รายงานการวิจัย

โครงการวิจัยเพื่อพัฒนาเซลล์ต้นกำเนิดเส้นผม

Research Project for Development of Human Hair Follicle Stem Cells

คณะผู้วิจัย

ศาสตราจารย์ นายแพทย์ประวิตร อัศวานนท์ (หัวหน้าโครงการ)

อาจารย์ แพทย์หญิงรัชต์ธร หมอนจันทร์ (นักวิจัยร่วมโครงการ)

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ ถนอม บรรณประเสริฐ (นักวิจัยร่วมโครงการ)

หน่วยงานหลัก

ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณสถาบัน องค์กร หน่วยงาน และบุคคลที่ให้ความช่วยเหลือช่วยเหลือและสนับสนุนเป็นอย่างดียิ่งดังต่อไปนี้

สภาวิจัยแห่งชาติ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สภากาชาดไทย

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศูนย์บริการวิชาการแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย

รองศาสตราจารย์ นายแพทย์วิวัฒน์ ก่อกิจ

อาจารย์ นายแพทย์ ดำเกิง ปฐมวาณิชย์

นายเกษม ธีรกิตติยากร

เจ้าหน้าที่และพยาบาลแผนกผู้ป่วยนอกโรคผิวหนัง โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

คณะผู้วิจัย

บทคัดย่อภาษาไทย

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษา และพัฒนากระบวนการแยกเซลล์ต้นกำเนิดเส้นผมชนิด dermal papilla จากเนื้อเยื่อต่อมขนบริเวณหนัง โดยใช้เทคนิคใหม่ "One-Step Enzyme digestion and Simple dissection" โดยอาศัยการตัดแยกเซลล์และเนื่อเยื่อส่วนต่างๆ จากต่อมขน (surgical microdissection) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ชนิดstereomicroscope ร่วมกับการย่อยด้วยเอนไซน์ (enzymatic Dissociation) ชนิดผสมระหว่าง Dispase และ collagenase (Liberase DH) เพื่อแยกเซลล์ต้นกำเนิด และสามารถเพาะเลี้ยงเซลล์ โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ (culture media) และสารเร่งการเจริญเติบโต (growth factors และ cytokines) ที่เหมาะสม ทำให้สามารถเพาะเลี้ยงและเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ปริมาณมาก มีสุขภาพแข็งแรง และเลี้ยงได้ยาวนานหลาย passages นอกจากนี้ยังศึกษาคุณสมบัติการย้อมติดสี Immunocytochemistry ของเซลล์ dermal papilla เช่น α-smooth muscle actin (SMA), alcian blue, vimentin และ toluidine blue O ซึ่งใช้บ่งบอกว่าเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเส้นผม ชนิดเซลล์ dermal papilla อีกด้วย

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

This study is the development of isolation, cultivation and characteristic of human hair follicle dermal papilla cells. In the past few years have seen significant developments in hair follicle research including hair multiplication and regeneration. It is a basic necessary for healthy dermal papilla cells to be isolated and cultured. The most commonly used method to isolate dermal papilla cells is microdissection technique which requires significant skill, is time-consuming and has several limitations regarding cell adhesion and low growth-out rates. To get better yields and simplify the method, the enzymatic digestions established but also have problems of DS cells contamination. So in this study, we developed more simple, rapid and efficient method for isolation and culture dermal papilla cells from human scalp hair follicle. By combining of simple dissection technique with one-step enzyme digestion, we easily obtained these cells on a large-scale in rapid time. We used the activity of a new mixture of purified dispase and collagenase enzyme, Liberase DH (dispase high) research grade (Roche, Basel, Switzerland), to proteolysis the membrane and extracellular matrix of dermal papilla. Our cultured DP cells showed high adherent and growth-out rate than microdissection alone. The DP cells in the culture condition grew well without the need of collagen-coated plate, and stained positive with specific markers (α-smooth muscle actin, AB-PAS, toluidine blue O and vimentin), which were similar to the staining results of in situ hair follicle. Optimistically, our results will provide some useful cell isolation and culture information in the field of hair study.

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ค
กิตติกรรมประกาศ ..... ง
สารบัญเรื่อง ..... จ
สารบัญตาราง ..... ฉ
สารบัญภาพ ..... ช
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในงานวิจัย ..... ฌ
บทที่
1. บทนำ 1
1.1. ทบทวนวรรณกรรม 1
1.2. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย 10
1.3. วัตถุประสงค์การวิจัย 11
1.4. ขอบเขตงานวิจัย 12
1.5. วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุป 12
1.6. แนวความคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย 13
1.7. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 13
2. เนื้อเรื่อง 15
2.1. วิธีดำเนินการวิจัย 15
2.2. ผลการวิจัย 20
2.3. อภิปราย/วิจารณ์ 33
2.4. สรุปผลและข้อเสนอแนะ 36
3. บรรณานุกรม 37
4. ประวัติของผู้วิจัยพร้อมหน่วยงานที่สังกัด 40

สารบัญตาราง (List of Tables)

ตารางลำดับที่ หน้า

1 แสดงการเปรียบเทียบลักษณะการย้อมติดสีของเซลล์ทั้ง 3 ชนิด DPCs, DSCs และ dermal fibroblasts 29

2. แสดงเปรียบเทียบข้อดีข้อเสียของวิธีการแยกเซลล์ทั้ง 3 วิธี microdissection alone, two- step enzymatic digestion และ combined simple microdissection with one-step enzymatic digestion 35

สารบัญภาพ (List of Illustrations)

รูปภาพลำดับที่ หน้า

1 แสดงโครงสร้างและส่วนประกอบต่างๆ ของเส้นผมทั้งในแนวยาว และภาพตัดขวาง 2
2. แสดงวัฏจักรของต่อมขนและเส้นผม 3
3. แสดง hair regeneration models 7
4. แสดงทฤษฎีการสร้างต่อมขนใหม่ คือ Morphogenetic switch และ Neogenesis model ...9
5. แสดงตัวอย่างหนังศีรษะและต่อมขนที่นำมาศึกษาที่เก็บใน transport media 15
6. แสดง ophthalmic corneal blade ที่ใช้ในการตัดแยกเซลล์และเนื้อเยื่อ 16
7. แสดงกล้อง stereomicroscope และอุปกรณ์ที่ใช้ในการตัดแยกเซลล์ในตู้ปลอดเชื้อ 16
8. แสดงลักษณะของ hair follicle ที่ตัดแยกส่วนล่าง lower one third แล้วนำไปย่อยต่อด้วยเอนไซม์ dispase 17
9. แสดง lower hair follicle หลังจากย่อยด้วย dispase 18
10. แสดง dermal part of hair follicle ซึ่งประกอบด้วย dermal papilla และ connective tissue sheath (dermal sheath) 18
11. แสดง dermal papilla หลังจากแยกด้วยวิธี simple micro-dissection ก่อนจะนำไปย่อยด้วยเอนไซม์ Liberase DH (dispase high) research grade 20
12. แสดงลักษณะของ dermal papilla ที่ได้จากการแยกด้วยวิธี simple micro-dissection with one-step enzymatic digestion 21
13. แสดงลักษณะของ dermal papilla cells ที่เริ่มแบ่งตัว หลังจาก DP explants เกาะ plate ได้เพียง 1 วัน 21
14. แสดงลักษณะของ dermal papilla cells ขณะแบ่งตัวกระจายออกจากศูนย์กลางคล้ายดอกทานตะวัน 22
15. แสดงลักษณะการแบ่งตัวของ dermal papilla cells หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 3 วัน 22
16. แสดงลักษณะของ DP cells ที่มีการรวมกลุ่มซ้อนกัน ซึ่งเป็นลักษณะจำเพาะ "multilayer aggregation and clump" 23
17. แสดงลักษณะของ DP cells หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 2 สัปดาห์ 23
18. แสดงลักษณะของ dermal papilla cells ใน passage ที่ 2 24
19. แสดงลักษณะของ dermal papilla cells ใน passage ที่ 6 24
20. แสดงลักษณะของ dermal papilla ที่ได้จากการแยกด้วยวิธี surgical micro-dissection ...25

21. แสดง needle scratch technique เพื่อให้ DP ที่แยกได้เกาะกับ plate ได้ดีขึ้น.....25
22. แสดง needle scratch technique.....26
23. แสดงลักษณะการแบ่งตัวของ dermal papilla cells หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 7วัน.....26
24. แสดงลักษณะของ DP ที่ได้จากการแยกด้วยวิธี two-step enzymatic digestion.....27
25. แสดงลักษณะการแบ่งตัวของ DP cells ที่ได้จากการแยกด้วยวิธี two-step enzymatic digestion หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 7 วัน.....27
26. แสดงลักษณะการแบ่งตัวของ DP cells ที่ได้จากการแยกด้วยวิธี two-step enzymatic digestion หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 7 วัน ซึ่งพบมี dermal sheath ปะปน.....28
27. แสดงลักษณะของ DP cells ที่ได้จากการแยกด้วยวิธี two-step enzymatic digestion หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 2 สัปดาห์.....28
28. แสดงการย้อมติดสี AB-PAS ซึ่ง cytoplasm ของ DP cells จะย้อมติดสีแดง (x100).....29
29. แสดงการย้อมติดสี AB-PAS ซึ่ง cytoplasm ของ DP cells จะย้อมติดสีแดง (x200).....30
30. แสดงการย้อมติดสี toluidine blue O ซึ่งทั้ง nucleus และ cytoplasm ของ DP cells จะย้อมติดสีม่วง (x200).....30
31. แสดงการย้อมติดสี alpha-smooth muscle actin ซึ่งจะย้อมเฉพาะบริเวณ "multi-layer aggregation and clumps" (x100).....31
32. แสดงการย้อมติดสี alpha-smooth muscle actin ซึ่งจะย้อมเฉพาะบริเวณ "multi-layer aggregation and clumps" (x200).....31
33 แสดงการติดสี Vimentin ซึ่งทั้ง DPCs, DSCs และ fibroblasts จะย้อมติดหมด (x100).....32
34. แสดงการติดสีน้ำตาลของ Vimentin ของ cultured DP Cells (x200).....32

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในงานวิจัย (List of Abbreviations)

1 ต่อมขน หรือเนื้อเยื่อรากผม (hair follicle, HF)

2 เซลล์รากขน (dermal papilla (DP) cells)

3 เซลล์ต้นกำเนิดเส้นผม (human follicular bulge stem cells. HFBSC)

บทนำ (Introduction)

ทบทวนวรรณกรรม

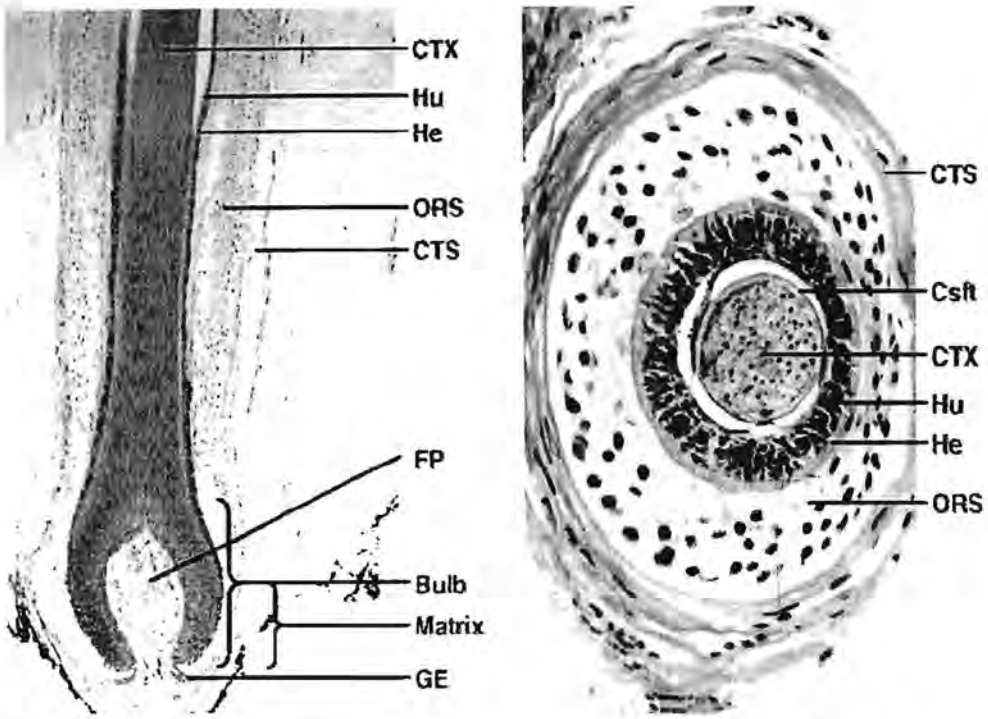
ผมหรือเส้นขนเป็นอวัยวะที่ซับซ้อน มีการผลัดให้หลุดร่วงไป และสามารถงอกมาใหม่ได้ โดยการทำงานของเนื้อเยื่อรากผม (hair follicle, HF) ที่เป็นวงรอบหรือวัฏจักร (hair cycle) บ่งชี้ให้เห็นว่า HF มีเซลล์ต้นกำเนิดของตนเอง และพบว่าถ้ามีความผิดปกติของ bulge epithelium stem cells รวมไปถึง dermal papilla cells เหล่านี้จะก่อให้เกิดภาวะผมร่วงตามมา

โครงสร้างของต่อมผม (The Structure of Hair Follicle)

โครงสร้างของ hair follicle ประกอบด้วยหลัก 2 ส่วน คือ (ดังแสดงในรูปที่ 1)

a. ส่วนที่เป็น epithelial cells ที่ต่อเนื่องมาจาก epidermis ประกอบไปด้วย keratinocytes ที่ differentiate ไปเป็นส่วนต่างๆ มาเรียงตัวกันเป็นชั้นๆ ทรงกระบอก แบ่งได้เป็นส่วนของ outer root sheaths และinner root sheaths ล้อมรอบ hair shaft
b. ส่วนรากผม base/ bulb ที่ซึ่งประกอบด้วย mesenchymal-derived dermal cells ประกอบด้วยเซลล์ dermal papilla (DP) และ dermal sheath (DS)
    a. Dermal Papilla มีรูปร่างคล้ายหยดน้ำ (tear-shaped) อยู่ตรงกลางของ hair bulb ประกอบด้วยเซลล์ fibroblast ชนิดพิเศษ embedded อยู่ใน extracellular matrix มี blood supply เป็นของตนเอง เซลล์ DP มีหน้าที่เป็น secretory cells หลั่งสารหรือส่งสัญญาณไปควบคุมการเจริญ เติบโตและกระตุ้น hair follicle epithelial cells ให้เกิดการสร้างใหม่ของเส้นผมในวัฏจักร [1] โดย DP จะมีขนาดใหญ่ที่สุดในระยะ anagen IV และ มีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าในระยะ telogen โดยจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นนี้อาจมาจากเซลล์ใน DS ซึ่งทำหน้าที่เป็น cellular reservoir ให้กับเซลล์ DP ระหว่าง hair cycle โดยเซลล์ DS มีคุณสมบัติบางอย่างคล้ายเซลล์ DP และจากการศึกษาของ Oliver และคณะพบว่าถ้าเมื่อตัดส่วนล่างของ bulb of lower follicle ของหนูออก สามารถสร้างDP ใหม่ได้ จาก DS แต่ถ้าทำลาย follicle ตั้งแต่ระดับของ bulge ลงมาจะไม่สามารถสร้าง DP ได้ถูก ส่วน melanocytes ของเส้นผมอยู่บริเวณส่วนบนของ DP
    b. Dermal sheath หรือ connective tissue sheath ประกอบด้วย collagen fiber สามชั้นประสานกันไปมา และเซลล์ fibroblast ในชั้น thickened middle collagen layer มีหน้าที่เป็นโครงสร้างให้กับ hair follicle หุ้มรอบ hair follicle ตั้งแต่ระดับ bulge ลงมาถึง stalk ของ DP โดยส่วนของ DP และ DS แยกจาก epithelial compenent ของ hair follicle ด้วย basement

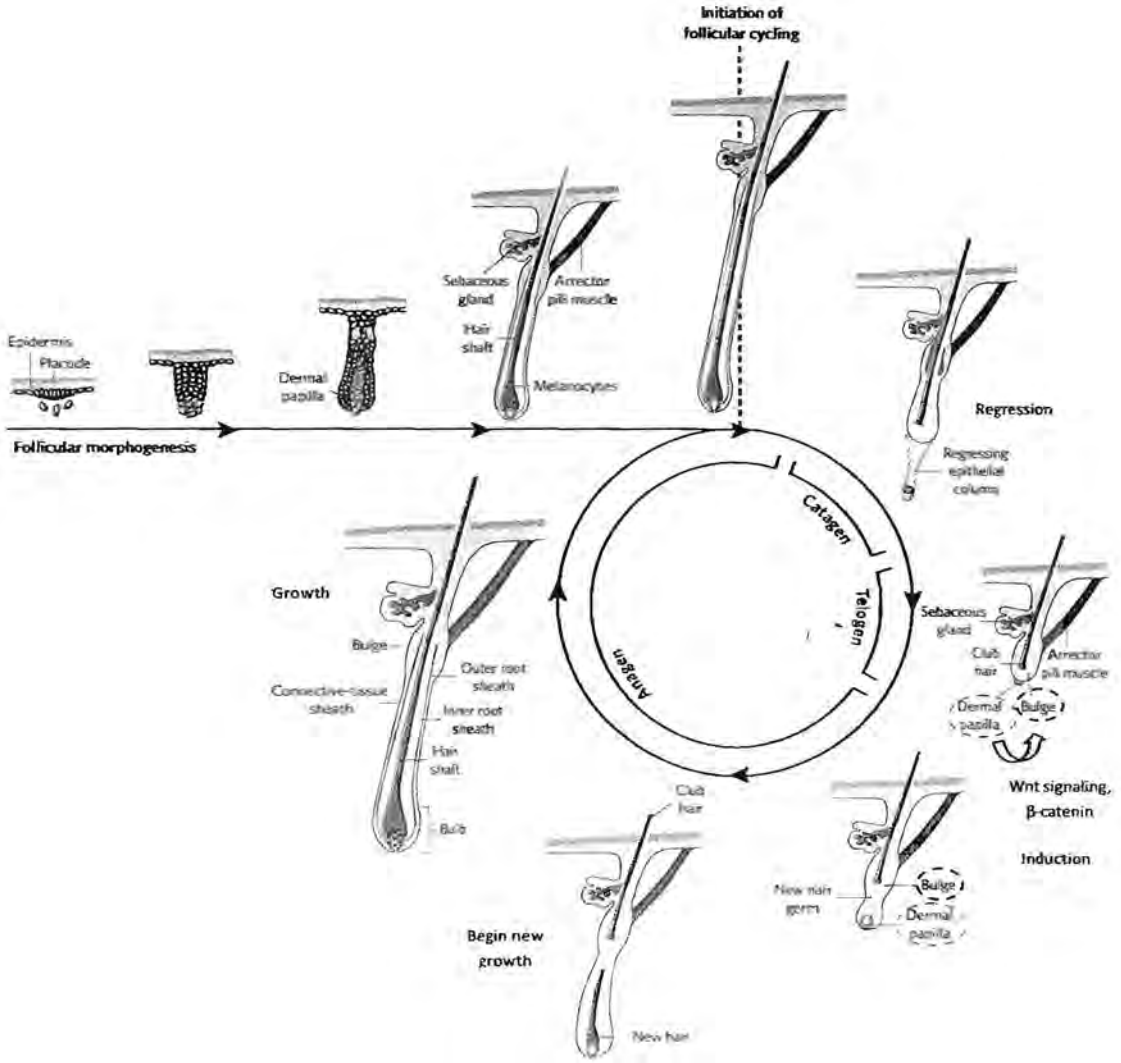
membrane และเป็น reservioir ให้กับ DP cells ด้วย ซึ่ง DS cells สามารถเปลี่ยนเป็น DP cells ได้ ถ้า DP cells ถูกทำลาย



รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างและส่วนประกอบต่างๆ ของเส้นผมทั้งในแนวยาว และภาพตัดขวาง

วัฏจักรของผม (Hair cycle) [1]

วัฏจักรของผม ประกอบด้วย 4 ระยะ คือ ระยะ anagen (growing) phase เป็นช่วงที่ผมเจริญเติบโต เซลล์บริเวณราก base (bulb) of the follicle มีการแบ่งตัวและเจริญเติบโตเป็นเส้นผมเซลล์เมื่อเข้าสู่ catagen (regression) phase หรือระยะถดถอย เซลล์ต่างๆ จะเกิด apoptosis ผมจะหยุดโตและจนเข้าสู่ระยะพัก telogen (resting) phase ที่ไม่มีการแบ่งตัวของสารพันธุกรรม (mitotic quiescence) ส่วนล่างสุดของ lower two-thirds of follicle จะฝ่อไป เหลือแต่ส่วน upper third of hair follicle และกลุ่มของเซลล์ที่มาล้อมรอบที่เรียกว่า club hair และเมื่อจะวนเข้าสู่ระยะ early anagen จะเกิดการกระตุ้นให้สร้างผมใหม่ โดย bulge epithelium stem cells (SCs) ที่อยู่บริเวณส่วนล่างของ club hair ได้รับสัญญาณจาก dermal papilla cells (DP) ที่อยู่ในชั้นหนังแท้ใกล้เคียง กระตุ้นให้เกิดเซลล์ต้นกำเนิด bulge SCs มีการแบ่งตัว ได้เป็น SCs หนึ่งตัว และ TA cells ที่มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและเจริญไปเป็นส่วนต่างๆ ของเส้นผมขึ้นใหม่ และดันเส้นผมเก่าให้หลุดร่วงออกไป (ระยะ exogen phase) (ดังรูปที่ 2)



รูปที่ 2 แสดงวัฏจักรของต่อมขนและเส้นผม แบ่งเป็น 3 ระยะ *Anagen* เป็นช่วงที่ผมเจริญเติบโต ในระยะนี้เส้นผมจะมีสีเข้มและมีความยาวมากที่สุด ผมระยะนี้จะมีอายุเวลาประมาณ 2-5 ปีและผมส่วนใหญ่บนศีรษะคนเราจะอยู่ในช่วงนี้ประมาณ 85- 90% *Catagen* ช่วงนี้กินเวลาประมาณ 2-3 สัปดาห์และระยะนี้มีประมาณ 1% ของเส้นผมบนหนังศีรษะ *Telogen* เป็นระยะสุดท้ายของเส้นผม ระยะนี้มี ประมาณ 3-4 เดือน จากนั้นจะถูกเส้นผมที่เกิดขึ้นใหม่ดันเส้นผมเก่าให้หลุดร่วงออกไป และระยะนี้มีประมาณ 10-15% ของเส้นผมบนหนังศีรษะ (คัดลอกจาก The biology of hair follicles. N Engl J Med 1999; 341: 491-7.)

สัญญาณต่างๆ ที่ใช้ในการสื่อสารระหว่าง follicular epithelium และ dermal cell (epidermal-mensenchymal interaction: EMI) ในวัฏจักรของผม พบว่าเหมือนกับในระยะตัวอ่อน morphogenesis ในระยะ anagen onset พบว่ามีการแสดงออกของ Wnt10b mRNA อยู่ที่ epithelial cellsใกล้กับ DP และ

WNR-responsive TOPGAL reporter gene ที่บริเวณ hair follicle bulge (ที่อยู่ของ stem cells) ถูกกระตุ้น จากการศึกษาพบว่าหนูที่ขาด β-catenin ที่ epidermis และ follicular epithelium เส้นขนจะไม่สามารถสร้างขน โดยไม่สามารถกระตุ้นให้ขนเข้าสู่ระยะ first post natal anagenได้ ชี้ให้เห็นว่าการกระตุ้นการเข้าสู่วัฏจักรของผมใหม่ ต้องอาศัย WNT signaling [1] นอกจากนี้พบว่า isolated dermal papilla cells ที่เพาะเลี้ยง พร้อมกับ WNT proteins เซลล์สามารถคงความสามารถในการเหนี่ยวนำ (hair follicle – inducing properties) ได้ โดยพบว่าความสามารถในการเหนี่ยวนำนี้จะลดลงเรื่อยๆ เมื่อเลี้ยงเซลล์ไปนานขึ้น แสดงให้เห็นว่า WNT signaling สำคัญในการสื่อสารระหว่าง follicular epithelium และ mensenchyme ส่วน SHH ก็มีส่วนในระยะ late anagen จำเป็นในการ proliferation of epithelial cells และ downgrowth of the follicle into dermis และ ectopic expressing ของยีน Shh ทำให้ผมหรือขนในระยะ resting state เข้ามาสู่ระยะ growth phase ได้

เซลล์ต้นกำเนิดชนิด Hair follicle dermal cells

ในปัจจุบันการศึกษาใหม่ๆ มุ่งความสนใจไปยัง inductive dermal cells ซึ่งประกอบด้วยเซลล์ dermal papilla และ dermal sheath (DS) เซลล์ภายใน DP และ DS เป็นเซลล์ fibroblast ชนิดพิเศษ มีต้นกำเนิดมาจาก neural crest stem cells โดยเฉพาะเซลล์ DP ที่มีหน้าที่หลั่งสาร (soluble paracrine factors) หรือส่งสัญญาณไปควบคุมทั้งในการสร้างเส้นผมในระยะ embryo (hair morphogenesis), การควบคุมวัฏจักรของผม [1] , การควบคุมการตอบสนองของ hair follicle ต่อฮอร์โมน androgen, การเสื่อมหรือ apoptosis ของผมตามวัย (age-related changes) ส่วนเซลล์ DS มีหน้าที่เป็น cellular reserviors ให้กับเซลล์ DP ซึ่งเซลล์ทั้งสองจะทำงานสนับสนุนกันและกัน (2-way traffic interaction) [2-4]

Markers of Hair Follicle Dermal Cells

การบ่งบอกชนิดเซลล์ DP และ DS อาศัยการย้อมติด specific marker และคุณสมบัติในการเหนี่ยวนำ (hair inductive properties)

1. alkaline phosphatase (AP)

การดู activity of AP เป็น marker ที่ใช้ย้อมติดเซลล์ และบ่งบองถึงคุณสมบัติในการเหนี่ยวนำของ DPC อีกด้วย [5] โดยพบว่า AP activity ในเซลล์ DP และ bulbar dermal sheath เปลี่ยนแปลงไปตาม cycle โดยใน DP ระยะ early anagen จะมี activity สูงที่สุด และลดลงบริเวณ proximal half ต่ำกว่า Auber's line ในระยะ mid anagen ส่วน DS จะพบ AP activity บริเวณ proximal DS ข้างๆ DP และพบสูงที่สุดในระยะ early anagen [6] โดยพบว่า hair inductivity of cultured DPC และ DSC จะลดลงหลังจากเพาะเลี้ยงนานหลาย passage ซึ่งแสดงให้เห็นจาก AP activity ที่ลดลง [7]

2. α-smooth muscle actin (SMA)

พบย้อมติด αSMA บริเวณ mid ถึง lower DS ในหนู แต่พบว่า hair follicle ของคนรวมทั้ง DP จะไม่ติด อย่างไรก็ตามพบว่าในเซลล์เพาะเลี้ยง cultured DPC ย้อมติด αSMA โดยสรุปพบว่าαSMA เป็น marker ของ DS ใน in vivo และเป็น marker ของทั้ง DS และ DP ใน in vitro [8]

3. Versican

ใน human hair follicle พบย้อมติด versican บริเวณ DP ในระยะ anagen และไม่พบ versican บริเวณ DP ใน miniaturized hair follicles ของผู้ป่วย AGA [9] และพบย้อมติดสีอ่อนๆ บริเวณ DS ที่อยู่ล้อมรอบ K15-positive bulge epithelial cells ส่วนในหนูพบย้อมติด versican บริเวณ DP ในระยะ anagen แต่ไม่พบในระยะ telogen ดังนั้นอาจสรุปได้ว่า versican มีความสำคัญในการเหนี่ยวนำให้เกิด anagen (anagen induction) และ maintenance of anagen

4. Corin

Corin เป็น transmembrane protease โดยปกติจะย้อมติดเซลล์หัวใจ และมีหน้าที่ในการ processing of natriuretic peptides ในหนูพบว่า corin จะย้อมติด DP ใน earliest stage [10] และมีความสำคัญในการ coat color specification แต่ไม่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับ hair morphogenesis

5. CD 133

CD 133 หรือ Prominin-1 ปกติใช้เป็นสีย้อม hematopoietic stem cell แต่พบว่าในผิวหนังหนูย้อมติด DP ด้วย (strong expression) ใน stage 3-4 developing hair follicles และ early anagen โดย CD133 -positive cells ที่แยกได้จากผิวหนังหนู โดยการทำ FACS มีรูปร่างคล้าย DPC และสามารถเหนี่ยวนำให้เกิด hair follicle neogenesis ได้ มากกว่า unsorted dermal cells 10 เท่า (ในแง่ของปริมาณเซลล์ที่ต้องการใช้) [11]

Hair Inductivity in Dermal Cells

คุณสมบัติในการเหนี่ยวนำ (hair inductivity) ของ dermal cells ค้นพบเริ่มต้นจากการศึกษาของ Oliver และคณะ ในปีค.ศ.1967 พบว่าสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดเส้นผมใหม่ได้ใน hooded rat โดยการปลูกถ่ายเซลล์ DP ที่ติดอยู่กับ amputated HF [12] หลายการศึกษาต่อมาพบว่า cultured DPC และ DSC รวมไปถึง intact DS tissue สามารถเจริญไปเป็น hair follicle ใหม่ได้ในสัตว์ทดลอง (in vivo) [13-15] และในปีค.ศ.1967 Reynolds และคณะ พบว่า DS จากหนังศีรษะของผู้ชาย สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดเส้นผมใหม่ได้โดยการปลูกถ่ายไปยังผิวหนังบริเวณแขนส่วนล่างของผู้หญิง และตรวจพบว่า DP ของเส้นผมที่ขึ้นใหม่นี้มี Y-chromosome ของผู้ชายอยู่ [14] แม้ว่ายังไม่ทราบแน่ชัดถึง epithelial target population ในการศึกษานี้

แต่ก็อาจแสดงให้เห็นว่าคุณสมบัติในการเหนี่ยวนำของเซลล์ DP เกิดได้ในเพศ (trans-gender) หรือแม้แต่ species (trans-gender) ที่แตกต่างกันระหว่างผู้ให้ (donor) และผู้รับ (recipient)

Dermal Cells in Hair Reconstitution Assay

In vivo Hair Regeneration Model

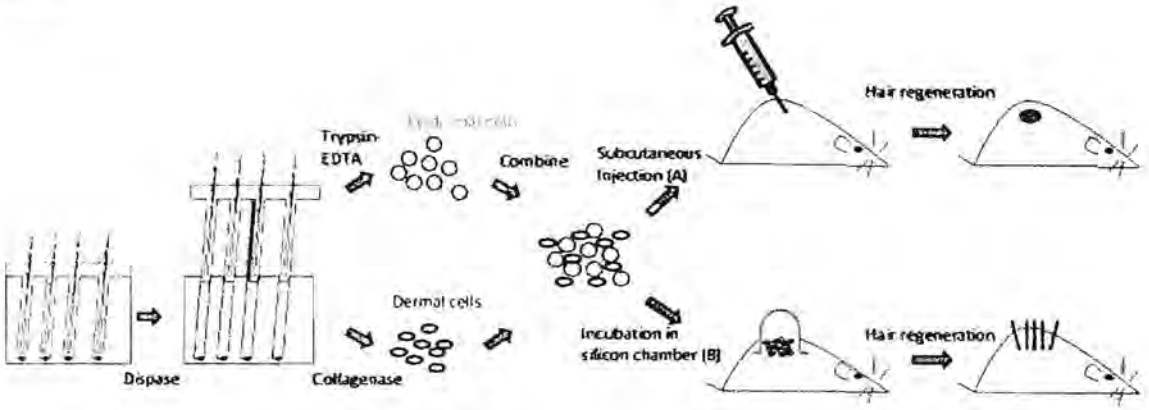
Hair reconstitution assay จัดว่ามีประโยชน์อย่างยิ่งในการศึกษาคุณสมบัติในการเหนี่ยวนำของ isolated cell populations โดยการศึกษาในระยะแรกจะใช้ dermal tissue หรือเซลล์ที่อยู่ใต้หรือชิดกับ upper half of amputated hair follicle มาปลูกถ่าย โดยพบว่า dermal tissue สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างผมใหม่ได้ แต่พบว่าเส้นผมที่ขึ้นใหม่นั้นเป็นการ restore hair follicle ที่ได้รับบาดเจ็บมากกว่าจะเป็นการสร้างเส้นผมขึ้นมาใหม่ และยังมีข้อจำกัดด้านเวลา แรงงาน จำนวนและขนาดของ donor hair follicle ในการคัดแยกเนื้อเยื่อด้วย [12]

การศึกษาในระยะต่อมาจึงนำเอา dermal tissue หรือเซลล์มาปลูกถ่ายไปยัง dermis โดยหวังว่าเซลล์เหล่านี้จะเหนี่ยวนำให้สร้าง hair follicle ใหม่ได้ด้วยการส่งสัญญาณไปกระตุ้น hair epithelial stem cells [16] โดยคุณสมบัติในการเหนี่ยวนำของ dermal cells เปลี่ยนแปลงไปตามภาวะต่างๆ ของ donor status เช่น hair cycle stage, อายุ และต้นกำเนิดของ dermal cells โดย dermal condensate จาก embryonic tissue และ DP จาก adult skin กระตุ้นให้เกิด hair transformation ด้วยกลไกที่แตกต่างกัน

ในปัจจุบันมีหลายวิธีที่ใช้ในการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเส้นผม (hair regeneration models) ได้โดยใช้ dissociated cell aggregates หรือ single cells จาก hair follicle ทั้ง epidermal และ dermal components จากทั้งคน และหนู แต่ 3 วิธีที่ทำการศึกษาล่าสุดคือ วิธีที่หนึ่ง "graft chamber" (ดังรูปที่ 6) โดยการใส่เซลล์ 2 ชนิดของหนู หรือ mouse neonates ทั้ง epidermal และ dermal cells ลงใน full-thickness wound บนผิวหนังบริเวณหลังของหนูที่ไม่มีภูมิคุ้มกัน และครอบปิดด้วย bell-shaped silicon chamber ทำให้เซลล์ติดอยู่ที่ wound bed และถอดออกหลังจาก 1 สัปดาห์ พบว่าสามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างเส้นผมขึ้นใหม่ที่ผิวหนังของหนูได้ใน 3 สัปดาห์ [17-18]

วิธีที่สองคือการฉีดเซลล์ผสมทั้ง epidermal และ dermal components เข้าผิวหนังใต้ชั้นไขมัน (subcutaneous injection) เซลล์ epidermal ที่ฉีดเข้าไปจะรวมตัวกันเป็น cystic spheres เห็นเป็นตุ่มนูนบนผิวหนังของหนู nude เรียกวิธีนี้ว่า "patch assay" เซลล์ epidermis ที่มารวมตัวกันจะเกิดการ apoptosis ตรงกลาง และเกิดเป็น cyst ส่วนเซลล์ dermal condensate จะเหนี่ยวนำให้สร้าง hair follicle ใหม่เจริญยื่นออกจาก cyst wall ส่วนของ hair shafts จะพุ่งเข้าใน cyst cavity ภายในเวลาประมาณ 2 สัปดาห์ โดยเส้นผมที่เกิดขึ้นจะเห็นอยู่ใต้ผิวหนัง (undersurface) (ดังรูปที่ 3) [19]

วิธีที่สามคือ การทำให้ผิวหนังแยกชั้นด้วยเอนไซม์ dispase ก่อน เพื่อทำให้เกิดช่องว่าง (pocket) ระหว่าง epidermis และ dermis และใส่เซลล์ในช่องว่าง ก่อนที่จะนำผิวหนังทั้งหมดไป graft ลงบนผิวของ nude mice [20-21]



รูปที่ 3 แสดง hair regeneration models โดยใช้ dissociated epidermal-และ dermal cells หรือ cultured cells A) โดยวิธีฉีดเข้าผิวหนังใต้ชั้นไขมัน (subcutaneous injection) หรือใส่เซลล์ลงใน full-thickness wound และคลุมด้วย silicon chamber บนผิวหนังบริเวณหลังของหนูที่ไม่มีภูมิคุ้มกัน (immunodeficient nude mice) (คัดลอกจาก Journal of Dermatological Science 2010; 57: 2-11.)

นอกจากนี้มีหลายการศึกษาที่เลือกใช้เซลล์ที่มีลักษณะจำเพาะ (special cell subpopulation) ที่มีคุณลักษณะของเซลล์ต้นกำเนิดมาศึกษา reconstitution assay เช่น ใช้ K-15 positive epithelial cells จาก adult mice มาผสมกับ dermal cells จาก mouse neonates ปลูกถ่ายลงบน nude mice พบว่า adult epithelial stem cells นี้สามารถเจริญไปเป็น cutaneous epithelial lineages ของ hair follicle รวมไปถึง sebaceous gland และ interfollicular epidermis ได้ [22] และในปีค.ศ. 2007 Ito และคณะ เลือกใช้ enrich hair-inductive dermal cells ที่ย้อมติด CD133 มาศึกษา

อย่างไรก็ตามการใช้ immunodeficient nude mice มาศึกษา in vivo model อาจไม่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในคนได้ เนื่องจากยังไม่ทราบแน่ชัดถึงผลของ host factors ต่อการสร้างผม hair follicle neogenesis ดังแสดงให้เห็นจากผลของการศึกษาที่ทำการปลูกถ่ายเซลล์คนลงในหนู พบว่ายังได้ผลไม่ดีนัก และต้องใช้เซลล์จำนวนมากหลายพันหลายล้านเซลล์ในการสร้างเป็น hair follicle อันเดียว

Clinical Application of Hair Follicle Stem Cells and Tissue Engineering

ในปัจจุบันเริ่มมีการนำเซลล์ต้นกำเนิดมาใช้ในทางการแพทย์ เพื่อรักษาอาการป่วยอันเนื่องมาจากเซลล์ เนื้อเยื่อ หรืออวัยวะที่เสียหายหรือเสื่อมสภาพไป โดยหวังว่าเซลล์ต้นกำเนิดจะพัฒนาไปเป็นอวัยวะตามต้องการ โดยเฉพาะกับการรักษาโรคที่ไม่สามารถรักษาได้ด้วยการรักษามาตรฐาน แต่เซลล์ต้นกำเนิดที่

มีการศึกษาวิจัย และใช้รักษาจริงๆ ในทางการแพทย์แล้ว มีแต่เซลล์ต้นกำเนิดทางโลหิตวิทยาเท่านั้น โดยทำการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (autologous peripheral hematopoietic stem cells) นำไปใช้รักษาโรคมะเร็งเม็ดเลือดบางชนิด หรือโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียเป็นต้น ส่วนเซลล์ต้นกำเนิดชนิดอื่นๆ ยังอยู่ในขั้นศึกษาทดลอง เช่น การนำเซลล์ต้นกำเนิด cornea epithelial จาก บริเวณ limbusไปใช้เป็นเทคนิคใหม่ในการปลูกถ่ายกระจกตา (corneal transplantation) หรือการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดไขมัน (adipose-derived stem cells) ไปทดแทนชั้นไขมันใต้ผิวหนังในบริเวณที่ขาดไป ทำให้คงความหนาของชั้นไขมันไว้ได้นานกว่าการปลูกถ่ายเซลล์ไขมันอย่างเดียว **(autologous fat transfer) เป็นต้น**

แนวทางในการรักษาภาวะผมร่วง (alopecia) ด้วยเซลล์ต้นกำเนิดเส้นผมอาจทำได้หลายวิธี โดยทั้งนี้ต้องขึ้นอยู่กับพยาธิกำเนิดของโรคผมร่วงเหล่านั้น โดยการใช้เทคโนเลยีด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue engineering) หรือการรักษาด้วยยีน (gene therapy) จากเซลล์ต้นกำเนิดเส้นผม (Human follicular bulge stem cells) และเซลล์รากขน (hair dermal papilla cells) มาใช้ในการรักษาภาวะผมร่วง (alopecia) หรือโรคทางผิวหนังบางชนิด ได้แก่

1. การใช้วิธีเซลล์บำบัด (cell-based therapy) [23-24]

การนำเอาเซลล์ต้นกำเนิด hair follicle bulge epithelial cells มาเพาะเลี้ยง ร่วมกับ inductive dermal cells และนำกลับเข้าไปยังผิวหนังบริเวณที่ผมร่วงพบว่าสามารถกระตุ้นให้ผมขึ้นหรือสร้าง hair follicle ใหม่ได้ การเกิดเส้นผมใหม่ตามหลังการใส่ trichogenic cells กลับเข้าสู่ผิวหนังเชื่อว่าอาจเกิดมาจาก 2 กลไก ดังนี้

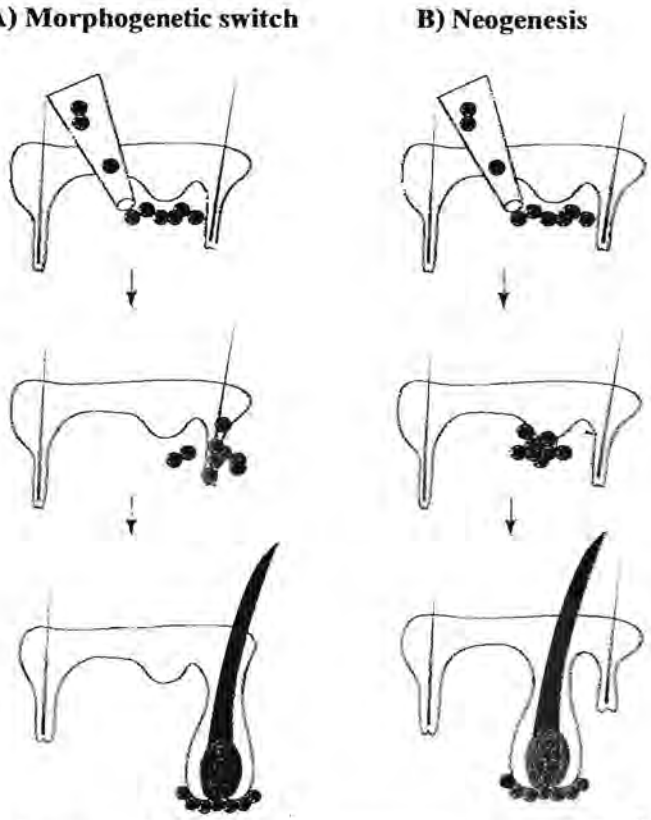
a) Morphogenetic switch: เมื่อใส่ trichogenic cells เข้าไปกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจาก small follicle (vellus hair) ไปเป็น large follicle (Terminal hair) (รูปที่ 3A)

b) Neogenesis: เกิดการสร้างเป็นต่อมขน (hair follicle) ใหม่จากการเหนี่ยวนำของ inductive dermal signals จาก trichogenic cells ร่วมกับเซลล์ผิวหนังระหว่างต่อมขน (Interfollicular keratinocytes) หรือเซลล์ต้นกำเนิดเส้นผม (hair follicle epithelial stem cells) คล้ายกับการสร้างต่อมขนของ fetus (folliculogenesis) (รูปที่ 3B)

แต่อย่างไรก็ตามยังมีหลายปัจจัยที่ส่งผลต่อความสามารถของเซลล์ต้นกำเนิดเหล่านี้ ทั้งขั้นตอนการแยก การเพาะเลี้ยงไปจนถึงการเพิ่มจำนวนโดยพบว่าเซลล์ที่เลี้ยงในหลอดทดลองจะมีความสามารถในการเหนี่ยวนำหรือกระตุ้นให้สร้างผมใหม่น้อยลง นอกจากนี้ยังมีข้อสงสัยหลายประการที่รอคำตอบเกี่ยวกับการนำเซลล์มาใช้ ซึ่งต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

2. การปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ (Tissue-based therapy)

คือการนำเอาเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของ hair follicle เช่นการผ่าตัดปลูกผม (hair transplantation) ในปัจจุบัน ที่อาศัย dermal sheath ไปปลูกถ่าย



รูปที่ 4 แสดงทฤษฎีการสร้างต่อมขนใหม่ จากการนำ trichogenic cells เข้าไปในชั้น dermis โดยเชื่อว่าอาจเป็นไปได้จาก 2 กลไก คือ A) Morphogenetic switch model และ B) Neogenesis model

3. การปลูกถ่ายอวัยวะ (Organogenesis)

คือสร้าง hair follicle ใหม่จากเซลล์ต้นกำเนิดที่เพาะเลี้ยงบน scaffold ให้เจริญเป็น mini-organs หรือ proto-hair ขึ้นมาในหลอดทดลอง (in vitro) ก่อน แล้วค่อยนำมาปลูก (surgical transplantation) กลับไปในบริเวณที่ผมบาง ข้อดีของวิธีนี้คือ เราสามารถปรับแต่งยีน (genetic manipulation) ให้ได้ต่อมขนที่แข็งแรง ex vivo และนำกลับไปปลูกใหม่ในทิศทางที่สวยงามตามธรรมชาติของทรงผมผู้รับการปลูกถ่ายแต่ละราย

นอกจากการนำเอาเซลล์มาใช้ในการรักษาแล้ว เซลล์ต้นกำเนิดเส้นผมเหล่านี้ยังมีประโยชน์ในการศึกษาหาสาเหตุ และกลไกของโรคผมร่วงต่างๆ การออกฤทธิ์ของยา ประสิทธิภาพและผลของยาก่อน

จะนำมาศึกษาในสัตว์ทดลอง หรือในมนุษย์ รวมไปถึงการการพัฒนาการรักษา หรือยาใหม่ๆ ที่ช่วยการเจริญเติบโต หรือการสร้างใหม่ของเส้นผมผ่านทางเซลล์ต้นกำเนิด หรือการรักษาด้วยยีน (gene therapy)

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ภาวะผมบางจากพันธุกรรม (Androgenetic Alopecia, AGA) เป็นปัญหาที่พบบ่อย พบในผู้ชายมากกว่าผู้หญิง จะเริ่มพบภาวะนี้ได้เมื่อผู้ป่วยเข้าสู่วัยรุ่นและพบอุบัติการณ์มากขึ้นเมื่ออายุมากขึ้น ในประเทศสหรัฐอเมริกาพบว่าในชายผิวขาวอายุ 30 ปีจะพบภาวะนี้ได้ประมาณ 30% และพบได้ถึง 50% ของประชากรชายเมื่ออายุมากกว่า 50 ปี ซึ่งมากกว่าชายผิวดำถึง 4 เท่า ส่วนในประเทศไทย จากการสำรวจเมื่อประมาณ 4-5 ปีที่แล้วพบว่า ผู้ชายไทยมีปัญหาผมร่วงผมบางจากพันธุกรรมกว่า 30% และพบมากขึ้นเรื่อยๆ

วิธีการรักษาภาวะผมร่วงจากพันธุกรรมที่ใช้กันในปัจจุบัน แบ่งออกเป็นการรักษาด้วยการใช้ยาและการผ่าตัดปลูกผม (Hair transplantation) การรักษาด้วยยาได้ผลเฉพาะในผู้ป่วยบาง และเมื่อหยุดยาผมจะร่วงและกลับไปบางใหม่ ยาบางตัวมีผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ และไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างใหม่ของผม และต่อมขนในผู้ป่วยที่ศีรษะล้านได้ ส่วนการผ่าตัดปลูกผมเป็นการผ่าตัดย้ายเซลล์รากผมจากบริเวณที่คาดว่าผมแข็งแรงไม่มีแนวโน้มจะหลุดร่วงซึ่งมักจะเป็นบริเวณท้ายทอยมาปลูกยังตำแหน่งที่ต้องการ โดยจะเลือกผ่าตัดในผู้ป่วยที่มีผมบางมาก ที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยา แต่การรักษาด้วยการปลูกผมนี้พบว่ามีข้อจำกัดมาก ไม่สามารถทำได้ในผู้ป่วยที่มีปริมาณ และความหนาแน่นของเส้นผมบริเวณ donor site ไม่เพียงพอ และขาดความยืดหยุ่นของหนังศีรษะ อีกทั้งอาจเกิดผลข้างเคียงจากการผ่าตัด เช่นเกิดแผลเป็นทั้งบริเวณ donor และ recipient site ได้

ในปัจจุบันได้มีการนำสเต็มเซลล์ (stem cells) หรือที่ภาษาไทยใช้คำว่าเซลล์ต้นกำเนิดมาใช้ในทางการแพทย์อย่างแพร่หลาย เพื่อรักษาอาการป่วยอันเนื่องมาจากเซลล์ เนื้อเยื่อ หรืออวัยวะที่เสียหายหรือเสื่อมสภาพไป โดยหวังว่าเซลล์ต้นกำเนิดจะพัฒนาไปเป็นอวัยวะตามต้องการ โดยเริ่มต้นตั้งแต่การค้นพบเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือด นำไปสู่การปลูกถ่ายเซลล์ (autologous peripheral hematopoietic stem cells) และการรักษาด้วยยีนในโรคมะเร็งเม็ดเลือด, การค้นพบ cornea epithelial stem cells ที่ limbus และนำไปใช้เป็นเทคนิคใหม่ในการปลูกถ่ายกระจกตา (corneal transplantation) เช่นเดียวกับแนวคิดของคณะผู้วิจัยที่ในเล็งเห็นประโยชน์และแนวทางความเป็นไปได้ในการใช้เทคโนเลยีด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (new hair follicles bioengineering) หรือการรักษาด้วยยีน (gene therapy) จากเซลล์ต้นกำเนิดเส้นผม (Human follicular bulge stem cells) และเซลล์รากขน (hair dermal papilla cells) มาใช้ในการรักษาภาวะผมร่วง (alopecia) หรือโรคทางผิวหนังบางชนิด

การที่จะได้มาซึ่งเซลล์ต้นกำเนิดที่มีคุณภาพดีเป็นที่สิ่งจำเป็นของงานวิจัยที่เกี่ยวกับเซลล์ต้นกำเนิดทุกชนิด วิธีการคัดแยก (isolation) และเพาะเลี้ยง (cultivation) เซลล์ต้นกำเนิดเส้นผมชนิด dermal papilla จึงเป็นพื้นฐานสำคัญ วิธีแรกที่ถูกคิดค้นขึ้นคือวิธี การผ่าตัด (surgical microdissection) โดย Cohen และ Oliver [25] ซึ่งเริ่มจากการแยกต่อมขนของหนู (vibrissa) และต่อมา Johada & Oliver [26] และ Messenger [27] ได้ประยุกต์วิธีดังกล่าวมาใช้แยก และเพาะเลี้ยงเซลล์ DP จากต่อมขนของคนบ้าง ซึ่งการแยกเซลล์ต่อมขนของคนด้วยวิธีนี้ต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญ และเสียเวลามากในการคัดแยก เนื่องจากต่อมขนของคนมีขนาดเล็กกว่าต่อมขนของหนู หรือสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอื่นๆ มาก อีกทั้งผลที่ได้พบว่าได้เซลล์ในปริมาณน้อย และมีการเจริญเติบโตไม่ดี ต่อมามีการพัฒนานำเอาเอนไซม์ต่างๆ ได้แก่ dispase และ collagenase [28-30] มาใช้ย่อยเซลล์แทนการผ่าตัด โดยมุ่งหวังว่าจะลดแรงงานคน และได้เซลล์ที่มีทั้งคุณภาพ และปริมาณมากขึ้น แต่เซลล์ DP ที่ได้จากการแยกด้วยวิธีนี้มีการปนเปื้อนจากเซลล์ข้างเคียงอื่นๆ มาก ดังนั้นงานวิจัยนี้มุ่งเน้นที่จะศึกษาและพัฒนาเทคนิคใหม่ที่มีประสิทธิภาพและสะดวกในการแยกเซลล์จากเนื้อเยื่อ (Extraction) การคัดแยกเซลล์ (Isolation and Purification) และเพาะเลี้ยงเซลล์ (Expansion and Proliferation) รวมทั้งการพิสูจน์คุณสมบัติและลักษณะจำเพาะ (Identification and Characterization) ที่บ่งชี้ว่าเป็นเซลล์ต้นกำเนิดชนิด dermal papilla เพื่อนำไปสู่การศึกษาวิจัยในส่วนต่างๆ ต่อไป เช่นการศึกษาประสิทธิภาพของยาหรือวิธีการรักษาโรคผมร่วง รวมไปถึงการประยุกต์ใช้ในทางคลินิกในการรักษาภาวะผมบางจากพันธุกรรมต่อไป

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาและพัฒนาวิธีการการคัดแยกเซลล์ต้นกำเนิดเส้นผมชนิด dermal papilla cells จากเนื้อเยื่อต่อมขน (hair follicle) จากหนังศีรษะ(Isolation and Purification)
2. ศึกษาและพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยง และเพิ่มจำนวน เซลล์ต้นกำเนิดเส้นผมชนิด dermal papilla cells (Expansion and Proliferation)
3. ศึกษาคุณสมบัติ และลักษณะของเซลล์ต้นกำเนิดเส้นผมชนิด dermal papilla cells (Identification and Characterization)

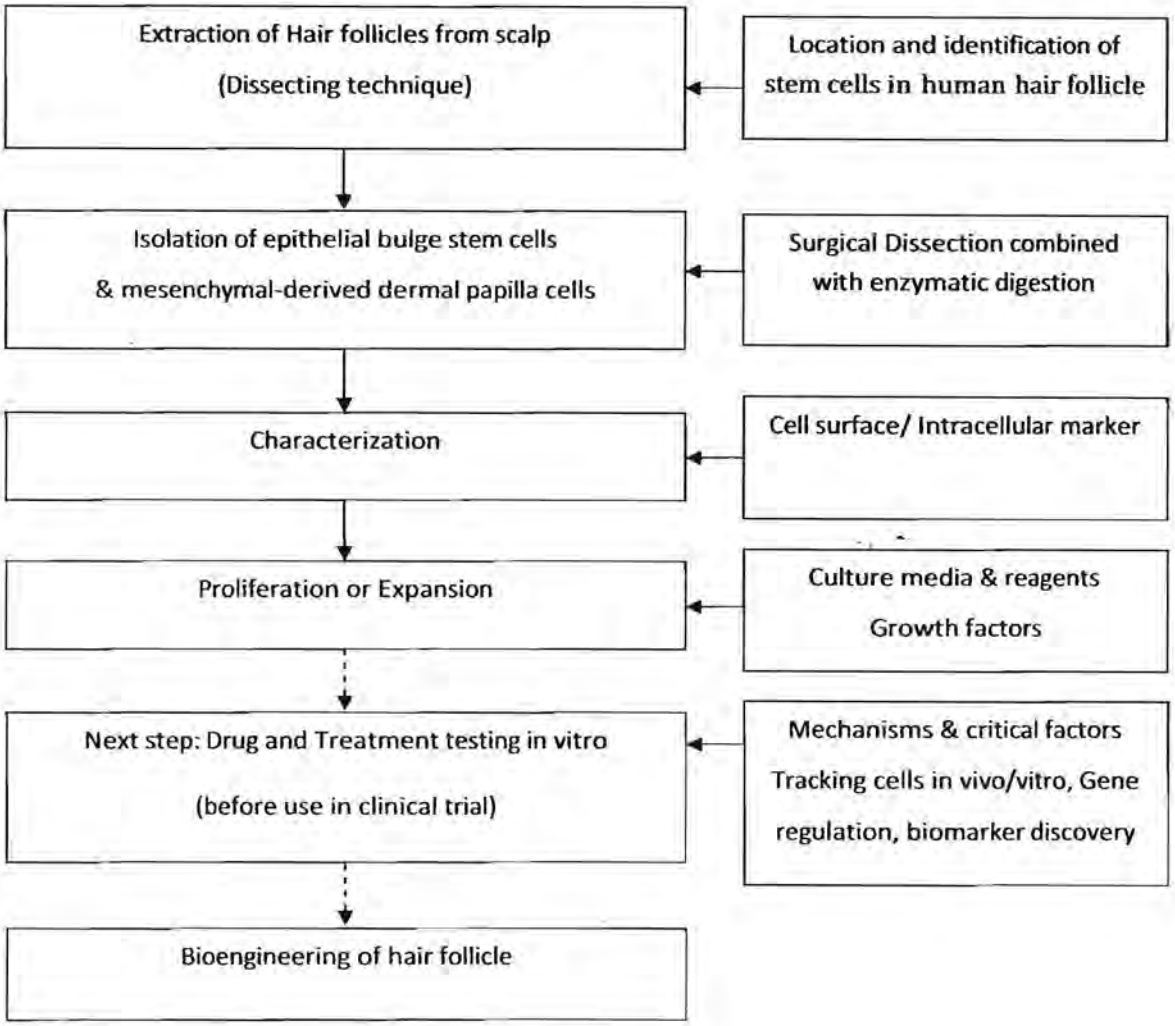
ขอบเขตการวิจัย

ขอบเขตการวิจัยมุ่งเน้นเพื่อการพัฒนากระบวนการแยกเซลล์จากเนื้อเยื่อ (Extraction), การคัดแยกเซลล์ (Isolation and Purification), ศึกษาคุณสมบัติและลักษณะจำเพาะ (Identification and Characterization) ของเซลล์ต้นนำกำเนิด hair follicular stem cells และ dermal papilla cells, การขยายและเพาะเลี้ยงเซลล์ (Expansion and Proliferation) และครอบคลุมไปถึงการชักนำให้เปนเนื้อเยื่อที่จำเพาะ (differentiation) เพื่อนำไปสู่การทำวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (bioengineering of hair follicle) ประยุกต์ใช้ทางคลินิกในการรักษาภาวะผมร่วง (alopecia) ต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุป

1. สืบค้นข้อมูลทางวิชาการ จัดเตรียมวัสดุอุปกรณ์และสถานที่ปฏิบัติการสำหรับการวิจัย
2. ทำการเก็บตัวอย่างหนังศีรษะ (Human scalp) ของผู้ป่วยที่เข้ารับการผ่าตัดปลูกผม ดึงหน้า (routine face-lift surgery) ในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ที่แสดงความยินยอมเข้าร่วมการศึกษาวิจัย
3. ศึกษาและพัฒนาวิธีการการคัดแยกเซลล์ต้นกำเนิดเส้นผมชนิด dermal papilla cells จากเนื้อเยื่อต่อมขน (hair follicle) จากหนังศีรษะ(Isolation and Purification)
    a. ศึกษาเทคนิคการแยกเซลล์ dermal papilla ด้วยวิธี surgical dissection
    b. ศึกษาเทคนิคการแยกเซลล์ dermal papilla ด้วยวิธีcombined surgical microdissection และ enzymatic digestion
    c. ศึกษาเทคนิคอื่นในการแยกเซลล์
4. ศึกษาและพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยง และเพิ่มจำนวนเซลล์ dermal papilla (Proliferation)
    a. ศึกษาหา culture media และ reagents ที่เหมาะสม
    b. ศึกษาหา Growth factors และ cytokines ที่ช่วยในการเจริญของเซลล์
5. ศึกษาและวิเคราะห์คุณสมบัติ และลักษณะของเซลล์ต้นกำเนิดเส้นผมชนิด dermal papilla cells (Identification and Characterization)
    a. การย้อมดูโปรตีนที่ผิวเซลล์ (cell surface markers) หรือ immunocytochemistry ได้แก่ α-smooth muscle actin, AB-PAS, toluidine blue O และ vimentin
6. รวบรวม วิเคราะห์ สรุปผลการทดลองและเรียบเรียงข้อมูลเพื่อจัดทำรายงาน

แนวทางความคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย



ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เป็นองค์ความรู้ในงานวิจัยต่อไป

งานวิจัยดังกล่าวก่อให้เกิดองค์ความรู้ใหม่ในประเทศไทยในเรื่อง เซลล์ต้นกำเนิด Hair follicular stem cells และ hair dermal papilla cells นำไปสู่การพัฒนาทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อ และการนำไปประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคผมร่วงและโรคผิวหนังบางชนิดต่อไป

กลุ่มเป้าหมาย: อาจารย์นักวิจัย และบุคลากรระดับมหาบัณฑิตและดุษฎีบัณฑิต หน่วยงานรัฐบาล เอกชน

2. บริการความรู้แก่ประชาชน

ให้ความรู้ ความเข้าใจเกี่ยวกับเซลล์ต้นกำเนิด

กลุ่มเป้าหมาย: ประชาชนทั่วไปที่สนใจ

3. บริการความรู้แก่ภาคธุรกิจ นำไปสู่การผลิตเชิงพาณิชย

การให้บริการทางการแพทย์ในรูปแบบการแยก และเพาะเลี้ยง autologous hair follicular stem cells และ dermal papilla cells เพื่อนำไปใช้ศึกษาและประยุกต์ใช้ในการรักษาผู้ป่วยผมร่วง

กลุ่มเป้าหมาย: ผู้ป่วยโรคผมบางจากพันธุกรรม โรคผมร่วง และโรคผิวหนังบางชนิด

4. เพิ่มประสิทธิภาพการผลิต

งานวิจัยนี้เป็นหาพัฒนาการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดและการนำไปใช้ โดยคิดค้นวิธีการและเทคโนโลยีใหม่เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพต่อยอดจากในระดับงานวิจัยที่เคยปรากฏมา

กลุ่มเป้าหมาย: เพื่อนำไปใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคผมบาง ทั่วประเทศ ทั้งภาครัฐบาลและเอกชน

5. เป็นประโยชน์ต่อประชากรกลุ่มเป้าหมาย

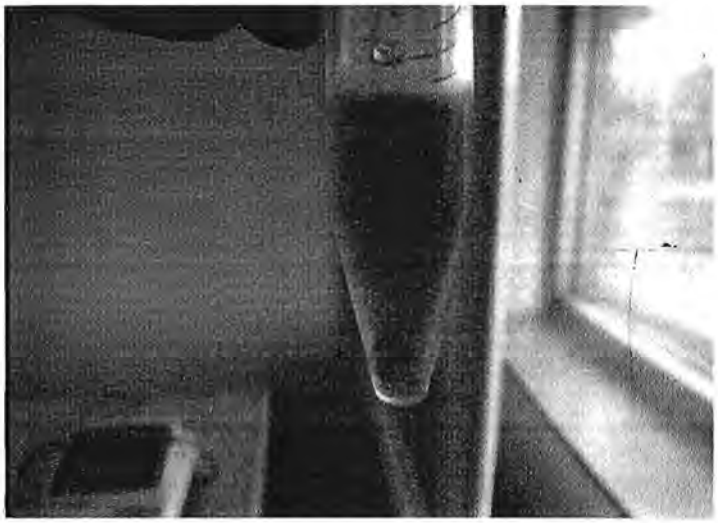
ผู้ป่วยโรคผมบางจากพันธุกรรม โรคผมร่วง และโรคผิวหนังบางชนิด

เนื้อเรื่อง (Main body)

วิธีดำเนินการวิจัย (Materials & Method)

Scalp specimens

ทำการเก็บตัวอย่างหนังศีรษะ (human scalp) ของผู้ป่วยที่เข้ารับการผ่าตัดปลูกผม (hair transplantation surgery) หรือผ่าตัดดึงหน้า (routine face-lift surgery) ในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ที่แสดงความยินยอมเข้าร่วมการศึกษาวิจัย (ดังรูปที่ 5)



รูปที่ 5 แสดงตัวอย่างหนังศีรษะและต่อมขนที่นำมาศึกษาที่เก็บใน transport media

Isolation of human hair follicle dermal papilla cells

1. The scalp specimens were transported in Williams' E serum free media (Gibco BRL, Paisley, Scotland) with 2% antibiotic-antimycotic (Gibco BRL) at 4℃, not more than 48 hours.

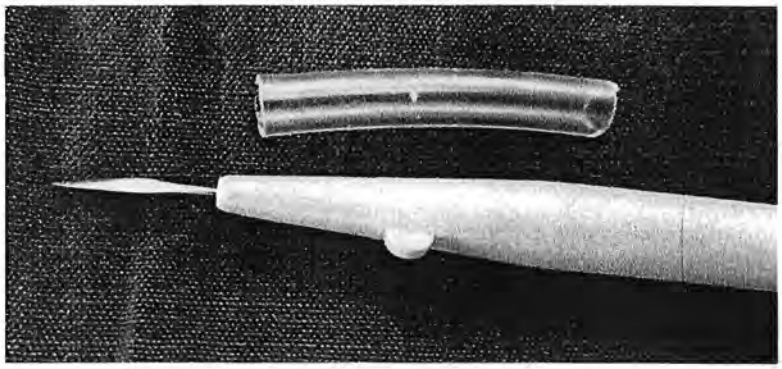
2. After transferred to the laboratory, the specimens were washed 3 times with phosphate-buffered saline (PBS).

3. We compared 3 methods of isolation of dermal papillae as follows:
   - Surgical microdissection alone
   - Two-step enzymatic digestion
   - Simple microdissection with one-step enzyme digestion technique.

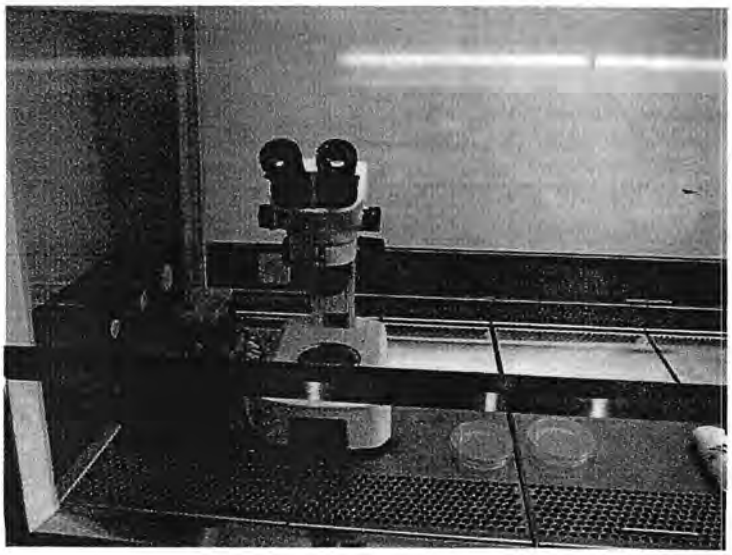
Surgical micro-dissection method

1. Briefly, the DP was released from each hair follicle by transection at the level of papilla, opened inversely to expose the inner side and cut at the stalk by using with ophthalmic corneal blade under a stereomicroscope. (ดังรูปที่ 6, 7)

2. Then the isolated DPs were transfer to the Petri dish by forcept and half of them were anchored to the plastic plate by scratch through center using fined needle.



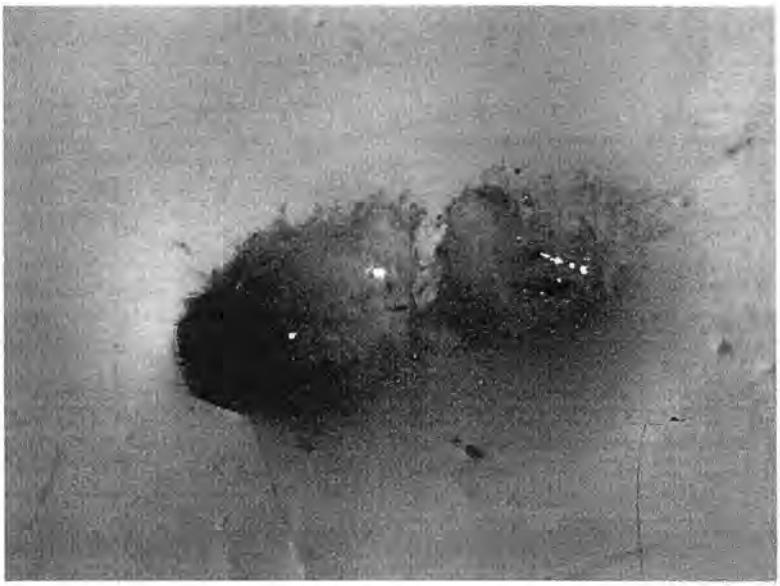
รูปที่ 6 แสดง ophthalmic corneal blade ที่ใช้ในการตัดแยกเซลล์และเนื้อเยื่อ



รูปที่ 7 แสดงกล้อง stereomicroscope และอุปกรณ์ที่ใช้ในการตัดแยกเซลล์ในตู้ปลอดเชื้อ

Two-step enzymatic digestion method

1. The scalp specimens were cut off at the interface of dermo-subcutaneous fat junction with blade (ดังรูปที่ 8)



รูปที่ 8 แสดงลักษณะของ hair follicle ที่ตัดแยกส่วนล่าง lower one third แล้วนำไปย่อยต่อด้วยเอนไซม์ dispase

2. The lower hair follicle in the subcutaneous tissue was incubated with 12.5 mg/ml dispase in DMEM for 16-18 hours at 4°c.

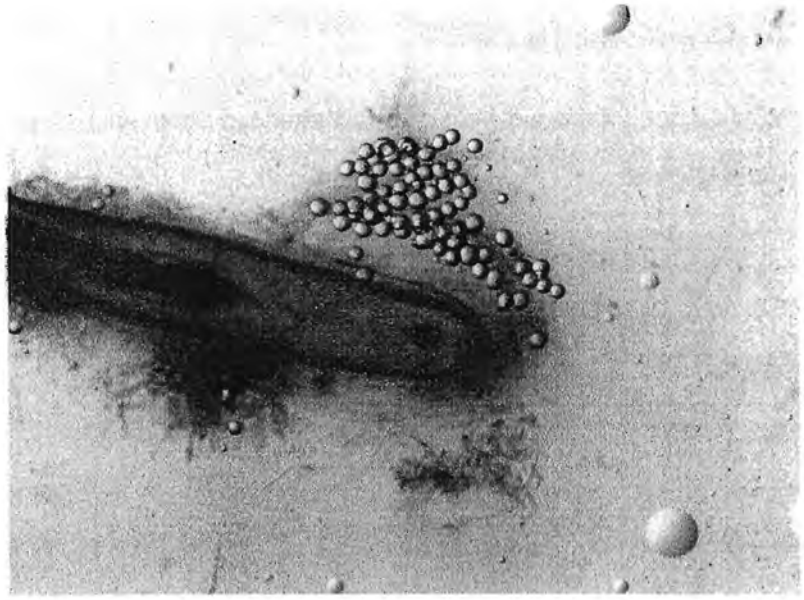
3. The dermal parts of low hair follicles were pulled out form subcutaneous fat by using forcept (ดังรูปที่ 9, 10).

4. The lower hair follicle was digested with Collagenase type I solution (1mg/ml, Sigma) at 37°c for 4-5 hours or until stalk of DP was digested under microscope (when fibrous dermal sheath has been digested entirely and the papilla just began to be digested, the enzyme digestion should be stopped)

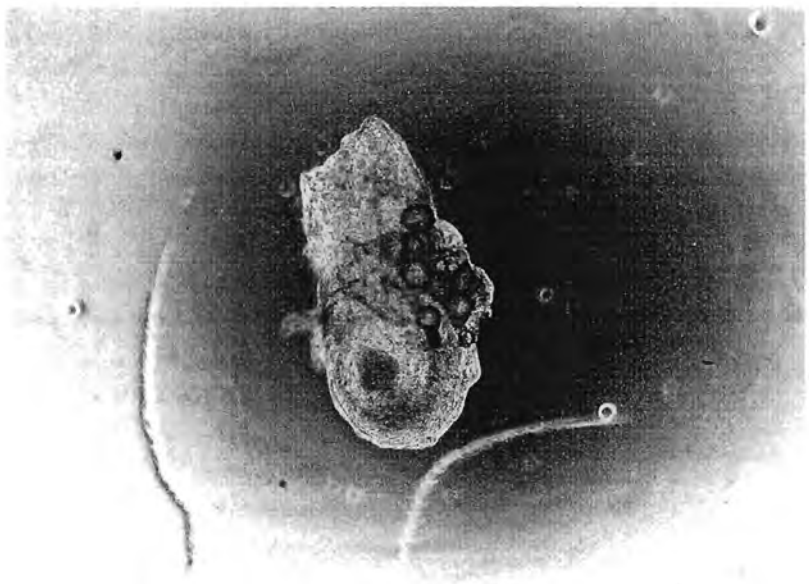
5. Pipette the mixture till the DPs emerged freely.

6. The suspension was centrifuged at 1,000 rpm for 10 minutes to release free DP cells.

7. Then the isolated final DP pellets were plated into a 6-well plate without feeder layer.



รูปที่ 9 แสดง lower hair follicle หลังจากย่อยด้วย dispase ทำให้ epithelial part แยกจาก dermal part ได้ง่าย



รูปที่ 10 แสดง dermal part of hair follicle ซึ่งประกอบด้วย dermal papilla และ connective tissue sheath (dermal sheath) รอบๆ

Simple micro-dissection with one-step enzymatic digestion method

1. After the DPs were isolated by simple micro-dissection method as above, the isolated DPs were then digested with Liberase DH (dispase high) research grade (Roche, Basel, Switzerland) at 37 °C for 2 hours or until dermal sheath and stalk of DP were digested and the papilla just began to be digested.

2. After the enzymatic dissociation, the DPs were cultured in a 6-well plate.

Cultivation and Proliferation of human hair follicle dermal papilla cells

1. DP from all methods were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Sigma Co) supplemented with nutrient Ham F12 (3 parts of DMEM, 1 part of Ham's F12), 10% fetal bovine serum (FBS), 200 mmol/L L-glutamine and 4% antibiotic-antimycotic at 37^{o}C under a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO_2. .

2. Primary cultures were left untouched for 3-5 days or until the DP cells were attached and the first cell migration became apparent.

3. Thereafter the medium was changed every 2 days. After the cell outgrowth become confluent, the cells were subcultured in a 1:3 spilt using 0.25% trypsin/EDTA solution.

Cytochemical and Immunocytochemical staining

The DP cells in the third passages were cultured on sterile chamber slide (Nunc®, Lab-tex II™) and used for immunohistochemical staining (α-smooth muscle actin, AB-PAS, 0.1% toluidine blue O and vimentin). The cells at nearly confluence were fixed with cold acetone 10 minutes and rinsed with 0.01 M PBS for three times. The following steps of these cytochemical and immunocytochemical staining procedures were performed as usual.

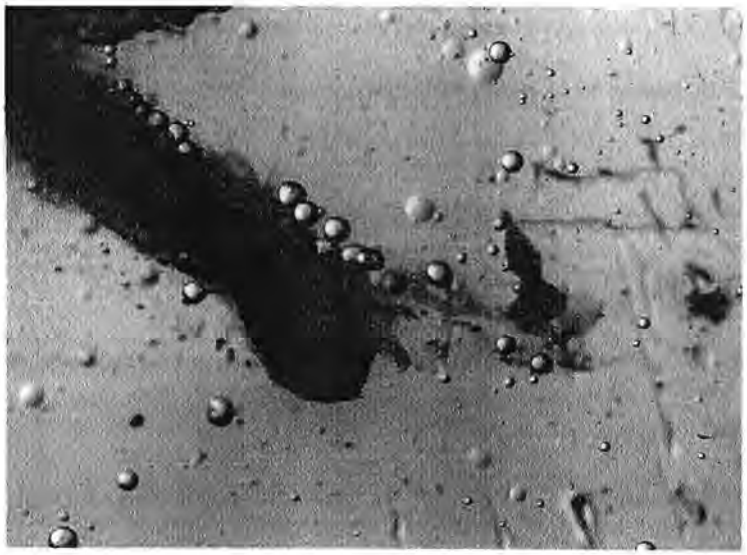
ผลการวิจัย (Results)

ลักษณะของเซลล์ dermal papilla (Characteristics of cultured DP cells)

At present, isolation of DP cells is hard to perform simplicity and effectively. We recognized a more efficient method by using simple micro-dissection with one-step enzyme digestion to isolate the DP cells of hair follicle. We observed that our isolated DP cells grown well on the plate without the feeder layer in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with Nutrient Ham's F12, 10% Fetal bovine serum, L-glutamine (200 mmol/L) and 1% antibiotic-antimycotic.

ลักษณะของเซลล์ DP ที่แยกด้วยวิธี Simple micro-dissection with one-step enzymatic digestion

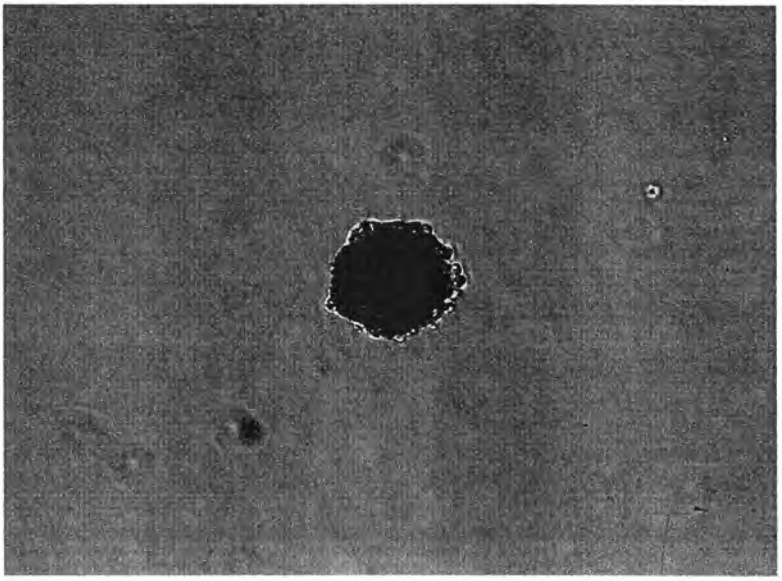
After simple microdissection (รูปที่ 11), we do digestion the DP with Liberase DH at 37 °C for 2 hours to digest directly the capsule sheath of follicular dermis to expose the DP cells.



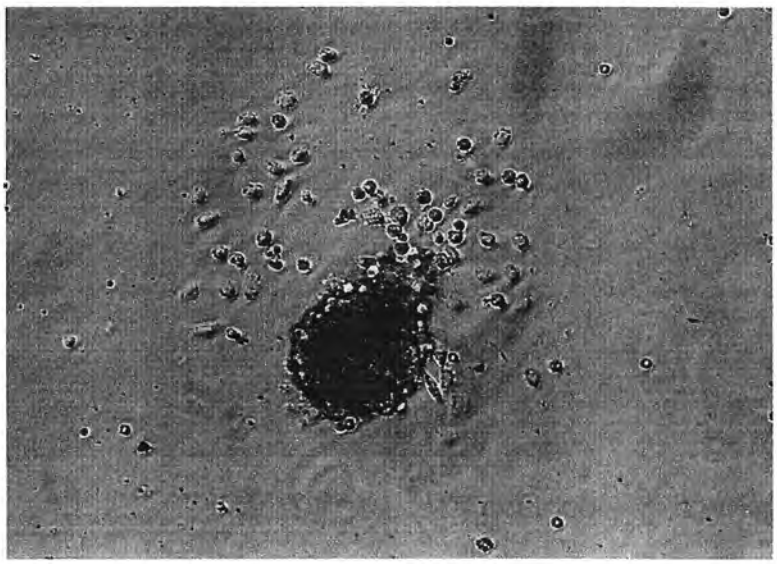
รูปที่ 11 แสดง dermal papilla หลังจากแยกด้วยวิธี simple micro-dissection ก่อนจะนำไปย่อยด้วยเอนไซม์ Liberase DH (dispase high) research grade (Roche, Basel, Switzerland)

The DPs after digestion were in spherical shape (ดังรูปที่ 12). Most of DPs attached quickly within one day on the plastic plate with higher attached rate 95% (N = 95/100). One day after DP was attached to the plate, the cells initially outgrowth from the DP explants and spread

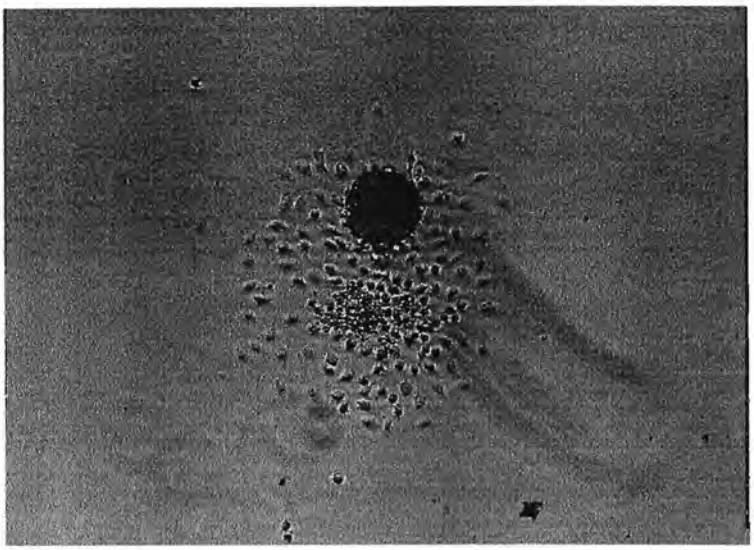
out like sunflowers (outgrowth rate for the 5 days is 92% (N= 92/100)). (ดังรูปที่ 13, 14) In this method, the culture plates were kept untouched for 3 days, allowing all DPs to adhere.



รูปที่ 12 แสดงลักษณะของ dermal papilla ที่ได้จากการแยกด้วยวิธี simple micro-dissection with one-step enzymatic digestion method

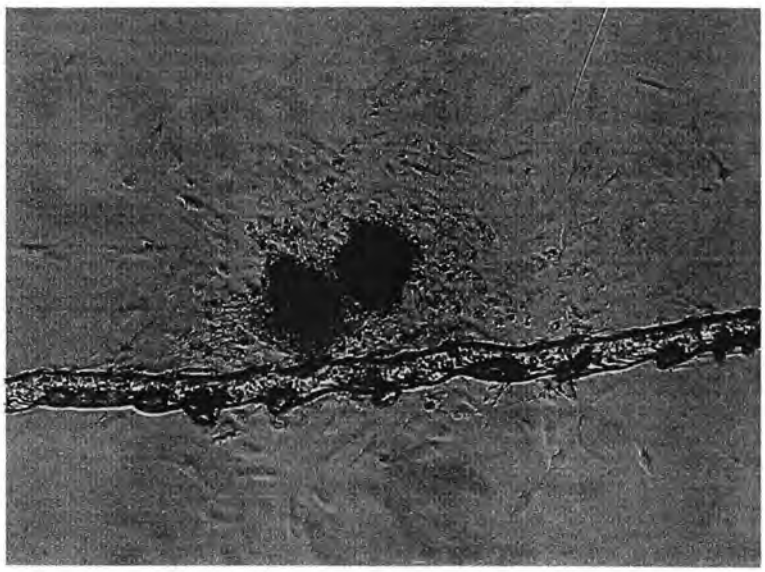


รูปที่ 13 แสดงลักษณะของ dermal papilla cells ที่เริ่มแบ่งตัว หลังจาก DP explants เกาะ plate ได้เพียง 1 วัน

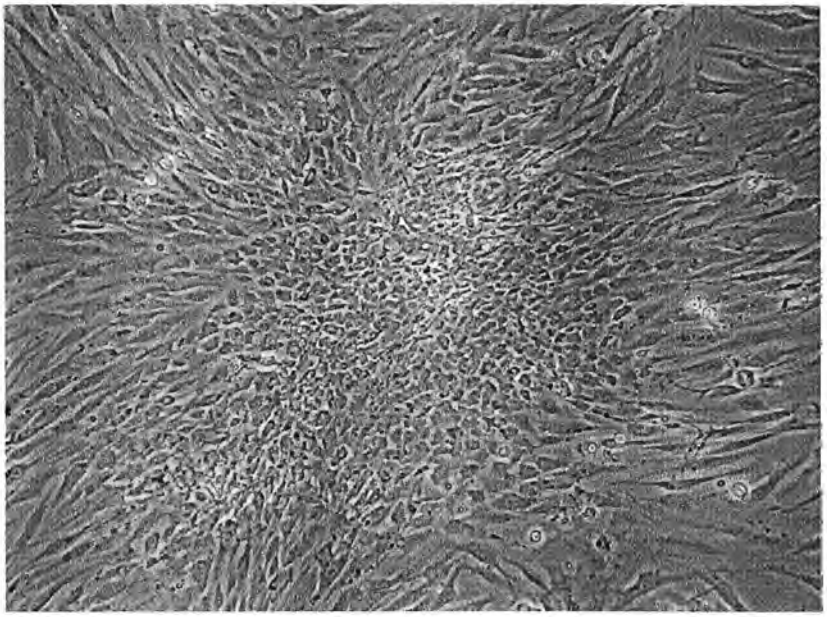


รูปที่ 14 แสดงลักษณะของ dermal papilla cells ขณะแบ่งตัวกระจายออกจากศูนย์กลาง คล้ายดอกทานตะวัน (sunflower)

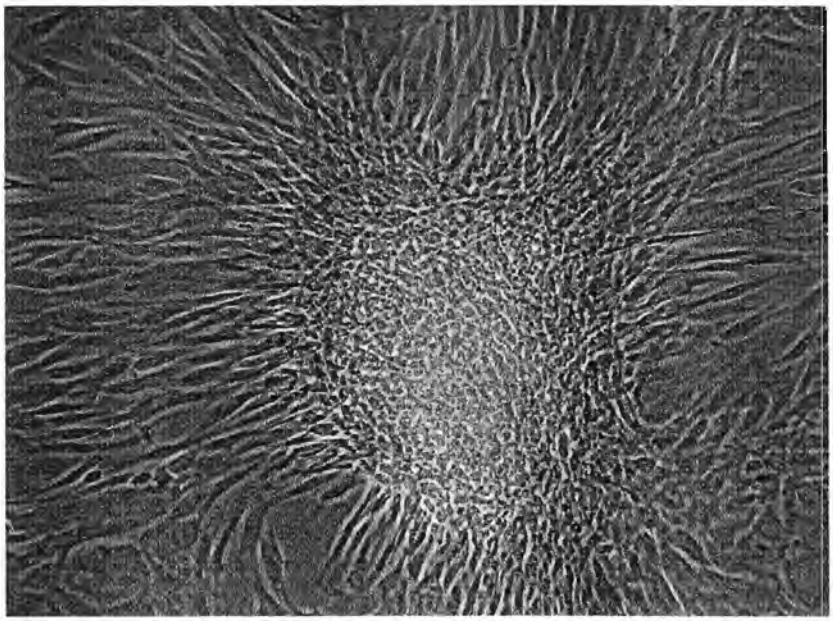
These cells showed polygonal morphology with many various length processes and containing pigments in the large cytoplasm. (ดังรูปที่ 15) The DP cells reached confluence and could be subcultured within 2 weeks after primary culture. Difference from the dermal fibroblasts and dermal sheath cells, DP cells generally spindle shaped at low density and form multilayer aggregation and clump at preconfluent density. (ดังรูปที่ 16.17)



รูปที่ 15 แสดงลักษณะการแบ่งตัวของ dermal papilla cells หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 3 วัน

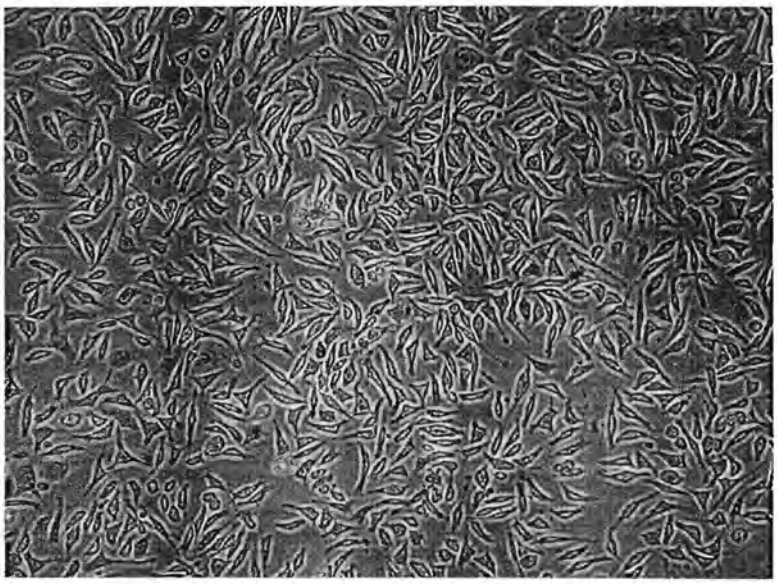


รูปที่ 16 แสดงลักษณะของ DP cells ที่มีการรวมกลุ่มซ้อนกัน ซึ่งเป็นลักษณะจำเพาะ "multilayer aggregation and clump"

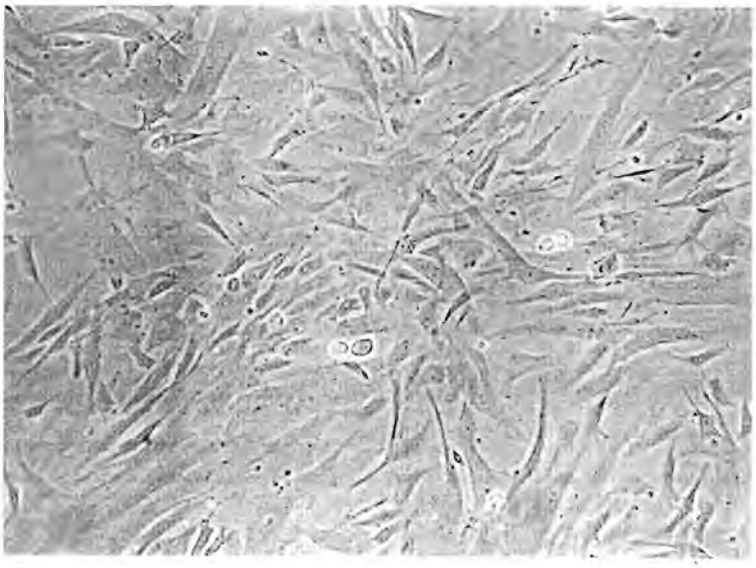


รูปที่ 17 แสดงลักษณะของ DP cells หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 2 สัปดาห์ เซลล์แบ่งตัวเต็ม plate ในรูป ยังเห็นลักษณะของเซลล์ที่มาซ้อนทับกันที่เรียกว่า "multilayer aggregation and clump"

Similar to the bulge outer root sheath cells, DP cells also showed high proliferative capacity. In early passages, DP cells were smaller in size and grow quickly. (ดังรูปที่ 18) In the later passages DP cells became larger, flat, irregular shape and grow less aggressively. (ดังรูปที่ 19) The aggregation of cells into multi-layer clumps, which is characteristic of cultured DP cells, was less seen in multiple passages (over 8 passages).



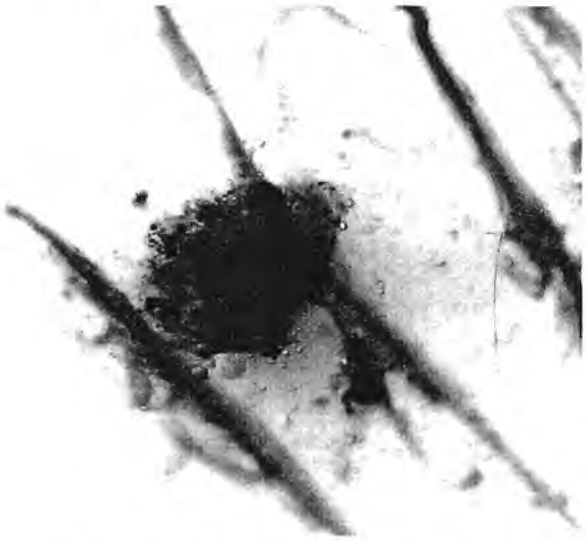
รูปที่ 18 แสดงลักษณะของ dermal papilla cells ใน passage ที่ 2 เซลล์จะมีขนาดเล็ก และแบ่งตัวเร็ว



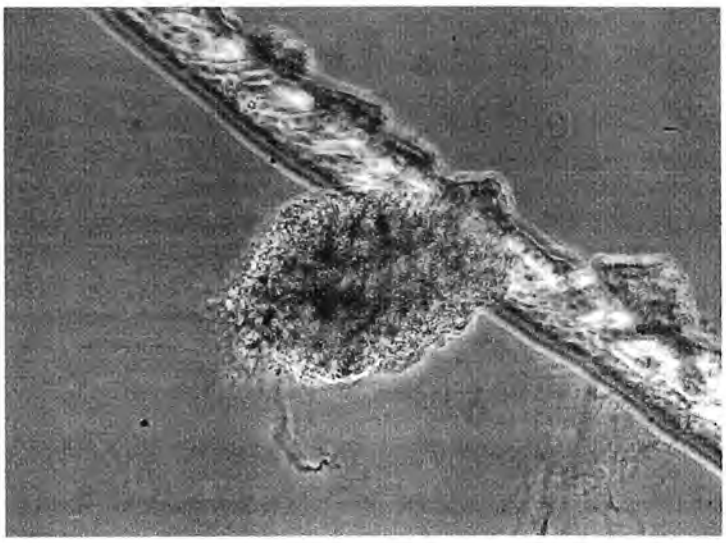
รูปที่ 19 แสดงลักษณะของ dermal papilla cells ใน passage ที่ 6 เซลล์จะมีขนาดใหญ่ขึ้น และแบ่งตัวช้าลง

ลักษณะของเซลล์ DP ที่แยกด้วยวิธี Surgical micro-dissection

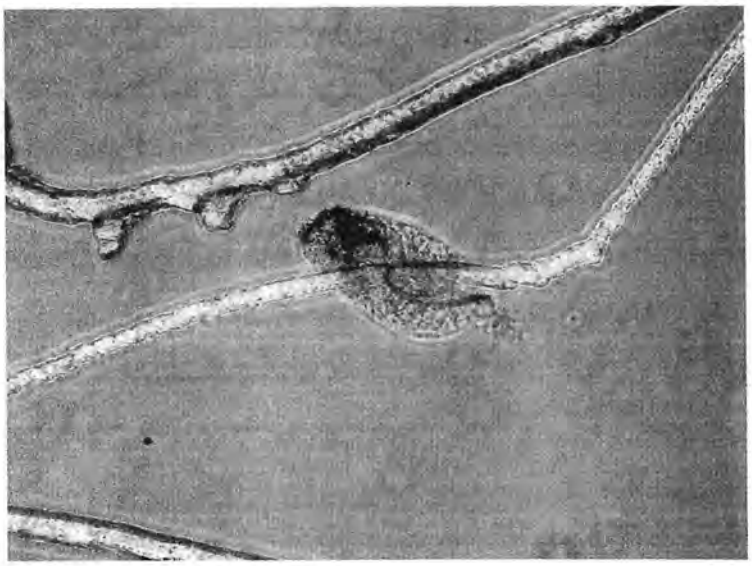
Compared with surgical micro-dissection technique, the isolated DP was still in elliptical or oval shape with intact basement membrane. (ดังรูปที่ 20) The DP was very hard to adhere (N=20/40) even using needle scratch technique. (ดังรูปที่ 21, 22) In this method, the culture plates were kept untouched for 5-7 days, allowing all DPs to adhere. About 5-10 days after, DP by this method began to attach and the cells outgrowth from the explant in about 5-14 days (outgrowth rate for the 10 days is 37.5% (N= 15/40)). (ดังรูปที่ 23)



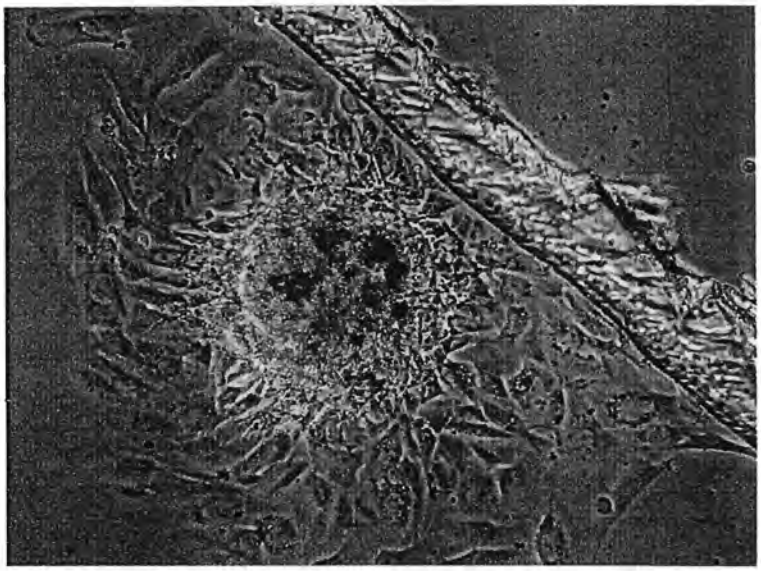
รูปที่ 20 แสดงลักษณะของ dermal papilla ที่ได้จากการแยกด้วยวิธี surgical micro-dissection



รูปที่ 21 แสดง needle scratch technique เพื่อให้ DP ที่แยกได้เกาะกับ plate ได้ดีขึ้น



รูปที่ 22 แสดง needle scratch technique

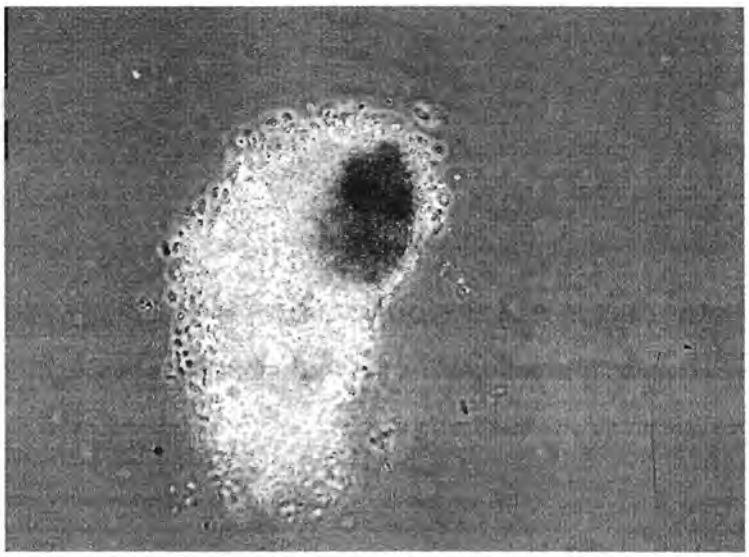


รูปที่ 23 แสดงลักษณะการแบ่งตัวของ dermal papilla cells หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 7 วัน

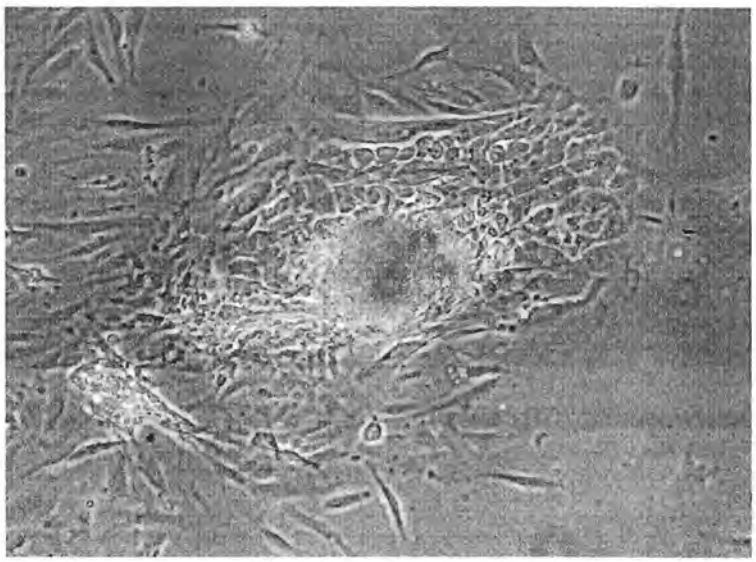
ลักษณะของเซลล์ DP ที่แยกด้วยวิธี Two-step enzymatic digestion

In two-step enzymatic digestion method, The lower hair follicles were digested with dispase, their epithelial part was easily detached form the dermal part that made it easy to isolate the DP. Then the dermal part was digested with collagenase I for 6-8 hours. Afterward the free DP cells were isolated by low speed centrifugation. The DP isolated by this method was in elliptical or oval shape with surrounding dermal sheath. (ดังรูปที่ 24) It also hard to adhere

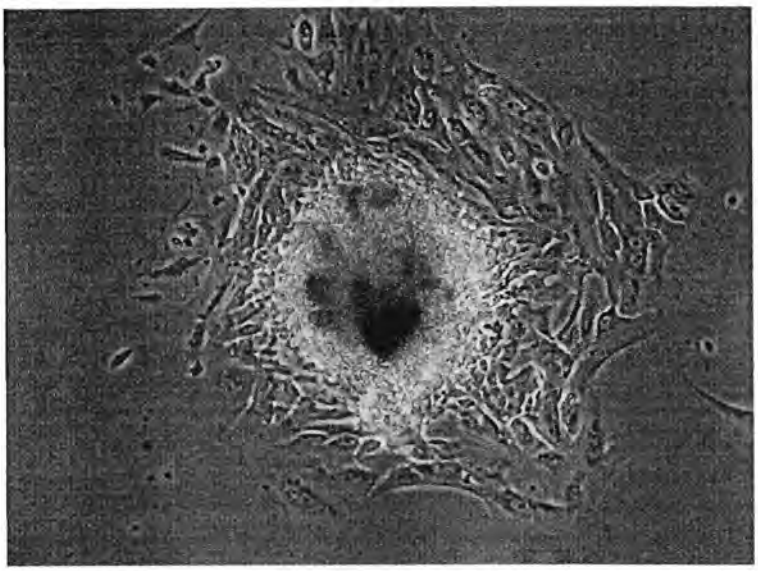
(N=12/40) even using little media. DPs start to attach in 5-10 days and the cells outgrowth from the explant in about 5-14 days (outgrowth rate for the 10 days is 25% (N= 10/40)). (ดังรูปที่ 25, 26, 27) In this method the cultured DP cells usually contaminated with dermal sheath cells and other surrounding cells such as melanocytes and outer root sheath cells.



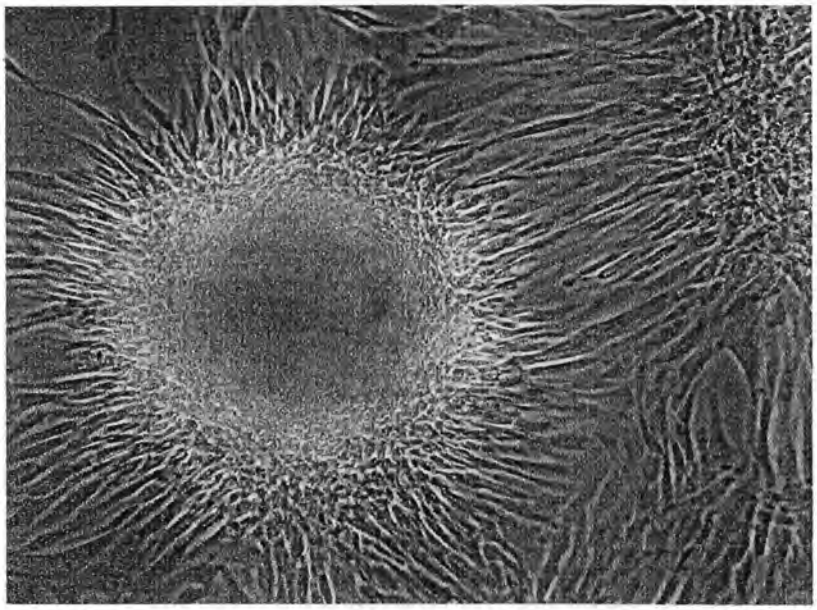
รูปที่ 24 แสดงลักษณะของ DP ที่ได้จากการแยกด้วยวิธี two-step enzymatic digestion



รูปที่ 25 แสดงลักษณะการแบ่งตัวของ DP cells ที่ได้จากการแยกด้วยวิธี two-step enzymatic digestion หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 7 วัน



รูปที่ 26 แสดงลักษณะการแบ่งตัวของ DP cells ที่ได้จากการแยกด้วยวิธี two-step enzymatic digestion หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 7 วัน ซึ่งพบมี dermal sheath ปะปน



รูปที่ 27 แสดงลักษณะของ DP cells ที่ได้จากการแยกด้วยวิธี two-step enzymatic digestion หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 2 สัปดาห์

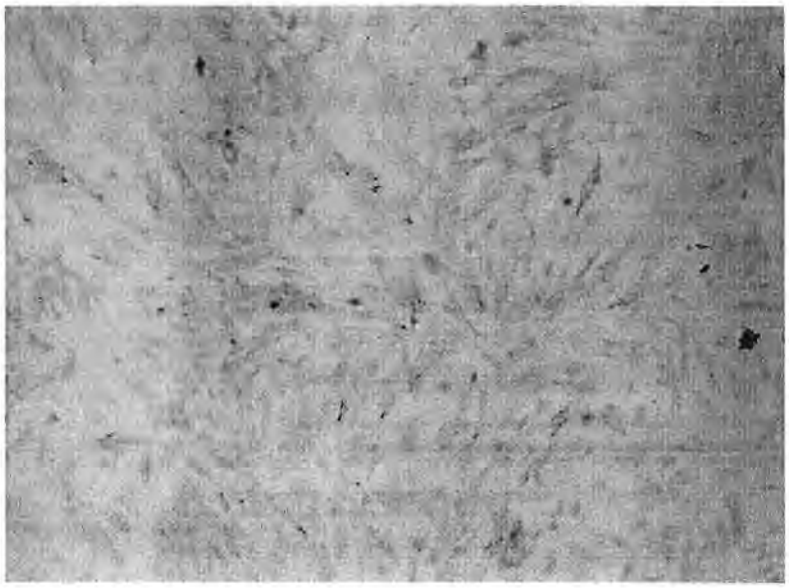
ลักษณะการติดสีย้อมของเซลล์ dermal papilla (Immunocytochemistry of DP cells)

The cultured DP cells were identified by positive immunocytochemistry (α-smooth muscle actin, AB-PAS, 0.1% toluidine blue O and vimentin), which were similar to the staining

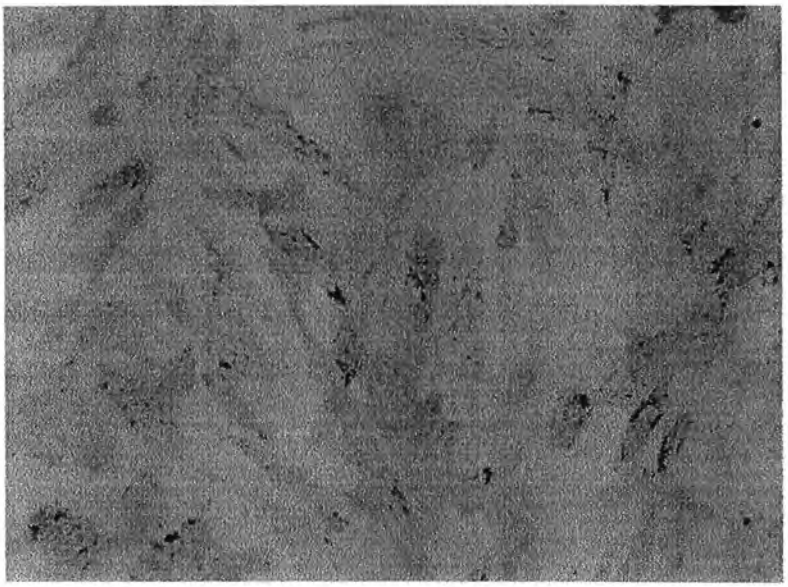
results of in situ hair follicle and consistent with published report. When stained with alcian blue followed by periodic acid Schiff (AB-PAS), the DP cells showed red cytoplasm. (ดังรูปที่ 28, 29) When stained with toluidine blue O, both nucleus and cytoplasm of DP cells stained purple. (ดังรูปที่ 30) For alpha-smooth muscle actin, DP cells cytoplasm showed positive brown color in multi-layer aggregation and clumps. (ดังรูปที่ 31, 32) DP cells, DS cells and dermal fibroblasts were all positive for vimentin. (ดังรูปที่ 33) Except showed positive with AB and AB-PAS, DS cells were negative for toluidine blue O. Dermal fibroblasts were all negative with AB, AB-PAS and toluidine blue O. The results showed as in Table I

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบลักษณะการย้อมติดสีของเซลล์ทั้ง 3 ชนิด DPCs, DSCs และ dermal fibroblasts

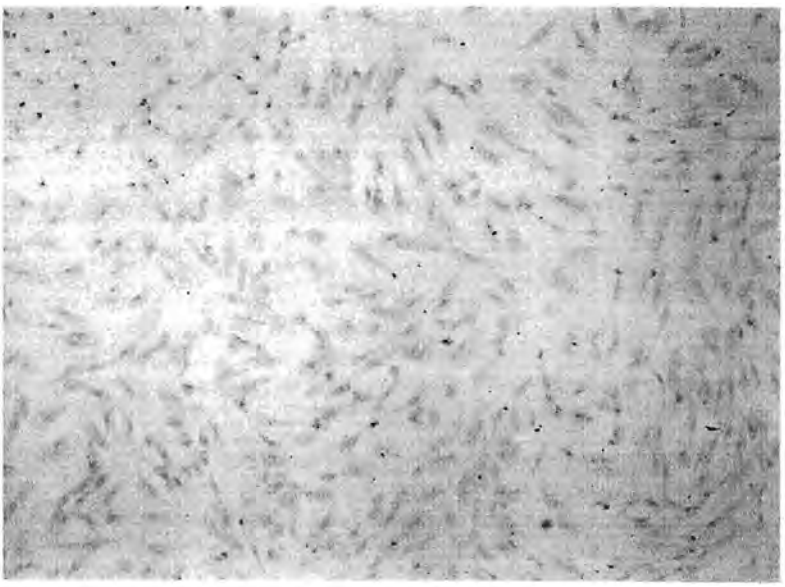
ชนิดของเซลล์	AB	AB-PAS	Toluidine blue	Vimentin	SMA
DP cells	+	++	+	+	+
DS cells	+	+/-	-	+	+
Fibroblasts	-	—	-	+	-



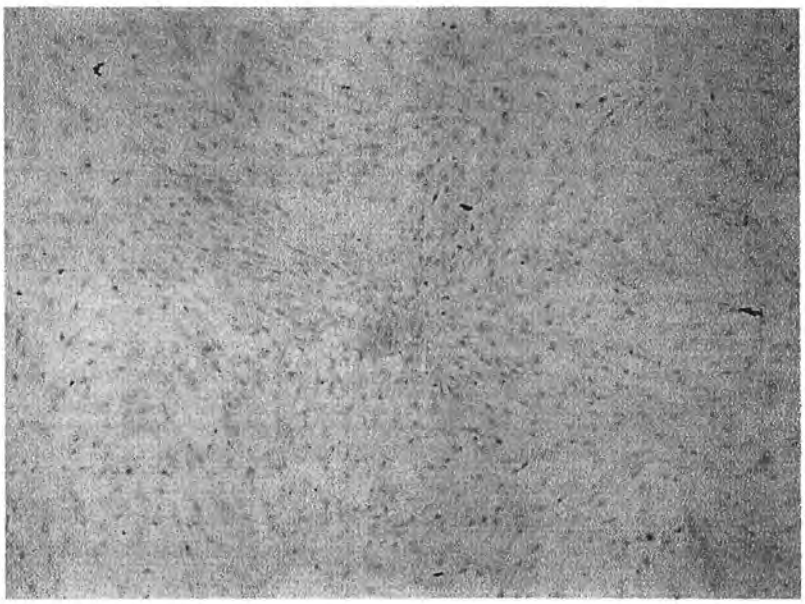
รูปที่ 28 แสดงการย้อมติดสี AB-PAS ซึ่ง cytoplasm ของ DP cells จะย้อมติดสีแดง (x100)



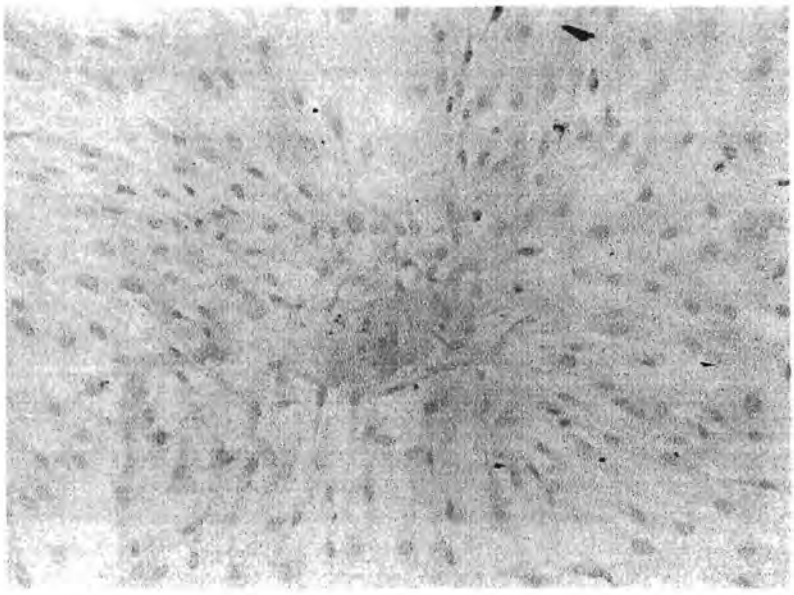
รูปที่ 29 แสดงการย้อมติดสี AB-PAS ซึ่ง cytoplasm ของ DP cells จะย้อมติดสีแดง (x200)



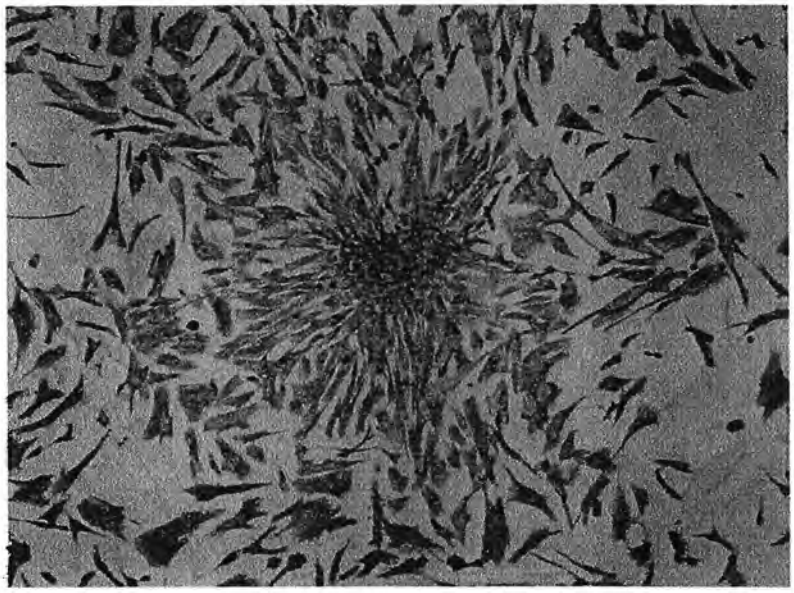
รูปที่ 30 แสดงการย้อมติดสี toluidine blue O ซึ่งทั้ง nucleus และ cytoplasm ของ DP cells จะย้อมติดสีม่วง (x200)



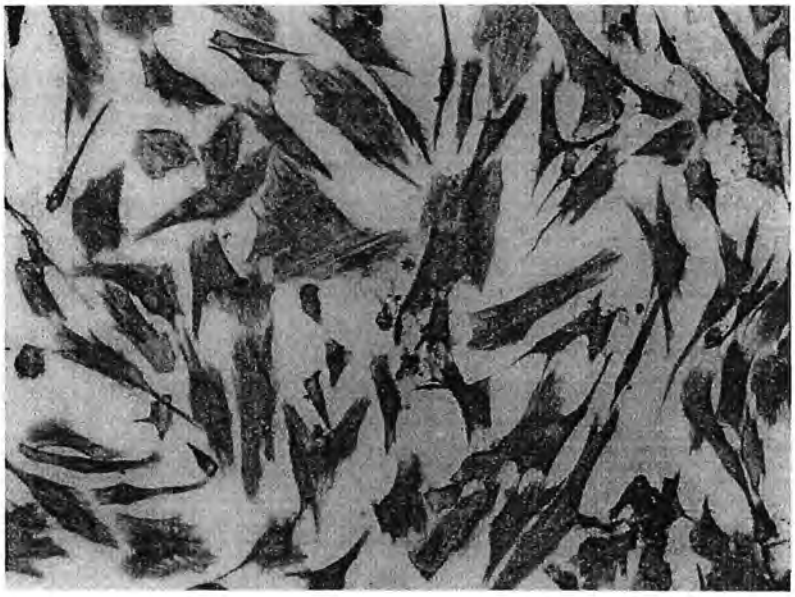
รูปที่ 31 แสดงการย้อมติดสี alpha-smooth muscle actin ซึ่งจะย้อมเฉพาะบริเวณ "multi-layer aggregation and clumps" (x100)



รูปที่ 32 แสดงการย้อมติดสี alpha-smooth muscle actin ซึ่งจะย้อมเฉพาะบริเวณ "multi-layer aggregation and clumps" (x200)



รูปที่ 33 แสดงการติดสี Vimentin ซึ่งทั้ง DPCs, DSCs และ dermal fibroblasts จะย้อมติดหมด (x100)



รูปที่ 33 แสดงการติดสีน้ำตาลของ Vimentin ของ cultured DP Cells (x200)

อภิปราย/วิจารณ์ (Discussion)

This study is the development of isolation and cultivation of human hair follicle dermal papilla cells. In the past few years have seen significant developments in hair follicle research including hair multiplication and regeneration. It is a basic necessary for healthy dermal papilla cells to be isolated and cultured.

The most commonly used method to isolate dermal papilla cells is "surgical microdissection" technique which first established by Cohen and Oliver in 1966 [25] and adapted by Messenger in 1984 [26-27]. This method requires significant skill, is time-consuming and has several limitations regarding cell adhesion and low growth-out rates. To get better yields and simplify the method, the enzymatic digestion was established but also has problem of DS cells contamination. So in this study, we developed a novel method for the simple, rapid and efficient isolation of dermal papilla cells from human scalp hair follicle. By combining of simple dissection technique followed by with one-step enzyme digestion, we easily obtained these cells on a large-scale in rapid time. We used the activity of a new mixture of purified dispase and collagenase enzyme, Liberase DH (dispase high) research grade, to proteolysis the isolated DP.

When compared among 3 methods, microdissection alone, two-step enzymatic digestion and combined the simple microdissection with one-step enzymatic digestion, we found that our new method has several significant advantages over the others. (As in Table 2)

Our new method remarkably increases DP yield and purity. Most of our DP attached the plate within 1-3 days (attachment rate 90% VS 50% of surgical microdissection VS 33.3% of two-step enzymatic digestion) and the cells can spread out more quickly in 1-2 days later (outgrowth rate 92% VS 37.5% of surgical microdissection VS 25% of two-step enzymatic digestion). The DPs isolated by microdissection are very hard to adhere. The free-floating DP after 10 days cannot adhere to the plate even do a needle scratching. The key point is the use of purified enzyme blends, Liberase DH, with the good control of right digestive time. Liberase DH Research Grade contains highly purified Collagenase I and Collagenase II which exhibit collagenase activity of 14 Wunsch unit/ ml. These two collagenase isoforms are blended in a precise ratio with each other and with a high concentration of Dispase, a non-clostridial neutral

protease. The activity of type I and II collagenase through the proteolysis of capsule sheath (basement membrane) and digestion of extracellular matrix, considerably facilitates cell attachment and accelerates the cells to migrate out more freely. While Neutral proteases or type IV collagenase of dispase act synergistically with collagenase.

Moreover, these enzyme blends contain high dispase from *Bacillus Polymyxa*, so the bacterial by-products, such as endotoxins, are reduced up to several thousand-fold (< 50 EU/mg). Because of it high purity and less in endotoxin, we are able to increase the rate of primary DP cells per DP, improve the viability and functionality of isolated cells and reproducibility of tissue dissociation.

Furthermore, we used microdissection first to separate DPs out from DS under microscope, hence our method can decrease the possibility of DS cells contamination when using enzymatic digestion alone. For enzymatic digestion technique, time of dissociation, enzyme ratios, and enzyme concentration are very important. They all affect the tissue-dissociation out-come. If enzyme concentration is too high, might be decreased in cell viability and impaired cell function. If concentration is too low, the dissociation might be incomplete and results in low cell yield.

Another main advancement of this method is time saver, from 20-24 hours of the former two-step enzymatic digestion to 2 hours of one incubation step using mixture of purify enzyme. The two-step enzymatic digestion is composed of the overnight incubation with dispase at 4°c followed by collagenase for further 4-5 hours in the incubator. It is much more easy to use enzyme blend to shortening the enzyme digestive time.

When compared with others' former results using enzymatic digestion, such as Warren [28] who treated the fleshly DP with collagenase type IV (500U/mg) after microdissection and Chiu [29], who treated the expose hair bulbs with dispase (50U/ml) for 45 minutes before microdissection, we obviously affirm that the operated steps and our method is more easy and efficient.

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบข้อดีข้อเสียของวิธีการแยกเซลล์ทั้ง 3 วิธี microdissection alone, two- step enzymatic digestion และ combined simple microdissection with one-step enzymatic digestion

Method	Surgical Micro-dissection alone	2-step enzymatic digestion	Micro-dissection with 1-step enzymatic digestion
Description	Cut DS to expose DP → release DP by cutting stalk	Two-step enzyme, using dispase and then collagenase I treatment of lower hair follicle	Dissect DP followed by one-step enzyme (Liberase DH: collagenase + dispase)
Adventage	Preserve the intact DP	Reduced labor	Time saver Efficient with high purity
Time use	Require significant skill, Time-consuming	16-18 hours for dispase 6-8 hours for collagenase	3 hours
Culture outcome	Low product poor cell adhesion low growth-out rates	Contamination of ORS and DSC	Better cell attachment + cell yield and viability Less DSC contamination

Our DP cells in the culture condition grew well without the need of collagen-coated plate. The culture media we used is DMEM supplemented with nutrient Ham F12 (3 parts of DMEM, 1 part of Ham's F12), 10% fetal bovine serum (FBS), 200 mmol/L L-glutamine and 1% antibiotic-antimycotic at 37^{o}C under a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO_2. The DP cells reached confluence and could be subcultured within 2 weeks after primary culture and can be subcultured about every 2 weeks in passage culture.

For immunocytochemical study, the DP cells were cultured on special slide chamber, which easily used for staining procedure. The cultured DP cells stained positive with specific markers (α-smooth muscle actin, AB-PAS, toluidine blue O and vimentin), which were similar to the staining results of in situ hair follicle and previous invitro study [30]. Compared with DP cells, DS cells can be stained positive with AB and toluidine blue O but negative with PAS as same in situ dermal sheath.

สรุปและข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยแรกในประเทศไทยที่ได้ทำการศึกษา และพัฒนากระบวนการแยกเซลล์ต้นกำเนิดเส้นผมชนิด dermal papilla จากเนื้อเยื่อต่อมขนบริเวณหนังศีรษะ โดยคิดค้นเทคนิคใหม่ คือ "One-Step Enzyme digestion and Simple dissection" โดยอาศัยการตัดแยกเซลล์และเนื่อเยื่อส่วนต่างๆ จากต่อมขน (surgical microdissection) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ชนิด stereomicroscope ร่วมกับการย่อยด้วยเอนไซน์ (enzymatic Dissociation) ชนิดผสมระหว่าง Dispase และ collagenase (Liberase DH) เพื่อแยกเซลล์ต้นกำเนิด

วิธีการแยกเซลล์ที่ทางคณะผู้วิจัยพัฒนาขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการวิจัยแบบเก่าทั้งแบบ คือ surgical microdissection และ two- step enzyme digestion พบว่ามีประสิทธิภาพสูงกว่า ขั้นตอนไม่ยุ่งยาก และประหยัดเวลามากกว่า เซลล์ที่ได้มีความสามารถในการเกาะภาชนะเลี้ยงเซลล์ และแบ่งตัวได้ดีกว่า ไวกว่า ได้เซลล์ที่ viable มากกว่า

นอกจากนี้ยังได้พัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงที่มีประสิทธิภาพ โดยงานวิจัยนี้สามารถเพาะเลี้ยงเซลล์โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ (culture media) และสารเร่งการเจริญเติบโต (growth factors และ cytokines) ที่เหมาะสม ทำให้สามารถเพาะเลี้ยงและเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ปริมาณมาก มีสุขภาพแข็งแรง และเลี้ยงได้ยาวนานหลาย passages

ในการศึกษาคุณสมบัติการย้อมติดสี Immunocytochemistry พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดเส้นผมชนิด dermal papilla ที่เพาะเลี้ยงได้ ย้อมติดสีที่แสดงลักษณะจำเพาะ ได้แก่ α-smooth muscle actin (SMA), alcian blue (AB)-PAS, vimentin และ toluidine blue O ซึ่งสามารถใช้บ่งบอก (identify) ว่าเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเส้นผมชนิดเซลล์ dermal papilla และผลการย้อมติดสีมีลักษณะเหมือนกับการย้อมติดสีของเซลล์ dermal papilla ในเนื้อเยื่อ และตรงกับงานวิจัยที่ตีพิมพ์ก่อนหน้านี้

โดยทั้งนี้ทางคณะผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าการศึกษาเกี่ยวกับการคัดแยกและเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดเส้นผมชนิด dermal papilla ซึ่งเป็นพื้นฐานที่สำคัญของงานวิจัยเกี่ยวกับเซลล์ต้นกำเนิดเส้นผม และโรคของเส้นผมทุกชนิด จะมีประโยชน์อย่างมากต่อการศึกษาอื่นๆ ในอนาคต เช่นการศึกษาลักษณะทางชีววิทยาของเส้นผม (hair biology) โรคของเส้นผม (hair disorders) การนำมาใช้ทดสอบประสิทธิภาพของยา หรือการรักษาใหม่ๆ ในเซลล์ต้นกำเนิดก่อนนำมาทดสอบในมนุษย์ หรือแม้กระทั่งการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเส้นผม (hair folliculogenesis) เป็นต้น

บรรณานุกรม (Bibliography)

1 Reynolds AJ, Jahoda CA. Cultured dermal papilla cells induce follicle formation and hair growth by transdifferentiation of an adult epidermis. Development 1992; 115: 587-93.

2 Ohyama M. Advances in the study of stem-cell-enriched hair follicle bulge cells: a review featuring characterization and isolation of human bulge cells. Dermatology 2007; 214: 342-351.

3 Inamatsu M, Tochio T, Makabe A, Endo T, Oomizu S, Kobayashi E, et al. Embryonic dermal condensation and adult dermal papilla induce hair follicles in adult glabrous epidermis through different mechanisms. Dev Growth Differ 2006; 48: 73-86.

4 Gharzi A, Reynolds AJ, Jahoda CA. Plasticity of hair follicle dermal cells in wound healing and induction. Exp Dermatol 2003; 12: 126–36.

5 McElwee KJ, Kissling S, Wenzel E, Huth A and Hoffmann R. Cultured peribulbar dermal sheath cells can induce hair follicle development and contribute to the dermal sheath and dermal papilla, J Invest Dermatol 2003;121:1267–1275.

6 Iida M, Ihara S, Matsuzaki T. Hair cycle-dependent changes of alkaline phosphatase activity in the mesenchyme and epithelium in mouse vibrissa follicles. Dev Growth Differ 2007; 49: 185–195.

7 Rendl M, Polak L, Fuchs E. BMP signaling in dermal papilla cells is required for their hair follicle-inductive properties. Genes Dev 2008; 22: 543–557.

8 Jahoda CA, Reynolds AJ, Chaponnier C, Forester JC, Gabbiani G. Smooth muscle alpha-actin is a marker for hair follicle dermis in vivo and in vitro. J Cell Sci 1991; 99: 627–636.

9 Tajima SM, Kishimoto J. Hair cycle-specific expression of versican in human hair follicles. J Dermatol Sci 2005; 39: 147–154.

10 Enshell-Seijffers DLindon C, Morgan BA. The serine protease Corin is a novel modifier of the Agouti pathway, Development 2008; 135: 217–225.

11 Ito Y, Hamazaki TS, Ohnuma K, Tamaki K, Asashima M, Okochi H. Isolation of murine hair-inducing cells using the cell surface marker prominin-1/CD133. J Invest Dermatol 2007; 127: 1052-60.

12 Oliver RF. The experimental induction of whisker growth in the hooded rat by implantation of dermal papillae. J Embryol Exp Morphol 1967; 18: 43–51.

13 Horne KA, Jahoda CA. Restoration of hair growth by surgical implantation of follicular dermal sheath. Development 1992; 116: 563–71.

14 Reynolds AJ, Lawrence C, Cserhalmi-Friedman PB, Christiano AM, Jahoda CA. Trans-gender induction of hair follicles. Nature 1999; 402: 33–34.

15 McElwee KJ, Kissling S, Wenzel E, Huth A, Hoffmann R. Cultured peribulbar dermal sheath cells can induce hair follicle development and contribute to the dermal sheath and dermal papilla.K J Invest Dermatol 2003; 121: 1267–75.

16 Reynolds AJ, Jahoda CA. Cultured dermal papilla cells induce follicle formation and hair growth by transdifferentiation of an adult epidermis. Development 1992; 115: 587–593.

17 Anders LJ, Yuspa SH. Isolation and short-term culture of primary keratinocytes, hair follicle populations and dermal cells from newborn mice and keratinocytes from adult mice for in vitro analysis and for grafting to immunodeficient mice. Nat Protoc 2008; 3: 799–810.

18 Ehama R, Ishimatsu-Tsuji Y, Iriyama S, Ideta R, Soma T, Yano K. Hair follicle regeneration using grafted rodent and human cells. J Invest Dermatol 2007; 127: 2106–2115.

19 Zheng Y, Du X, Wang W, Boucher M, Parimoo S, Stenn K. Organogenesis from dissociated cells: generation of mature cycling hair follicles from skin-derived cells. J Invest Dermatol 2005; 124: 867–876.

20 Inamatsu M, Tochio T, Makabe A, Endo T, Oomizu S, Kobayashi E. Embryonic dermal condensation and adult dermal papilla induce hair follicles in adult glabrous epidermis through different mechanisms. Dev Growth Differ 2006; 48: 73–86.

21 Osada A, Kobayashi K, Masui S, Hamazaki TS, Yasuda K, Okochi H. Cloned cells from the murine dermal papilla have hair-inducing ability. J Dermatol Sci 2009; 54: 129–131.

22 Morris RJ, Liu Y, Marles L, Yang Z, Trempus C, Li S, et al. Capturing and profiling adult hair follicle stem cells. Nat Biotechnol 2004; 22: 411–417.

23 Cotsarelis G. Epithelial stem cells: a folliculocentric view. J Invest Dermatol 2006; 126: 1459-68.

24 Stenn K, Cotsarelis G. Bioengineering the hair follicle: fringe benefits of stem cell technology. Current Opinion in Biotechnology 2005, 16: 493–497.

25 Oliver RF. The induction of hair follicle formation in the adult hooded rat by vibrissa dermal papillae. J Embryol Exp Morphol 1970; 23: 219–236.

26 Jahoda CAB, Oliver RF. The growth of vibrissa dermal papilla cells in vitro. Br J Dermatol 1981; 105: 623–627.

27 Messenger AG. The culture of dermal papilla cells from human hair follicles. Br J Dermatol 1984; 110: 685–689.

28 Warren R, Chestnut MH, Wong TK, Otte TE, Lanners KM, Meili ML. Improved method for the isolation and cultivation of human scalp dermal papilla cells. J Invest Dermatol 1992; 98: 693–699.

29 Chiu H-C, Chang C-H, Wu Y-C. An efficient method for isolation of hair papilla and follicle epithelium from human scalp specimens. Br J Dermatol 1993; 129: 350–351.

30 Wu JJ, Liu RQ, Lu YG, Zhu TY, Bo Cheng, Xue Men. Enzyme digestion to isolate and culture human scalp dermal papilla cells: a more efficient method. Arch Dermatol Res 2005; 297: 60–67.

ประวัติคณะผู้วิจัย พร้อมทั้งหน่วยงานที่สังกัด

Pravit Asawanonda, MD.

Work Address:	Division of Dermatology
	Department of Medicine
	Faculty of Medicine
	King Chulalongkorn Memorial Hospital
	Rama 4 Road
	Bangkok 10330
	Thailand
Home Address:	152 Nang Linchi Road
	Bangkok 10120
Email Address:	pravit@adsl.loxinfo.com
	fibrosis@gmail.com
Date of Birth:	September 13, 1964
Place of Birth:	Bangkok, Thailand

Education and Training:

1988	M.D. Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand
	(second-class honors)
1988-1990	M.Sc. in Dermatology
	Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

Thesis title "Isoprinosine in the Treatment of Multiple Warts"

September1993-February 1994

Clinical Fellow in Photobiology, Division of Dermatology, Ramathibodi Hospital, Bangkok, Thailand

1998 Doctor of Science in Dermatology, Boston University, Boston, Massachusetts

July 1997-December 1998

Clinical Fellowship in Phototherapy and Lasers Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts

Licensure and Certification:

1990 Educational Commission for Foreign Medical Graduates (ECFMG) Certification # 0-450-585-5

1993 Thai Board of Dermatology certification

1997 Commonwealth of Massachusetts limited medical licensure License #97-5273-99

Academic Appointment:

1993-1995 Instructor in Dermatology, Srinakharinwirot University Bangkok, Thailand

1998-2002 Instructor in Dermatology, Chulalongkorn University Bangkok, Thailand

2002-2006 Assistant Professor in Dermatology, Chulalongkorn University Bangkok, Thailand

2006-2009 Associate Professor of Dermatology, Chulalongkorn University Bangkok, Thailand

2009- Professor of Dermatology, Chulalongkorn University Bangkok, Thailand

Hospital Appointment:

1990-1995 Dermatologist, Bangkok General Hospital Bangkok, Thailand

1998- Dermatologist, Bumrungrad General Hospital

Professional Affiliations:

1988- Member, Medical Council of Thailand

1988- Member, Medical Association of Thailand

1993- Member, Dermatological Society of Thailand

1998- Member, Photomedicine Society

2001- International fellow, American Academy of Dermatology

2002-2004 Conference facilities

2003-2005 Member, American Society for Laser Medicine and Surgery

2004-2006 Chair, Scientific Section, The Dermatological Society of Thailand

2005- Fellow, American Society for Laser Medicine and Surgery

2006-2008 Public Relations

2007- Member, Royal College of Physicians, Thailand, membership number 3413

2008-2010 Chair, Scientific Section, The Dermatological Society of Thailand

2009- Foundation Fellow, The Asian Academy of Dermatology and Venereology

2010-2012 Chair, Scientific Section, The Dermatological Society of Thailand

2010 Member, International Society of Dermatology

Editorial Activities

Reviewer for

Archives of Dermatology

International Journal of Dermatology

Clinical and Experimental Dermatology

American Journal of Clinical Dermatology

Photodermatology Photoimmunology Photomedicine

Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology

Expert Opinion on Pharmacotherapy

Journal of Cutaneous Medicine & Surgery

Clinical Spectrum of Psoriasis: The Thailand Perspectives, PSOR Summit, Singapore, 16 July 2010

New Modalities of Treatment for Psoriasis, PSOR Summit, Singapore, 17 July 2010

Unmet Needs in Psoriasis Treatment, Meet the Experts for Psoriasis Management, Singapore, 6 August 2010

Pediatric Psoriasis, 7th Post graduate course, Multi-faceted dermatology: a Clinicians challenge, Bellevue hotel, Alabang, Muntinlupa City, The Philippines, 26-27 August 2010

Oral Treatment for Melasma, 7th Post graduate course, Multi-faceted dermatology: a Clinicians challenge, Bellevue hotel, Alabang, Muntinlupa City, The Philippines, 26-27 August 2010

Herbal Remedies for Androgenetic Alopecia, Aesthetic Asia 2010, Marina Bay Sands Convention Center, Singapore, 18 September 2010

Androgens and the Skin, 19th Regional Conference of Dermatology (Asian-Australasian), Sutera Harbour Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia, 22 October 2010

Nail Psoriasis, Is there Hope?, 19th Regional Conference of Dermatology (Asian-Australasian), Sutera Harbour Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia, 22 October 2010

2011 Scalp Psoriasis Treatment: Sharing the Best Practice. LEO Pharma-sponsored symposium at 22nd World Congress of Dermatology, Seoul, Korea, 25 May 2011

AIDS-associated alopecia areata (AAAA): a case report from Thailand and review of the literature. Premmaneesakul H, Asawanonda P, Suwanwalaikorn S, Asawametha K, Kongkabpan M, Likitthummagun S, Taungjaruwinai WM. E-Poster at 22nd World Congress of Dermatology, Seoul, Korea, 25 May 2011

Primary Care of Psoriasis Patients in Thailand. Satellite Meeting 2009. League of Asean Dermatological Societies, Hilton Hanoi Opera, Hanoi, Vietnam, 7 November 2009

Phototherapy for Psoriasis: What's New. Satellite Meeting 2009. League of Asean Dermatological Societies, Hilton Hanoi Opera, Hanoi, Vietnam, 7 November 2009

2010 Oral Whitening Agents. 1st International Congress of Aesthetic Dermatology, Bangkok Convention Centre at the Central World, Bangkok, Thailand, 22 January 2010

Full-Body Phototherapy in Dermatology. Seminar Dermatology Update: Nusantara 2010, Semarang, Central Java, Indonesia, 27 February 2010

Zooming in on Targeted Phototherapy: UV and 308-nm Excimer Laser. Philippines Dermatological Society CME Meeting organized by the Philippines Dermatological Society, The PDS Photodermatology Subspecialty Group and the Research Institute for Tropical Medicine, Mandaluyong City, The Philippines, 24 Mar 2010

Treatment for the Three Most Difficult Areas: the Scalp, the face and the Folds. PSORtalk, Danang, Vietnam, 27 Mar 2010

Phototherapy: Protocols and Phototesting. National Skin Centre Dermatology Update2010, Singapore, 14 May 2010

Phototherapy Complications: How do I deal with it? National Skin Centre Dermatology Update 2010, Singapore, 14 May 2010

Update on Photobiology: The Safety Issues of Narrowband UVB Phototherapy, National Skin Centre Dermatology Update2010, Singapore, 15 May 2010

Oral Treatment for Melasma, International Master Course on Aging Skin, Hong Kong, 12 July 2010

2005 Narrowband UV-B Phototherapy: How to Get Started. presented at the 7th Asian Congress of Dermatology. Kuala Lumpur, Malaysia. 28 Sep-1 Oct 2005

Phototherapy and Laser Treatment for Psoriasis: an Update. presented at the 7th Asian Congress of Dermatology. Kuala Lumpur, Malaysia. 28 Sep-1 Oct 2005

2006 Targeted UVB Phototherapy for Vitiligo presented at the 1st Asian Dermatologic Laser and Surgery Meeting. Cebu, the Philippines. 17-19 February 2006

"Let There be Light" presented at The Khosrow Momtaz Memorial Lectureship. Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, U.S.A. 9 March 2006

Tacrolimus for Psoriasis. presented at the Dermatology Update: The Southeast Asian Experience. Hoi An, Vietnam 8 July 2006

The Aging Face. presented at the International Symposium & Live Surgery on Facial Plastic and Reconstructive Surgery. Bangkok, Thailand 7 December 2006

2008 Is Long-Term Management of Psoriasis still a Challenge? 8th Asian Dermatological Congress, Seoul, Korea. 2 October 2008

How Niels and Barbara Changed our World: The Long Journey of Short Wavelengths. Boston University School of Medicine, Boston, Massachusetts. 5 November 2008

2009 Asia-Pacific Dermatology Medical Advisory Board Meeting, Singapore, 23 June 2009

Light Treatment of Vitiligo. International Master Course on Aging Skin, Intercontinental Hotel, Bangkok. 14 July 2009

Clinical Insights into Topical Psoriasis Treatment. Satellite Meeting 2009. League of Asean Dermatological Societies, Hilton Hanoi Opera, Hanoi, Vietnam, 5 November 2009

Consultant:

2006-2008 Procter and Gamble

2009-Present Wyeth

2009-Present Centocor

Presentations at International Meetings:

1997 Poster presentation "Repopulation of Melanocytes in Grafts of Cultured Human Keratinocytes and Human Acellular Dermis Transplanted to Athymic Mice" at the 1997 Annual Meeting, Society for Investigative Dermatology, Washington, DC. April 23-27, 1997

1998 Panel Discussion "Photoaging: the Molecular Mechanisms" at the 60th Mexican Society of Dermatology Meeting, Ixtapa-Zihuatanejo, Mexico. September 13, 1997

1999 Mini-Lecture "Narrow-band UVB for the Treatment of Vitiligo" At the New England Dermatological Society Meeting, Lahey-Hitchcock Clinic, Dartmouth, Massachusetts, April 25, 1998

Narrow-Band UVB Phototherapy: Massachusetts General Hospital Experience. Taylor CR, Asawanonda P, Alora M, and Momtaz K.

1998 Tyrosinase expression is regulated by p53. M. Khigatian, P. Asawanonda, M. Eller, M. Yaar, M. Fujita, , D.A. Norris, and B.A. Gilchrest. Presented at the Society for Investigative Dermatology meeting

2002 Taylor CR. Taneja A. Gupta S. Racette A. Asawanonda P. Trehan M. 022 308 excimer laser treatment of psoriasis. Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine. 18(2):107, 2002 April.

2004 Targeted light therapy including excimer laser. Presented at the 16th Regional Conference of Dermatology Singapore July 14-17, 2004

Non-cosmetic applications of laser therapy. Presented at the 16th Regional Conference of Dermatology. Singapore July 14-17, 2004

Extensive hair loss due to peginterferon and ribavirin in chronic hepatitis C virus infection. Chairerg P, Asawanonda P.

Extensive hair loss due to peginterferon and ribavirin in chronic hepatitis C virus infection. Chairerg P, Asawanonda P, Angsuwatcharakon P, Likitthummagun S, Premmaneesakul H, Kongkabpan M, Taungjaruwinai WM. E-Poster at 22nd World Congress of Dermatology, Seoul, Korea, 25 May 2011

Publications:

1999

Asawanonda P, Khoo LSW, Fitzpatrick TB, Taylor CR., UV-A1 for Keloid. Arch Dermatol 1999;135:348-349 (vignette)

Asawanonda P and Taylor CR. Narrowband (TL-01) UVB Phototherapy beyond Psoriasis. J Dermatol Treat 1999;10:53-57

Khoo LSW, Asawanonda P, Grevelink S, Taylor CR. Narrow-band UVB associated blisters in pityriasis rubra pilaris. J Am Acad Dermatol 1999;41:803-804.

Asawanonda P, Taylor CR. Wood's light in Dermatology. Int J Dermatol 1999;38:801-807

Asawanonda P, Ortel B, Taylor CR. Temperatures reached inside stand-up ultraviolet treatment boxes. Photodermatol Photoimmunol Photomed 1999;15:179-182

Asawanonda P, Oberlender S, Taylor CR. The use of dihydroxyacetone for the photoprotection in variegate porphyria. Int J Dermatol 1999;38: 916-918

2000

Asawanonda P, Taylor CR, Anderson RR. Pendulaser carbon dioxide resurfacing laser versus electrodesiccation with curettage in the treatment of isolated, recalcitrant psoriatic plaques. J Am Acad Dermatol 2000;42(4):660-6.

Wessagowit P Asawanonda P, Noppakun N. Papular perniosis mimicking erythema multiforme: the first case report in Thailand. Int J Dermatol 2000;39(7):527-529

Asawanonda P, Anderson RR, Chang Y, Taylor CR 308-nm Excimer Laser for the Treatment of Psoriasis: A Dose-Response Study. Arch Dermatol 2000; 136(5):619-624

Asawanonda P. Narrowband UVB Phototherapy:
A Review. Thai J Dermatol 2000;16:36-41

2001 Asawanonda P, Anderson RR, Taylor CR. 308-nm Excimer Laser Therapy for Psoriasis. Arch Dermatol 2001. 137(1):95-96

2002 Khlgatian MK, Hadshiew IM, Asawanonda P, Yaar M, Eller MS, Fujita M, Norris DA, Gilchrest BA. Tyrosinase Gene Expression is Regulated by p53. J Invest Dermatol 2002;118(1):126-32

Puavilai S. Krisadaphong P. Leenutaphong V. Asawanonda P. Akaraphan R. Ploysangham T. Ruangkarnchanasetr S. Noppakun N. Charuwichitratana S. Kulthanan K. Huiprasert P. Tresukosol P. Ophaswongse S. Comparative study of the efficacy of topical corticosteroid: five locally made and one brand name creams. J Med Assoc Thailand Jul 2002.85(7):789-799

2003 จารุวรรณ ปวิตรปก, ประวิตร อัศวานนท์. โรคสะเก็ดเงิน. จุฬาอายุรศาสตร์ May-June 2003 16(3):91-106

กนกพรรณ สุขเจริญนุกูล, ประวิตร อัศวานนท์. Chronic Urticaria. จุฬาอายุรศาสตร์ Sep-Oct 2003 16(5):163-174

2004 Asawanonda P. Chronic actinic dermatitis developing during narrowband UVB phototherapy for psoriasis
Photodermatol Photoimmunol Photomed Feb 2004. 20 (1):66-67

2005 Asawanonda P, Noppakun N, Huiprasert P. Seborrheic Keratosis-like Porokeratosis: a case report. Dermatol Online J;11 (1):18

Petcharapirat P, Rerknimitr R, Asawanonda P. Digestive endoscopic corner. Thai J Gastroenterol Sep-Dec 2005;6(3):178-181

Puavilai S, Noppakun N, Sitakalin C, Leenutaphong V, Wattanakrai P, Nakakes A, Kulthanan K, Asawanonda P, Akaraphan R, Tresukosol P, Suthipinittharm P, Somburanasin P, Charuwichitratana S, Rajatanavin N. Drug eruptions at five institutes in Bangkok. J Med Assoc Thai Nov 2005;88(11):1642-1650

Asawanonda P, Chingchai A, Torranin P. Targeted UV-B Phototherapy for plaque-type psoriasis. Arch Dermatol Dec 2005;141(12):1542-1546

2006 Asawanonda P, Nateetongrungsak Y. Methotrexate plus Narrowband UV-B Phototherapy vs. Narrowband UV-B Phototherapy Alone in the Treatment of Plaque-Type Psoriasis: A randomized, placebo-controlled study. J Am Acad Dermatol June 2006;54 (6):1013-1018

Asawanonda P, Charoenlap M, Korkij W. Treatment of Localized Vitiligo with Targeted UV-B Phototherapy: a pilot study. Photodermatol Photoimmunol Photomed June 2006; 22(3): 133-136

Kampitak T, Asawanonda P. The Efficacy of Combination Treatment with Narrowband UVB (TL-01) and Acitretin vs Narrowband UVB Alone in Plaque-Type Psoriasis: a Retrospective Study. J Med Assoc Thai 2006;89 (Suppl 3): S20-24

ชชล ศรียายาง และ ประวิตร อัศวานนท์. การรักษาทางเลือกสำหรับโรคสะเก็ดเงิน. จุฬาอายุรศาสตร์ Jul-Sep 2006;19(3):63-70

Amornpinyokeit N, Asawanonda P. 8-Methoxypsoralen cream plus targeted narrowband ultraviolet B for psoriasis. Photodermatol Photoimmunol Photomed Dec 2006; 22(6): 285-289

2008 Asawanonda P, Amornpinyokeit N, Nimnuan C. Topical 8-MOP Enhances the Therapeutic Results of Targeted Narrowband UVB Phototherapy for Plaque-Type Psoriasis. J Eur Acad Dermatol Venereol Jan 2008; 2(1):50-55

Klinubol P, Asawanonda P, Wanichweacharungruang SP Transdermal Penetration of UV Filters. Skin Pharmacol Physiol; 21(1):23-29

Monhaphol T, Yibchok-anun S, Banlunara W, Wittayasupom M, Palaga T, Asawanonda P, Wanichweacharungruang SP. Cytotoxicity, acute oral toxicity and skin irritation of 2-ethylhexyl-2,4,5-trimethoxycinnamate and di(2-ethylhexyl)-2,4,5-trimethoxybenzalmalonate Drug Chem Toxicol 31(2):289-301

Wongpiyabovorn J, Hirankarn N, Ruchusatsawat K, Yooyongsatit S, Asawanonda P, Poovorawan Y. Association of the interleukin-10 distal promoter (-2763A/C) polymorphism with late-onset psoriasis. Clin Exp Dermatol. 33(2):186-9, 2008 Mar

Asawanonda P, Kijluakiat J, Korkij W, Sindhupak W. Targeted Broadband UVB Phototherapy produces similar responses to Targeted Narrowband UVB for vitiligo: a randomized, double-blind study. Acta Derm Venereol July 2008; 88 (4): 376-381

Schwartz JR, Rocchetta H, Asawanonda P, Luo F, Thomas JH. Does tachyphylaxis occur in long-term management of scalp seborrheic dermatitis with pyrithione zinc-based treatments? Int J Dermatol (accepted for publication Apr 20, 2008)

2009 Schwartz JR, Rocchetta H, Asawanonda P, Luo F, Thomas JH. Does tachyphylaxis occur in long-term management of scalp seborrheic dermatitis with pyrithione zinc-based treatments? Int J Dermatol 2009;48:79-85

Pootongkam S and Asawanonda P. Purpura-free Treatment of Lentigines using Long-Pulsed 595 nm Pulsed Dye Laser with Compression Handpiece: a randomized, controlled study. J Drugs Dermatol 2009 Nov;8 (11 Suppl):s18-s24

Klahan S and Asawanonda P. Topical Tacrolimus Enhances the Repigmentation Capacity of Targeted Narrowband UVB Phototherapy in the Treatment of Vitiligo. Clin Exp Dermatol 2009;34(8):e1029-e1030

2010 Asawanonda P, Sutthipong T, Prejawai N. Pimecrolimus for Idiopathic Guttate Hypomelanosis. J Drugs Dermatol 2010 Mar 2010; 9 (3): 238-9

Wittayasuporn M, Rengpipat S, Palaga T, Asawanonda P, Anumansirikul N, Wanichwecharungruang SP. Chitosan derivative nanocarrier: Safety evaluation, antibacterial property and ascorbyl palmitate encapsulation. J Microencapsul 2010 May;27(3):218-25

Arjinpathana N, Asawanonda P. Oral glutathione as an oral whitening agent: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. J Dermatolog Treat 2010

Chairerg P, Kongkabpan M, Suwanwalaikorn S, Asawanonda P, Taungjaruwinai WM. The use of sulfasalazine in severe types of alopecia areata (submitted for publication)

Asawanonda P and Klahan S. Tetrahydrocurcuminoid Cream plus Targeted Narrowband UVB Phototherapy for Vitiligo: a preliminary, randomized, controlled study, Photomed Lasers Surg 2010; 28(5):679-84

2011 Ganniga Pumthong, Pravit Asawanonda, Supenya Varothai, Vorapicha Jariyasethavong, Daranporn Triwongwaranat, Puan Suthipinittharm, Kornkanok Ingkaninan, Pimporn Leelapornpisit, Neti Waranuch. Curcuma Aeruginosa, a Novel Botanically-Derived 5α-Reductase Inhibitor in the Treatment of Male-Pattern Baldness, a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study. J Dermatolog Treat (accepted for publication)

Pichai Saelim, Marisa Pongprutthipan, Suwimon Pootongkam, Vorapicha Jariyasethavong, Pravit Asawanonda. Long-Pulsed 1064-nm Nd:YAG Laser Significantly Improves Keratosis Pilaris; a Randomized, Evaluator-Blind Study. submitted for publication

Panlop Chakkavittumrong, Pravit Asawanonda. Does Metal or Fracture Prevent Psoriasis? submitted for publication

Ratchathorn Panchaprateep, Wiwat Korkij, Pravit Asawanonda, Brain-derived nerve factor and neurotrophins in androgenetic alopecia. Br J Dermatol (accepted for publication)

Ratchathorn Panchaprateep (Mornchan), MD.

Sex	Female
Date of birth	October 6, 1980
Place of birth	Bangkok, Thailand
Work Address	Division of Dermatology
	Department of Medicine
	Faculty of Medicine
	King Chulalongkorn Memorial Hospital
	Rama 4 Road Bangkok 10330 Thailand
Home Address	166/15 Soi Phaholyothin 14 Phaholyothin road Phayathai Samsennei
	BKK.10400, Thailand
	Tel (662) 2790276
	Mobile (669) 8923819
	Fax (662) 9303518
Email Address	Nim_bonus@hotmail.com, Nim_bonus@yahoo.com

Education

2003	Medical degree (First Class Honours), Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand
2003-2005	Internship at Nakornpathom Hospital, Nakornpathom, Thailand.
2005-2007	Master degree of Science in dermatology, Division of Dermatology, Department of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand Thesis title "mRNA Expression of Interferon Alpha in Common Warts Treated with Topical 5% Imiquimod Cream, A Randomized, Placebo-Controlled, Double-Blind Study"
2007- 2008	Clinical fellow in Dermatologic Surgery, Division of Dermatology, Department of Medicine, Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand
2008- Now	Phd. Study, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand (Stem cells research of skin and hair)
March 2010 -	Fellowship in Hair Restoration Surgery (ISHRS), DHT Clinic, Bangkok, Thailand

Extra curriculum rotation and Training

2005	Certificate of Attendance in Cosmetcetuticals and Drugs in Cosmetic I, Division of Dermatology, Department of Medicine, Phramongkutklao Hospital, Bangkok, Thailand
2006	Certificate of Attendance in Cosmetcetuticals and Drugs in Cosmetic II, Division of Dermatology, Department of Medicine, Phramongkutklao Hospital, Bangkok, Thailand Certificate in Aesthetic and Anti-Aging Medicine (ECCA), Bangkok, Thailand
2007	Certificate of Attendance in International Master Course on Aging Skin (IMCAS), Bangkok, Thailand Certificate of Attendance in Conference of Aesthetic Medicine, Singapore

	Certificate course in Aesthetic Medicine, American Academy of Aesthetic medicine
	Certificate in Aesthetic and Anti-Aging Medicine (ECCA), Bangkok, Thailand
2008	Certificate in Aesthetic and Anti-Aging Medicine (ECCA), Bangkok, Thailand
2009	Certificate in Aesthetic and Anti-Aging Medicine (ECCA), Bangkok, Thailand
	Certificate of Attendance in 2nd Spring *International Society of Dermatologic Surgery (ISDS) Meeting*, Bangkok, *Thailand*, March 27-29, 2009
2010	Certificate in Aesthetic and Anti-Aging Medicine (ECCA), Bangkok, Thailand
	Certificate of Attendance in 30^{in} Annual American Society for Laser Medicine and Surgery (ASLMS) Conference, Phoenix, Arizona April 14-18, 2010
	Certificate of Attendance in New Advances in Asians Hair Transplantation Workshop, June 25-27 2010, Bangkok, Thailand
	Certificate of Attendance in Chula Stem Cells conference 2010, Bangkok, Thailand, January13, 2010

Academic Appointment

2008-	Instructor in Dermatosurgery, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

Qualification

2003	Doctor of Medicine (M.D.) (First Class Honours)
2003	Certificate of Medical Licensure, Thai medical council
2004	Certificate of Internship training
2005	Master of Science in Dermatology, Chulalongkorn University
2008	Fellowship in Dermatologic Laser Surgery and Phototherapy, Ramathibodi Hospital, Mahidol University

Professional Memberships

2003-	Memberships of The Medical Council of Thailand
2005-	Memberships of The Dermatological Society of Thailand
2007-	Memberships of The Thai Cosmetic Dermatology and Surgery

Research interests

Dermatologic surgery

Cosmetic dermatology and Laser

Hair transplantation

Stem cells of skin and hair

Publications

1. Mornchan R., Puvabanditsin P. Angiokeratoma Diffusum (Fabry 's disease): A Case Report. Thai Journal of Dermatology 2006.
2. Mornchan R, Korkij W. mRNA Expression of Interferon Alpha in Common Warts Treated with Topical 5% Imiquimod Cream, A Randomized, Placebo-Controlled, Double-Blind Study. Thai Journal of Dermatology 2007; 23:40-41.
3. Mornchan R, Eimpunth S., Wattanakrai P. Low-Fluence Q-Switched Nd:YAG (1064 nm) Laser for the Treatment of Facial Melasma in Asians. Thai J Dermatol 2008.
4. Eimpunth S, Mornchan R, Wattanakrai P. Half Face Comparison of Low-Fluence Q-Switched Nd:YAG (1064 nm) and Intense Pulse Light for the Facial Rejuvenation in Asians. Thai J Dermatol 2008.
5. PENPUN WATTANAKRAI, RATCHATHORN MORNCHAN, SASIMA EIMPUNTH. Low-Fluence Q-Switched Neodymium-Doped Yttrium Aluminum Garnet (1,064 nm) Laser for the Treatment of Facial Melasma in Asians (p 76-87)
6. Ratchathorn Panchaprateep, Wiwat Korkij, Pravit Asawanonda, Brain-derived nerve factor and neurotrophins in androgenetic alopecia. Br J Dermatol (accepted for publication)

Presentations

2007	mRNA Expression of Interferon Alpha in Common Warts Treated with Topical 5% Imiquimod Cream, A Randomized, Placebo-Controlled,

Double-Blind Study. Presented at the Annual Meeting of the Dermatological society of Thailand 2007.

2008 Low-Fluence Q-Switched Nd:YAG (1064 nm) Laser for the Treatment of Facial Melasma in Asians. Presented at the Annual Meeting of the Dermatological society of Thailand 2008.

Management of Melasma with Low-Fluence Q-Switched Nd:YAG (1064 nm) Laser. Present at the 2nd Annual Thailand Congress on Anti-Aging Medicine and Biomedical Technologies, Bangkok, Thailand, Junes 27-29th, 2008.

2009 The Cosmetic Use in Botulinum Toxin. Presented at the Joint Conference in Medical Sciences 2009 (JCMS 09), Bangkok, Thailand, Junes 22-24th, 2009

Current Applications in Lasers. Presented at the interhospital conference in plastic surgery 2009, Bangkok, Thailand, August 5th, 2009

Hairy Talk: Hair Follicle Stem Cells. Presented at the Dermatology Issues 2009, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Thailand, Oct 29th, 2009

2010 Hair Follicle Stem Cells in Regenerative Medicine. Presented at the Chula Stem Cells conference 2010, Bangkok, Thailand, January 13rd, 2010

What Hot and What Not? Hair Follicle Stem Cells. Presented at the Annual Meeting of the Dermatological society of Thailand 2010, March 11th, 2010

Lecture and Workshop for Beginner and Professional: Intense pulse light and Matrix RF. Presented at Siriraj Skin Laser Surgery Lecture and Workshop for Beginner and Professional, Plaza Athenee Bangkok Thailand, May 6-7th, 2010

A Simple Way to Isolate and Cultivate Dermal Papilla Cells from Human Scalp Hair Follicle. Presented at New Advances in Asians Hair Transplantation Workshop, June 25-27 2010, Bangkok,Thailand.

Follicular stem cell: from bench to bedside. Presented at the Hair-in-Hair out: All about hair conference, Siriraj Hospital, Mahidol University,P laza Athenee Bangkok, Thailand, Aug 26-27th , 2010

2011 Review of hair follicle dermal cells. Presented at the first annual meeting of Asian Society of Hair restoration surgery conference 2011, Bangkok, Thailand, June 24-26th, 2011

Tanom Bunaprasert, M.D.

Date of Birth: November 29, 1966

Citizenship: Thai

Contact address:

Department of Otolaryngology

Innovative Cell-Tissue Engineering and Organ Synthesis Center,

Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

Tel. (662) 256-4103, 252-7787 Fax. (662) 252-7787

Mobile Phone 08-9144-7233

E-mail address:

drtanom@yahoo.com

Home address:

66-68 arunamarin Road Siriraj Bangkoknoi, Bangkok Thailand

Education:

- Board certified of Facial Plastic and Reconstructive Surgery Chulalongkorn University 2005
- Fellow in Head & Neck (Facial Plastic) Reconstructive Surgery Harvard University 2002 (Tissue engineering: MEEI: Harvard Medical School)
- Board certified of Otolaryngology Head & Neck Surgery Chulalongkorn University 1996
- Doctor of Medicine (second honor) Prince of Songkla University 1990

University Position:

1. Instructor and committee secretary of "Maxillofacial System of Gross Anatomy" Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University 1997-1999

2. Instructor, Department of Otolaryngology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University 1999-present
3. Instructor of Facial Plastic and Reconstructive Surgery Department of Otolaryngology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University 2005-present
4. Instructor of Biomedical Engineering (Tissue Engineering)2005-present
5. Director of Innovative Cell-Tissue Engineering and Organ Synthesis Center 2005-present
6. Administrative committee of Chulalongkorn Medical Research Center 2005 –present
7. Administrative board of Chulalongkorn Biomedical Program (Master and Ph.D.)

Award:

Won the resident's best research paper award on the topic of "the facial soft tissue study" from the Royal College of Otolaryngologist of Thailand

Position Held in Scientific Society:

1. Member, Royal College of Otolaryngologists of Thailand, 1996-present
2. Committee secretary of Surgical Training Center, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University1998-2004
3. Administrative committee of Chulalongkorn Medical Research Center 2004-present
4. Director of Phyathai Cosmetic Center 2005 -2006
5. Director of K&T Facial Aesthetic Surgery & Laser Center 2004 -present
6. Founded member of Thai Society of Wound Healing2005 –present
7. Regulation board of Stem cell and Tissue product (Thai FDA) 2007-present

Important Development:

1. Developed soft cadaver preservation solution and technique 1997
2. Established the Chulalongkorn Cadaveric-Surgical Training Center 1998 (The first cadaveric surgical training center in South East Asia)
3. First success in tissue engineering of cartilage in Thailand, 2003
4. Established Innovative Tissue Engineering Laboratory, 2005

Publication

- Bunaprasert T, Hadlock T, Marler J, Kobler J, Cowan D, Faquin W, Varvares M. Tissue engineered muscle implantation for tongue reconstruction: a preliminary report. Laryngoscope. 2003 Oct; 113(10): 1792-7.
- Pak-Art R, Silapunt P, Bunaprasert T, Tansatit T, Vajrabukka T. Prospective, randomized, controlled trial of proximally based vs. distally based gluteus maximus flap for anal incontinence in cadavers. Dis Colon Rectum. 2002 Aug;45(8):1100-3.
- Bunaprasert T, Narawoot T, Sorada K., et al. "Tissue Engineering of Cartilage with Porous Polycarpolactone- Alginate scaffold: The first Report of Tissue Engineering in Thailand". J Med Assoc Thai. 2006 Sep; vol. 89: Suppl. 3: S108-114. .
- Tangsadthakun C, Kanokpanont S, Sanchavanakit N, Banaprasert T, Damrongsakkul S. "Properties of Collagen/Chitosan Scaffolds for Skin Tissue Engineering". J. Metals, Materials and Minerals. 2006;16:37-44.
- Ratanavaraporn J, Damrongsakkul S, Sanchavanakit N, Banaprasert T, Kanokpanont S. "Comparison of Gelatin and Collagen Scaffolds for Fibroblast Cell Culture". J. Metals, Materials and Minerals. 2006;16: 31-36.
- Suwantong O, Waleetorncheepsawat S, Sanchavanakit N, Pavasant P, Cheepsunthorn P, Bunaprasert T, Supapol P. "In vitro biocompatibility of electrospun poly (3-hydroxybutyrate) and poly (3-hydroxybuturate-co-3-hydroxyvalerate) fiber mats ". International Journal of Biological Macromolecules. 2007; 40: 217-223.
- Neamnark A, Sanchavanakit N, Pavasant P, Bunaprasert T, Supapol P, Rujiravanit R. " In vitro Biocompatibility evaluations of hexanoyl chitosan film".
- Sanchavanakit N, Sangrungraungroj W, Kaomaongkolgit R, Bunaprasert T, Pavasant P, Phisalaphong M. "Growth of human keratinocytes and fibroblasts on bacterial cellulose film".
- Prasertsung I, Kanokpanont S, Bunaprasert T, Thanakit V, Damrongsakkul S. "Development of acellular dermis from porcine skin".
- Wongpanit P, Sanchavanakit N, Pavasant P, Bunaprasert T, Tabata Y, Rujiravanit R. "Improving limitations of silk fibroin scaffolds by incorporation of chitin whisker: nanocomposite materials".

- นายศิรภัคย์ วงศ์กุลศิริ เรื่อง "การพัฒนาผิวหนังมนุษย์ชนิดปราศจากเซลล์ เพื่อใช้ในงานวิศวกรรมการแพทย์ผิวหนัง" หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2549.
- นางสาวดวงฤดี อรุณเลิศรัศมี เรื่อง "การปรับปรุงโครงเลี้ยงเซลล์โดยใช้ผลิตภัณฑ์
- Cryoprecipitate, plasma และ platelet concentration ของมนุษย์ เพื่องานวิศวกรรมเนื้อเยื่อผิวหนังแท้" หลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2549.

Speaker

- Introduction in Tissue Engineering: Annual meeting of Chulalongkorn Medical School 2003
- Instructor of "The System of Facial Soft Tissue: the Method for Injection of Botulium Toxin A for Massenteric Hypertrophy. 14 July 2003, Conrade Hotel Bangkok Thailand
- New Concepts of Wound Healing: Annual meeting of Chulalongkorn Medical School 2004
- The First facial soft tissue dissection course in South East Asia: World Congress on Cosmetic and Dermatologic Surgery 26-29 February 2004
- Instructor of "Degradable Materials with Biological Recognition" Chulalongkorn Memorial Hospital; 12 July 2004;
- Instructor of "New concept of wound healing and clinical applications" 19 August 200, Prince of Songkla University
- Dynamic of facial soft tissue Suture sling facelift: International of Therapeutic Innovation in Dermatology and Dermato-cosmetology 22-25 October 2004
- Instructor of "Stem cell & Tissue engineering therapy: The regenerative medicine" Chulalongkorn Memorial Hospital; 25 August 2005
- Presentation of "Suture Sling in Face Lifting" and "Facial Anatomy and Dynamic of Aging Face": International Congress "Therapeutic Innovation in Dermatology and Dermato-Cosmetology" 22-23 October 2004 Shangri-la Hotel Bangkok Thailand.
- Speaker "Tissue Engineering" in Stem cell biology and Therapeutic Potential Annual Meeting of Thailand Research fund 2005, 14 Oct 2005 Regent Hotel, Cha-am, Phetburi, Thailand

- Speaker of "Tissue Engineering in Bone and Joint Surgery" 47th Annual Meeting and Short Practicing Faculty of Medicine, Chulalongkorn Memorial Hospital; 29 June 2006
- Presentation of "Facial Plastic and Reconstructive Surgery" Chulalongkorn Memorial Hospital; 6-8 December 2006.
- Presentation of "Facelifts to face transplants" ECAA - 1st Eurasian Congress in Aesthetic and Anti-Aging Medicine; 20 January 2007.
- Presentation of "Tissue Engineering in Bone and Joint Surgery" Update Practice in Wound Management, The Second Wound Care Meeting of The Thai Society of Wound Healing; 2 March 2007
- Presentation of "Tissue Engineering" Technologies for Healthcare Applications, NAC2007; 29 March 2007
- Presentation of "Tissue Engineering in Aging" Towards Quality Aging Society: From Basic Science To Practice, Chulalongkorn Memorial Hospital; 10 April 2007
- Visit National University of Singapore BME 29 May 2007
- Presentation of "Stem Cell", National Research Council, Miracle Grand Hotel 5 June 2007
- Organizing committee of Conference NCBME 2007 Chulalongkorn University and NSTDA 8 July 2007
- Presentation of "Research and Development of Tissue Engineering in Thailand with its Future Clinical Application" The Second Wound Care Meeting of The Thai Society of Wound Healing, Royal College of Surgeons 30 July 2007
- Presentation of "Therapeutic Potential of Stem Cell" "ศักยภาพของเซลล์ต้นกำเนิดในการรักษาผู้ป่วย" ณ มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 31 August 2007
- Presentation of "Bioengineering" โรงแรมแอมบาสซาเดอร์ ชลบุรี; 12 October 2007
- Presentation of "Bioengineering" โรงแรมแอมบาสซาเดอร์ ชลบุรี; 21 October 2007
- Presentation of "Dermal Regeneration Template" Miracle Grand Hotel; 10 November 2007
- Presentation of "การตัดปีกจมูก" Chulalongkorn Memorial Hospital; 15 November 2007
- Presentation of "Future Trend of Longevity (ศาสตร์แห่งการยืดอายุขัย)" โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า; 21 November 2007

- Presentation of "Organ Regeneration Template" 11th Asia-Oceania Head & Neck Congress. Royal Cliff Beach Hotel, Pattaya Chonburi, 25 November 2007
- Presentation of "Tissue Engineering " King Mongkut's University of Technology Thonburi, 14 January 2008
- Presentation of "Stem Cell" องค์การอาหารและยา 15 January 2008
- Presentation of "Future Direction of Research & Development in Tissue Engineering with Clinical Application in Thailand" Update on Wound Care 2008" The Thai Society of Wound Healing (TSWH), 259 February 2008