ผลของเมลาโทนินต่อความยาวเส้นผมของมนุษย์ในห้องปฏิบัติการ

นางสาวณัฐินี จิตครองธรรม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาอายุรศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2558
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECTS OF MELATONIN ON HUMAN HAIR SHAFT ELONGATION *IN VITRO*

Miss Natthinee Chitkrongtam

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medicine
Department of Medicine
Faculty of Medicine
Chulalongkorn University
Academic Year 2015

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของเมลาโทนินต่อความยาวเส้นผมของมนุษย์ในห้องปฏิบัติการ
โดย	นางสาวณัฐินี จิตครองธรรม
สาขาวิชา	อายุรศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ประวิตร อัศวานนท์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	อาจารย์ ดร. แพทย์หญิง รัชต์ธร ปัญจทีป

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ สุทธิพงศ์ วัชรสินธุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ สมเกียรติ แสงวัฒนาโรจน์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ประวิตร อัศวานนท์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์ ดร. แพทย์หญิง รัชต์ธร ปัญจทีป)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ สารัช สุนทรโยธิน)

ณัฐินี จิตครองธรรม : ผลของเมลาโทนินต่อความยาวเส้นผมของมนุษย์ในห้องปฏิบัติการ (EFFECTS OF MELATONIN ON HUMAN HAIR SHAFT ELONGATION *IN VITRO*) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ศ. ดร. นพ.ประวิตร อัศวานนท์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: อ. ดร. พญ. รัชต์ธร ปัญจทีป, 51 หน้า.

ที่มา : เมลาโทนินเป็นฮอร์โมนที่หลั่งจากต่อมไพเนียลเป็นหลัก ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของระบบต่างๆภายในร่างกาย ไม่ว่าจะเป็นสารสื่อประสาท ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย หรือการควบคุมนาฬิกาทางชีวภาพ นอกจากนี้เมลาโทนินยังสามารถทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระในร่างกายได้อีกด้วย มีการพบตัวรับเมลาโทนินบริเวณเซลล์รากผม แต่ยังไม่ทราบผลของเมลาโทนินต่อวงจรชีวิตเส้นผมที่ชัดเจน

วัตถุประสงค์ : เพื่อศึกษาผลของเมลาโทนินในระดับความเข้มข้นต่างๆ ในการเพิ่มความยาวของเส้นผมมนุษย์ในห้องปฏิบัติการจากหนังศีรษะบริเวณท้ายทอยของผู้ป่วยชายที่มีภาวะผมบางจากพันธุกรรม

วิธีการวิจัย : การวิจัยเชิงทดลองในห้องปฏิบัติการ โดยการนำเส้นผมบริเวณท้ายทอยของผู้ป่วยชายที่มีภาวะผมบางจากพันธุกรรมมาเพาะเลี้ยงในสารละลาย William's E ที่มีส่วนผสมของเมลาโทนินที่มีความเข้มข้น3, 30 และ 300 ไมโครโมลาร์เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เพาะเลี้ยงในสารละลาย William's E เพียงอย่างเดียว โดยวัดการเปลี่ยนแปลงความยาวของเส้นผมจากการเพาะเลี้ยงในสารละลายที่แตกต่างกันในวันที่ 0 และ 6 ของการทดลองโดยวิเคราะห์ข้อมูลหลังจากตัดข้อมูลเส้นผมที่ไม่มีชีวิตออก (Per protocol analysis)

ผลการศึกษา : จากผลการเพาะเลี้ยงเซลล์รากผมในกลุ่มควบคุมที่เพาะเลี้ยงในสารละลาย William's E mediumเพียงอย่างเดียว พบว่ามีค่ามัธยฐานการเปลี่ยนแปลงของเส้นผมในวันที่ 6 เท่ากับ 974.75ไมครอนในกลุ่มที่เพาะเลี้ยงในสารละลายเมลาโทนินที่ความเข้มข้น 300ไมโครโมลาร์พบว่ามีค่ามัธยฐานการเปลี่ยนแปลงของเส้นผมในวันที่ 6 เท่ากับ 1099.28ไมครอน ซึ่งเส้นผมมีความยาวเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.002)ในขณะที่สารละลายเมลาโทนินที่ความเข้มข้น 3และ30ไมโครโมลาร์ไม่สามารถเพิ่มความยาวของเส้นผมได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

สรุป : การเพาะเลี้ยงเส้นผมในสารละลาย William's E และเมลาโทนินที่มีความเข้มข้น 300ไมโครโมลาร์สามารถเพิ่มความยาวเส้นผมได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่สารละลายเมลาโทนินเข้มข้น 30ไมโครโมลาร์มีผลกระตุ้นความยาวของเส้นผมได้เล็กน้อยเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยฤทธิ์ในการกระตุ้นความยาวของเส้นผมอาจเกิดจากการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์รากผม การยับยั้งการตายของเซลล์รากผมแบบ apoptosisหรือทำให้เส้นผมอยู่ในระยะ anagen ยาวนานขึ้น

ภาควิชา	อายุรศาสตร์	ลายมือชื่อนิสิต .....
สาขาวิชา	อายุรศาสตร์	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....
ปีการศึกษา	2558	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

5774024330 : MAJOR MEDICINE

KEYWORDS: MELATONIN / ANDROGENETIC ALOPECIA / HAIR FOLLICLES

NATTHINEE CHITKRONGTAM: EFFECTS OF MELATONIN ON HUMAN HAIR SHAFT ELONGATION *IN VITRO*. ADVISOR: PROF. PRAVIT ASAWANONDA, M.D., Ph.D., CO-ADVISOR: RATCHATHORN PANCHAPRATEEP, Ph.D., 51 pp.

Background: Melatonin is a neuroendocrine mediator with pleiotropic bioactivities such as hormonal, neurotransmitter, immunomodulator and biological modifier actions. Melatonin also functions as a free-radical scavenger and broad-spectrum antioxidant.Melatonin receptors were found within the hair follicles but the mechanism of melatonin to hair cycles is not elicited.

Objective: The objective of this study is to demonstrate melatonin effects on human hair follicular unit elongation *in vitro*.

Materials and method: Per protocol analysis of 521 hair follicles from sevenAGA patientswere divided into 4 groups then cultured in William E's medium and William E's medium with 3, 30 and 300 micromolar of melatonin solution. Culture medium was changed every other day parallel with measurement of hair shaft length. Median difference in length of hair shaft after cultured at day 0 and day 6 were compared.

Result: Comparing the hair shaft length between day 0 and day 6, hair follicles in Group1 or control group increased in length at a median of 974.76 micron. In Group2 (3 mmol of melatonin), the median difference of hair length was 966.00, Group3 (30 mmol) was 1046.81 and Group4 (300 mmol) was 1099.28. There was a statistically significant difference in hair length between control group and group 4. (p= 0.002, Wilcoxon signed rank test).

Conclusion: Our study demonstrated 300 micromolar of melatonin solution had stimulatory effect on hair shaft elongation significantly while 30 micromolar of melatonin had minimal effects compared to control group. Melatonin may increase cell proliferation, decrease cell apoptosis or play a role in hair cycle regulation, prolong anagen phase.

Department:	Medicine	Student's Signature	.....
Field of Study:	Medicine	Advisor's Signature	.....
Academic Year:	2015	Co-Advisor's Signature	.....

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สามารถสำเร็จลุล่วงได้เนื่องจากความแมตตากรุณา และความช่วยเหลือเป็นอย่างดีจาก ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ประวิตร อัศวานนท์และอาจารย์แพทย์หญิง ดร. รัชต์ธร ปัญจประทีป ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลักและอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่ได้เสียสละเวลาในการให้คำปรึกษาอย่างดีเสมอมา ซึ่งผู้วิจัยกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอบพระคุณเจ้าหน้าที่หน่วยงานตจวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ที่ให้ความร่วมมือในการทำงานวิจัย และขอบพระคุณผู้ป่วยที่อนุญาตให้นำเส้นผมมาศึกษาในการทดลองของงานวิจัยนี้

ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาของทุกท่านที่กล่าวมา ตลอดจนผู้ที่ไม่ได้กล่าวนามในที่นี้ซึ่งมีส่วนให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้กราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจตลอดมา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ
กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ
สารบัญ ..... ช
สารบัญตาราง ..... ฌ
สารบัญรูปภาพ ..... ญ
สารบัญแผนภูมิ ..... ฎ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหาการวิจัย 1
1.2 คำถามการวิจัย 3
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 3
1.4 สมมุติฐาน 3
1.5 กรอบแนวความคิดในการวิจัย 3
1.6 ข้อตกลงเบื้องต้น 4
1.7 การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่จะใช้ในการวิจัย 4
1.8 ปัญหาทางจริยธรรม 5
1.9 ข้อจำกัดในการวิจัย 5
1.10 ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย 6
1.11 อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นและมาตรการแก้ไข 6
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง 7
โครงสร้างผมและวงจรชีวิตผม 7
วงจรชีวิตผม 9

หน้า

การเพาะเลี้ยงเซลล์รากผมมนุษย์ในห้องปฏิบัติการ (Hair organ culture).....11
เมลาโทนิน.....13
ผลของเมลาโทนินในแง่ของการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ.....13
ผลทางชีวภาพของเมลาโทนินต่อเซลล์ผิวหนังและเส้นผม.....15
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....19
3.1 รูปแบบการวิจัย.....19
3.2 ระเบียบวิธีวิจัย.....19
3.3 ขนาดตัวอย่าง.....20
3.4 การสังเกตและการวัด.....20
3.5 ขั้นตอนในการดำเนินการวิจัย.....21
3.6 การรวบรวมข้อมูล.....24
3.7 การวิเคราะห์ข้อมูล.....25
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....26
บทที่ 5 อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ.....35
5.1 อภิปรายผล.....35
5.2 จุดแข็งในงานวิจัย.....40
5.3 จุดด้อยงานวิจัย.....41
รายการอ้างอิง.....43
รายการอ้างอิง.....49
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....51

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1ลักษณะพื้นฐานของผู้เข้าร่วมวิจัย 26

ตารางที่ 2 จำนวนเซลล์รากผมที่ได้รับการสุ่มจำแนกตามกลุ่มการศึกษา 4 กลุ่ม (n=976) 27

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบจำนวนเซลล์รากผมที่มีความยาวเปลี่ยนแปลงมากกว่าหรือเท่ากับ 300 ไมครอนและน้อยกว่า 300ไมครอน (n=976) 27

ตารางที่ 4 แสดงจำนวนเซลล์รากผมที่มีชีวิตและไม่มีชีวิตในแต่ละกลุ่มการศึกษา (n=976).....27

ตารางที่ 5 แสดงจำนวนเซลล์รากผมที่มีชีวิตและไม่มีชีวิตในผู้ป่วยแต่ละราย 28

ตารางที่ 6 แสดงค่ามัธยฐานของการเปลี่ยนแปลงความยาวของเส้นผมวันที่ 0, 2, 4 และ 6 ของการทดลอง วิเคราะห์ข้อมูลหลังจากตัดข้อมูลเส้นผมที่ไม่มีชีวิตออก (Per protocol analysis) 30

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญรูปภาพ

รูปภาพที่ **1** แสดงกายวิภาคของเส้นผมในแนว longitudinal โดยแบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ infundibulum, isthmus และ inferior (suprabulbar และ bulb) (คัดลอกมาจากหนังสือ Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine พิมพ์ครั้งที่ 8 บทที่ 86 หน้าที่ 965).....7

รูปภาพที่ 2 แสดงโครงสร้างระดับเซลล์ของเส้นผมในแนวcross-sectional section (ซ้าย) และ longitudinal section (ขวา) (คัดลอกมาจากหนังสือ Bolognia Dermatology พิมพ์ครั้งที่ 3 บทที่ 68หน้าที่ 1083).....9

รูปภาพที่ **3**แสดงวงจรชีวิตเส้นผม (คัดลอกมาจากหนังสือBolognia Dermatology พิมพ์ครั้งที่ 3 บทที่ 68 หน้าที่ 1080).....11

รูปภาพที่ 4 แสดงภาพ 24 microwell plate.....22

รูปภาพที่ 5 แสดงภาพกล้อง Stereomicroscope (Olympus SZX 16) 23

รูปภาพที่ **6** แสดงภาพการวัดความยาวเส้นผมโดยใช้โปรแกรม D2P-BSW หน่วยความยาวที่วัดคือไมครอน (μm).....24

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญแผนภูมิ

แผนภูมิที่ 1 แสดงค่ามัธยฐานความยาวของเส้นผมที่เพิ่มขึ้น (n=521) หน่วยไมครอน วิเคราะห์ข้อมูลหลังจากตัดข้อมูลเส้นผมที่ไม่มีชีวิตออก (Per protocol analysis).....31

แผนภูมิที่ 2 แสดงร้อยละของความยาวที่เปลี่ยนแปลงไปจากวันที่เริ่มการทดลองในแต่ละกลุ่มการศึกษา วิเคราะห์ข้อมูลหลังจากตัดข้อมูลเส้นผมที่ไม่มีชีวิตออก (Per protocol analysis)...31

แผนภูมิที่ 3แสดงค่ามัธยฐานความยาวของเส้นผมที่เพิ่มขึ้น (n=976) หน่วยไมครอน วิเคราะห์ข้อมูลโดยไม่ได้ตัดข้อมูลของเส้นผมที่ไม่มีชีวิตออก (Intention to treat analysis) 33

แผนภูมิที่ 4 แสดงร้อยละของความยาวที่เปลี่ยนแปลงไปจากวันที่เริ่มการทดลองในแต่ละกลุ่มการศึกษา วิเคราะห์ข้อมูลโดยไม่ได้ตัดข้อมูลของเส้นผมที่ไม่มีชีวิตออก (Intention to treat analysis) 34

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหาการวิจัย

ภาวะผมบางจากพันธุกรรม (Androgenetic alopecia) พบได้ทั้งในเพศชายและเพศหญิง เป็นภาวะที่พบได้บ่อย มีรายงานอัตราการเกิดโรคโดยรวมมากถึง 96% ในชายชาวตะวันตก โดยปกติอัตราการเกิดโรคจะสูงขึ้นเมื่ออายุมากขึ้น สามารถพบผู้ป่วยชายที่มีภาวะผมบางจากพันธุกรรมสูงถึง 53% ในผู้ชายอายุระหว่าง 40-49 ปี[1] เมื่อเทียบกับผู้ชายอายุ 18-29 ปี สามารถพบผู้ป่วยที่มีภาวะผมบางจากพันธุกรรมเพียง 16%[2]ส่วนอัตราการเกิดโรคในคนเอเชียมีประมาณ 73%[3]ซึ่งต่ำกว่าชาวตะวันตกอยู่มาก และอัตราการเกิดโรคในคนไทยอยู่ที่ประมาณ40% ซึ่งภาวะผมบางจากพันธุกรรมมีแบบแผนลักษณะจำเพาะ กล่าวคือ ในเพศชายจะมีรูปแบบตาม Hamilton-Norwood pattern เริ่มต้นจากเส้นผมเล็กลง สั้น สีอ่อน บางลง เกิดจากการมี miniaturization ของ hair follicle และเส้นผมระยะ anagen สั้นลงโดยเริ่มจากบริเวณแนวผมบริเวณขมับ 2 ข้าง (bilateral recession) ต่อไปยังบริเวณกลางกระหม่อม เมื่อโรคดำเนินไปพบว่า ผมจะบางทั่วศีรษะ ยกเว้นบริเวณด้านท้ายทอย (occipitalarea)และด้านข้าง (temporal area)

การเปลี่ยนแปลงของผมในผู้ป่วยที่มีภาวะผมบางจากพันธุกรรม มีอิทธิพลจากพันธุกรรม, อิทธิพลจากฮอร์โมนเพศชาย และการอักเสบในระดับเซลล์[4-7]

1. อิทธิพลจากพันธุกรรม มีรายงานยีนที่เกี่ยวข้องกับภาวะผมบางจากพันธุกรรม ได้แก่ androgen-receptor gene, 5α-receptor gene และ aromatase gene
2. Dihydrotestosterone (DHT) เป็นฮอร์โมนที่สำคัญที่ทำให้เกิดภาวะผมบางจากพันธุกรรม กล่าวคือ testosterone ที่อยู่ในกระแสเลือดเมื่อเข้าสู่ hair follicle จะเปลี่ยนแปลงไปเป็น dihydrotestosterone (DHT) โดยเอนไซม์ 5α-reductase จากนั้นจะเข้าไปกระตุ้น androgen receptor ที่อยู่บริเวณ dermal papilla cells ส่งผลให้เส้นผมระยะ anagen สั้นลง เปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะ telogen เร็วขึ้น และทำให้เกิด miniaturization ของ hair follicle เมื่อฮอร์โมนจับกับ androgen receptor แล้ว จะกระตุ้นการ transcription ของยีนและเกิดการสร้างโปรตีน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่างๆตามมา โดยพบยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดภาวะผมบางจากพันธุกรรมจำนวนมาก เช่น androgen receptor gene, steroid metabolism gene เป็นต้น
3. กระบวนการอักเสบระดับเซลล์[8-10] พบว่าเซลล์เม็ดเลือดขาว (activated T cells), macrophages และ langerhans cells จะเข้ามาบริเวณ infundibulum โดยมีปัจจัยจำนวนมากที่ทำให้เกิด

กระบวนการอักเสบ ไม่ว่าจะเป็นมลพิษ รังสีอัลตร้าไวโอเลต ความเครียด อนุมูลอิสระ หรืออาจเกิดจากจุลชีพที่อยู่บริเวณรูขุมขน[11] เช่น PropionibacteriumSpecies, Staphylococcus Species หรือ Malassezia Oevalis กระตุ้นให้ keratinocytes สร้าง pro-inflammatory cytokines กระตุ้นให้เกิดการกระบวนการอักเสบ จากนั้นเซลล์เม็ดเลือดขาว T lymphocytesจะกระตุ้นให้เกิดการสร้างพังผืดรอบ hair follicles เมื่อระยะเวลาผ่านไปเส้นผมจะเล็กลงและเกิดภาวะผมร่วงอย่างถาวร

การรักษามาตรฐานของภาวะผมบางจากพันธุกรรม[12] คือ2%และ5% minoxidil ชนิดทาและยา finasteride ชนิดรับประทาน โดยfinasteride ออกฤทธิ์โดยไปยับยั้งการทำงานของ 5α-reductase ทำให้ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของ testosterone เป็น dihydrotestosterone (DHT)ดังนั้นจึงสามารถลดความรุนแรงของภาวะผมบางจากพันธุกรรมได้ในขณะที่ minoxidilเป็น potassium-channel opener และเพิ่มการขยายตัวของหลอดเลือดแต่ในปัจจุบันยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัดของminoxidil ในการลดความรุนแรงของโรค[13]ส่วนการรักษาทางเลือกอื่นๆที่พบว่ามีประสิทธิภาพ[14] ได้แก่ melatonin, antiandrogen, prostaglandin analogs, caffeine, platelet rich plasma, nutritional supplementเป็นต้น

ปัญหาในการรักษาผู้ป่วยภาวะผมบางจากพันธุกรรม พบว่าการทา minoxidil อาจพบผลข้างเคียงได้ เช่น อาการคัน แดง แห้ง หรือแสบหลังการทายา, การเกิดรังแคบนหนังศีรษะ และการเกิดขนบริเวณใบหน้า ส่วนการรับประทานยา finasteride อาจพบภาวะขนขึ้นตามใบหน้าและร่างกาย ซึ่งแพทย์อาจพิจารณาใช้ยานี้ในการรักษาผู้ป่วยชายและผู้ป่วยหญิงวัยหลังหมดประจำเดือนที่มีภาวะผมบางจากพันธุกรรม

เมลาโทนินเป็นฮอร์โมนหลักที่หลั่งจากต่อมไพเนียล ซึ่งควบคุมการทำงานของร่างกาย ได้แก่ การนอนหลับ การควบคุมกลางวันกลางคืน การสร้างเม็ดสี การเจริญเติบโตของเซลล์ การทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน และการชะลอวัย นอกจากนี้เมลาโทนินสามารถสังเคราะห์จากเรตินา[15], ลำไส้[16, 17], ตับ[18], ไต,ม้าม[19], รังไข่[20], ไขกระดูก[21] และเซลล์รากผม[22]ได้อีกด้วย

จากผลการศึกษาในปัจจุบันพบว่าเมลาโทนินมีผลต่อเส้นขนของหนูและเส้นผมของมนุษย์ โดยจากการศึกษาในห้องทดลอง พบว่าเมลาโทนินมีผลในการยับยั้งการตายของเซลล์ ส่งผลให้เส้นผมระยะ anagen ยาวนานขึ้น และยังมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระอีกด้วยนอกจากนี้มีการทำการทดลองในมนุษย์พบว่าเมลาโทนินสามารถเพิ่มจำนวนเส้นผมในระยะanagenในผู้ป่วยหญิงที่มีภาวะผมบางจากพันธุกรรมได้

การวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาผลของเมลาโทนินต่อความยาวเส้นผมของมนุษย์ในห้องปฏิบัติการจากหนังศีรษะบริเวณท้ายทอยของผู้ป่วยชายที่มีภาวะผมบางจากพันธุกรรม

1.2 คำถามการวิจัย

คำถามหลัก (Primary research question)

เมลาโทนินเข้มข้น 30 ไมโครโมลาร์ สามารถเพิ่มความยาวของเส้นผมมนุษย์ในห้องปฏิบัติการจากหนังศีรษะบริเวณท้ายทอย (donor area) ของผู้ป่วยชายที่มีภาวะผมบางจากพันธุกรรม เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมได้หรือไม่

1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

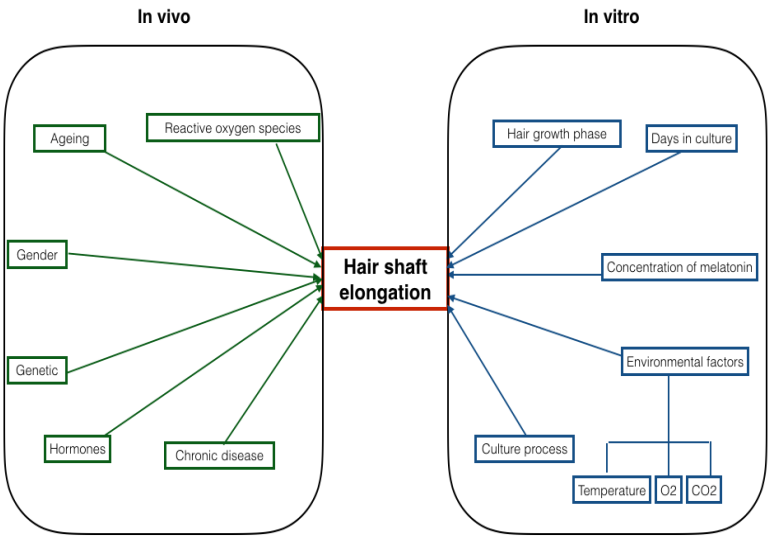
เพื่อศึกษาผลของเมลาโทนินในระดับความเข้มข้นต่างๆ ในการเพิ่มความยาวของเส้นผมมนุษย์ในห้องปฏิบัติการจากหนังศีรษะบริเวณท้ายทอย (donor area) ของผู้ป่วยชายที่มีภาวะผมบางจากพันธุกรรมเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

1.4 สมมุติฐาน

เมลาโทนินเข้มข้น 30 ไมโครโมลาร์ สามารถเพิ่มความยาวของเส้นผมมนุษย์ในห้องปฏิบัติการจากหนังศีรษะบริเวณท้ายทอย (donor area) ของผู้ป่วยชายที่มีภาวะผมบางจากพันธุกรรม เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

1.5 กรอบแนวความคิดในการวิจัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



1.6 ข้อตกลงเบื้องต้น

เซลล์รากผมจากบริเวณท้ายทอย (donor area) ของกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยชายที่มีภาวะผมบางจากพันธุกรรมที่เข้ารับการผ่าตัดบริเวณหนังศีรษะ ถือเป็นตัวแทนของเซลล์รากผมของหนังศีรษะในประชากรทั่วไป

1.7 การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่จะใช้ในการวิจัย

- Occipital area คือ หนังศีรษะบริเวณด้านหลังที่ไม่มีภาวะผมบางจากพันธุกรรม
- Hair follicular unit ประกอบด้วยterminal hair, vellus hair, sebaceous glandและarrector pili muscle ซึ่งได้มาจากหนังศีรษะบริเวณท้ายทอยของผู้ป่วยชายที่มีภาวะผมบางจากพันธุกรรมที่เข้ารับการผ่าตัดปลูกถ่ายรากผมที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ซึ่งได้รับความยินยอมจากผู้ป่วยแล้ว
- Hair follicular unit length คือ ความยาวของเส้นผมในหลอดทดลอง โดยผู้วิจัยถ่ายรูปเส้นผมที่ทำการเพาะเลี้ยง ณ วันที่0, 2, 4, 6โดยใช้กล้องถ่ายภาพกำลังขยาย 40เท่าstereomicroscope (Olympus SZX16**)** กำหนดแสง มุมกล้อง ระยะห่างระหว่างเลนส์และเส้นผมให้เท่ากันทุกครั้ง จากนั้นทำการวัดความยาวโดยใช้โปรแกรมD2P-BSWซึ่งวัดตั้งแต่โคนรากผมถึงปลายเส้นผม หน่วยความยาวที่วัด คือ ไมครอน(μm)
- Median difference คือ ค่ามัธยฐานของการเปลี่ยนแปลงความยาวของเส้นผมที่แตกต่างกันในวันที่0และ6ของแต่ละกลุ่ม
- เมลาโทนิน (5-methoxy-N-acetyltryptamine, $C_{13}H_{16}N_2O_2$)เป็นฮอร์โมนที่ควบคุมการทำงานต่างๆของร่างกาย ในมนุษย์มีการสร้างและหลั่งเมลาโทนินจากบริเวณต่อมไพเนียลเป็นหลัก
- ความเข้นข้นของเมลาโทนิน คือ สารละลายเมลาโทนิน ที่มีหน่วยความเข้นข้นเป็นไมโครโมลาร์ **(**μM)
- กลุ่มควบคุมคือ เซลล์รากผมที่ได้รับการเพาะเลี้ยงใน William’s E medium
- กลุ่มทดลอง คือ เซลล์รากผมที่ได้รับการเพาะเลี้ยงใน Willam’s E medium ร่วมกับเมลาโทนินที่มีความเข้นข้น3, 30 และ300 ไมโครโมลาร์ในสภาวะแวดล้อมที่เหมือนกับกลุ่มควบคุมทุกประการ
- เซลล์รากผมที่ไม่มีชีวิต คือ เซลล์รากผมที่มีความยาวน้อยกว่า 300 ไมครอนหลังทำการเพาะเลี้ยงในห้องทดลองปฏิบัติการเป็นเวลานาน 6 วัน เนื่องจากเซลล์รากผมที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการปกติจะมีค่าความยาวเฉลี่ยเพิ่มขึ้นประมาณ 300 ไมครอนต่อวัน[23] ดังนั้นหากเพาะเลี้ยงนาน 6

วัน เส้นผมควรจะมีความยาวเพิ่มขึ้นโดยประมาณ 1,800 ไมครอน ดังนั้นงานวิจัยนี้จะถือว่าเส้นผมที่มีความยาวเพิ่มขึ้นน้อยกว่า 20% จาก 1,800 ไมครอน หรือประมาณ 300 ไมครอน จะถือว่าเป็นเส้นผมที่ไม่มีชีวิต

- เซลล์รากผมที่มีชีวิต คือ เซลล์รากผมที่มีความยาวมากกว่าปกติหรือเท่ากับ 300 ไมครอนหลังทำการเพาะเลี้ยงในห้องทดลองปฏิบัติการเป็นเวลานาน 6 วัน

1.8 ปัญหาทางจริยธรรม

- หลักความเคารพในบุคคล (Respect for person)
    - ผู้เข้าร่วมวิจัยจะได้รับข้อมูลที่ถูกต้องและเพียงพอในการตัดสินใจเข้าร่วมงานวิจัย จากนั้นผู้เข้าร่วมวิจัยสามารถตัดสินใจได้อย่างอิสระ และได้รับความยินยอมเป็นลายลักษณ์อักษร(inform consent) และหากยินยอมเข้าร่วมวิจัย ข้อมูลของผู้ป่วยจะได้รับการเก็บรักษาเป็นความลับ โดยจะไม่มีข้อมูลที่สามารถระบุถึงตัวผู้เข้าร่วมวิจัย
- หลักการให้ประโยชน์ ไม่ก่อให้เกิดอันตราย (Beneficence/ Non-maleficence)
    - ผู้วิจัยจะนำชิ้นเนื้อบริเวณหนังศีรษะบริเวณท้ายทอยไปทำการเพาะเลี้ยงในห้องทดลอง ซึ่งการตัดชิ้นเนื้อบริเวณดังกล่าวเป็นขั้นตอนหนึ่งในการผ่าตัดปลูกถ่ายรากผมอยู่แล้ว
- หลักความยุติธรรม (Justice)
    - ผู้ป่วยชายที่มารับการรักษาที่แผนกผิวหนัง มีโอกาสได้รับการเข้าร่วมวิจัยอย่างเสมอภาค ตามเกณฑ์ inclusion criteria และexclusion criteria ผู้ป่วยสามารถปฏิเสธหรือถอนตัวจากงานวิจัยได้ตลอด โดยไม่มีผลใดๆต่อการรักษา

1.9 ข้อจำกัดในการวิจัย

- การวิจัยนี้เป็นการทดลองลักษณะ *in vitro*ซึ่งผลของเมลาโทนินต่อผู้ป่วยที่มีภาวะผมบางจากพันธุกรรม อาจไม่สอดคล้องกับผลในห้องปฏิบัติการ
- การทดลองนี้นำเส้นผมมาจากผู้ป่วยชายเท่านั้น ดังนั้นการขยายผลการทดลองไปสู่ประชากรจึงจำกัดเฉพาะกลุ่มผู้ป่วยชาย
- การทดลองนี้นำเส้นผมจากผู้ป่วยไทย ซึ่งผมของคนจะมีลักษณะจำเพาะของแต่ละเชื้อชาติ ดังนั้นการขยายผลการทดลองไปสู่ประชากร จึงจำกัดเฉพาะเชื้อชาติเอเชีย

1.10 ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

ทราบถึงผลของเมลาโทนินที่มีต่อระดับความยาวของเส้นผมในห้องปฏิบัติการในผู้ป่วยชายที่มีภาวะผมบางจากพันธุกรรม ซึ่งอาจนำไปประยุกต์ใช้ในการรักษาผู้ป่วยในอนาคต

1.11 อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นและมาตรการแก้ไข

- จำนวนตัวอย่างมีจำนวนจำกัด ขั้นตอนการคัดแยกและการเพาะเลี้ยง ต้องอาศัยความชำนาญ วิธีการแก้ไข คือ ทำการฝึกหัดคัดแยกเส้นผมจากหนังศีรษะส่วนเกินจากการผ่าตัดก่อนจะทำการคัดแยกในผู้ป่วยจริง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 2
ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

โครงสร้างผมและวงจรชีวิตผม

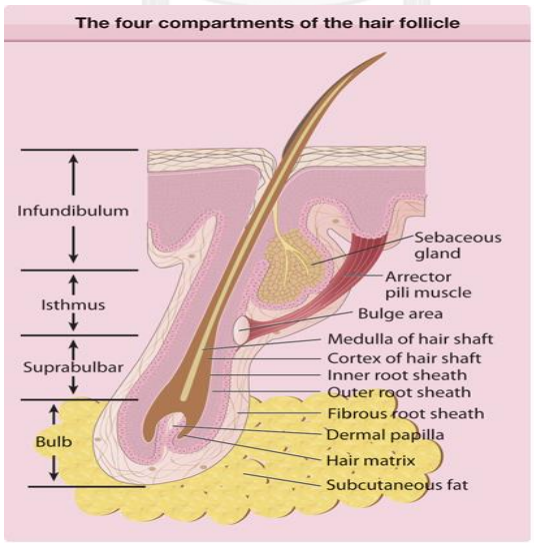
วิธีจำแนกเส้นผมของมนุษย์ สามารถแบ่งได้ 3 ลักษณะคือ แบ่งตามกายวิภาคของเส้นผม แบ่งตามลักษณะโครงสร้างในระดับเซลล์ และแบ่งตามขนาดของเส้นผม [24]

กายวิภาคของเส้นผม[25, 26]สามารถแบ่งออกเป็น 3 ส่วน ได้แก่ infundibulum, isthmus และ inferior parts

1. Infundibulum part คือ บริเวณรูเปิดของรูขุมขนจนถึงรูเปิดของต่อมไขมัน (sebaceous gland) ซึ่งเป็นบริเวณที่ต่อมาจากหนังกำพร้า (epidermis) ประกอบด้วย stratum corneum และ stratum granulosum

2. Isthmus part คือ บริเวณรูเปิดของต่อมไขมันจนถึงบริเวณที่กล้ามเนื้อ arrector pili มาเกาะ โดยบริเวณที่กล้ามเนื้อ arector pili มาเกาะจะเป็นที่อยู่ของ bulge region[27]ซึ่งประกอบด้วย hair follicular stem cells จำนวนมาก

3. Inferior part คือ บริเวณที่กล้ามเนื้อ arrector pili มาเกาะไปจนถึงฐานของ hair follicle ซึ่งเรียกว่า hair bulb



รูปภาพที่ **1** แสดงกายวิภาคของเส้นผมในแนว longitudinal โดยแบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ infundibulum, isthmus และ inferior (suprabulbar และ bulb) (คัดลอกมาจากหนังสือ Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine พิมพ์ครั้งที่ 8 บทที่ 86 หน้าที่ 965)

โครงสร้างในระดับเซลล์ของเส้นผม[28] แบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือepithelial part, hair bulb และ hair shaft

1. Epithelial part คือ ส่วนที่ต่อลงมาจากหนังกำพร้า (epidermis) ประกอบด้วย keratinocytes ซึ่งจะเจริญเปลี่ยนแปลงเป็น outer root sheaths, inner root sheathsและ companion layer จากด้านในสู่ด้านนอกตามลำดับ

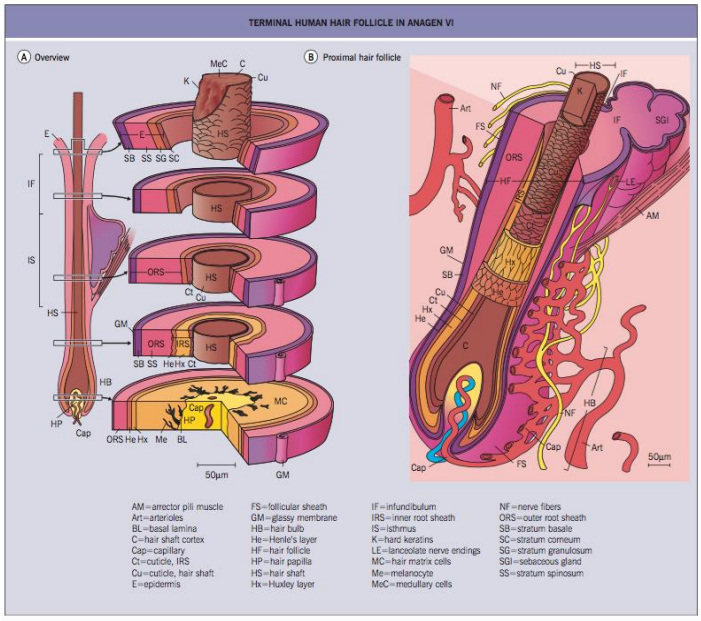
- Outer root sheath (ORS) คือ ส่วนที่ต่อมาจาก basal layer ของหนังกำพร้า (epidermis) โดยจะเรียงตัวตลอดแนวความยาวของเส้นผม ตั้งแต่infundibulum ลงไปสู่ inferior part
- Inner root sheath (IRS) คือ ส่วนที่ต่อมาจากหนังกำพร้าเช่นเดียวกับ ORS แต่จะสุดที่บริเวณรูเปิดของต่อมไขมัน ซึ่งอยู่ใน isthmus part โดยที่ IRS จะแบ่งออกเป็น 3 ชั้น ได้แก่ Henle’s layer, Huxley’s layer และ IRS cuticle ซึ่ง Henle’s layer เป็นชั้นสำคัญที่มีการสร้าง keratohyaline granule ที่จะเป็นโครงสร้างสำคัญในการสร้างเคราตินที่เป็นส่วนประกอบหลักของเส้นผม
- Companion layer คือ ชั้นที่อยู่ติดกับ Henle’s layer เป็นบริเวณที่เกิดการเลื่อนออกจากกันระหว่างชั้น ORS และ IRS

2. Hair bulb คือ บริเวณฐานล่างสุดของ hair follicle ประกอบด้วย matrix cell, dermal papilla (DP) และ dermal sheath (DS)

- Matrix cell คือ เซลล์ที่มีการแบ่งตัวเร็ว ซึ่งเซลล์เหล่านี้จะกลายเป็นเส้นผม (hair shaft) และ inner rooth sheath ต่อไป
- Dermal papilla เซลล์บริเวณนี้จะทำการสร้างและหลั่ง growth factor จำนวนมาก ซึ่งทำให้เกิดการแบ่งตัวและเจริญเติบโตของเส้นผม
- Dermal sheath หรือ connective tissue sheath ประกอบด้วย collagen fiber และ fibroblast พบว่า dermal sheath cell มีคุณสมบัติเป็น progenitor cell ของ fibroblast, กระตุ้นให้เกิดการสร้าง hair follicle ใหม่ รวมถึงกระตุ้นให้เกิดการหายของแผล

3. Hair shaft คือ เส้นผม ประกอบด้วย 3 ชั้น ได้แก่ cuticle, cortex และ medulla

- Medullaคือ บริเวณแกนกลางของเส้นผม
-Cortex ประกอบด้วย macrofibrils ที่เรียงตัวในลักษณะ cable-like structure
- Cuticle ประกอบด้วย cuticle cellจำนวน 6-10 ชั้น เป็นส่วนสำคัญที่ทำให้ผมแข็งแรง



รูปภาพที่ 2 แสดงโครงสร้างระดับเซลล์ของเส้นผมในแนวcross-sectional section (ซ้าย) และ longitudinal section (ขวา) (คัดลอกมาจากหนังสือ Bolognia Dermatology พิมพ์ครั้งที่ 3 บทที่ 68หน้าที่ 1083)

ขนาดของเส้นผม สามารถแบ่งได้เป็น2ประเภท คือ terminal hair และ vellus hair

1. Terminal hairคือ เส้นผมที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 0.06มิลลิเมตรและมีความยาวมากกว่า1 เซนติเมตร เส้นผมจะมีสีเข้ม

2. Vellus hairคือ คือ เส้นผมที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 0.03มิลลิเมตรและมีความยาวน้อยกว่า 1เซนติเมตร มักจะมีสีอ่อน พบบริเวณใบหน้ารวมถึงพบในคนไข้ที่มีภาวะผมบางจากพันธุกรรม

วงจรชีวิตผม

โดยเฉลี่ยมนุษย์จะมีเส้นผมบนหนังศีรษะประมาณ 100,000 เส้น ซึ่งเส้นผมจะเข้าสู่วงจรชีวิตทั้งหมด 10-20 ครั้ง[29, 30] วงจรชีวิตเส้นผมจะประกอบด้วยทั้งหมด 3 ระยะคือ anagen, catagen และ telogen โดยระยะเวลาเฉลี่ยของเส้นผมในระยะต่างๆ ได้แก่ ระยะ anagen 2-6 ปี, catagen 2-3 สัปดาห์, telogen 3 เดือน และ exogen ประมาณสัปดาห์จนถึงเดือนตามลำดับ โดยที่ผมจำนวน 85-90% อยู่ในระยะ anagen, 1% อยู่ในระยะcatagen และ 10% อยู่ในระยะ telogen[31, 32]

<u>ระยะ anagenเข้าสู่ระยะ catagen</u>

anagen bulb ผลิตเส้นผม (hair shaft), inner root sheath และ outer root sheath เมื่อเวลาผ่านไป hair follicle จะได้รับสัญญาณให้เข้าสู่ระยะ catagen จากนั้น matrix cell จะหยุด

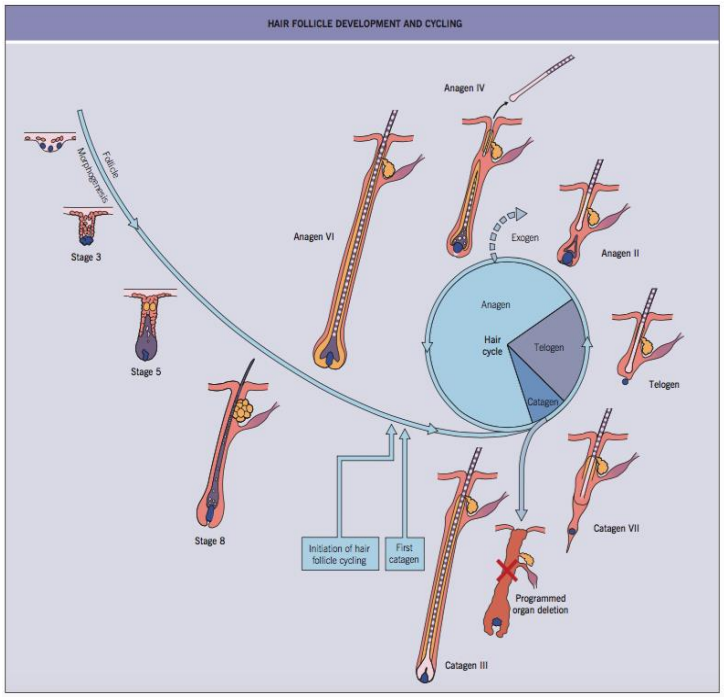
การผลิตเม็ดสีdermal papillae จะเริ่มหดและหลุดออกจาก hair follicle นอกจากนี้บริเวณ middle portion ของ hair follicle เกิดการหดรัดร่วมกับบริเวณ inferior part เกิดการหดรั้งขึ้นมาถึงบริเวณ hair bulge ทำให้เกิดเป็น fibrous tract ซึ่งกระบวนการหดรั้งของ hair follicle ส่วน inferior part เกิดจากการตายของเซลล์แบบ apoptosis อย่างไรก็ตามสัญญาณที่ส่งมากระตุ้นให้ hair follicle เข้าสู่ระยะ catagen ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่มีรายงานที่พบว่า fibroblast growth factor (FGF), transforming growth factor (TGF)-beta, sonic hedgehog (Shh), Wingless or Wnt pathway (Wnt), BMP, Neurotrophins and homeobox (hox) gene family กระตุ้นให้เส้นผมเข้าสู่ระยะ catagen[32-35]

<u>ระยะ catagenเข้าสู่ระยะ telogen</u>

โดยปกติผมระยะcatagen อยู่นานน้อยกว่า 1เดือน ไม่สามารถแยกระยะ catagenจากผมระยะ early telogenได้

<u>ระยะtelogenเข้าสู่ระยะanagen</u>

ในระยะ telogen พบว่า dermal papilla จะหดเล็กลงและด้านบนของ dermal papilla จะเริ่มมีการสร้าง secondary hair germ cell เมื่อระยะเวลาผ่านไปจะเริ่มมีสัญญาณจาก dermal papilla, secondary hair germ cell และ hair follicular stem cell มากระตุ้นให้เส้นผมเข้าสู่ระยะ anagenถึงแม้ว่าในปัจจุบันยังไม่ทราบกลไกการควบคุมเส้นผมให้เข้าสู่ระยะ anagen แต่มีงานวิจัยที่สนับสนุนทฤษฎี “Bulge activation hypothesis”[32] กล่าวคือ การที่ผมจะเข้าสู่ระยะ anagen นั้นจะต้องอาศัยสัญญาณที่ส่งมาจาก dermal papilla ไปกระตุ้น hair follicularstem cell ที่อยู่ในบริเวณ hair bulge ส่งผลให้ matrix cell เกิดการแบ่งตัวจำนวนมากอย่างรวดเร็ว จากนั้นเส้นผมที่เริ่มเข้าสู่ระยะ anagen จะแบ่งตัวเรื่อยๆลงไปตาม fibrous tract นอกจากนี้ dermal papilla เริ่มขยายใหญ่อีกครั้ง



รูปภาพที่ **3**แสดงวงจรชีวิตเส้นผม (คัดลอกมาจากหนังสือBolognia Dermatology พิมพ์ครั้งที่ 3บทที่ 68 หน้าที่ 1080)

การเพาะเลี้ยงเซลล์รากผมมนุษย์ในห้องปฏิบัติการ (Hair organ culture)

ในปี 1990 Philpott และคณะ[23, 36] ทำการศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์รากผมมนุษย์ในห้องปฏิบัติการ โดยนำเซลล์รากผมระยะ anagen จากหนังศีรษะของผู้หญิงอายุ 35-55 ปีที่เข้ารับการผ่าตัดยกกระชับหน้า เส้นผมที่นำมาเพาะเลี้ยงจะถูกตัดชั้นไขมันออกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นจึงนำไปเพาะเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ William's E medium ปริมาณ 500 ไมโครลิตร บรรจุใน 24 well plate ภายในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและมีสภาพแวดล้อมที่ประกอบด้วยอากาศปกติ 95% ผสมกับ คาร์บอนไดออกไซด์ 5% พบว่าความยาวเส้นผมในห้องปฏิบัติการเฉลี่ยต่อวัน คือ 300 ไมครอน ซึ่งสอดคล้องกับความยาวเฉลี่ยของเส้นผมบนหนังศีรษะของมนุษย์ โดยพบว่าในช่วง 4 วันแรกของการเพาะเลี้ยงเส้นผมมีความยาวเพิ่มขึ้นอย่างคงที่ จากนั้นคณะผู้วิจัยทำการทดลองเพื่อดูการสร้างสายพันธุกรรม (DNA) ในเซลล์รากผมโดยใช้วิธี [methyl-H] thymidine kinase autoradiography พบว่าที่ matrix cell บริเวณ hair bulb เป็นบริเวณที่มีการสร้างสายพันธุกรรม และเซลล์รากผมมีการสร้างสายพันธุกรรมอย่างคงที่ในช่วง 4 วันแรกของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นการสร้างสายพันธุกรรมจะลดลง ซึ่งสอดคล้องกับความยาวที่เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน ดังนั้นอาจอธิบายได้ว่าความยาวที่เพิ่มขึ้นของเส้นผมเกิดจากการแบ่งตัวของ matrix cells ทำ

ให้เกิด keratinized hair shaft กล่าวได้ว่างานวิจัยนี้ได้กลายเป็นต้นแบบวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์รากผมมนุษย์ในห้องปฏิบัติการในภายหลัง

ในปี 1995 Jindo และคณะ [37] ได้ทำการทดลองในห้องปฏิบัติการเพื่อดูผลของ hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) ที่ความเข้มข้น 0.1, 1 และ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมต่อเซลล์รากผมมนุษย์ โดยนำเส้นผมจากหนังศีรษะคนปกติจำนวน 6 คน จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงนาน 72 ชั่วโมง ทำการวัดความยาวของเส้นผม ณ วันที่เริ่มและวันที่สิ้นสุดการทดลอง พบว่า HGF/SF ที่ 0.1 และ 1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถกระตุ้นความยาวของเส้นผมได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.01) โดยเฉลี่ยมีความยาวเพิ่มขึ้น 0.61 (SD ± 0.12) และ 0.71 (SD ± 0.24) มิลลิเมตรตามลำดับ และวัดการสร้างสายพันธุกรรมโดยวิธี [methyl-H] thymidine kinase autoradiography พบว่า HGF/SF ที่ 0.1 และ 1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มีการสร้างสายพันธุกรรมเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดย HGF/SF ที่ความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของเส้นผมมากกว่า 1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยงานวิจัยของผู้วิจัยนำข้อมูลของการทดลองดังกล่าวมาคิดจำนวนตัวอย่างเส้นผมที่ต้องใช้ในงานวิจัย

ในปี 2009 Kloepper และคณะ[38]ทำงานวิจัยเพาะเลี้ยงเซลล์รากผมในห้องปฏิบัติการ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อหาความแตกต่างระหว่างระยะของเส้นผมในระยะ anagen และ catagen โดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์รากผมเช่นเดียวกับงานวิจัยที่กล่าวถึงข้างต้น จากนั้นทำการตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์หลังทำการเพาะเลี้ยงนาน 6 วันพบว่าเส้นผมระยะ anagen จะเริ่มเข้ าสู่ระยะ early catagen โดยพบว่ามีความแตกต่างระหว่างสองระยะกล่าวคือ เส้นผมระยะ anagen มี hair matrix จำนวนมาก, dermal papilla มีรูปร่างคล้ายหัวหอม (onion-shape) อยู่กันอย่างหลวมๆและจำนวนเม็ดสีมาก ในขณะที่เส้นผมระยะ catagen มี hair matrix จำนวนน้อย, dermal papilla มีรูปร่างคล้ายวงรี (oval shape) อยู่รวมกันค่อนข้างแน่นและจำนวนเม็ดสีน้อย เมื่อทำการย้อม immunohistochemistry ได้แก่ Ki-67 ซึ่งเป็นตัวชี้วัดที่แสดงจำนวนเซลล์ที่กำลังแบ่งตัว (proliferation) และ TUNEL ซึ่งเป็นตัวชี้วัดที่แสดงจำนวนเซลล์ที่เกิดการตายแบบ apoptosis พบว่าเส้นผมระยะ anagen บริเวณ hair matrix มีการแบ่งตัวมากกว่าระยะ catagen อย่างมีนัยสำคัญทางสถิตินอกจากนี้ยังพบว่าการตายของเซลล์แบบ apoptosis มีปริมาณมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติบริเวณ hair matrix และ dermal papilla ในเส้นผมระยะ catagen อีกด้วย

ในปี 2003 Bak และคณะ[39] ทำการทดลองโดยนำเซลล์รากผมบริเวณท้ายทอยจากผู้ป่วยชายที่เข้ารับการผ่าตัดปลูกผมมาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 6 วัน เพื่อดูผลของสาร 7-Phloroeckol ต่อเซลล์รากผม ซึ่งเป็นสารสกัดจากสาหร่ายทะเลสีน้ำตาล ที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบ พบว่าสาร 7-Phloroeckol ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 1 ไมโครโมลาร์ กระตุ้นความยาวของเส้นผมได้ถึง 1.57 และ 1.84 มิลลิเมตรตามลำดับ โดยที่กลุ่มควบคุมมีความยาว

เพิ่มขึ้นเพียง 0.96 มิลลิเมตร ซึ่งมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งงานวิจัยนี้พบว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์รากผมเป็นเวลา 6 วัน สามารถแสดงให้เห็นการเปลี่ยนแปลงความยาวของเส้นผมระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เมลาโทนิน

เมลาโทนิน คือ ฮอร์โมนที่หลั่งมาจากต่อมไพเนียลเป็นหลัก เมลาโทนินมีหน้าที่ควบคุมกลไกการทำงานต่างๆในร่างกายจำนวนมาก[40] เช่น การควบคุมกลางวันกลางคืน การควบคุมระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ที่มีการแบ่งตัวผิดปกติ และการควบคุมระบบสืบพันธุ์ นอกจากนี้เมลาโทนินยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระอีกด้วย[41-43] เมลาโทนินมีคุณสมบัติเป็น lipophilic จึงสามารถแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปในเซลล์ ทำให้เมลาโทนินออกฤทธิ์ปกป้องโครงสร้างที่อยู่ภายในเซลล์จากสารอนุมูลอิสระได้[44, 45] เช่น ไมโตคอนเดรีย หรือสายพันธุกรรม เป็นต้น นอกจากนี้เมลาโทนินทำหน้าที่กระตุ้น antioxidative enzyme ต่างๆ ได้แก่ Copper/Zinc oxide dismutase, Manganese-superoxide dismutase และ Glutathione peroxidase อีกด้วย จึงมีผลทางอ้อมในแง่ของการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ นอกจากต่อมไพเนียลที่ทำหน้าที่สร้างเมลาโทนินเป็นหลัก ยังตรวจพบว่ามีอวัยวะอื่นๆที่สามารถสังเคราะห์เมลาโทนินได้เช่น จอประสาทตา รังไข่ ลำไส้ ตับ ไต ม้าม ไขกระดูก เซลล์ผิวหนัง และเซลล์รากผม[46-49] โดยมีรายงานว่าสามารถตรวจพบการสร้างและหลั่งเมลาโทนินจากเซลล์ผิวหนัง ในเซลล์ผิวหนังที่นำมาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ และเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงร่วมกับสาร noradrenaline ซึ่งเป็นสารที่กระตุ้นการหลั่งเมลาโทนินจากต่อมไพเนียล พบว่ามีการหลั่งของเมลาโทนินจากเซลล์ผิวหนังในปริมาณเพิ่มมากขึ้นอย่างชัดเจน[22]โดยที่ระดับของเมลาโทนินในกระแสเลือดแตกต่างกันภายในช่วงระยะเวลาต่างๆของวัน โดยพบว่าระดับของเมลาโทนินในช่วงกลางวันจะมีระดับที่ต่ำกว่าคือประมาณ 10 pg/ml โดยจะเพิ่มสูงขึ้นในช่วงกลางคืน และมีระดับสูงสุดเมื่อเวลา 2 ถึง 4 นาฬิกาคือประมาณ 250 pg/ml[50]

ผลของเมลาโทนินในแง่ของการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

ในปี 1997 Bangha และคณะ[51] รายงานการใช้เมลาโทนินชนิดทาในผู้ป่วยที่มีแผลพุพองจากความร้อน พบว่าเมลาโทนินสามารถลดความรุนแรงของแผลพุพองได้ นอกจากนี้มีรายงานพบว่าการใช้ 0.5% เมลาโทนินทาที่ผิวหนังก่อนได้รับรังสีอัลตร้าไวโอเลตสามารถลดความแดงของผิวหนังจากการได้รับรังสีอัลตร้าไวโอเลตได้ แต่หากทาเมลาโทนินหลังจากการได้รับรังสีอัลตร้าไวโอเลตจะไม่สามารถลดความแดงของผิวหนังได้ จึงอาจสรุปได้ว่าเมลาโทนินสามารถลดปริมาณสารอนุมูลอิสระจากการบาดเจ็บของผิวหนังได้ทันทีที่ได้รับรังสี

ในปี 2001 Ryoo และคณะ[52]ได้ทำการทดลอง เพื่อศึกษาผลของเมลาโทนินต่อ dermal fibroblast ที่ได้รับรังสีอัลตร้าไวโอเลต โดยในกลุ่มควบคุมจะนำ dermal fibroblast ของมนุษย์ที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ มาทำการฉายรังสีอัลตร้าไวโอเลตบี ในช่วงความยาวคลื่น 290-320 นาโนเมตร ส่วนกลุ่มทดลองจะทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ร่วมกับเมลาโทนินที่ความเข้มข้น 10 นาโนโมลาร์ ก่อนที่ dermal fibroblast จะได้รับการฉายรังสี โดยในกลุ่มทดลองจะมีจำนวน dermal fibroblast ที่รอดชีวิตมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และพบว่าระดับของ malondialdehyde (MDA) น้อยลง ซึ่งบ่งบอกถึงการเกิด lipid oxidation บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ที่น้อยลง นอกจากนี้เมื่อย้อม immunohistochemistry เพื่อดูจำนวนเซลล์ที่ตายแบบ apoptosis พบว่ากลุ่มที่ได้รับเมลาโทนินมีปริมาณน้อยกว่ากลุ่มควบคุมเช่นกัน

ในปี 2002 Fischer และคณะ[53] ได้ทำการศึกษาผลของเมลาโทนินเมื่อเทียบกับวิตามินซีและวิตามินอีในการยับยั้งการสร้างสารอนุมูลอิสระในเม็ดเลือดขาวหลังการได้รับรังสีอัลตร้าไวโอเลต โดยนำเม็ดเลือดขาวมนุษย์มาฉายรังสีอัลตร้าไวโอเลตที่ความยาวแสง 280-360 นาโนเมตร พลังงานทั้งหมด 750 มิลลิจูลส์ต่อตารางเซนติเมตร จากนั้นทำการวัดปริมาณสารอนุมูลอิสระ โดยใช้เครื่องมือ chemiluminescence technique พบว่าเมลาโทนินที่ความเข้มข้น 1 และ 10 มิลลิโมลาร์ สามารถลดปริมาณอนุมูลอิสระได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยพบว่าเมลาโทนินเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์สามารถยับยั้งการสร้างอนุมูลอิสระได้แล้ว แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของเมลาโทนินต่อความสามารถให้การลดสารอนุมูลอิสระ กล่าวคือ ยิ่งเมลาโทนินความเข้มข้นเยอะ ยิ่งมีความสามารถในการลดสารอนุมูลอิสระ และเมื่อเทียบความสามารถในการลดการสร้างสารอนุมูลอิสระของเมลาโทนินกับวิตามินซีและวิตามินอี พบว่าเมลาโทนินสามารถลดการสร้างสารอนุมูลอิสระภายในเม็ดเลือดขาวได้มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิต

ในปี 2004 Fischer และคณะ[54] ทำการศึกษาความสามารถในการซึมผ่านของเมลาโทนินเข้าสู่ผิวหนังและกระแสเลือด ระหว่างเมลาโทนินชนิดครีมและสารละลายเมลาโทนินในเอทานอล โดยนำผู้เข้าร่วมวิจัยที่มีสุขภาพแข็งแรงสมบูรณ์ ทำการวัดระดับของเมลาโทนินในกระแสเลือดก่อนการทาเมลาโทนิน พบว่าที่เวลา 9 นาฬิกา ระดับเมลาโทนินอยู่ระหว่าง 0.6 ถึง 15.9 pg/ml มีค่าเฉลี่ยของระดับเมลาโทนินในกระแสเลือดเท่ากับ 7.4 pg/ml หลังการทา 0.01% เมลาโทนินชนิดครีม (0.1 มิลลิกรัมของเมลาโทนิน) และ0.01% สารละลายเมลาโทนินในเอทานอล (0.1 มิลลิกรัมของเมลาโทนิน) นาน 24 ชั่วโมง พบว่าระดับเมลาโทนินในกระแสเลือดเพิ่มขึ้นเฉลี่ย 9 และ 12.7 pg/ml ตามลำดับแต่อย่างไรก็ตามความแตกต่างนี้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ในปี 2006 Fischer และคณะ[55] ทำการศึกษาความสามารถของเมลาโทนินในการยับยั้งการตายของ keratinocytes แบบ apoptosis หลังการได้รับรังสีอัลตร้าไวโอเลต โดยนำ keratinocytes มา preincubate ด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่มีเมลาโทนินเข้มข้นระหว่าง 10 นาโนโมลาร์ถึง 10 มิลลิโม

ลาร์นาน 30 นาที จากนั้นนำมาฉายรังสีอัลคร้าไวโอเลตที่พลังงาน 25 และ 50 มิลลิจูลส์ต่อตารางเซนติเมตร จากนั้นทำการวัดปริมาณการสร้างสายพันธุกรรมด้วยเทคนิค [3H]-thymidine kinase autoradiography และวัดปริมาณการตายของเซลล์ keratinocytes โดยใช้ TUNEL assay พบว่าเมลาทินเข้มข้น 10 และ 100 มิลลิโมลาร์ มีการสร้างสายพันธุกรรมมากขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และพบว่าเมลาโทนินเข้มข้นตั้งแต่ 10 มิลลโมลาร์ไปจนถึง 10 ไมโครโมลาร์สามารถลดอัตราการตายของเซลล์ keratinocytes ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้คณะวิจัยได้ทำการทดลองโดยนำเซลล์ keratinocytes ไปฉายรังสีอัลตร้าไวโอเลตก่อนจะนำมา incubate ด้วยเมลาโทนิน แต่ไม่พบว่าอัตราการตายของเซลล์ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

ผลทางชีวภาพของเมลาโทนินต่อเซลล์ผิวหนังและเส้นผม

เมลาโทนินมีผลต่อผิวหนังและเส้นขนในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายสายพันธุ์ โดยมีผลในลักษณะเปลี่ยนแปลงตามฤดูกาล ไม่ว่าจะเป็นการผลัดขนตามฤดูกาล การเปลี่ยนแปลงของสีขน อย่างไรก็ตามผลของเมลาโทนินต่อผิวหนังของมนุษย์ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่มีการค้นพบ melatonin receptor ในผิวหนังและเส้นผม[56, 57]ซึ่ง melatonin receptor สามารถแบ่งออกได้ 3 ประเภทตามตำแหน่งที่อยู่ คือ Membrane-bound, Cytosolic และ Nuclear receptor

1. Membrane-bound receptor คือ MT1, MT2 receptor[58]โดยที่ MT1 receeptor พบบริเวณ hair follicular keratinocytes และ dermal papilla fibroblast ในขณะที่ MT2 receptor พบบริเวณ dermal papilla fibroblast[59]แต่ไม่พบที่บริเวณ hair follicular keratinocytes นอกจากนี้มีการค้นพบว่า MT2 receptor มีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกตามระยะวงจรชีวิตของเส้นผม กล่าวคือ MT2 receptor จะแสดงออกมากขึ้นในเส้นผมระยะ late anagen และแสดงออกน้อยลงเมื่อเส้นผมอยู่ในระยะ telogen

2. Cytosolic receptor คือ MT3 receptor ตรวจพบการแสดงออกในเซลล์ผิวหนัง แต่ไม่พบการแสดงออกในเซลล์รากผม

3. Nuclear receptor คือ RORα พบมากบริเวณ mesenchymal dermal papilla และบริเวณ epithelium ของ inner root sheath และ outer root sheath[22]โดยแสดงออกเพิ่มขึ้นในระยะ late catagen และแสดงออกลดลงเมื่อเส้นผมอยู่ในระยะ late anagen และ telogen

มีการศึกษาในสัตว์ทดลองและมนุษย์ทั้งในห้องปฏิบัติการและในทางคลินิก พบว่าเมลาโทนินมีผลต่อการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์รากผม ยับยั้งการตายแบบ apoptosis และสามารถเพิ่มเส้นผมระยะ anagen เช่นในปี 2005 Kobayashiและคณะ[22] ทำการศึกษาในหนูทดลอง C57BL/6 โดยแบ่งเป็น murine skin organ cultures, murine vibrissae follicles และทำการศึกษาในผม

ของคนปกติ human hair follicle organ cultures พบว่าใน hair follicle ของหนูทดลองและคนมี melatonin-like immunoreactivity ในบริเวณ outer root sheath, lower part of inner root sheathจำนวนมากรวมถึงยังพบที่บริเวณ dermal papilla fibroblasts จำนวนเพิ่มขึ้นเล็กน้อย เนื่องจากnorepinephrine สามารถกระตุ้นการสร้างเมลาโทนินที่ต่อมไพเนียลได้จึงได้นำ norepinephrine มาทำการทดลองพบว่า murine skin organ cultures, murine vibrissae follicles, human scalp hair follicles มีการสร้างเมลาโทนินเพิ่มขึ้น 2.5, 100 และ 5 เท่า ตามลำดับเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมเมื่อศึกษา melatonin receptors พบว่าใน mouse skin organ cultures มี RORα receptor และ MT2 receptor ซึ่ง receptor ทั้งสองมีการสร้างโปรตีน mRNA ที่แตกต่างกันไปในแต่ละช่วงระยะการเจริญของเส้นผมกล่าวคือ การแสดงออกของ RORαreceptor ลดลงในระยะ late anagen และเพิ่มขึ้นในระยะ late catagen และพบว่าการแสดงออกของ MT2receptor เพิ่มขึ้นในระยะ late anagen, catagen และลดลงในระยะ telogen นอกจากนี้ คณะวิจัยยังศึกษาความสามารถของเมลาโทนินในการยับยั้งการตายแบบ apoptosis ของ hair follicle โดยใช้ TUNEL assay และ Ki-67 ในการประเมินพบว่าเมลาโทนินเข้มข้น 0.01 นาโนโมลาร์ สามารถลดการตายแบบ apoptosis ของtelogen mouse skin organ cultureได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแต่ไม่สามารถยับยั้งการตายแบบapoptosis ในระยะ anagen หรือ catagen mouse skin organ culture นอกจากนี้พบว่าเมลาโทนินเข้มข้น 0.01 และ 1 นาโนโมลาร์สามารถลดปริมาณการแสดงออกของ estrogen receptor α ในmouse skin organ culture บริเวณ hair follicle matrix, inner root sheath และ dermal papilla ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติซึ่งเชื่อว่าเมลาโทนินไปออกฤทธิ์กระตุ้นการเจริญเติบโตของเส้นผมโดยไปทำให้ hair follicle ตอบสนองต่อ estrogen ลดลง

ในปี 2004 Fisherและคณะ[60]ทำการศึกษาในผู้ป่วยหญิงที่มีภาวะผมบางจากพันธุกรรมเป็นการศึกษา double-blind, randomized, placebo-controlledโดยใช้ 0.1% เมลาโทนินชนิดทา (4.3 มิลลิโมลาร์) ทาวันละครั้งเทียบกับยาหลอกโดยระยะการวิจัยทั้งหมดนาน 6 เดือนพบว่า 0.1% เมลาโทนินชนิดทาสามารถเพิ่มเส้นผมระยะ anagen บริเวณท้ายทอยได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ในงานวิจัยพบว่าเมลาโทนินสามารถซึมผ่านเข้าสู่กระแสเลือดและพบว่าระดับของเมลาโทนินในเลือดสูงขึ้นหลังจากการใช้ 0.1% เมลาโทนินชนิดทาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับยาหลอกอย่างไรก็ตามระดับของเมลาโทนินในกระแสเลือดที่เพิ่มขึ้นไม่เกินระดับของ physiological night peak

ในปี 2008 Fischerและคณะ[61]ได้รายงานผลการศึกษาที่ได้ทำการศึกษาเมื่อปี 2000 ซึ่งเป็นการศึกษาความเข้มข้นของเมลาโทนินต่อการเจริญเติบโตของเซลล์รากผมเพาะเลี้ยงนาน 11 วันพบว่าที่ความเข้มข้น 1, 2, 3, 5 มิลลิโมลาร์ 20 และ 200ไมโครโมลาร์มีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์รากผม ในขณะที่ความเข้มข้น 30, 40 ไมโครโมลาร์กระตุ้นการเจริญของเซลล์รากผมในงานวิจัยนี้สรุปว่าการที่เซลล์รากผมถูกกระตุ้นได้ที่ความเข้มข้นต่ำ (นาโนโมลาร์) น่าจะเกิดจากการที่ไปกระตุ้น melatonin receptor และเกิดการกระตุ้นผ่าน pathway ต่างๆ

ในปี 2012 Fisherและคณะ[62]ได้ทำการวิจัย pilot study ของ 0.0033% เมลาโทนินชนิดทา(14.21ไมโครโมลาร์) ในผู้ป่วยที่มีภาวะผมบางทางพันธุกรรมในเดือนมกราคม 2003 ถึงเดือนตุลาคม 2006 พบว่าการทาเมลาโทนินวันละครั้งไม่ส่งผลต่อการเพิ่มหรือลดการสร้างเมลาโทนินในร่างกาย และไม่พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณชีพที่ผิดปกติส่วนในผู้ป่วยหญิงและชายกลุ่มละ 15 คนที่มีอายุระหว่าง 18-40 ปีและมีภาวะผมบางจากพันธุกรรมระยะที่ 1,2 พบว่าหลังจากการใช้ 0.0033% เมลาโทนินชนิดทาพบว่าระดับความรุนแรงของภาวะผมบางลดลงภายใน 30 วันหลังใช้และลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหลังใช้ 90 วันการวัดจำนวนเส้นผมและความหนาแน่นของเส้นผมโดยใช้เครื่องมือ Trichoscan ในผู้ป่วยชายที่มีภาวะผมบางจากพันธุกรรมระยะที่ 1,2 (Hamilton-Norwood scale) จำนวน 35 คนโดยใช้ 0.0033% เมลาโทนินชนิดทาวันละครั้งก่อนนอนนาน 6 เดือนหลังจากทายาในเดือนที่ 1,3 และ 6 พบว่าจำนวนและความหนาแน่นของเส้นผมเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิตินอกจากนี้มีการเก็บข้อมูลการใช้ 0.0033% เมลาโทนินชนิดทาในผู้ป่วยที่มีภาวะผมบางระยะเริ่มต้นทั้งหมด 60 คนโดยให้ผู้เข้าร่วมวิจัยใช้ 0.0033% เมลาโทนินชนิดทาช่วงเย็นทุกวันนาน 90 วันและให้ช่างเสริมสวยประเมินผลโดยใช้แบบสอบถามพบว่า hair texture ดีขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและจำนวนผมร่วงลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นเดียวกันในขณะที่ผู้เข้าร่วมวิจัยทำการประเมินจำนวนผมร่วงพบว่าผู้เข้าร่วมวิจัยหญิงรายงานว่าจำนวนผมที่ร่วงลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแต่ผู้เข้าร่วมวิจัยชายไม่พบความแตกต่างของจำนวนผมที่ร่วงระหว่างก่อนทายาและหลังทายาอย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ผู้เข้าร่วมวิจัยรายงานถึงผลข้างเคียงหลังการใช้ยา0.0033% เมลาโทนินชนิดทา ได้แก่ผื่นแดงคันรู้สึกแสบร้อนเนื่องจากผลข้างเคียงไม่รุนแรงจึงไม่มีผู้เข้าร่วมวิจัยที่ออกจากงานเพราะผลข้างเคียงเหล่านี้ ช่วงสุดท้ายของงานวิจัยเป็นการศึกษา large, open-label, multi-centerstudy ทำใน 200 สถาบันผิวหนังในประเทศเยอรมนีรวบรวมผู้เข้าร่วมวิจัยที่มีภาวะผมบางจากพันธุกรรมในระยะ 1,2 ได้ทั้งหมด 1,891 คนแบ่งเป็นเพศชาย 902 คนและเพศหญิง 990 คนโดยให้ผู้เข้าร่วมวิจัยใช้ 0.0033% เมลาโทนินชนิดทา วันละครั้งนาน 90 วันจากนั้นทำการประเมิน

hair pull test เพื่อประเมิน hair loss activity โดยให้ผู้ประเมินให้ระดับมาก-น้อยของจำนวนผมที่หลุดเมื่อทำการดึงผมโดยระดับแบ่งเป็น0, 1+, 2+, 3+ พบว่าหลังจากการใช้ 0.0033% เมลาโทนินชนิดทา ผู้เข้าร่วมวิจัยมีความรุนแรงของภาวะผมร่วงลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิตินอกจากนี้มีการประเมินโดยการใช้แบบสอบถามในผู้วิจัยรายงานว่า 0.0033% เมลาโทนินชนิดทาลดภาวะผมหลุดร่วงและสามารถเพิ่มจำนวนเส้นผมใหม่ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและทำการประเมินแบบสอบถามในผู้เข้าร่วมวิจัยพบว่า 0.0033% เมลาโทนินชนิดทาช่วยลดระดับความรุนแรงของภาวะผมร่วงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 รูปแบบการวิจัย

Experimental study ลักษณะ*In-vitro* experimental trial

3.2 ระเบียบวิธีวิจัย

ประชากรเป้าหมาย (Target population)

เซลล์รากผมบริเวณท้ายทอยของประชากรชายไทยที่มีภาวะผมบางจากพันธุกรรม

ประชากรที่นำมาศึกษา (Study population)

เซลล์รากผมบริเวณท้ายทอยของผู้ป่วยชายที่มีภาวะผมบางจากพันธุกรรมที่เข้ารับการผ่าตัดปลูกถ่ายรากผมที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์สภากาชาดไทยระหว่างเดือนมิถุนายน 2558 ถึงเดือนมีนาคม 2559

เกณฑ์ในการคัดเลือกผู้เข้าร่วมการศึกษา (Patient inclusion criteria)

1.) ผู้ป่วยชายที่มีภาวะผมบางจากพันธุกรรมโดยมีระดับความรุนแรง Hamilton-Norwood classification II-III ที่เข้ารับการผ่าตัดปลูกผมที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

2.) อายุ 18 – 50ปี

เกณฑ์ในการคัดออกผู้เข้าร่วมการศึกษา(Patient exclusion criteria)

1.) ได้รับยา finasteride หรือ dutasteride ชนิดรับประทานก่อนเข้ารับการตัดชิ้นเนื้อนาน 12สัปดาห์

2.) มีโรคผมร่วงหรือผมบางอื่นๆเช่น telogen effluvium, alopecia areata

เกณฑ์ในการคัดเลือกเซลล์รากผมที่นำมาศึกษา (Hair inclusion criteria)

1.) เซลล์รากผมในระยะ anagen ที่มีส่วนของรากผมถึงปลายผมที่สมบูรณ์

เกณฑ์ในการคัดออกเซลล์รากผมที่นำมาศึกษา(Hair exclusion criteria)

1.) เซลล์รากผมสีขาว

2.) เซลล์รากผมที่ขาดชัดเจน

เกณฑ์ในการคัดเซลล์รากผมออกหลังจากการเพาะเลี้ยง (Hair drop-out criteria)

1.) เซลล์รากผมที่มีความยาวเพิ่มขึ้นน้อยกว่า 300 ไมครอน ณ วันที่ 6 ของการวิจัย เนื่องจากเซลล์รากผมที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ปกติจะมีค่าความยาวเฉลี่ยเพิ่มขึ้นประมาณ 300 ไมครอนต่อวัน ดังนั้นหากเพาะเลี้ยงนาน 6 วัน เส้นผมควรจะมีความยาวเพิ่มขึ้นโดยประมาณ 1,800 ไมครอน ดังนั้นงานวิจัยนี้จะถือว่าเส้นผมที่มีความยาวเพิ่มขึ้นน้อยกว่า 20% จาก 1,800 ไมครอน หรือประมาณ 300 ไมครอน จะคัดออกจากงานวิจัย

2.) เซลล์รากผมที่มีการปนเปื้อนหลังการเพาะเลี้ยง เช่น เชื้อราแบคทีเรีย

3.3 ขนาดตัวอย่าง

จากการทบทวนวรรณกรรม[37] จำนวนเส้นผมที่ต้องใช้ในการทดลองคำนวณจากสูตร

$$\text{n/group} = 2[\frac{(z_{\alpha/2} + z_{\beta})\sigma}{\Delta}]^2$$

กำหนดให้type 1 error (α) = 0.05ดังนั้นค่า$z_{\alpha/2}$= 1.96

type 1 error (β) = 0.2ดังนั้นค่าz_{β} = 0.84

เมื่อแทนค่าลงในสูตรพบว่าจำนวนhair follicleที่ต้องใช้ในการทดลองคือ 60 hair follicular units/กลุ่มรวมทั้งหมดเป็น240 hair follicular unitsซึ่งคาดว่าจะต้องนำมาจากผู้ป่วย 3คน

3.4 การสังเกตและการวัด

- ตัวแปรอิสระคือความเข้มข้นของเมลาโทนิน
- ตัวแปรตามคือความยาวของเส้นผมในห้องปฏิบัติการ
- ตัวแปรควบคุม (confounding factors) คือ

  1.) อุณหภูมิห้อง

  2.) น้ำเพาะเลี้ยงเซลล์รากผม

  3.) ความแปรปรวนจากการวัดความยาวเส้นผม

การวัดความยาวของเส้นผมจะทำการวัดในหน่วยความยาวไมครอนและทำการวัดโดยผู้วิจัย1คนโดยทำการทดสอบความเที่ยงตรงของผู้วิจัยเพื่อประเมินความน่าเชื่อถือในการวัดความยาวเส้นผมของผู้วิจัย (Intra-rater reliability)โดยใช้สถิติแบบพรรณนา คือ Intra-class Correlation Coeffient (ICC) พบว่าค่า Alphacronbach = 0.83 ซึ่งถือเป็นระดับความเที่ยงดีมากเนื่องจากค่า ICCเมื่อคำนวณแล้วจะต้องนำมาดูว่าตัวเลขที่ได้มานั้นอยู่ในช่วงระดับใด กล่าวคือ หากค่าความเที่ยง 0.6-0.65 แสดงว่าผู้วิจัยมีความเที่ยงไม่ดี, ค่าความเที่ยง 0.65-0.7 แสดงว่าผู้วิจัยมีความเที่ยงน้อย แต่พอ

ยอมรับได้, ค่าความเที่ยง 0.7-0.8 แสดงว่าผู้วิจัยมีความเที่ยงดี, ค่าความเที่ยง 0.8-0.9 แสดงว่าผู้วิจัยมีความเที่ยงดีมาก และค่าความเที่ยงมากกว่า 0.9 แสดงว่าผู้วิจัยมีความเที่ยงสูงมาก

3.5 ขั้นตอนในการดำเนินการวิจัย

วัสดุ (Material)

หนังศีรษะบริเวณท้ายทอย (donor area) ของผู้ป่วยชายที่มีภาวะผมบางจากพันธุกรรมที่มีความประสงค์และเข้ารับการผ่าตัดปลูกถ่ายรากผมที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์โดยผู้วิจัยทำการขออนุญาตนำตัวอย่างหนังศีรษะบริเวณท้ายทอยไปทำการเพาะเลี้ยงในห้องทดลอง ซึ่งจะทำผ่าตัดโดยวิธี strip harvesting ใช้ใบมีดเบอร์ 10 กรีดลงบนหนังศีรษะบริเวณท้ายทอยเป็นแนวนอนโดยให้มีความกว้างประมาณ 1 เซนติเมตรและความยาวประมาณ 20 เซนติเมตรโดยจะแบ่งชิ้นเนื้อจากหนังศีรษะผู้ป่วยพื้นที่ 1 ตารางเซนติเมตรซึ่งจะได้เส้นผมประมาณ 60-80 เส้น จากนั้นเย็บปิดหนังศีรษะด้วยวิธี Trichophytic method

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. ชี้แจงถึงวัตถุประสงค์ขั้นตอนการวิจัยประโยชน์ที่จะได้ในการศึกษาวิจัยและให้ผู้ป่วยลงชื่อในใบยินยอมให้ส่วนของเซลล์รากผมของผู้ร่วมวิจัยที่เหลือจากทำการผ่าตัดบริเวณหนังศีรษะในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์สภากาชาด

2. ซักประวัติตรวจร่างกายโรคร่วมและโรคประจำตัวประวัติแพ้ยาและประวัติการรักษาที่ได้รับมาก่อนหน้า

3. ทำการบันทึก baseline characteristics ของผู้เข้าร่วมวิจัยตามแบบฟอร์มที่กำหนด

4. เตรียมเส้นผมที่ได้จากการผ่าตัดบริเวณหนังศีรษะโดยนำมาจากหนังศีรษะบริเวณท้ายทอยของผู้เข้าร่วมวิจัย (donor area) นำมาตัดแบ่งผ่านกล้องจุลทรรศน์ด้วยมีดผ่าตัดเบอร์10ตัดส่วนเนื้อเยื่อไขมันรอบเส้นผมออกเหลือเพียงส่วนเนื้อเยื่อบางที่ห่อหุ้มเส้นผมไว้

5. นำเส้นผมไปเลี้ยงใน 24-well plateโดยกำหนดให้ 1 hair follicle/1well plate โดยใส่ 500 microliters serum-free William's E medium (Gibco BRL, Paisley, Scotland) with 2 mmol/L L-glutamine (Gibco), 10 ng / ml hydrocortisone (Sigma), 10 mg / l insulin (Sigma, Taufkirchen, Germany) and 1% antibiotic / antimycotic mixture (Gico BRL) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสประกอบด้วย 5% CO2 /95% air

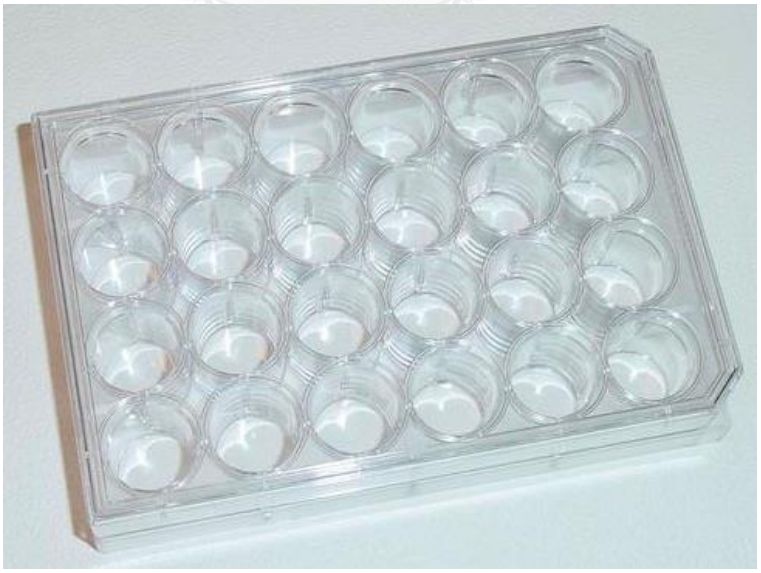
6. เตรียมเมลาโทนินใหม่ทุกครั้งที่ทำการทดลอง โดยนำเมลาโทนินบริสุทธิ์ชนิดผงจำนวน 50 มิลลิกรัมมาผสมกับ 95% เอทธานอลปริมาณ 1 มิลลิลิตร ซึ่งจะได้ความเข้มข้นของเมลาโทนิน 50 mg/ml จากนั้นคำนวณหาความเข้มข้นของเมลาโทนินให้เป็นหน่วยโมลาร์ จะได้เท่ากับ 0.215 โมลาร์ จากนั้นจะเตรียมสารละลาย William E's medium ร่วมกับเมลาโทนินความเข้มข้น 300 ไมโครโมลาร์ โดยคำนวณตามสูตร

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$0.215 \times (V1) = (300\times10^{-6}) \times (100\ ml)$$

$$V_1 = 0.14\ ml$$

แปลว่าสารละลาย William E's medium ร่วมกับเมลาโทนินความเข้มข้น 300 ไมโครโมลาร์ที่นำมาใช้เตรียมจากการผสมของ 0.5%เมลาโทนินในเอทธานอลจำนวน 0.14 มิลลิลิตร กับสารละลาย William E's medium จำนวน 100 มิลลิลิตร ส่วนสารละลาย William E' mediumร่วมกับเมลาโทนินความเข้มข้น 30 และ 3 ไมโครโมลาร์ จะเตรียมโดยใช้สารละลาย William E's medium ร่วมกับเมลาโทนินความเข้มข้น 300 ไมโครโมลาร์ มาทำให้เจือจางด้วยสารละลาย William E's medium เป็น 10 และ 100 เท่าตามลำดับ



รูปภาพที่ 4 แสดงภาพ 24 microwell plate

วันที่ 0 แบ่งเซลล์รากผมออกเป็น4กลุ่ม

- กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุมเพาะเลี้ยงในน้ำยา William’s E medium
- กลุ่มที่ 2 กลุ่มทดลองเพาะเลี้ยงในน้ำยา William’s E medium ร่วมกับเมลาโทนินเข้มข้น 3 ไมโครโมลาร์
- กลุ่มที่ 3 กลุ่มทดลองเพาะเลี้ยงในน้ำยา William’s E medium ร่วมกับเมลาโทนินเข้มข้น 30 ไมโครโมลาร์
- กลุ่มที่ 4 กลุ่มทดลองเพาะเลี้ยงในน้ำยา William’s E medium ร่วมกับเมลาโทนินเข้มข้น 300 ไมโครโมลาร์

7. นักเทคนิคห้องปฏิบัติการทำการเปลี่ยนน้ำเพาะเลี้ยงทุกวันเว้นวันนาน6วัน

8. ผู้วิจัยทำการวัดความยาวของเส้นผมวันที่ 0, 2, 4 และ 6 โดยการถ่ายรูปเส้นผมด้วยกล้องถ่ายภาพกำลังขยาย 16 เท่า Stereomicroscope (Olympus SZX16) จากนั้นทำการวัดความยาวโดยใช้โปรแกรม D2P-BSW ซึ่งวัดตั้งแต่โคนรากผมถึงปลายเส้นผมหน่วยความยาวที่วัดคือไมครอน (μm) โดยกำหนดแสงมุมกล้องและระยะห่างระหว่างเลนส์กล้องและเส้นผมให้เท่ากันทุกครั้งโดยทำการวัดความยาว 3 ครั้งและนำมาหาค่าเฉลี่ย

รูปภาพที่ 5 แสดงภาพกล้อง Stereomicroscope (Olympus SZX 16)

รูปภาพที่ **6** แสดงภาพการวัดความยาวเส้นผมโดยใช้โปรแกรม D2P-BSW หน่วยความยาวที่วัดคือไมครอน (μm)

3.6 การรวบรวมข้อมูล

เก็บข้อมูลจากหน่วยโรคผิวหนังโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

ผู้เก็บข้อมูล คือ ผู้ดำเนินการวิจัย และผู้บันทึกข้อมูล คือ ผู้ดำเนินการวิจัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

<u>แผนการเก็บรวบรวมข้อมูล</u>

Study group..... Melatonin concentration.....

วันที่ทำการเก็บตัวอย่าง.....

Number	Hair length Day 0	Hair length Day 2	Hair length Day 4	Hair length Day 6	Mean difference

3.7 การวิเคราะห์ข้อมูล

3.7.1 การสรุปข้อมูล (Summarization of Data), การนำเสนอข้อมูล (Data presentation) และสถิติที่ใช้

ข้อมูลที่ได้เป็นเชิงปริมาณ วิธีการทางสถิติที่ใช้ในการสมมติฐานเปรียบเทียบความแตกต่างของค่ามัธยฐานของข้อมูลที่มากกว่า 2 กลุ่ม เป็นอิสระต่อกันและมีช่วงเวลาเข้ามาเกี่ยวข้อง แต่เนื่องจากข้อมูลมีการแจกแจงแบบไม่ปกติ จึงใช้สถิติ Wilcoxon sign rank test

3.7.2 การทดสอบสมมติฐาน (Hypothesis testing)

สมมติฐาน H_0: ค่าเฉลี่ยความยาวรากผมที่เปลี่ยนแปลงไป (median difference) ในแต่ละกลุ่มไม่แตกต่างกัน

$\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4$

$H\alpha : \mu_i \neq \mu_j$ อย่างน้อย 1คู่ โดยให้ $\alpha = 0.05$

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 4
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 ประชากรที่นำมาศึกษา

งานวิจัยนี้เก็บรวบรวมเซลล์รากผมจำนวน 976 เซลล์ จากผู้ที่เข้ารับการปลูกถ่ายรากผมทั้งหมด 7 ราย โดยลักษณะข้อมูลทั่วไปของผู้เข้าร่วมวิจัย (ตารางที่1) โดยเซลล์รากผมจำนวน 976 เซลล์ ถูกแบ่งเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม เพาะเลี้ยงในน้ำยา William's E medium กลุ่มที่ 2 กลุ่มทดลอง เพาะเลี้ยงในน้ำยา William's E medium ร่วมกับเมลาโทนินเข้มข้น 3 ไมโครโมลาร์ กลุ่มที่ 3 กลุ่มทดลอง เพาะเลี้ยงในน้ำยา William's E medium ร่วมกับเมลาโทนินเข้มข้น 30 ไมโครโมลาร์กลุ่มที่ 4 กลุ่มทดลอง เพาะเลี้ยงในน้ำยา William's E medium ร่วมกับเมลาโทนินเข้มข้น 300 ไมโครโมลาร์ (ตารางที่2)

ตารางที่ 1ลักษณะพื้นฐานของผู้เข้าร่วมวิจัย

ข้อมูล	N=7
เพศ, ชาย; n	7
สัญชาติ, ไทย; n	7
อายุ(ปี); mean (SD)	43.7(SD ± 4.24)
Hamilton-Norwood class II; n	5
Hamilton-Norwood class III; n	2

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

จำนวนเซลล์รากผมตั้งต้นที่นำมาทดลองมีจำนวน 976 เซลล์ทำการสุ่มตัวอย่างแบ่งเซลล์รากผมออกเป็น 4 กลุ่มทำการเพาะเลี้ยงนาน 6 วันแต่เซลล์จำนวน 455 เซลล์คิดเป็นร้อยละ 46.62 ซึ่งมีความยาวเพิ่มขึ้นไม่เกิน 300 ไมครอนเมื่อสิ้นสุดการทดลอง เซลล์จำนวนนี้จะไม่ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์ เนื่องจากเซลล์รากผมที่เพาะเลี้ยงในสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมในห้องปฏิบัติการ ควรมีความยาวที่เพิ่มขึ้นมากกว่า 300 ไมครอนต่อวัน[23] ดังนั้นจึงใช้เกณฑ์นี้ในการคัดเซลล์รากผมที่เจริญน้อยกว่า 300 ไมครอนต่อวันออกจากการวิจัย โดยถือว่าเสมือนว่าเป็นเซลล์ที่ไม่มีชีวิตมาตั้งแต่เริ่มต้น โดยจะเหลือเซลล์ทั้งหมดที่จะนำมาวิเคราะห์จำนวน 521 เซลล์ (ตารางที่3)

ตารางที่ 2 จำนวนเซลล์รากผมที่ได้รับการสุ่มจำแนกตามกลุ่มการศึกษา 4 กลุ่ม (n=976)

กลุ่ม	จำนวนเซลล์ (ร้อยละ)
control	248(25.41)
3 micromolar	266 (27.25)
30 micromolar	225 (26.13)
300 micromolar	237 (24.28)

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบจำนวนเซลล์รากผมที่มีความยาวเปลี่ยนแปลงมากกว่าหรือเท่ากับ 300 ไมครอนและน้อยกว่า 300ไมครอน (n=976)

ความยาวที่เปลี่ยนแปลงไป (ไมครอน)	จำนวนเซลล์ (ร้อยละ)
≥ 300	521 (53.38)
< 300	455 (46.62)

หากจำแนกเซลล์รากผมที่มีความยาวเปลี่ยนแปลงมากกว่าหรือเท่ากับ 300 ไมครอนลงในแต่ละกลุ่ม พบว่ากลุ่มควบคุมมีเซลล์รากผมที่มีชีวิตจำนวน 114 เซลล์ (45.97%) กลุ่มทดลองที่ 1 มีเซลล์รากผมที่มีความยาวเปลี่ยนแปลงมากกว่าหรือเท่ากับ 300 ไมครอนมีจำนวน 150 เซลล์ (55.76%) กลุ่มทดลองที่ 2 มีเซลล์รากผมที่มีความยาวเปลี่ยนแปลงมากกว่าหรือเท่ากับ 300 ไมครอนมีจำนวน 121 เซลล์ (54.5%) กลุ่มทดลองที่ 3 มีเซลล์รากผมที่มีความยาวเปลี่ยนแปลงมากกว่าหรือเท่ากับ 300 ไมครอนมีจำนวน 139 เซลล์ (58.65%) (ตารางที่4)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 4 แสดงจำนวนเซลล์รากผมที่มีชีวิตและไม่มีชีวิตในแต่ละกลุ่มการศึกษา (n=976)

	เซลล์รากผมที่มีชีวิต	เซลล์รากผมที่ไม่มีชีวิต
control	114 (45.97)	134 (54.03)
3 micromolar	150 (55.76)	119 (44.24)
30 micromolar	121 (54.5)	101 (45.5)
300 micromolar	139 (58.65)	98 (41.35)

ตารางที่ 5 แสดงจำนวนเซลล์รากผมที่มีชีวิตและไม่มีชีวิตในผู้ป่วยแต่ละราย

ผู้ป่วยรายที่ 1	เซลล์รากผมที่มีชีวิต	เซลล์รากผมที่ไม่มีชีวิต
control	14 (38.89)	22 (61.11)
3 micromolar	18 (50)	18 (50)
30 micromolar	18 (50)	18 (50)
300 micromolar	15 (42.86)	20 (57.14)

ผู้ป่วยรายที่ 2	เซลล์รากผมที่มีชีวิต	เซลล์รากผมที่ไม่มีชีวิต
control	18 (64.29)	10 (35.71)
3 micromolar	18 (40.91)	26 (59.09)
30 micromolar	20 (45.45)	20 (54.55)
300 micromolar	13 (29.55)	31 (70.45)

ผู้ป่วยรายที่ 3	เซลล์รากผมที่มีชีวิต	เซลล์รากผมที่ไม่มีชีวิต
control	6 (12.5)	42 (87.5)
3 micromolar	0 (0)	24 (100)
30 micromolar	4 (9.52)	42 (90.48)
300 micromolar	0 (0)	24 (100)

ผู้ป่วยรายที่ 4	เซลล์รากผมที่มีชีวิต	เซลล์รากผมที่ไม่มีชีวิต
control	19 (39.58)	29 (60.42)
3 micromolar	20 (43.48)	26 (56.52)
30 micromolar	14 (58.33)	10 (41.67)
300 micromolar	7 (29.17)	17 (70.83)

ผู้ป่วยรายที่ 5	เซลล์รากผมที่มีชีวิต	เซลล์รากผมที่ไม่มีชีวิต
control	20 (83.33)	4 (16.67)
3 micromolar	39 (81.25)	9 (18.75)
30 micromolar	35 (87.5)	7 (12.5)
300 micromolar	43 (71.43)	5 (28.57)

ผู้ป่วยรายที่ 6	เซลล์รากผมที่มีชีวิต	เซลล์รากผมที่ไม่มีชีวิต
control	20 (83.33)	4 (16.67)
3 micromolar	39 (81.25)	9 (18.75)
30 micromolar	35 (83.33)	7 (16.67)
300 micromolar	43 (89.58)	5 (10.42)

ผู้ป่วยรายที่ 7	เซลล์รากผมที่มีชีวิต	เซลล์รากผมที่ไม่มีชีวิต
control	17 (70.83)	7 (29.17)
3 micromolar	14 (58.33)	10 (41.67)
30 micromolar	18 (75)	6 (25)
300 micromolar	19 (79.17)	5 (20.83)

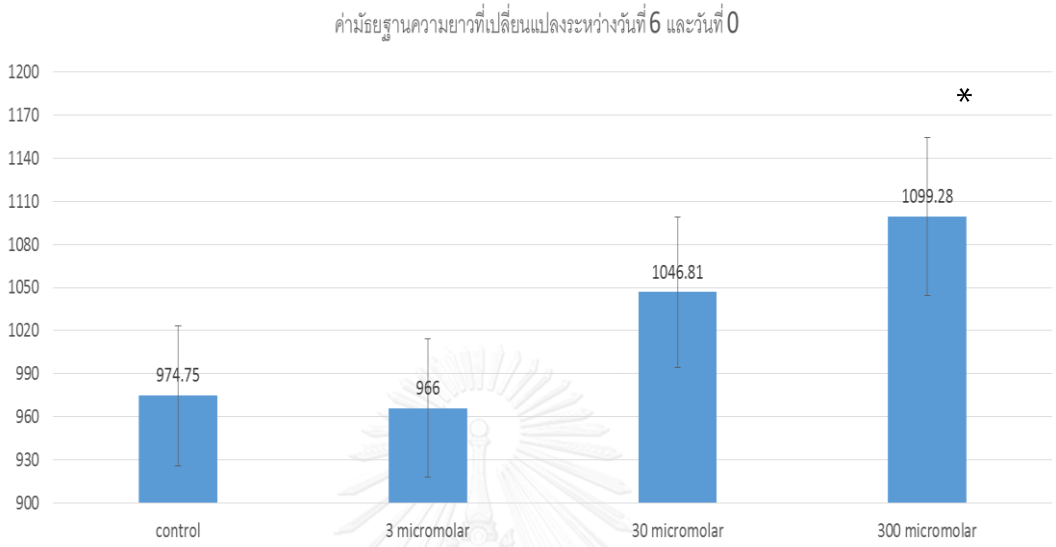
ผู้วิจัยทำการวัดความยาวของเส้นผมวันที่ 0, 2, 4 และ 6 โดยการถ่ายรูปเส้นผมด้วยกล้องถ่ายภาพกำลังขยาย 16 เท่า Stereomicroscope (Olympus SZX16) จากนั้นทำการวัดความยาวโดยวัดตั้งแต่โคนรากผมถึงปลายเส้นผม หน่วยความยาวที่วัด คือ ไมครอน (μm)และตัดข้อมูลของเซลล์รากผมที่ไม่มีชีวิตออกซึ่งเป็นการวิเคราะห์ข้อมูลแบบ Per protocol โดยความยาวของเส้นผมที่เปลี่ยนแปลงไปในกลุ่มควบคุม ณ วันที่เริ่มการทดลอง มีค่ามัธยฐานของความยาวเส้นผม 2965.06 ไมครอน เมื่อเวลาผ่านไป 6 วันมีค่ามัธยฐานของการเปลี่ยนแปลงความยาวของเส้นผมเพิ่มขึ้น974.75 ไมครอน ในกลุ่มทดลองที่ 1 มีค่ามัธยฐานของความยาวเส้นผม 2822.58 ไมครอน เมื่อเวลาผ่านไป 6 วันมีค่ามัธยฐานของการเปลี่ยนแปลงความยาวของเส้นผมเพิ่มขึ้น 966 ไมครอนในกลุ่มทดลองที่ 2 มีค่ามัธยฐานของความยาวเส้นผม 2860.07 ไมครอน เมื่อเวลาผ่านไป 6 วันมีค่ามัธยฐานของการเปลี่ยนแปลงความยาวของเส้นผมเพิ่มขึ้น 1046.81 ไมครอนในกลุ่มทดลองที่ 3 มีค่ามัธยฐานของความยาวเส้นผม 2753.28 ไมครอน เมื่อเวลาผ่านไป 6 วันมีค่ามัธยฐานของการเปลี่ยนแปลงความยาวของเส้นผมเพิ่มขึ้น 1099.28 ไมครอน ซึ่งพบความแตกต่างของค่ามัธยฐานการเปลี่ยนแปลงความยาวของเส้นผมระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่มีสารละลายเมลาโทนินเข้มข้น 300 ไมโครโมลาร์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.002) (แผนภูมิที่ 1)

เมื่อคำนวณร้อยละของความยาวที่เปลี่ยนแปลงไปในแต่ละกลุ่มการศึกษาจากวันที่เริ่มการทดลองถึงวันที่ 6 ของการศึกษา พบว่าในกลุ่มควบคุมมีความยาวเปลี่ยนแปลงร้อยละ 34.32 ในกลุ่มทดลองที่1 มีความยาวเปลี่ยนแปลงร้อยละ 34.49 ในกลุ่มทดลองที่2 มีความยาวเปลี่ยนแปลงร้อยละ 37.39 และในกลุ่มทดลองที่ 3 มีความยาวเปลี่ยนแปลงร้อยละ 40.49 (แผนภูมิที่2)

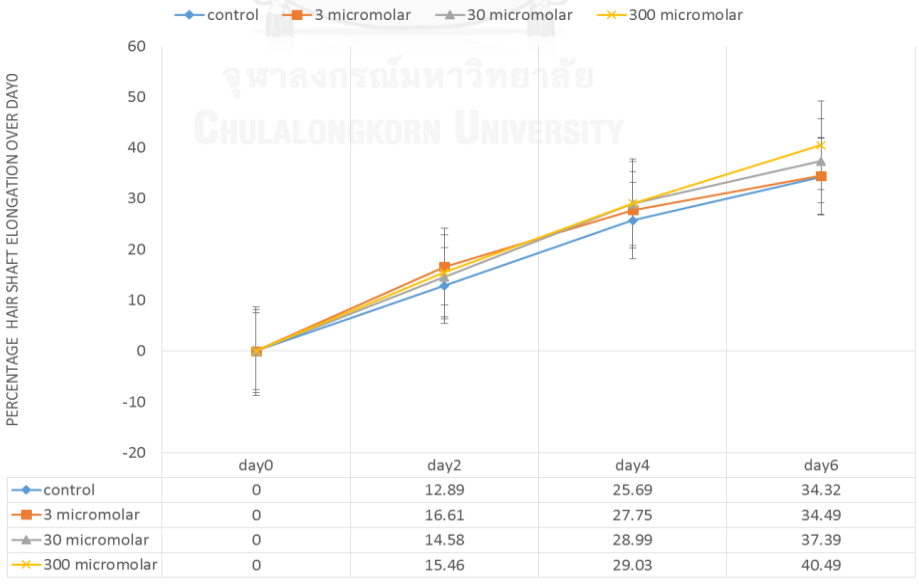
ตารางที่ 6 แสดงค่ามัธยฐานของการเปลี่ยนแปลงความยาวของเส้นผมวันที่ 0, 2, 4 และ 6 ของการทดลอง วิเคราะห์ข้อมูลหลังจากตัดข้อมูลเส้นผมที่ไม่มีชีวิตออก (Per protocol analysis)

	Day 0	Day 2	Median different (IQR)	P-value
Control	2840.2 (2580.4-3375.8)	3345.4 (2988.8-3765.1)	366 (216.2-602.8)	-
3 micromolar	2801.1 (2480.3-3134.1)	3268.5 (2952.6-3559.2)	465.2 (272.2-631.8)	0.50
30 micromolar	2801.3 (2488.3-3180.6)	3292.9 (2940.3-3627.1)	408.4 (265.2-557)	0.18
300 micromolar	2714.8 (2506.9-2994.9)	3220.5 (2882.2-3516.3)	419.8 (264.1-596.7)	0.22
	Day 0	Day 4	Median different (IQR)	P-value
Control	2840.2 (2580.4-3375.8)	3762.3 (3421.2-4065.2)	729.6 (458.1-1126.9)	-
3 micromolar	2801.1 (2480.3-3134.1)	3603.6 (3315.8-3904.7)	777.3 (454-1022.7)	0.59
30 micromolar	2801.3 (2488.3-3180.6)	3645.8 (3202.3-4124)	812 (478.1-1009.9)	0.30
300 micromolar	2714.8 (2506.9-2994.9)	3572 (3144.9-4009.2)	788.2 (560.8-1129.9)	0.74
	Day 0	Day 6	Median different (IQR)	P-value
Control	2840.2 (2580.4-3375.8)	4088.7 (3605.2-4398.5)	974.8 (648.5-1447.9)	-
3 micromolar	2801.1 (2480.3-3134.1)	3828.6 (3500.3-4202.9)	966 (628.5-1370.2)	0.65
30 micromolar	2801.3 (2488.3-3180.6)	3832.7 (3454.8-4416.3)	1046.8 (641.8-1407.3)	0.38
300 micromolar	2714.8 (2506.9-2994.9)	3843.6 (3362-4353.3)	1099.3 (726.1-1565.8)	0.002
	Day 2	Day 4	Median different (IQR)	P-value
Control	3345.4 (2988.8-3765.1)	3762.3 (3421.2-4065.2)	974.8 (648.5-1447.9)	-
3 micromolar	3268.5 (2952.6-3559.2)	3603.6 (3315.8-3904.7)	966 (628.5-1370.2)	0.89
30 micromolar	3292.9 (2940.3-3627.1)	3645.8 (3202.3-4124)	1046.8 (641.8-1407.3)	0.54
300 micromolar	3220.5 (2882.2-3516.3)	3572 (3144.9-4009.2)	384.3 (237.8-550.9)	0.18
	Day 2	Day 6	Median different (IQR)	P-value
Control	3345.4 (2988.8-3765.1)	4088.7 (3605.2-4398.5)	665.7 (371.7-919.1)	-
3 micromolar	3268.5 (2952.6-3559.2)	3828.6 (3500.3-4202.9)	593 (288.7-804.3)	0.96
30 micromolar	3292.9 (2940.3-3627.1)	3832.7 (3454.8-4416.3)	676.8 (381.7-906.7)	0.98
300 micromolar	3220.5 (2882.2-3516.3)	3843.6 (3362-4353.3)	668.4 (406-956.7)	0.06
	Day 4	Day 6	Median different (IQR)	P-value
Control	3762.3 (3421.2-4065.2)	4088.7 (3605.2-4398.5)	292.9 (116.6-401)	-
3 micromolar	3603.6 (3315.8-3904.7)	3828.6 (3500.3-4202.9)	225.4 (90-342.3)	0.92
30 micromolar	3645.8 (3202.3-4124)	3832.7 (3454.8-4416.3)	255.6 (127.4-377.4)	0.84
300 micromolar	3572 (3144.9-4009.2)	3843.6 (3362-4353.3)	281.4 (140.5-431)	0.07

แผนภูมิที่ 1 แสดงค่ามัธยฐานความยาวของเส้นผมที่เพิ่มขึ้น (n=521) หน่วยไมครอน วิเคราะห์ข้อมูลหลังจากตัดข้อมูลเส้นผมที่ไม่มีชีวิตออก (Per protocol analysis)



แผนภูมิที่ 2 แสดงร้อยละของความยาวที่เปลี่ยนแปลงไปจากวันที่เริ่มการทดลองในแต่ละกลุ่มการศึกษา วิเคราะห์ข้อมูลหลังจากตัดข้อมูลเส้นผมที่ไม่มีชีวิตออก (Per protocol analysis)



	day0	day2	day4	day6
control	0	12.89	25.69	34.32
3 micromolar	0	16.61	27.75	34.49
30 micromolar	0	14.58	28.99	37.39
300 micromolar	0	15.46	29.03	40.49

หากวิเคราะห์ข้อมูลของเซลล์รากผมทั้งหมด โดยไม่ตัดข้อมูลของเซลล์รากผมที่ไม่มีชีวิตออก ซึ่งเป็นการวิเคราะห์แบบ Intention to treat พบว่าในกลุ่มควบคุม ณ วันที่เริ่มการทดลอง มีค่ามัธยฐานของความยาวเส้นผม 3009.9 ไมครอน เมื่อเวลาผ่านไป 6 วันมีค่ามัธยฐานของการเปลี่ยนแปลงความยาวของเส้นผมเพิ่มขึ้น 403.7 ไมครอน ในกลุ่มทดลองที่ 1 มีค่ามัธยฐานของความยาวเส้นผม 2930.5 ไมครอน เมื่อเวลาผ่านไป 6 วันมีค่ามัธยฐานของการเปลี่ยนแปลงความยาวของเส้นผมเพิ่มขึ้น 494.7 ไมครอนในกลุ่มทดลองที่ 2 มีค่ามัธยฐานของความยาวเส้นผม 2962.7 ไมครอน เมื่อเวลาผ่านไป 6 วันมีค่ามัธยฐานของการเปลี่ยนแปลงความยาวของเส้นผมเพิ่มขึ้น 497.6 ไมครอนในกลุ่มทดลองที่ 3 มีค่ามัธยฐานของความยาวเส้นผม 2885.5 ไมครอน เมื่อเวลาผ่านไป 6วันมีค่ามัธยฐานของการเปลี่ยนแปลงความยาวของเส้นผมเพิ่มขึ้น 444.2 ไมครอนซึ่งไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่ามัธยฐานการเปลี่ยนแปลงความยาวของเส้นผมระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองทั้งสามกลุ่ม (แผนภูมิที่ 3)

เมื่อคำนวณร้อยละของความยาวที่เปลี่ยนแปลงไปในแต่ละกลุ่มการศึกษาจากวันที่เริ่มการทดลองถึงวันที่ 6 ของการศึกษา พบว่าในกลุ่มควบคุมมีความยาวเปลี่ยนแปลงร้อยละ 10.9 ในกลุ่มทดลองที่1 มีความยาวเปลี่ยนแปลงร้อยละ 16.5 ในกลุ่มทดลองที่ 2 มีความยาวเปลี่ยนแปลงร้อยละ 16.5 และในกลุ่มทดลองที่ 3 มีความยาวเปลี่ยนแปลงร้อยละ 16.8 (แผนภูมิที่4)

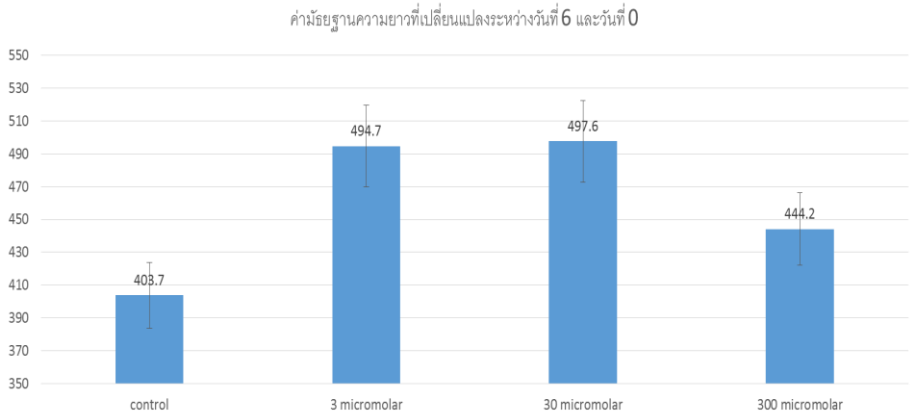
ตารางที่ 7 แสดงค่ามัธยฐานของการเปลี่ยนแปลงความยาวของเส้นผมวันที่ 0, 2, 4 และ 6 ของการทดลอง วิเคราะห์ข้อมูลโดยไม่ได้ตัดข้อมูลของเส้นผมที่ไม่มีชีวิตออก (Intention to treat analysis)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

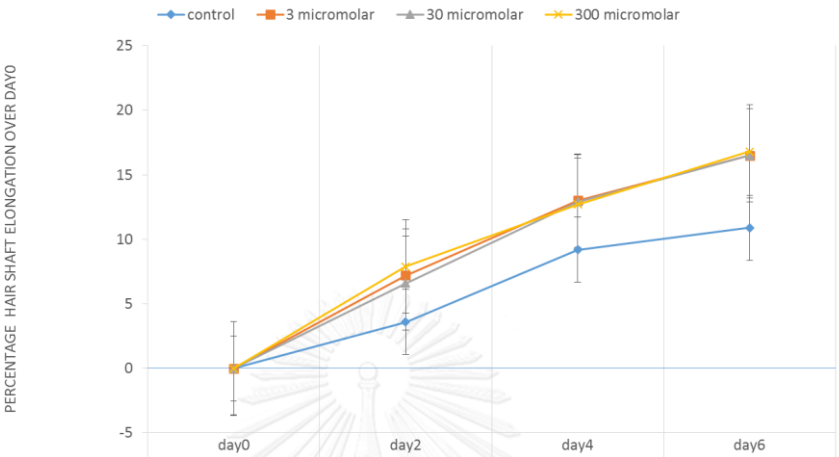
	Day 0	Day 2	Median different (IQR)	P value
Control	3009.9 (2676.9-3494.5)	3272.9 (2916.7-3628.2)	167.7 (5.9 to 383.9)	-
3	2930.5 (2535.9-3313.5)	3164.9 (2787.5-3461.7)	200.7 (6.5 to 492.8)	0.35
30	2962.7 (2610.9-3368.4)	3185.3 (2855.7-3569.5)	184.2 (11 to 459.1)	0.47
300	2885.5 (2541.2-3253.7)	3152.9 (2815.1-3483.6)	206.9 (26.6 to 440.4)	0..28
	Day 0	Day 4	Median different (IQR)	
Control	3009.9 (2676.9-3494.5)	3507.6 (3038.2-3860.4)	321.5 (6.8 to 769.7)	-
3	2930.5 (2535.9-3313.5)	3423.6 (2917.2-3721.7)	387.1 (31.9 to 892.3)	0.46
30	2962.7 (2610.9-3368.4)	3443.5 (3003.3-3841.1)	384.3 (59.1 to 880.7)	0.48
300	2885.5 (2541.2-3253.7)	3322.8 (2947.2-3804.4)	355.4 (39.1 to 835)	0.66
	Day 0	Day 6	Median different (IQR)	
Control	3009.9 (2676.9-3494.5)	3568 (3091.7-4135.8)	403.7 (9.8 to 992.2)	-
3	2930.5 (2535.9-3313.5)	3547.3 (2996.2-3902.5)	494.7 (42.2 to 1100.6)	0.27

30	2962.7 (2610.9-3368.4)	3573.8 (3051.7-4016.4)	497.6 (63.6 to 1179.7)	0.25
300	2885.5 (2541.2-3253.7)	3447.5 (2986.3-4010.2)	444.2 (39.2 to 1137.6)	0.44
	Day 2	Day 4	Median different (IQR)	
Control	3272.9 (2916.7-3628.2)	3507.6 (3038.2-3860.4)	164.8 (4.3 to 401.6)	-
3	3164.9 (2787.5-3461.7)	3423.6 (2917.2-3721.7)	163.6 (13 to 366.6)	0.89
30	3185.3 (2855.7-3569.5)	3443.5 (3003.3-3841.1)	179.4 (28.1 to 439.7)	0.43
300	3152.9 (2815.1-3483.6)	3322.8 (2947.2-3804.4)	157.4 (15.6 to 401.8)	0.96
	Day 2	Day 6	Median different (IQR)	
Control	3272.9 (2916.7-3628.2)	3568 (3091.7-4135.8)	197.7 (7.7 to 705.5)	-
3	3164.9 (2787.5-3461.7)	3547.3 (2996.2-3902.5)	252.9 (8.2 to 637.7)	0.24
30	3185.3 (2855.7-3569.5)	3573.8 (3051.7-4016.4)	239.3 (32.5 to 733.1)	0.28
300	3152.9 (2815.1-3483.6)	3447.5 (2986.3-4010.2)	231 (17.5 to 696.3)	0.31
	Day 4	Day 6	Median different (IQR)	
Control	3507.6 (3038.2-3860.4)	3568 (3091.7-4135.8)	74.1 (4.4 to 302.6)	-
3	3423.6 (2917.2-3721.7)	3547.3 (2996.2-3902.5)	95.8 (6.7 to 278.5)	0.21
30	3443.5 (3003.3-3841.1)	3573.8 (3051.7-4016.4)	103.4 (9 to 293.1)	0.18
300	3322.8 (2947.2-3804.4)	3447.5 (2986.3-4010.2)	75.5 (2.6 to 302.9)	0.68

แผนภูมิที่ 3แสดงค่ามัธยฐานความยาวของเส้นผมที่เพิ่มขึ้น (n=976) หน่วยไมครอน วิเคราะห์ข้อมูลโดยไม่ได้ตัดข้อมูลของเส้นผมที่ไม่มีชีวิตออก (Intention to treat analysis)



แผนภูมิที่ 4 แสดงร้อยละของความยาวที่เปลี่ยนแปลงไปจากวันที่เริ่มการทดลองในแต่ละกลุ่มการศึกษา วิเคราะห์ข้อมูลโดยไม่ได้ตัดข้อมูลของเส้นผมที่ไม่มีชีวิตออก (Intention to treat analysis)



	day0	day2	day4	day6
control	0	3.6	9.2	10.9
3 micromolar	0	7.2	13	16.5
30 micromolar	0	6.6	12.9	16.5
300 micromolar	0	7.9	12.7	16.8

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 5
อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

5.1 อภิปรายผล

การศึกษาของผู้วิจัยเป็นการวิจัยเชิงทดลอง (experimental study) แบบ *in vitro*โดยนำเซลล์รากผมบริเวณท้ายทอยจากผู้ป่วยชายที่มีภาวะผมบางจากพันธุกรรมมาเพาะเลี้ยงในสารละลาย William's E medium และสารละลาย William's E medium ร่วมกับเมลาโทนินเข้มข้น 3, 30 และ 300 ไมโครโมลาร์ พบว่าเมลาโทนินที่ความเข้มข้น 300 ไมโครโมลาร์สามารถกระตุ้นความยาวของเส้นผมให้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติส่วนเมลาโทนินที่ความเข้มข้น 30 ไมโครโมลาร์นั้นพบว่ากระตุ้นความยาวของเส้นผมได้แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ผลการทดลองของผู้วิจัยสนับสนุนผลของเมลาโทนินในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์รากผม มีแนวโน้มสัมพันธ์กับความเข้มข้น กล่าวคือเมลาโทนินที่มีความเข้มข้นสูงสามารถกระตุ้นความยาวของเส้นผมได้มากกว่าความเข้มข้นที่ต่ำกว่า

เนื่องจากการศึกษาการเจริญเติบโตของเส้นผมมนุษย์ในห้องปฏิบัติการ สามารถศึกษาได้ 3 ลักษณะ ได้แก่ การวัดความยาวของเส้นผมที่เปลี่ยนแปลง การวัดจำนวนเซลล์ที่แบ่งตัวเพิ่มขึ้น และการวัดจำนวนเซลล์ที่ตายแบบ apoptosis[23] โดยงานวิจัยนี้เลือกใช้วิธีการวัดความยาวของเส้นผมเป็นตัวแทนการเจริญเติบโตของเส้นผมเนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย ไม่ต้องใช้อุปกรณ์ที่ซับซ้อน และไม่จำเป็นต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญเฉพาะทางในการแปลผล อีกทั้งยังเป็นวิธีที่สามารถแสดงให้เห็นผลความแตกต่างได้อย่างชัดเจน ในขณะที่การวัดจำนวนเซลล์ที่แบ่งตัวและจำนวนเซลล์ที่ตายแบบ apoptosis จำเป็นต้องใช้การย้อมพิเศษ Immunohistochemistry คือ Ki-67 และ TUNEL ตามลำดับ ซึ่งค่อนข้างซับซ้อน จึงไม่ได้ทำการศึกษาในงานวิจัยนี้

จากการศึกษาก่อนหน้านี้[23]พบว่าเส้นผมในห้องปฏิบัติการมักจะมีความยาวเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและคงที่ในช่วง 4 วันแรกของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นเส้นผมจะมีอัตราการยาวลดลง และความสามารถในการสร้างสายพันธุกรรมของ matrix cell บริเวณ hair bulb เพิ่มขึ้นในช่วง 4 วันแรกเช่นเดียวกัน ดังนั้นผู้วิจัยจึงออกแบบงานวิจัยโดยเลือกเพาะเลี้ยงเซลล์รากผมนาน 6 วัน เนื่องจากการเพาะเลี้ยงเพียง 6 วัน น่าจะสามารถพบความแตกต่างของสารละลายเมลาโทนินความเข้มข้นต่างๆในการเพิ่มความยาวของเส้นผมในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองได้

จากการเก็บข้อมูลโดยจำแนกกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองในผู้ป่วยแต่ละราย พบว่าเส้นผมในผู้ป่วยบางรายมีอัตราการมีชีวิตต่ำมาก นอกจากการตอบสนองต่อเมลาโทนิน อาจเกิดจากหลาย

สาเหตุ ได้แก่ อายุ ระดับความรุนแรงของโรค การจัดเก็บ หรือการนำส่ง ดังนั้นจึงไม่สามารถสรุปได้ว่าการมีหรือไม่มีชีวิตของเส้นผมเกิดจากการตอบสนองต่อเมลาโทนินเพียงอย่างเดียว

จากผลการวิจัยเมื่อนำข้อมูลมาคำนวณแยกเป็น 2 กรณี กล่าวคือ กรณีที่1 นำข้อมูลเส้นผมที่นำมาเพาะเลี้ยงทั้งหมดมาคำนวณ (Intention to treat analysis) และกรณีที่2 นำเฉพาะข้อมูลเส้นผมที่มีชีวิต คือเส้นผมที่มีความยาวมากกว่าหรือเท่ากับ 300 ไมครอนหลังการเพาะเลี้ยงนาน 6 วันมาคำนวณ (Per protocol analysis) พบว่าหากคำนวณโดยใช้ข้อมูลเส้นผมที่นำมาเพาะเลี้ยงทั้งหมดโดยไม่ได้จำแนกเส้นผมที่ไม่มีชีวิตออก พบว่าเส้นผมที่เพาะเลี้ยงในสารละลายเมลาโทนินที่ความเข้มข้น 3 และ 30 ไมโครโมลาร์ มีค่ามัธยฐานของความยาวที่เปลี่ยนแปลงมากกว่าเส้นผมที่เพาะเลี้ยงในสารละลายเมลาโทนินที่ความเข้มข้น 300 ไมโครโมลาร์ และไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองทุกกลุ่ม แต่หากนำเฉพาะข้อมูลเส้นผมที่มีชีวิตมาคำนวณพบว่า เส้นผมที่เพาะเลี้ยงใน William’s E medium ร่วมกับสารละลายเมลาโทนินเข้มข้น 300 ไมโครโมลาร์ มีความยาวของเส้นผมเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ผลการคำนวณทางสถิติที่แตกต่างกันของทั้งสองวิธีเกิดจากการคำนวณโดยใช้ข้อมูลที่แตกต่างกัน ในกลุ่มที่นำข้อมูลทั้งหมดที่เพาะเลี้ยงนำมาคำนวณ การนำข้อมูลเส้นผมที่ไม่มีชีวิตที่มีจำนวนสูงถึง 46.62% ไม่ว่าจะเพาะเลี้ยงใน William’s E medium หรือ William’s E medium ที่มีส่วนประกอบของเมลาโทนินในความเข้มข้นต่างๆ ย่อมจะไม่สามารถเพิ่มความยาวของเส้นผมได้ ดังนั้นหากนำข้อมูลของเส้นผมกลุ่มนี้มาวิเคราะห์ทำให้ผลของการทดลองเบี่ยงเบนไปจากความเป็นจริง ดังนั้นการสรุปผลของงานวิจัยนี้ จึงเลือกสถิติที่ใช้ข้อมูลผมที่มีชีวิตมาคำนวณเท่านั้น เนื่องจากมีความเกี่ยวข้องมากกว่า

ผลการศึกษาที่นำมาวิเคราะห์แบบ Per protocol analysis พบว่าสารละลายเมลาโทนินที่มีความเข้มข้น 300 ไมโครโมลาร์สามารถกระตุ้นความยาวของเส้นผมให้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนเมลาโทนินที่ความเข้มข้น 30 ไมโครโมลาร์นั้นพบว่ากระตุ้นความยาวของเส้นผมได้เช่นเดียวกัน แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งพบว่าความยาวของเส้นผมที่เพิ่มขึ้นมีแนวโน้มสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารละลายเมลาโทนินที่สูงขึ้น โดยที่ผลการศึกษาของผู้วิจัยสอดคล้องกับงานวิจัยที่ศึกษาเส้นขนในสัตว์ทดลอง เส้นผมมนุษย์ในห้องปฏิบัติการรวมถึงการศึกษาในมนุษย์ก่อนหน้านี้ เช่นจากการทดลองในห้องปฏิบัติการในสัตว์ทดลองบางชนิด พบว่าเมลาโทนินสามารถเพิ่มความยาวของเส้นขนและลดการตายของเซลล์แบบ apoptosisได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นในปี 1994 Ibraheem และคณะ[63]ศึกษาความยาวของเส้นขนใน Cashmere goat พบว่าเมลาโทนินที่ความเข้มข้น 0.3 ไมโครโมลาร์มีผลเพิ่มความยาวของเส้นขนที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน 120ชั่วโมงซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของผู้วิจัยแต่แตกต่างกันที่ระดับความเข้มข้นของเมลาโทนินนอกจากนี้ในปี 2005 Kobayashiและคณะ[22]ได้รายงานการศึกษา

ในหนู พบว่าเมลาโทนินมีผลต่อ telogen skin organ cultureโดยพบว่าเมลาโทนินสามารถลดการตายของเซลล์แบบ apoptosis ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ในระยะ anagen และ catagen เมลาโทนินไม่มีผลยับยั้งการตายแบบ apoptosis ดังนั้นผลของเมลาโทนินจากการศึกษาของผู้วิจัย อาจอธิบายได้ว่าเมลาโทนินที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม อาจมีผลยับยั้งการตายแบบ apoptosis ส่งผลให้เส้นผมมีความยาวเพิ่มมากขึ้น

เมื่อพิจารณาผลของเมลาโทนินต่อความยาวเส้นผมมนุษย์ในห้องปฏิบัติการ ซึ่งมีการศึกษาก่อนหน้านี้ในปี2000 Fischer และคณะ[61]ได้ศึกษาการเจริญเติบโตของเส้นผมคนปกติในห้องปฏิบัติการนาน 11 วัน พบว่าความเข้มข้นของสารละลายเมลาโทนิน 30 ไมโครโมลาร์ สามารถเพิ่มความยาวของเส้นผมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยพบมากสุดในวันที่ 4ของการทดลอง ส่วนสารละลายเมลาโทนินในความเข้มข้นอื่นๆ คือ 1, 2, 3 และ 5 มิลลิโมลาร์มีผลยับยั้งการเพิ่มความยาวของเส้นผม เช่นเดียวกับความเข้นข้นของสารละลายเมลาโทนินที่ 20 และ 200 ไมโครโมลาร์ สำหรับการศึกษาของผู้วิจัยได้ผลแตกต่างกัน กล่าวคือเมลาโทนินเข้มข้น 300 ไมโครโมลาร์สามารถเพิ่มความยาวเส้นผมได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ถึงแม้ว่าความเข้มข้นของเมลาโทนิน 3 และ 30 ไมโครโมลาร์ไม่สามารถเพิ่มความยาวเส้นผมได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่พบว่าที่ความเข้มข้น 30 ไมโครโมลาร์มีค่ามัธยฐานความยาวที่เปลี่ยนแปลงมากกว่าความเข้มข้น 3 ไมโครโมลาร์ และมีแนวโน้มที่จะเพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มข้นของเมลาโทนิน ดังนั้นหากเพิ่มจำนวนเส้นผมที่นำมาศึกษา อาจพบความแตกต่างของความยาวที่เพิ่มขึ้นของทั้งสองกลุ่มเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติอย่างไรก็ตามผลการทดลองของผู้วิจัยไม่พบผลของเมลาโทนินในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นผม นอกจากนี้การทดลองนี้นำเส้นผมของคนปกติมาทดลอง ดังนั้นผลการศึกษาอาจแตกต่างกันในแง่ของความเข้มข้นของเมลาโทนินที่เหมาะสมในการกระตุ้นหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นผม

ยิ่งไปกว่านั้นมีรายงานผลการศึกษาเมลาโทนินชนิดทาในทางคลินิก พบว่าเมลาโทนินชนิดทาสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของเส้นผมซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของผู้วิจัย กล่าวคือในปี 2004 Fischerและคณะ[60]ทำการศึกษาผลของ 0.1%เมลาโทนินชนิดทา (4.3 มิลลิโมลาร์) ในผู้ป่วยหญิงที่มีภาวะผมบางจากพันธุกรรม พบว่าเมลาโทนินเพิ่มจำนวนเส้นผมระยะ anagen บริเวณท้ายทอยได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และยังเพิ่มจำนวนเส้นผมระยะ anagen บริเวณหน้าผากได้แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยกลไกการออกฤทธิ์ของเมลาโทนินในการรักษาภาวะผมบางจากพันธุกรรมคือการชักนำให้เส้นผมเข้าสู่ระยะ anagen ได้เร็วขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของผู้วิจัยที่พบว่าเส้นผมที่เพาะเลี้ยงด้วยเมลาโทนินเข้มข้น 300 ไมโครโมลาร์มีความยาว

เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและในปี 2012 Fischer และคณะ[62]ได้ทำการศึกษา 0.0033% เมลาโทนินชนิดทา (14.21 ไมโครโมลาร์)ในผู้ป่วยชายและหญิงที่มีภาวะผมบางจากพันธุกรรม พบว่าเมลาโทนินชนิดทาสามารถลดความรุนแรงของภาวะผมบางจากพันธุกรรม เพิ่มจำนวนเส้นผม เพิ่มความหนาแน่นของเส้นผมต่อหนึ่งตารางเซนติเมตรโดยอาจเกิดจากเมลาโทนินกระตุ้น dormant hair follicles ให้มีการสร้างเส้นผมขึ้นมา และลดจำนวนผมร่วงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เนื่องจากการศึกษาดังกล่าวใช้ 0.0033%เมลาโทนินชนิดทาที่มีส่วนประกอบของ ginkgo biloba และ biotin ซึ่งมีผลกระตุ้นการเจริญเติบโตของเส้นผม ทำให้ไม่สามารถบอกได้ชัดเจนว่าผลของยาเกิดจากเมลาโทนินเพียงอย่างเดียวหรือจากส่วนประกอบอื่นร่วมด้วยแต่ผลการทดลองของผู้วิจัยสนับสนุนผลของเมลาโทนินในการกระตุ้นความยาวเส้นผม การใช้ยาทาเมลาโทนินเพียงอย่างเดียวอาจจะเพิ่มความยาวของเส้นผมได้ หากต้องการศึกษาผลที่ชัดเจนยิ่งขึ้น อาจทำการทดลองโดยเปรียบเทียบผลของสารแต่ละชนิดในการกระตุ้นความยาวของเส้นผม

การกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์รากผมอาจจะสัมพันธ์กับกระตุ้น melatonin receptor(MT) ซึ่ง MT1receptor แสดงออกบริเวณ dermal papillae, inner root sheathและ outer root sheath ในขณะที่ MT2receptorแสดงออกบริเวณ dermal papillae[47, 64]ซึ่งการแสดงออกของmelatonin receptorขึ้นกับระยะต่างๆของเส้นผม โดย MT2 receptor จะแสดงออกสูงสุดในเส้นผมที่อยู่ในระยะ late anagen, catagenและจะมีการแสดงออกที่ลดลงในเส้นผมระยะ telogen[22]ซึ่งการแสดงออกของ MT2 receptorที่กล่าวมานี้ อาจจะอธิบายผลของเมลาโทนินในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเส้นผม โดยอาจไปควบคุมวงจรชีวิตของเส้นผม ส่งผลให้เส้นผมระยะ anagen ยาวนานขึ้นหรือส่งผลให้เส้นผมระยะtelogenสั้นลง ในอนาคตหากมีการศึกษาเมลาโทนินในความเข้มข้นที่สูงขึ้นอาจพบความเข้มข้นของเมลาโทนินที่เหมาะสมที่จะสามารถกระตุ้นการทำงานของ melatonin receptorได้สูงที่สุด

เมลาโทนินเป็นฮอร์โมนที่หลั่งออกมาจากต่อมไพเนียลในปริมาณที่แตกต่างกันในแต่ละช่วงเวลาของวัน กล่าวคือในเวลากลางวันเมลาโทนินจะถูกหลั่งออกมาปริมาณน้อย และเมลาโทนินจะถูกหลั่งออกมาปริมาณมากขึ้นในช่วงเวลากลางคืน โดยเมลาโทนินจะหลั่งออกมามากที่สุดในช่วงเวลา 2 ถึง 4 นาฬิกา[40] การทาเมลาโทนินช่วงกลางคืนและเกิดการดูดซึมเมลาโทนินผ่านทางผิวหนังเข้ากระแสเลือด อาจเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเมลาโทนินในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเส้นผม นอกจากนี้มีรายงานการใช้เมลาโทนินชนิดทาในรูปของสารละลายเอธทานอล พบว่ามีการซึมผ่านผิวหนังได้ดีกว่าการใช้เมลาโทนินชนิดทาในรูปแบบครีม ซึ่งสัมพันธ์กับความสามารถของเอทธานอลในการละลายในไขมันได้ดีกว่า โดยสารที่ละลายในไขมันจะสามารถซึมผ่านผิวหนังได้ดี เนื่องจากสารจะ

เข้าไปจับกับบริเวณ intercellular bridge ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นไขมัน ดังนั้นการเลือกใช้เมลาโทนินชนิดทาในรูปแบบสารละลายเอทธานอล อาจยิ่งเพิ่มประสิทธิภาพของเมลาโทนินได้ดียิ่งขึ้น

ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายๆสายพันธุ์พบว่ามีการเพิ่มความยาวของเส้นขน การผลัดเส้นขน การเปลี่ยนสีขนตามฤดูกาลซึ่งเมลาโทนินเป็นฮอร์โมนที่สำคัญในการควบคุมให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้ แต่ในมนุษย์ยังไม่พบรายงานการเปลี่ยนแปลงของเส้นผมตามฤดูกาล หากในอนาคตพบว่าเส้นผมบนหนังศีรษะของมนุษย์มีการเปลี่ยนแปลงตามฤดูกาล วิธีการทาเมลาโทนินที่สอดคล้องไปกับฤดูกาลอาจพบความสามารถของเมลาโทนินในการกระตุ้นความยาวของเส้นผมได้เช่นกัน

งานวิจัยของผู้วิจัยเป็นการทดลองเพาะเลี้ยงเส้นผมในห้องปฏิบัติการซึ่งนำเส้นผมมาจากผู้ป่วยที่มีภาวะผมบางจากพันธุกรรม ดังนั้นผลของงานวิจัยอาจนำไปประยุกต์ใช้กับผู้ป่วยกลุ่มนี้ได้จริง นอกจากนี้วิธีการวัดความยาวของเส้นผมใช้เครื่องมือที่ได้มาตรฐานโดยถ่ายรูปเส้นผมด้วยกล้องถ่ายภาพกำลังขยาย16เท่าStereomicroscope (Olympus SZX 16) จากนั้นทำการวัดความยาวโดยใช้โปรแกรมD2P-BSW หน่วยความยาวที่วัดคือไมครอนทำให้สามารถวัดความยาวของเส้นผมได้อย่างเที่ยงตรงและแม่นยำมากกว่าการวัดความยาวด้วยตาเปล่าโดยใช้กล้องจุลทรรศน์

แม้ว่างานวิจัยของผู้วิจัยจะมีตัวอย่างเส้นผมในการทดลองจำนวนน้อย แต่ผลการทดลองพบว่าเมลาโทนินความเข้มข้น 300 ไมโครโมลาร์ สามารถกระตุ้นความยาวของเส้นผมมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ หากใช้ตัวอย่างมาทดลองมากขึ้นอาจพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่มเมลาโทนินความเข้มข้น 3 และ 30 ไมโครโมลาร์ตามลำดับ อย่างไรก็ตามหากทำการทดลองโดยใช้เมลาโทนินในความเข้มข้นหลายๆระดับ อาจพบความเข้มข้นเมลาโทนินที่เหมาะสมที่สามารถกระตุ้นความยาวของเส้นผมได้มากที่สุด

จากผลการทดลองของผู้วิจัยทำให้เข้าใจกลไลของเมลาโทนินต่อการเจริญของเส้นผมได้ดียิ่งขึ้น ซึ่งอาจนำมาประยุกต์ใช้เป็นยารักษาทางเลือกได้ในอนาคต เช่น การรักษาภาวะผมบางจากพันธุกรรมในเพศชายและเพศหญิง, telogen effluvium และ anagen effluvium (chemotherapy induced alopecia) โดยในปัจจุบันเริ่มมีการศึกษายาทาเมลาโทนินในผู้ป่วยที่มีภาวะผมบางจากพันธุกรรมซึ่งพบว่าได้ผลค่อนข้างดี พยาธิกำเนิดของภาวะผมบางจากพันธุกรรมมีความสัมพันธ์กับพันธุกรรมและอิทธิพลของฮอร์โมนเพศชายคือ แอนโดรเจน โดยแอนโดรเจนเมื่อเข้าสู่ hair follicle จะเปลี่ยนแปลงไปเป็น dihydrotestosterone (DHT) ด้วยเอนไซม์ 5α-reductase จากนั้นจะเข้าไปกระตุ้น androgen receptor ส่งผลให้เส้นผมระยะ anagen สั้นลง เปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะ telogen เร็วขึ้น และทำให้เกิด miniaturization ของ hair follicle ซึ่งผลของเมลาโทนินต่อการเจริญเติบโตของเส้นผมในมนุษย์ อาจเกิดจากการมีปฏิสัมพันธ์กับตัวรับของแอนโดรเจนและเอสโตรเจนใน hair follicleทำให้เส้นผมอยู่ในระยะ anagen นานขึ้นรวมทั้งลดการเกิด miniaturization

Telogen effluvium เป็นภาวะผมร่วงเฉียบพลัน โดยที่ผมจะร่วงไม่เกินครึ่งหนึ่งของหนังศีรษะ และจะหายเองภายใน6เดือน[65]โดยเหตุกระตุ้นมีได้หลายสาเหตุ เช่น ความเครียดการตั้งครรภ์และภาวะทุพโภชนาการ ในช่วง2-3เดือนก่อนที่จะเกิดภาวะผมร่วง โดยเชื่อว่าเกิดจากการที่เส้นผมเข้าสู่ระยะ catagen พร้อมๆกัน จากนั้นเส้นผมจะเข้าสู่ระยะtelogen และเกิดผมร่วงตามมา ในปัจจุบันมีการนำเมลาโทนินมาใช้ในการรักษาโรคtelogen effluviumโดยเมลาโทนินอาจชักนำเส้นผมระยะ telogenเข้าสู่ระยะ anagenเร็วยิ่งขึ้น และทำให้เส้นผมอยู่ในระยะ anagenยาวนานขึ้น มีรายงานที่พบว่าเมลาโทนินควบคุมระยะต่างๆของเส้นขนรวมถึงการผลัดขนในหนูดังนั้นการใช้เมลาโทนินรักษาภาวะ telogen effluviumอาจป้องกันการเกิดผมร่วงพร้อมๆกันซ้ำอีกในอนาคต

คุณสมบัติในการกำจัดอนุมูลอิสระและกระตุ้นให้เกิดการซ่อมแซมของสายพันธุกรรมของเมลาโทนิน ทำให้มีฤทธิ์ในการชะลอการตายแบบ apoptosis ของเซลล์รากผมโดยคุณสมบัติดังกล่าวข้างต้นนี้เกิดขึ้นใน anagen hair bulb[66]ซึ่งอาจมีประโยชน์ในการใช้รักษาภาวะ anagen effluvium จาก chemotherapy ซึ่งเป็นโรคที่เกิดจากการตายของ hair bulb และ matrix cells จำนวนมากพร้อมๆกัน

กล่าวโดยสรุป การศึกษาของผู้วิจัยพบว่าสารละลายเมลาโทนินที่ความเข้มข้น 300ไมโครโมลาร์สามารถเพิ่มความยาวเส้นผมได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่สารละลายเมลาโทนินที่ความเข้มข้น30ไมโครโมลาร์สามารถเพิ่มความยาวของเส้นผมได้เล็กน้อยเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมผลของงานวิจัยนี้สนับสนุนการใช้สารละลายเมลาโทนินที่มีความเข้มข้น 300ไมโครโมลาร์เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการรักษาผู้ป่วยต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

5.2 จุดแข็งในงานวิจัย

1. เป็นงานวิจัยในห้องทดลองปฏิบัติการ สามารถควบคุมปัจจัยแวดล้อมภายนอก เช่น อุณหภูมิ ความชื้น ก๊าซออกซิเจน เป็นต้น
2. มีการคัดเลือกตัวอย่างแบบสุ่ม เพื่อลดอคติในการเลือกกลุ่มทดลอง
3. มีการเปลี่ยนน้ำเลี้ยงเซลล์ทุก 48ชั่วโมง เพื่อให้ส่วนประกอบของน้ำเลี้ยงเซลล์มีความเข้นข้นใกล้เคียงกันในแต่ละวัน
4. เป็น single blind studyโดยผู้วิจัยซึ่งเป็นผู้วัดขนาดความยาวและถ่ายภาพเส้นผม ไม่ทราบว่าตัวอย่างเส้นผมมาจากกลุ่มการศึกษาใด
5. การถ่ายภาพและการวัดความยาวของเส้นผมใช้เครื่องมือที่ได้มาตรฐานละเอียด หน่วยคือไมครอน

6. เส้นผมที่นำมาศึกษานำมาจากผู้ป่วยที่มีภาวะผมบางจากพันธุกรรม ผลการทดลองน่าจะสามารถนำมาประยุกต์ใช้กับผู้ป่วยจริงในอนาคตได้

5.3 จุดด้อยงานวิจัย

1. การวิจัยนี้เป็นการทดลองในห้องปฏิบัติการ ซึ่งขาดสภาพแวดล้อมทางชีววิทยาที่มีเฉพาะในมนุษย์ เช่น ไซโตไคน์ต่างๆ หรือองค์ประกอบอื่น เช่น หนังกำพร้า, ต่อมไขมัน, เส้นผม, รูขุมขน, กล้ามเนื้อ arrector pili และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน หากทำการทดลองในมนุษย์อาจพบผลการทดลองที่อาจแตกต่างจากการทดลองทางห้องปฏิบัติการของผู้วิจัยในการกระตุ้นความยาวของเส้นผมได้ นอกจากนี้หากนำผลการศึกษาไปประยุกต์ใช้กับผู้ป่วย อาจจะต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมถึงประสิทธิภาพและผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้น
2. เนื่องจากการวัดความยาวที่เปลี่ยนแปลงของเส้นผม อาจจะเป็นการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในลำดับสุดท้าย การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ก่อนหน้านี้ เช่น กระบวนการ apoptosisและการเปลี่ยนแปลงระดับไซโตไคน์ชนิดต่างๆ ไม่สามารถแสดงให้เห็นได้จากงานวิจัยนี้
3. นักเทคนิคห้องปฏิบัติการทราบชนิดและความเข้นข้นของน้ำเลี้ยงเซลล์ที่นำไปใช้ในการทดลอง
4. เซลล์รากผมที่นำมาจากผู้เข้าร่วมวิจัยแต่ละคนมีจำนวนไม่เท่ากัน ซึ่งอัตราการงอกของเส้นผมในแต่ละคนก็อาจจะแตกต่างกันออกไป
5. ความยาวตั้งต้นของกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จึงใช้ median differenceของความยาวของเส้นผมแทนความยาวจริงของเส้นผมในแต่ละกลุ่มทดลอง

ข้อเสนอแนะ

1. สามารถทำให้เป็น double blind studyได้ โดยนักเทคนิคห้องปฏิบัติการไม่ทราบส่วนผสมและความเข้มข้นของน้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่นำไปใช้ในตัวอย่างแต่ละกลุ่ม
2. ออกแบบงานวิจัยให้สามารถวัดการเปลี่ยนแปลงต่างๆระดับเซลล์ เช่น cell proliferation, cell apoptosisหรือระดับ cytokines ต่างๆ ก่อนที่จะมีการเปลี่ยนแปลงความยาวของเส้นผม

3. ทำการศึกษาเปรียบเทียบผลของเมลาโทนินที่มีผลต่อเส้นผมบริเวณ balding และ non-balding area เพื่อดูความแตกต่างของความยาวเส้นผมเมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ชนิดเดียวกัน
4. ออกแบบงานวิจัยโดยเพิ่มความเข้มข้นของเมลาโทนินในหลายๆระดับความเข้มข้น อาจสามารถเห็นความเปลี่ยนแปลงของระดับความยาวเส้นผมที่แตกต่างจากการทดลองนี้
5. ออกแบบงานวิจัยโดยใช้เมลาโทนินชนิดทาในแต่ละช่วงเวลาของวัน เพื่อเลียนแบบการเปลี่ยนแปลงของระดับเมลาโทนินในร่างกายมนุษย์ตามธรรมชาติ
6. การเพิ่มระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเส้นผม อาจทำให้พบว่าค่ามัธยฐานของการเปลี่ยนแปลงความยาวของเส้นผมมีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
7. ในแบบบันทึกข้อมูลอาจเพิ่มข้อมูลของเส้นผมที่นำมาศึกษา เช่น ระยะเวลาจากที่ทำการผ่าตัดนำเส้นผมออกมาจาหนังศีรษะจนถึงเวลาที่นำผมเข้าตู้เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รายการอ้างอิง

1. Hamilton JB. Patterned loss of hair in man; types and incidence. Annals of the New York Academy of Sciences. 1951;53(3):708-28.

2. Smith MA, Wells RS. Male-Type Alopecia, Alopecia Areata, and Normal Hair in Women; Family Histories. Archives of dermatology. 1964;89:95-8.

3. Lee WS, Lee HJ. Characteristics of androgenetic alopecia in asian. Annals of dermatology. 2012;24(3):243-52.

4. Hoffmann R, Happle R. Current understanding of androgenetic alopecia. Part I: etiopathogenesis. European journal of dermatology : EJD. 2000;10(4):319-27.

5. Inui S, Itami S. Molecular basis of androgenetic alopecia: From androgen to paracrine mediators through dermal papilla. Journal of dermatological science. 2011;61(1):1-6.

6. Schweiger ES, Boychenko O, Bernstein RM. Update on the pathogenesis, genetics and medical treatment of patterned hair loss. Journal of drugs in dermatology : JDD. 2010;9(11):1412-9.

7. Sinclair R, Torkamani N, Jones L. Androgenetic alopecia: new insights into the pathogenesis and mechanism of hair loss. F1000Research. 2015;4(F1000 Faculty Rev):585.

8. El-Domyati M, Attia S, Saleh F, Abdel-Wahab H. Androgenetic alopecia in males: a histopathological and ultrastructural study. Journal of cosmetic dermatology. 2009;8(2):83-91.

9. Magro CM, Rossi A, Poe J, Manhas-Bhutani S, Sadick N. The role of inflammation and immunity in the pathogenesis of androgenetic alopecia. Journal of drugs in dermatology : JDD. 2011;10(12):1404-11.

10. Mahe YF, Michelet JF, Billoni N, Jarrousse F, Buan B, Commo S, et al. Androgenetic alopecia and microinflammation. International journal of dermatology. 2000;39(8):576-84.

11. Millikan LE. Androgenetic alopecia: the role of inflammation and Demodex. International journal of dermatology. 2001;40(7):475-6.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

12. Varothai S, Bergfeld WF. Androgenetic alopecia: an evidence-based treatment update. American journal of clinical dermatology. 2014;15(3):217-30.

13. Gupta AK, Charrette A. Topical Minoxidil: Systematic Review and Meta-Analysis of Its Efficacy in Androgenetic Alopecia. Skinmed. 2015;13(3):185-9.

14. Blume-Peytavi U, Vogt A. [Androgenetic alopecia. Diagnosis and therapy- a current review]. Der Hautarzt; Zeitschrift fur Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete. 2013;64(11):820-9.

15. Tosini G, Menaker M. The clock in the mouse retina: melatonin synthesis and photoreceptor degeneration. Brain research. 1998;789(2):221-8.

16. Bubenik GA. Gastrointestinal melatonin: localization, function, and clinical relevance. Digestive diseases and sciences. 2002;47(10):2336-48.

17. Bubenik GA. Localization, physiological significance and possible clinical implication of gastrointestinal melatonin. Biological signals and receptors. 2001;10(6):350-66.

18. Kvetnoy I. Extrapineal melatonin in pathology: new perspectives for diagnosis, prognosis and treatment of illness. Neuro endocrinology letters. 2002;23 Suppl 1:92-6.

19. Acuna-Castroviejo D, Escames G, Venegas C, Diaz-Casado ME, Lima-Cabello E, Lopez LC, et al. Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. Cellular and molecular life sciences : CMLS. 2014;71(16):2997-3025.

20. Kvetnoy IM. Extrapineal melatonin: location and role within diffuse neuroendocrine system. The Histochemical journal. 1999;31(1):1-12.

21. Conti A, Conconi S, Hertens E, Skwarlo-Sonta K, Markowska M, Maestroni JM. Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells. Journal of pineal research. 2000;28(4):193-202.

22. Kobayashi H, Kromminga A, Dunlop TW, Tychsen B, Conrad F, Suzuki N, et al. A role of melatonin in neuroectodermal-mesodermal interactions: the hair follicle synthesizes melatonin and expresses functional melatonin receptors. FASEB J. 2005;19(12):1710-2.

23. Philpott MP, Sanders D, Westgate GE, Kealey T. Human hair growth in vitro: a model for the study of hair follicle biology. J Dermatol Sci. 1994;7 Suppl:S55-72.

24. Krause K, Foitzik K. Biology of the hair follicle: the basics. Seminars in cutaneous medicine and surgery. 2006;25(1):2-10.

25. Bernard BA. Hair biology: an update. International journal of cosmetic science. 2002;24(1):13-6.

26. Buffoli B, Rinaldi F, Labanca M, Sorbellini E, Trink A, Guanziroli E, et al. The human hair: from anatomy to physiology. International journal of dermatology. 2014;53(3):331-41.

27. Biernaskie J. Human hair follicles: "bulging" with neural crest-like stem cells. The Journal of investigative dermatology. 2010;130(5):1202-4.

28. Barinov EF, Sulaeva ON. [Histophysiology of hair follicles: current concept]. Uspekhi fiziologicheskikh nauk. 2004;35(4):65-77.

29. Paus R, Foitzik K. In search of the "hair cycle clock": a guided tour. Differentiation; research in biological diversity. 2004;72(9-10):489-511.

30. Paus R, Muller-Rover S, Botchkarev VA. Chronobiology of the hair follicle: hunting the " hair cycle clock". The journal of investigative dermatology Symposium proceedings / the Society for Investigative Dermatology, Inc [and] European Society for Dermatological Research. 1999;4(3):338-45.

31. Chu TW, Santos L, McElwee KJ. Biology of the hair follicle and mechanisms of nonscarring and scarring alopecia. Seminars in cutaneous medicine and surgery. 2015;34(2):50-6.

32. Stenn KS, Paus R. Controls of hair follicle cycling. Physiological reviews. 2001;81(1):449-94.

33. Oro AE, Higgins K. Hair cycle regulation of Hedgehog signal reception. Developmental biology. 2003;255(2):238-48.

34. Paus R. Principles of hair cycle control. The Journal of dermatology. 1998;25(12):793-802.

35. Adly MA, Assaf HA, Hussein MR. Expression pattern of p75 neurotrophin receptor protein in human scalp skin and hair follicles: Hair cycle-dependent expression. Journal of the American Academy of Dermatology. 2009;60(1):99-109.

36. Philpott M. In vitro maintenance of isolated hair follicles: current status and future development. Experimental dermatology. 1999;8(4):317-9.

Chulalongkorn University

37. Jindo T, Tsuboi R, Imai R, Takamori K, Rubin JS, Ogawa H. The effect of hepatocyte growth factor/scatter factor on human hair follicle growth. Journal of dermatological science. 1995;10(3):229-32.

38. Kloepper JE, Sugawara K, Al-Nuaimi Y, Gaspar E, van Beek N, Paus R. Methods in hair research: how to objectively distinguish between anagen and catagen in human hair follicle organ culture. Experimental dermatology. 2010;19(3):305-12.

39. Bak SS, Sung YK, Kim SK. 7-Phloroeckol promotes hair growth on human follicles in vitro. Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology. 2014;387(8):789-93.

40. Claustrat B, Brun J, Chazot G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. Sleep Med Rev. 2005;9(1):11-24.

41. Fischer TW, Elsner P. The antioxidative potential of melatonin in the skin. Current problems in dermatology. 2001;29:165-74.

42. Akcay YD, Yalcin A, Sozmen EY. The effect of melatonin on lipid peroxidation and nitrite/nitrate levels, and on superoxide dismutase and catalase activities in kainic acid-induced injury. Cellular & molecular biology letters. 2005;10(2):321-9.

43. Albarran MT, Lopez-Burillo S, Pablos MI, Reiter RJ, Agapito MT. Endogenous rhythms of melatonin, total antioxidant status and superoxide dismutase activity in several tissues of chick and their inhibition by light. Journal of pineal research. 2001;30(4):227-33.

44. Tanabe M, Tamura H, Taketani T, Okada M, Lee L, Tamura I, et al. Melatonin protects the integrity of granulosa cells by reducing oxidative stress in nuclei, mitochondria, and plasma membranes in mice. The Journal of reproduction and development. 2015;61(1):35-41.

45. Reiter RJ, Guerrero JM, Garcia JJ, Acuna-Castroviejo D. Reactive oxygen intermediates, molecular damage, and aging. Relation to melatonin. Annals of the New York Academy of Sciences. 1998;854:410-24.

46. Fischer TW, Sweatman TW, Semak I, Sayre RM, Wortsman J, Slominski A. Constitutive and UV-induced metabolism of melatonin in keratinocytes and cell-free systems. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 2006;20(9):1564-6.

47. Slominski A, Fischer TW, Zmijewski MA, Wortsman J, Semak I, Zbytek B, et al. On the role of melatonin in skin physiology and pathology. Endocrine. 2005;27(2):137-48.

48. Slominski A, Baker J, Rosano TG, Guisti LW, Ermak G, Grande M, et al. Metabolism of serotonin to N-acetylserotonin, melatonin, and 5-methoxytryptamine in hamster skin culture. The Journal of biological chemistry. 1996;271(21):12281-6.

49. Slominski A, Pisarchik A, Semak I, Sweatman T, Wortsman J, Szczesniewski A, et al. Serotoninergic and melatoninergic systems are fully expressed in human skin. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 2002;16(8):896-8.

50. Benot S, Goberna R, Reiter RJ, Garcia-Maurino S, Osuna C, Guerrero JM. Physiological levels of melatonin contribute to the antioxidant capacity of human serum. Journal of pineal research. 1999;27(1):59-64.

51. Bangha E, Lauth D, Kistler GS, Elsner P. Daytime serum levels of melatonin after topical application onto the human skin. Skin pharmacology : the official journal of the Skin Pharmacology Society. 1997;10(5-6):298-302.

52. Ryoo YW, Suh SI, Mun KC, Kim BC, Lee KS. The effects of the melatonin on ultraviolet-B irradiated cultured dermal fibroblasts. Journal of dermatological science. 2001;27(3):162-9.

53. Fischer TW, Scholz G, Knoll B, Hipler UC, Elsner P. Melatonin suppresses reactive oxygen species in UV-irradiated leukocytes more than vitamin C and trolox. Skin pharmacology and applied skin physiology. 2002;15(5):367-73.

54. Fischer TW, Greif C, Fluhr JW, Wigger-Alberti W, Elsner P. Percutaneous penetration of topically applied melatonin in a cream and an alcoholic solution. Skin pharmacology and physiology. 2004;17(4):190-4.

55. Fischer TW, Zbytek B, Sayre RM, Apostolov EO, Basnakian AG, Sweatman TW, et al. Melatonin increases survival of HaCaT keratinocytes by suppressing UV-induced apoptosis. Journal of pineal research. 2006;40(1):18-26.

56. Ekmekcioglu C. Melatonin receptors in humans: biological role and clinical relevance. Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie. 2006;60(3):97-108.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

57. Jockers R, Delagrange P, Dubocovich ML, Markus RP, Renault N, Tosini G, et al. Update on Melatonin Receptors. IUPHAR Review. British journal of pharmacology. 2016.

58. Browning C, Beresford I, Fraser N, Giles H. Pharmacological characterization of human recombinant melatonin mt(1) and MT(2) receptors. British journal of pharmacology. 2000;129(5):877-86.

59. Fischer TW. [The influence of melatonin on hair physiology]. Der Hautarzt; Zeitschrift fur Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete. 2009;60(12):962-72.

60. Fischer TW, Burmeister G, Schmidt HW, Elsner P. Melatonin increases anagen hair rate in women with androgenetic alopecia or diffuse alopecia: results of a pilot randomized controlled trial. The British journal of dermatology. 2004;150(2):341-5.

61. Fischer TW FA, Knoll B. Melatonin in low doses enhances in vitro human hair follicle proliferation and inhibits hair growth in high doses. Archives of dermatology. 2000(292):147.

62. Fischer TW, Trueb RM, Hanggi G, Innocenti M, Elsner P. Topical melatonin for treatment of androgenetic alopecia. International journal of trichology. 2012;4(4):236-45.

63. Ibraheem M, Galbraith H, Scaife J, Ewen S. Growth of secondary hair follicles of the Cashmere goat in vitro and their response to prolactin and melatonin. Journal of anatomy. 1994;185 (Pt 1):135-42.

64. Slominski RM, Reiter RJ, Schlabritz-Loutsevitch N, Ostrom RS, Slominski AT. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions. Molecular and cellular endocrinology. 2012;351(2):152-66.

65. Malkud S. Telogen Effluvium: A Review. Journal of clinical and diagnostic research : JCDR. 2015;9(9):WE01-3.

66. Fischer TW, Slominski A, Zmijewski MA, Reiter RJ, Paus R. Melatonin as a major skin protectant: from free radical scavenging to DNA damage repair. Experimental dermatology. 2008;17(9):713-30.

รายการอ้างอิง

ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ นางสาวณัฐินี จิตครองธรรม

วันเดือนปีเกิด วันที่ 16ตุลาคม พ.ศ.2530 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร

การศึกษา

พ.ศ. 2549-2554 แพทยศาสตรบัณฑิตจากคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2557-2558 นิสิตปริญญาโท ภาควิชาอายุรศาสตร์ สาขาตจวิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การทำงาน

พ.ศ. 2555 แพทย์ใช้ทุนปีที่ 1ณ ศูนย์การแพทย์สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯสยามบรมราชกุมารี มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

พ.ศ. 2556 แพทย์ใช้ทุนปีที่ 2ณ ศูนย์การแพทย์ปัญญานันทภิกขุ โรงพยาบาลชลประทาน มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University