนในประเทศทางตะวันตกพบอุบัติการณ์ของมะเร็งท่อทางเดินน้ำดีอยู่ระหว่าง 0.3 ถึง 1.5 ต่อ 100,000 ราย สำหรับประเทศไทยนั้นพบอุบัติการณ์ของมะเร็งท่อทางเดินน้ำดีสูงกว่าประเทศทางตะวันตกมาก สำหรับผู้ชายพบอุบัติการณ์สูงกว่า 33.4 ต่อ 100,000 และในผู้หญิงเท่ากับ 12.3 ต่อ 100,000. ส่วนภาคที่มีอุบัติการณ์สูงที่สุดในประเทศไทยคือภาคตะวันออกเฉียงเหนือเนื่องจากมีความชุกของการติดเชื้อของพยาธิใบไม้ในตับ *O. viverrini* มากที่สุด โดยคาดว่าน่าจะมีผู้ป่วยที่สงสัยว่าเป็นมะเร็งท่อทางเดินน้ำดีที่ไม่มีอาการประมาณ 100,000 ราย จากประชากรทั้งสิ้น 20 ล้านคน การพยากรณ์โรคโดยรวมสำหรับมะเร็งท่อทางเดินน้ำดีนั้นถือว่าแย่มาก พบว่าอัตราการมีชีวิตรอดที่ 5 ปี น้อยกว่าร้อยละ 5 คาดการณ์อายุเฉลี่ยของผู้ป่วยมะเร็งท่อทางเดินน้ำดีชนิดที่อยู่ภายในเนื้อตับ (intrahepatic cholangiocarcinoma) อยู่ที่ 18-30 เดือน และอายุเฉลี่ยเฉลี่ยจะสั้นลงสำหรับผู้ป่วยมะเร็งท่อทางเดินน้ำดีชนิดที่อยู่รอบขั้วตับ (perihilar cholangiocarcinoma) ซึ่งจะอยู่ที่ 12-24 เดือน การรักษาโดยการผ่าตัดสำหรับผู้ป่วยในระยะเริ่มแรกเป็นวิธีการรักษาเพียงวิธีเดียวที่สามารถทำให้ผู้ป่วยหายขาดได้ อย่างไรก็ตามพบว่าร้อยละ 60 ถึง 90 ของผู้ป่วยจะมีการกลับเป็นซ้ำอีกของโรคภายใน 5 ปีหลังการผ่าตัด นอกจากนี้ผู้ป่วยจำนวนมากมักจะพบแพทย์ครั้งแรกด้วยระยะของโรคที่ลุกลามแล้ว ซึ่งไม่สามารถรักษาด้วยวิธีการผ่าตัดได้ และร้อยละ 75 ของผู้ป่วยกลุ่มนี้จะเสียชีวิตภายใน 1 ปีหลังจากการวินิจฉัยครั้งแรก สาเหตุเนื่องจากในปัจจุบันยังไม่มียาเคมีบำบัดที่ได้ผลสำหรับการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งทางเดินน้ำดี ดังนั้นการวิจัยนี้จึงจัดทำเพื่อศึกษาผลของ CIK ต่อเซลล์มะเร็งทางเดินน้ำดี

CIK เซลล์ทำลายเซลล์มะเร็ง โดยไม่ขึ้นกับ MHC บนผนังเซลล์ ผนังเซลล์ที่ออกฤทธิ์คือ เซลล์ที่มีการแสดงออกของ CD3+ CD56+ การออกฤทธิ์ของ CIK โดยโมเลกุลดังกล่าวจะไปจับกับ ligand (MHC-unrestricted) บนผิวของ

เซลล์มะเร็ง ทำให้มีการกระตุ้นของ perforin และ granzyme จาก CIK เซลล์ออกมาทำลายเซลล์มะเร็ง จากการศึกษาในหลอดทดลอง (in vitro) ทำลายเซลล์มะเร็งได้หลายชนิด ทั้งเซลล์มะเร็งปอด มะเร็งทางเดินอาหาร และมะเร็งตับ จากการศึกษาพบว่า CIK เซลล์ ที่ได้จากผู้ป่วยโรคมะเร็งทางเดินน้ำดี สามารถออกฤทธิ์ทำลายเซลล์มะเร็งทางเดินน้ำดีในหลอดทดลองได้เป็นอย่างดี ดังนั้น จึงได้นำมาใช้กับผู้ป่วยโรคมะเร็งทางเดินน้ำดี เพื่อศึกษาความปลอดภัยของการรักษาและผลการรักษาด้วย CIK เซลล์

การศึกษานี้ วางแผนคัดเลือกผู้ป่วย 10 รายเข้าร่วมโครงการ แต่มีปัญหาแง่ของจำนวนผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษา และช่วงเวลาที่ยากเกี่ยวกับการเกิดทุกภัยใหญ่ปลายปี 2554 ทำให้มีผู้ป่วยเข้าร่วมการวิจัยเพียง 5 ราย พบว่าผู้ป่วยที่เข้าร่วมการวิจัยทั้งหมด สามารถรับการรักษาด้วย CIK ได้ ไม่พบภาวะแทรกซ้อนที่รุนแรง ซึ่งผลที่ได้ในแง่ความปลอดภัยนี้ ตรงกับรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ ที่พบว่าการรักษาด้วย CIK ในผู้ป่วยมะเร็งต่อมน้ำเหลือง มะเร็งไต และมะเร็งตับ มีภาวะแทรกซ้อนน้อย และยังมีผู้ป่วยบางรายหายจากโรค (complete response) อีกด้วย และจากการศึกษาในประเทศเยอรมันพบว่า ผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วย CIK เซลล์ มีระยะเวลาปลอดจากโรค (disease-free survival) ดีกว่าผู้ป่วยกลุ่มควบคุมอีกด้วย

อย่างไรก็ตามจากการศึกษานี้พบว่ามีผู้ป่วย 1 ราย เสียชีวิตด้วยภาวะเยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ แม้ว่าการเกิดภาวะนี้จะเกิดหลังจากการรักษาด้วย CIK เซลล์นานถึง 2 เดือน ความสัมพันธ์ระหว่างการรักษาด้วย CIK เซลล์ และ ภาวะเยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ จึงควรพิจารณาอย่างใกล้ชิด ข้อจำกัดของการรักษาด้วย CIK เซลล์ คือ ราคาแพง เนื่องจากราคาสารเคมีและวัสดุที่ใช้เตรียม CIK เซลล์ มีราคาสูงมาก และต้องใช้นักวิทยาศาสตร์ที่มีความเชี่ยวชาญในเรื่องการเพาะเลี้ยงเซลล์ให้ปราศจากเชื้อ จึงทำให้การรักษาด้วย CIK เซลล์ไม่เป็นที่แพร่หลายเท่าที่ควร

สรุปผลการทดลอง

CIK เซลล์ (CD56+/3+) สามารถเตรียมได้จากเลือดผู้ป่วยโรคมะเร็งทางเดินน้ำดี ปริมาณเม็ดเลือดขาวและปริมาณ CIK เซลล์ มีจำนวนเพิ่มมากขึ้นภายหลังการกระตุ้นด้วย cytokines เมื่อนำกลับมาฉีดให้ผู้ป่วย พบว่าไม่มีภาวะแทรกซ้อนที่รุนแรง ผู้ป่วยสามารถทนต่อการรักษา

ด้วย CIK เซลล์ได้ดี อาจมีไข้ต่ำๆ จากการศึกษาในผู้ป่วย 3 ราย ยังมีชีวิตอยู่และปราศจากการเป็นซ้ำของโรค อย่างไรก็ตาม การประเมินผลของการรักษาด้วย CIK เซลล์ ต่อการรอดชีวิตของผู้ป่วยโรคมะเร็งทางเดินน้ำดี อาจมีการศึกษาเพิ่มเติมในการวิจัยที่รวบรวมผู้ป่วยจำนวนมากกว่านี้

เอกสารอ้างอิง

1. Blechacz B, Gores GJ. Cholangiocarcinoma: advances in pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Hepatology* 2008 Jul;48(1):308-21.
2. Sripa B, Pairojkul C. Cholangiocarcinoma: lessons from Thailand. *Curr Opin Gastroenterol* 2008 May;24(3):349-56.
3. Sandhu DS, Roberts LR. Diagnosis and management of cholangiocarcinoma. *Curr Gastroenterol Rep* 2008 Feb;10(1):43-52.
4. Patel T, Singh P. Cholangiocarcinoma: emerging approaches to a challenging cancer. *Curr Opin Gastroenterol* 2007 May;23(3):317-23.
5. Dingle BH, Rumble RB, Brouwers MC. The role of gemcitabine in the treatment of cholangiocarcinoma and gallbladder cancer: a systematic review. *Can J Gastroenterol* 2005 Dec;19(12):711-6.
6. Eckel F, Schmid RM. Chemotherapy in advanced biliary tract carcinoma: a pooled analysis of clinical trials. *Br J Cancer* 2007 Mar 26;96(6):896-902.
7. Hezel AF, Zhu AX. Systemic therapy for biliary tract cancers. *Oncologist* 2008 Apr;13(4):415-23.
8. Shi M, Zhang B, Tang ZR, Lei ZY, Wang HF, Feng YY, et al. Autologous cytokine-induced killer cell therapy in clinical trial phase I is safe in patients with primary hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004 Apr 15;10(8):1146-51.
9. Chang XH, Cheng HY, Cheng YX, Ye X, Guo HF, Fu TY, et al. [Specific immune cell therapy against ovarian cancer in vivo and in vitro]. *Ai Zheng* 2008 Dec;27(12):1244-50.
10. Chen FX, Liu JQ, Zhang NZ, Gong XJ, Zhang GL, Xu YM, et al. [Clinical observation on adoptive immunotherapy with autologous cytokine-induced killer cells for advanced malignant tumor]. *Ai Zheng* 2002 Jul;21(7):797-801.
11. Du Z, Zhao XL, Gao YT, Wu CX, Wang YJ, Zhu ZY, et al. [Induction of dendritic cells from intra-operative lost blood and their effects on CIK against liver cancer cells in vitro]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2008 Oct;30(10):759-63.
12. Franceschetti M, Pievani A, Borleri G, Vago L, Fleischhauer K, Golay J, et al. Cytokine-induced killer cells are terminally differentiated activated CD8 cytotoxic T-EMRA lymphocytes. *Exp Hematol* 2009 May;37(5):616-28 e2.

13. Hui D, Qiang L, Jian W, Ti Z, Da-Lu K. A randomized, controlled trial of postoperative adjuvant cytokine-induced killer cells immunotherapy after radical resection of hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis* 2009 Jan;41(1):36-41.
14. Introna M, Borleri G, Conti E, Franceschetti M, Barbui AM, Broady R, et al. Repeated infusions of donor-derived cytokine-induced killer cells in patients relapsing after allogeneic stem cell transplantation: a phase I study. *Haematologica* 2007 Jul;92(7):952-9.
15. Jiang J, Xu N, Wu C, Deng H, Lu M, Li M, et al. Treatment of advanced gastric cancer by chemotherapy combined with autologous cytokine-induced killer cells. *Anti-cancer Res* 2006 May-Jun;26(3B):2237-42.
16. Kim HM, Kang JS, Lim J, Park SK, Lee K, Yoon YD, et al. Inhibition of human ovarian tumor growth by cytokine-induced killer cells. *Arch Pharm Res* 2007 Nov;30(11):1464-70.
17. Kim HM, Lim J, Kang JS, Park SK, Lee K, Kim JY, et al. Inhibition of human cervical carcinoma growth by cytokine-induced killer cells in nude mouse xenograft model. *Int. Immunopharmacol* 2009 Mar;9(3):375-80.
18. Kim HM, Lim J, Park SK, Kang JS, Lee K, Lee CW, et al. Antitumor activity of cytokine-induced killer cells against human lung cancer. *Int Immunopharmacol* 2007 Dec 15;7(13):1802-7.
19. Kim HM, Lim J, Yoon YD, Ahn JM, Kang JS, Lee K, et al. Anti-tumor activity of ex vivo expanded cytokine-induced killer cells against human hepatocellular carcinoma. *Int. Immunopharmacol* 2007 Dec 15;7(13):1793-801.
20. Kornacker M, Verneris M, Kornacker B, Ganten T, Scheffold C, Negrin R. The apoptotic and proliferative fate of cytokine-induced killer cells after redirection to tumor cells with bispecific Ab. *Cytotherapy* 2006;8(1):13-23.
21. Leemhuis T, Wells S, Scheffold C, Edinger M, Negrin RS. A phase I trial of autologous cytokine-induced killer cells for the treatment of relapsed Hodgkin disease and non-Hodgkin lymphoma. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005 Mar;11(3):181-7.
22. Li H, Yu JP, Cao S, Wei F, Zhang P, An XM, et al. CD4 +CD25 + regulatory T cells decreased the antitumor activity of cytokine-induced killer (CIK) cells of lung cancer patients. *J Clin Immunol* 2007 May;27(3):317-26.
23. Linn YC, Hui KM. Cytokine-induced killer cells: NK-like T cells with cytolytic specificity against leukemia. *Leuk Lymphoma* 2003 Sep;44(9):1457-62.
24. Liu P, Chen L, Huang X. The antitumor effects of CIK cells combined with docetaxel against drug-resistant lung adenocarcinoma cell line SPC-A1/DTX in vitro and in vivo. *Cancer Biother Radiopharm* 2009 Feb;24(1):91-8.
25. Oliosio P, Giancola R, Di Riti M, Contento A, Accorsi P, Iacone A. Immunotherapy with cytokine induced killer cells in solid and hematopoietic tumours: a pilot clinical trial. *Hematol Oncol* 2009 Mar 17.

26. Schmidt-Wolf IG, Finke S, Trojaneck B, Denkena A, Lefterova P, Schwella N, et al. Phase I clinical study applying autologous immunological effector cells transfected with the interleukin-2 gene in patients with metastatic renal cancer, colorectal cancer and lymphoma. *Br J Cancer* 1999 Nov;81(6):1009-16.
27. Su HB, Li HW, Zhao HL, Shi M, Zhang B, Tang ZR, et al. [Therapeutic effect of autologous cytokine-induced killer cells on patients with liver cirrhosis caused by HBV infection]. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi* 2007 Mar;21(1):64-6.
28. Tita-Nwa F, Moldenhauer G, Herbst M, Kleist C, Ho AD, Kornacker M. Cytokine-induced killer cells targeted by the novel bispecific antibody CD19xCD5 (HD37xT5.16) efficiently lyse B-lymphoma cells. *Cancer Immunol Immunother* 2007 Dec;56(12):1911-20.
29. Wang J, He M, Shi W, Sha H, Feng J, Wang S, et al. Inducible costimulator (ICOS) enhances the cytolytic activity of cytokine-induced killer cells against gallbladder cancer in vitro and in vivo. *Cancer Invest* 2009 Mar;27(3):244-50.
30. Wei XC, Zhai XH, Han XR, Yang DD, Zhao WL. Biological activity of DC-CIK cells and its effect against leukemia cells in vitro. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2008 Oct;16(5):1150-3.
31. Weng DS, Zhou J, Zhou QM, Zhao M, Wang QJ, Huang LX, et al. Minimally invasive treatment combined with cytokine-induced killer cells therapy lower the short-term recurrence rates of hepatocellular carcinomas. *J Immunother* 2008 Jan;31(1):63-71.
32. Wongkajornsilp A, Somchitprasert T, Butraporn R, Wamanuttajinda V, Kasetsin-sombat K, Huabprasert S, et al. Human cytokine-induced killer cells specifically infiltrated and retarded the growth of the inoculated human cholangiocarcinoma cells in SCID mice. *Cancer Invest* 2009 Feb;27(2):140-8.
33. Wu C, Jiang J, Shi L, Xu N. Prospective study of chemotherapy in combination with cytokine-induced killer cells in patients suffering from advanced non-small cell lung cancer. *Anticancer Res* 2008 Nov-Dec;28(6B):3997-4002.
34. Zhao M, Wu PH, Zeng YX, Xia JC, Zhang FJ, Xian LJ, et al. [Cytokine-induced killer cell fusion to lower recurrence of hepatocellular carcinoma after transcatheter arterial chemoembolization sequentially combined with radiofrequency ablation: a randomized trial]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2006 Jul 11;86(26):1823-8.
35. Zhu BQ, Song-Wen J, Yong-Qian S. CD137 enhances cytotoxicity of CD3(+)CD56(+) cells and their capacities to induce CD4(+) Th1 responses. *Biomed Pharmacother* 2008 Oct 31