รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดผิวกระจกตาโดยเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงใหม่
Limbal stem cell transplantation with new cultivation technique

ผศ.พญ. วิลาวัณย์ พวงศรีเจริญ
รศ.พญ.งามจิตต์ เกษตรสุวรรณ
นพ.ดร นิพัญจน์ อิศรเสนาฯ
ผศ.พิเศษ พญ.อุษณีย์ เหรียญประยูร

ภาควิชาจักษุวิทยา
ภาควิชาเภสัชวิทยา
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล ประจำปีงบประมาณ 2558

บทคัดย่อ

การที่ Corneal epithelial stem cell ถูกทำลายจากการถูกสารเคมี, ความร้อน และโรค Steven-johnson syndrome ทำให้เกิดสภาวะที่เรียกว่า limbal stem cell deficiency (LSCD) ซึ่งจะมีการลุกล้ำของเนื้อเยื่อตาขาว และเส้นเลือดเข้ามาในตาดำ เกิดการอักเสบเรื้อรัง และสูญเสียการมองเห็นในที่สุด การปลูกถ่ายแผ่นกระจกตาที่ได้จากการเพาะเลี้ยง เซลล์ต้นกำเนิดกระจกตา (limbal stem cells, LSCs) มีการพิสูจน์แล้วว่าเป็นวิธีการรักษาที่มีประสิทธิภาพสูง แต่อย่างไรก็ดีวิธีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงปัจจุบันยังไม่สามารถรักษาคุณสมบัติความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์ต้นกำเนิดกระจกตาไว้ได้เกิน 3 passages ทำให้เราไม่สามารถนำไปใช้ได้อย่างเพียงพอ ในงานวิจัยที่ผ่านมา คณะผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดกระจกตาได้ยาวนานขึ้น ในการศึกษาครั้งนี้ คณะผู้วิจัยมีจุดประสงค์ที่จะพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยง และทดสอบความปลอดภัย และประสิทธิภาพของแผ่นกระจกตาที่สร้างได้จากการเพาะเลี้ยงวิธีใหม่ที่ได้พัฒนาขึ้นมาในผู้ป่วยจำนวน 20 ราย

สถาบันวิจัย
เลขทะเบียน 017634
วัน, เดือน, ปี 8 มิ.ย. 61

Abstract

Diseases that affect the corneal epithelial stem cells, such as chemical burn, thermal burn, and Steven-Johnson syndrome can leads to condition called limbal stem cell deficiency(LSCD), characterized by conjunctival epithelial ingrowth, vascularization, and chronic inflammation, and eventually lead to vision loss. Transplantation of cultivated epithelial sheet made from limbal stem cells (LSCs) have been proved to be effective therapy. Nevertheless, currently available culturing methods were unable to maintain LSC stemness in vitro for more than 3 passages prevent its broader usages. Previously we successfully developed culturing system that allowed longer period of LSC expansion without clonal evolution. In this study, we aim optimize our method and to test the safety and efficacy of epithelial sheet made with our new methods in20 patients with LSCD

สารบัญ

เนื้อเรื่อง	หน้า
1 บทนำ	5-6
2 เนื้อเรื่อง	
วิธีการดำเนิน การวิจัย	6
วิธีการทดลอง	7-8
ผลการทดลอง	8-16
3 อภิปรายผลการทดลอง	16-17
4 สรุปผลการวิจัย	17
บรรณานุกรม	18
ประวัตินักวิจัยและคณะ	19-21

1 บทนำ

Stem cell หรือเซลล์ต้นกำเนิด เป็นเซลล์ที่มีลักษณะเฉพาะ คือมีความสามารถในการเพิ่มจำนวนได้อย่างไม่จำกัดทำให้สามารถสร้างเซลล์ขึ้นมาทดแทนเซลล์ที่เสียหายได้ตลอดเวลา สามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ที่จำพาะชนิดต่างๆ ได้ในสภาวะที่เหมาะสม ด้วยคุณสบัติดังกล่าว เซลล์ต้นกำเนิดจึงนับว่าเป็นความหวังใหม่ในการรักษาโรคที่เกิดจากการเสื่อมและสภาวะการบาดเจ็บต่างๆ โดยวิธีการสร้างเซลล์และเนื้อเยื่อทดแทน แต่พบว่าการนำเซลล์ต้นกำเนิดโดยเฉพาะ adult stem cell ยังมีข้อจำกัดในการนำมาใช้คือ การเพิ่มจำนวนอย่างจำกัดเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงภายนอกร่างกาย และการคงคุณสมบัติความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด ซึ่งว่ามานำ adult stem cell มาเพาะเลี้ยงภายนอกร่างกายในระยะยาวจะสูญเสียคุณสมบัติความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด

Limbal stem cell จัดเป็น adult stem cell ซึ่งจะเจริญไปเป็นกระจกตา สามารถสร้างเซลล์กระจกตาขึ้นมาใหม่เพื่อทดแทนเซลล์ที่เสียหายได้ ภาวะขาดแคลนเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์ผิวกระจกตาดำ (Limbal Stem Cell Deficiency-LSCD) เกิดในโรคบางชนิด หรืออุบัติเหตุที่เกิดขึ้นกับดวงตามีผลทำให้มีการทำลายของเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์ผิวกระจกตา ส่งผลทำให้เกิดการงอกของเยื่อบุตาขาว (conjunctival invasion) พร้อมเส้นเลือดลุกล้ำเข้าไปในกระจกตา (corneal vascularization) เราเรียกภาวะนี้ว่าผิวตาล้มเหลว (ocular surface failure) หรือโรคผิวกระจกตา (ocular surface diseases) ผลที่ตามมาจากสภาวะดังกล่าวทำให้กระจกตาขุ่นและผู้ป่วยสูญเสียการมองเห็นในที่สุด

จากการสำรวจขององค์การอนามัยโลกปี 2002 พบประชากรที่มีการมองเห็นลดลงที่ไม่ได้เกิดจากสายตาผิดปกติ 161 ล้านคน โดยพบภาวะกระจกตาขุ่นเป็นสาเหตุอันดับ3 (5.1%) ของทั้งหมด โรคของผิวดวงตา (ocular surface disease) ที่เกิดจากภาวะขาดแคลนเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์ผิวกระจกตาดำ นั้นเป็นสาเหตุหนึ่งของภาวะกระจกตาขุ่น ในประเทศไทยเองพบผู้ป่วยซึ่งมองไม่เห็นจากโรค LSCD เป็นจำนวนมาก ผู้ป่วยเหล่านี้มักมารับการตรวจรักษาที่โรงพยาบาลใหญ่ๆโดยเฉพาะโรงพยาบาลชั้นนำรวมทั้งโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์เนื่องจากเป็นโรคที่รักษายาก การรักษาเดิมคือการรักษาโดยประคับประคองและรักษาตามอาการโดยไม่สามารถทำให้ผู้ป่วยหายหรือมีการมองเห็นดีขึ้นได้ ส่วนการผ่าตัดเปลี่ยนกระจกตาใหม่นั้นจะช่วยให้ผู้ป่วยมองเห็นดีขึ้นแค่เพียงชั่วคราว เนื่องจากไม่ได้แก้ไขที่ต้นเหตุ ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีการผ่าตัดปลูกถ่ายสเต็มเซลล์มาทดแทนส่วนที่ขาด (limbal stem cell transplantation-LT) ให้กับผู้ป่วยเหล่านี้ โดยเทคนิคที่ใช้ยังเป็นการยกเอาเนื้อเยื่อทั้งชิ้นจากตาอีกข้างที่ยังดีอยู่ หรือการตัดเอาเนื้อเยื่อจากขอบกระจกตาจากตาผู้บริจาค อย่างไรก็ตามการผ่าตัดดังกล่าวยังมีปัญหา เนื่องจากเทคนิคการผ่าตัดยาก มีจักษุแพทย์ไม่กี่คนที่สามารถทำผ่าตัดได้ ตลอดจนผลการรักษาไม่ดีนักเนื่องจากผู้ป่วยต้องใช้ยากดภูมิคุ้มกันราคาแพง ต้องรับการตรวจติดตามอย่างสม่ำเสมอต่อเนื่อง

จากการค้นพบว่า Stem cells ที่มีแหล่งอยู่ในบริเวณ limbus ของกระจกตา (limbal stem cells) จะแบ่งตัวได้เป็นเซลล์ผิวกระจกตา จึงนำไปสู่แนวสู่แนวทางการรักษาผู้ที่เกิดภาวะ limbal stem cell deficiency (LSCD) จากสาเหตุต่างๆ โดยการผ่าตัดปลูกถ่าย limbus แบบ autologous โดยใช้ชิ้นเนื้อ limbus จากตาอีกข้างซึ่งยังดีอยู่ได้เริ่มมีรายงานครั้งแรกตั้งแต่ปี 1989 โดย Kenyon and Tseng [4] ต่อมา Tsai และ Tseng [5] ในปี 1994 ได้รายงานความสำเร็จในการปลูกถ่ายชิ้นเนื้อ limbus tissue แบบ allogeneic ในผู้ป่วยที่เป็นโรคทั้ง 2 ข้าง โดยได้ limbus จากส่วนของกระจกตาที่เหลือจากการปลูกถ่ายกระจกตาผู้บริจาค (cadaveric donor) หลังจากการรักษาวิธีนี้แสดงให้เห็นว่าได้ผลดีและเป็นที่ปฏิบัติกันโดยกว้างขวาง ในปี 2004 medicare ของประเทศสหรัฐอเมริกาจัดว่าเป็น standard medical procedure ข้อเสียอย่างหนึ่งของเทคนิคนี้คือชิ้นเนื้อที่ต้องตัดออกจากตาข้างที่ดีไปปลูกถ่ายให้กับข้างที่มีภาวะ LSCD มี

ขนาดใหญ่ ทำให้ตาข้างที่บริจาคอาจเกิดภาวะแทรกซ้อนหรือกลายเป็น LSCD ได้ ในปี 1997 Pelligrini และคณะ [6] แสดงให้เห็นว่าสามารถ biopsy limbus tissue ขนาดเล็กและนำมาเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองก่อนสร้างเป็นแผ่นเพื่อปลูกถ่ายในผู้ป่วยได้ผล จากความสำเร็จนี้ได้มีหลายกลุ่มนำมาพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยง LSC แตกต่างกันออกไป โดยนับถึงปี 2011 มีรายงานในลักษณะ case report และ case series ประมาณ 20 รายงาน [7-8] ในผู้ป่วย 583 ราย (โดยนับเฉพาะรายงานที่มีผู้ป่วยมากกว่า 10 ราย) พบว่าโดยรวม success rate ประมาณ 59- 80% overall 76% โดยแบบ autograft 77% และ allogeneic 73% ในปี 2010 กลุ่มของ Pellegrini [9] ได้รายงานแสดงให้เห็นว่า LSC ที่ปลูกถ่ายสามารถให้ผลดีนานกว่า 10 ปีหลังปลูกถ่าย และอัตราความสำเร็จขึ้นกับจำนวน stem cell ที่มีใน graft ที่ปลูกถ่ายให้ผู้ป่วย โดยในประเทศอิตาลีนับตั้งแต่ปี 2010 เป็นต้นมา การรักษาวิธีนี้ถือเป็นการรักษามาตรฐาน

การศึกษาล่าสุดในปี ค.ศ. 2011 ของ Sangwan และคณะ [10] ได้รวบรวมผู้ป่วยจำนวน 200 รายที่ทำผ่าตัดปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อของผู้ป่วยเอง ผลการศึกษาพบว่าสุขภาพของผิวกระจกตาดีขึ้นร้อยละ 71 ผู้ป่วยมองเห็นดีขึ้นโดยไม่ต้องเปลี่ยนกระจกตาร้อยละ 60 โดยมีระยะติดตามการรักษาเฉลี่ย 3 ปี และนานที่สุด 7.6 ปี ซึ่งใกล้เคียงกันกับผลการรักษาในรายงานของ Pauklin และคณะ [11] ทำในผู้ป่วย 38 ราย รวมทั้งผลการศึกษาขั้นต้นในผู้ป่วย 20 รายของคณะผู้วิจัยด้วยเช่นกัน

ในประเทศไทยนั้น คณะผู้วิจัยสามารถเพาะเลี้ยงเซลล์ได้เจริญเต็มแผ่นบนเยื่อหุ้มรกเพื่อนำไปปลูกถ่ายให้กับผู้ป่วยโดยได้ผลเป็นที่น่าพอใจ อย่างไรก็ตามคณะผู้วิจัยพบว่าการนำเซลล์ต้นกำเนิดโดยเฉพาะเซลล์ต้นกำเนิดผู้ใหญ่มาเพาะยังมีข้อจำกัดคือ การเพิ่มจำนวนเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงภายนอกร่างกาย และการคงคุณสมบัติความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด ดังนั้นการปรับสิ่งแวดล้อมจุลภาค (microenvironment) ที่เหมาะสมจึงมีความสำคัญ รายงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าการนำ 3t3 feeder ร่วมทั้งปรับการใช้สารโมเลกุลเล็ก (small molecule) เพื่อนำมาใช้เพาะเลี้ยงร่วมกันทำให้เซลล์คงคุณสมบัติการเป็นเซลล์ต้นกำเนิด และเพิ่มการแบ่งตัวได้มากขึ้น (serial passage) ซึ่งคณะผู้วิจัยได้ปรับเปลี่ยนวิธีการเพาะเลี้ยงแบบดังกล่าวผลสำเร็จเป็นอย่างดี

ด้วยเหตุผลดังกล่าวคณะผู้วิจัยมีความต้องการที่จะนำเทคโนโลยีนี้มาผ่าตัดปลูกถ่ายให้กับผู้ป่วยโรค LSCD ซึ่งนับว่าเป็นการพัฒนาการก้าวสำคัญและต่อยอดจากงานที่ได้ทำ นอกจากนี้จะเป็นก้าวสำคัญในด้านเทคโนโลยีการรักษาด้วยเซลล์ต้นกำเนิดในประเทศไทย

2 เนื้อเรื่อง

วิธีการดำเนิน การวิจัย

การวิจัยเป็นการวิจัยประยุกต์ (Applied research) โดยมีรูปแบบเป็น experimental และ Intervention case series โดยมีวัตถุประสงค์ของโครงการคือ

1. เพื่อศึกษาคุณสมบัติระดับโมเลกุลและผลกระทบของสภาพแวดล้อมจุลภาค (stem cell niche) ต่อคุณสมบัติของสเต็มเซลล์
2. เพื่อพัฒนาความสามารถในการเพาะเลี้ยงและขยายปริมาณเซลล์อย่างต่อเนื่อง (multiple passages) จากเนื้อเยื่อที่มีจำกัด สำหรับใช้เป็นแหล่งจำหน่ายเซลล์ในอนาคต
3. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพและความปลอดภัยของการรักษาผู้ป่วยโรคผิวกระจกตาชนิดที่มีภาวะพร่องเนื้อเยื่อลิมบัสด้วยการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดผิวกระจกตา โดยใช้เนื้อเยื่อของผู้ป่วยเอง (autologous tissue) หรือเนื้อเยื่อของผู้บริจาค (allogenic tissue) ซึ่งเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิคใหม่

วิธีการทดลอง

เตรียม Feeder cell

1. เลี้ยง 3t3 จนโตเต็ม T75 หยุดการเจริญเติบโต โดยการใส่ Mitomysin C ความเข้มข้น 10 μg/ml นำบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
2. ครบเวลาย่อยด้วยเอ็นไซม์ 0.25% Trypsin/EDTA เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิ 37°C เมื่อครบเวลาหยุดปฏิกิริยาการทำงานของเอ็นไซม์ ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์
3. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ประมาณ 1 ml
4. นับจำนวนเซลล์ให้ได้จำนวน $1x10^6$ cell ในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 60 mm เขย่าให้เซลล์กระจายให้ทั่ว นำเซลล์ไปเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกาะก่อนนำมาใช้เป็นเซลล์พี่เลี้ยง

แยก Limbal stem cell จาก Limbal ring สำหรับเตรียมเซลล์ปฐมภูมิ (primary cell)

1. นำ limbal ring มาล้างด้วย PBS 2 รอบ จากนั้นนำไปย่อยด้วยเอ็นไซม์ Dispase II ความเข้มข้น 1.2 unit ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง
2. ดูดทิ้งและย่อยต่อด้วยเอ็นไซม์ 0.05% trypsin/EDTA เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 37oC เมื่อครบเวลาดูดพ่นให้ได้เซลล์เดี่ยว หยุดปฏิกิริยาด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์เซลล์ต้นกำเนิดกระจกตา
3. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1200 rpm เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งละลายตะกอนด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ 1 ml
4. นำเซลล์ทั้งหมดเพาะเลี้ยงในจานเพาะเซลล์ที่มีเซลล์พี่เลี้ยงที่เตรียมไว้แล้ว นำไปเลี้ยงที่สภาวะอุณหภูมิ 37°C คาร์บอนไดออกไซม์ 5% ทำการพาะเลี้ยงต่อระยะเวลาประมาณ 10-14 วัน จะได้เซลล์ปฐมภูมิ

การศึกษาเปรียบเทียบผลของ small molecule ที่มีต่อลักษณะ limbal stem cell ที่เจริญบน 3t3 feeder ที่ใส่ small molecule ชนิดต่างๆ

1. Small molecule ที่นำศึกษาได้แก่ A ความเข้มค้น 10 uM, B ความเข้มข้น 0.5 uM และ C ความเข้มข้น 10 uM
2. นำ primary cell ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก ล้างด้วย 1x PBS ดูด PBS ออกแล้วเติม versene 1 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37oC เป็นเวลา 1 นาที นั้นดูด versene ออก เติม PBS 2 ml ใช้ไปเปตดูดพ่นเซลล์พี่เลี้ยงออกให้หมด เหลือกลุ่มเซลล์กระจกตา (holoclone) ซึ่งจะยังไม่หลุดในขั้นตอนนี้
3. จากนั้นจึงย่อยต่อด้วย 0.25% trypsin/EDTA เป็นเวลา 2-3 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์
4. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1200 rpm เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ 1 ml นับจำนวนเซลล์ และนำเซลล์จำนวน $2x10^4$ - $5x10^4$เซลล์ สำหรับทำ Serial passage และ 3000 เซลล์ สำหรับทำ colony-forming efficiency

การเพาะเลี้ยงและการเพิ่มจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดกระจกตาจากชิ้นเนื้อที่มีขนาด 2 x 2 มม.

1. นำ limbal ring มาล้างด้วย PBS 2 รอบ จากนั้นนำไปย่อยด้วยเอ็นไซม์ Dispase II ความเข้มข้น 1.2 unit ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

2. ดูดทิ้งและย่อยต่อด้วยเอ็นไซม์ 0.05% trypsin/EDTA เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 37oC เมื่อครบเวลาดูดพ่นให้ได้เซลล์เดี่ยว หยุดปฏิกิริยาด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์เซลล์ต้นกำเนิดกระจกตา
3. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1200 rpm เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งละลายตะกอนด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ 1 ml
4. นำเซลล์ทั้งหมดเพาะเลี้ยงในจานเพาะเซลล์ที่มีเซลล์พี่เลี้ยงที่เตรียมไว้แล้ว นำไปเลี้ยงที่สภาวะอุณหภูมิ 37 °C คาร์บอนไดออกไซม์ 5% ทำการพาะเลี้ยงต่อระยะเวลาประมาณ 10-14 วัน จะได้เซลล์ปฐมภูมิ
5. ย่อยเซลล์ปฐมภูมิเลี้ยงในภาชนะ (cell insert) โดยมีเซลล์พี่เลี้ยงอยู่ดานล่าง แสดงดังภาพที่10 เลี้ยงประมาณ 7 วัน แสดงดังภาพที่ 10

ผลการทดลอง

1.ศึกษาเปรียบเทียบผลของ small molecule ที่มีต่อลักษณะ limbal stem cell ที่เจริญบน 3t3 feeder ที่ใส่ small molecule ชนิดต่างๆ

Limbal stem cell จัดเป็น adult stem cell ซึ่งจะเจริญไปเป็นกระจกตา สามารถสร้างเซลล์กระจกตาขึ้นมาใหม่เพื่อทดแทนเซลล์ที่เสียหายได้ ภาวะขาดแคลนเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์ผิวกระจกตาดำ (Limbal Stem Cell Deficiency-LSCD) เกิดในโรคบางชนิด หรืออุบัติเหตุที่เกิดขึ้นกับดวงตามีผลทำให้มีการทำลายของเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์ผิวกระจกตา ส่งผลทำให้เกิดการงอกของเยื่อบุตาขาว (Conjunctival invasion) พร้อมเส้นเลือดลุกล้ำเข้าไปในกระจกตา (Corneal vascularization) เราเรียกภาวะนี้ว่าผิวตาล้มเหลว (Ocular surface failure) หรือโรคผิวกระจกตา (Ocular surface diseases) ผลที่ตามมาจากสภาวะดังกล่าวทำให้กระจกตาขุ่นและผู้ป่วยสูญเสียการมองเห็นในที่สุด สำหรับการรักษาจำเป็นต้องฟื้นฟูน limbal stem cell ที่เสียหายก่อน โดยการปลูกถ่าย limbal stem cell

การนำ limbal stem cell มาเพาะเลี้ยงภายนอกร่างกายนั้นจำเป็นจะต้องมี microenvironment ที่เหมาะสมสำหรับการคงคุณสมบัติการเป็น stem cell และยังสามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างไม่จำกัดภายนอกร่างกาย จึงทำการศึกษาเพื่อหา microenvironment ที่เหมาะสม ซึ่งมีรายงานวิจัยที่ผ่านมามีการนำ 3t3 feeder ซึ่งใช้เป็นเซลล์พี่เลี้ยงที่ดีในการเพาะเลี้ยง limbal stem cell แต่ยังมีข้อจำกัดคือสามารถทำ Serial passage ได้ไม่เกิน 3 passage เท่านั้น ดังนั้นทางกลุ่มวิจัยนี้จึงมุ่งหาระบบการเพาะเลี้ยง limbal stem cell แบบใหม่เพื่อคงคุณสมบัติการเป็น stem cell และสามารถเพิ่มการทำ Serial passage ในการเพาะเลี้ยง limbal stem cell ภายนอกร่างกายได้ โดยทางกลุ่มวิจัยสนใจนำ small molecule 3 มาใช้ร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยงเพื่อเพาะเลี้ยง limbal stem cell โดยศึกษาทั้งหมด 3 ชนิด คือ small molecule A, small molecule B และ small molecule Cโดยพบว่าลักษณะ limbal stem cell ที่เลี้ยงบน 3t3 ที่ใส่ small molecule แต่ละชนิด ให้ผลแตกต่างกันทั้งลักษณะของเซลล์ ของขนาดของ colony และความสามารถในการ Serial passage โดยพบว่า limbal stem cell ที่เพาะเลี้ยงบน 3t3 ร่วมกับ small molecule B ลักษณะเซลล์จะเป็นเซลล์ epithelium ที่มีลักษณะเล็กกว่า ขอบของ colony มีลักษณะหนากว่า เมื่อเทียบกับเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบน 3t3 ร่วมกับ small molecule Aและ 3t3 ร่วมกับ small molecule C แสดงดังรูปที่ 1

A B C

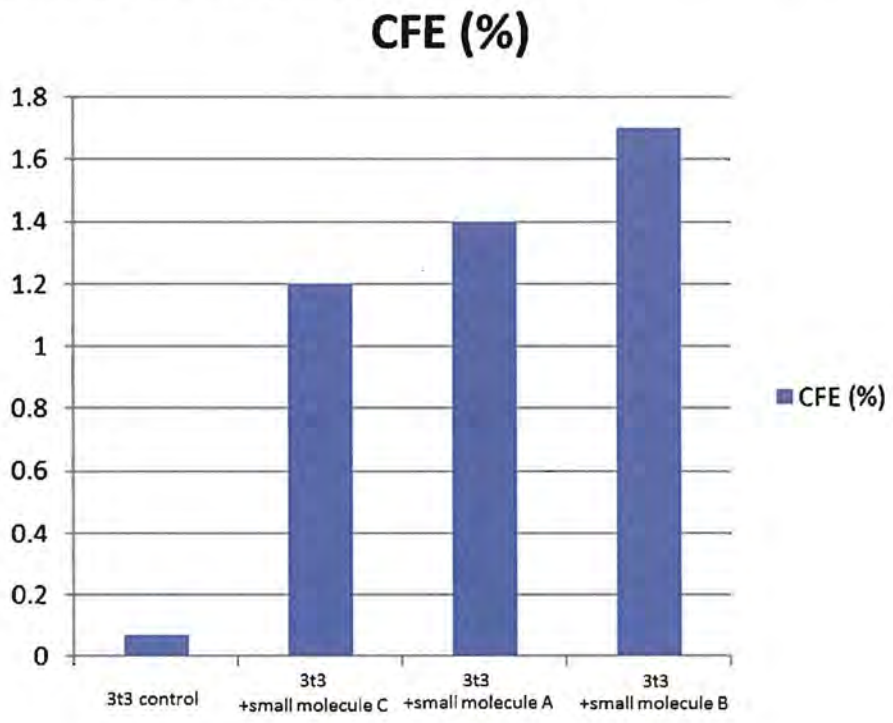
รูปที่1 แสดงลักษณะโคโลนีที่เจริญบน 3t3 feeder ที่ใส่ small molecule ชนิดต่างๆ

A: 3t3+small molecule A

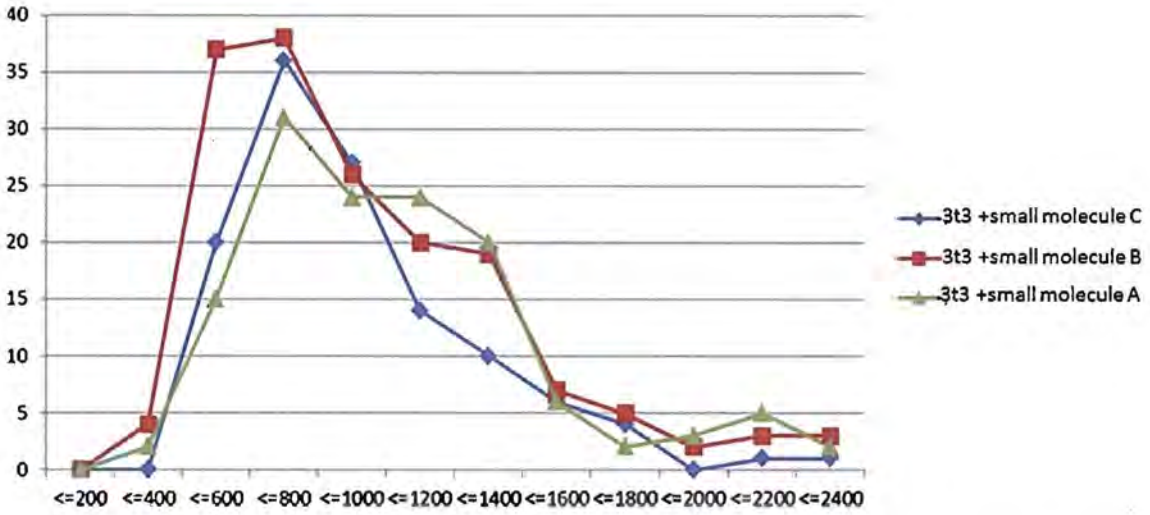
B: 3t3+small molecule B

C: 3t3+small molecule C

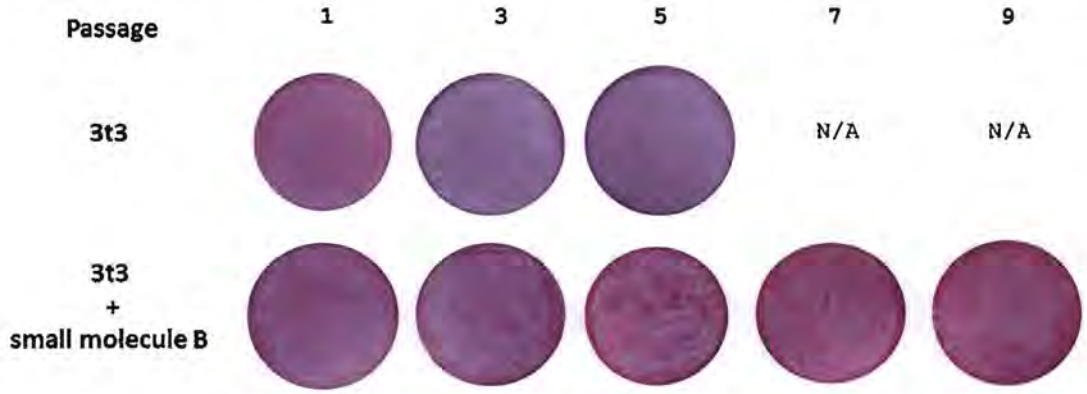
ผลของ colony-forming efficiency โดยผลการทดลองพบว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบน 3t3 control, 3t3+ small molecule C, 3t3 +small molecule A และ 3t3+small molecule B คือ 0.3%, 1.23%, 1.4% และ 1.78% ตามลำดับ จากผลการทดลองพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยง limbal stem cell ด้วยระบบเพาะเลี้ยง 3t3 +small molecule B ช่วยเพิ่มจำนวน colony-forming efficiency สูงสุด แสดงดังรูปที่2 และเมื่อทำการวัดขนาด colony พบว่า limbal stem cell ที่เพาะเลี้ยงด้วย 3t3+small molecule B จะมี colony ขนาดใหญ่จำนวนมากกว่า แสดงดังรูปที่3 และผลของการทำ Serial passage พบว่าระบบเพาะเลี้ยง 3t3+ small molecule สามารถ Serial passage ได้มากถึง 9 passage ในขณะที่การเลี้ยงบน 3t3 อย่างเดียวสามารถ serial passage ได้เพียง 3 passage เท่านั้น



รูปที่2 กราฟแสดงจำนวนเปอร์เซ็นต์ colony-forming efficiency ของ limbal stem cell ที่เพาะเลี้ยงบน 3t3 ร่วมกับ small molecule ชนิดต่าง ๆ



รูปที่3 แสดงจำนวน colony และขนาดของ colony ของ limbal stem cell ที่เพาะเลี้ยงบน 3t3 ร่วมกับ small molecule ชนิดต่างๆ



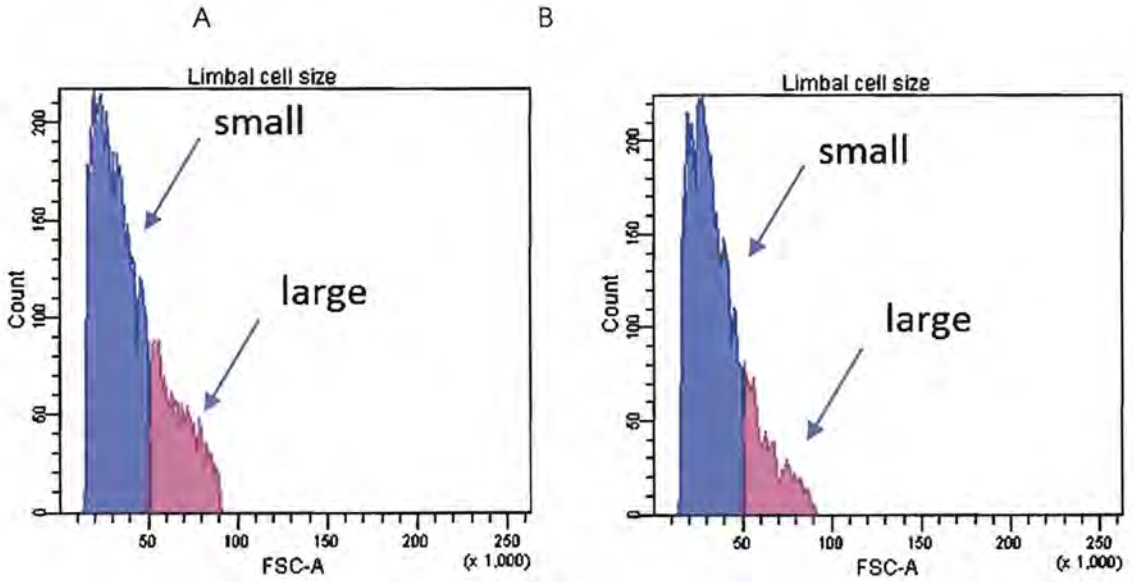
รูปที่4 แสดงผล Serial passageของ limbal stem cell ที่เพาะเลี้ยงบน 3t3 ร่วมกับ small molecule B

2.ศึกษาผลของ small molecule B ที่มีผลต่อลักษณะของ epithelium cell ภายใน limbal stem cell colony

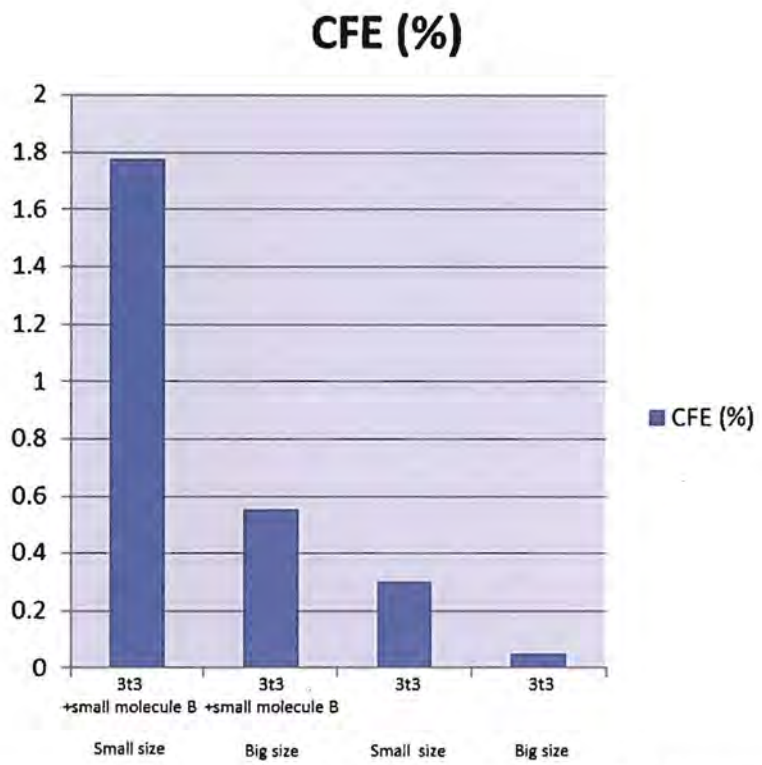
จากผลการทดลองเปรียบเทียบ small molecule ชนิดต่างๆ พบว่า small molecule B ให้ผลเป็นที่น่าพอใจ ทางกลุ่มผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาผลการเพราะเลี้ยง limbal stem cell ด้วยระบบ 3t3+ small molecule B โดยศึกษาผลที่ต่อขนาดของเซลล์ และความสามารถคงคุณสมบัติการเป็นเซลล์ต้นกำเนิด

ผลการทดลองแยกขนาดของเซลล์โดยอาศัย flow cytometry สามารถแยกขนาดของเซลล์ได้โดยแยกเป็นกลุ่มเซลล์ที่มีขนาดเล็ก และกลุ่มเซลล์ที่ขนาดมีใหญ่จากระบบการเพาะเลี้ยงด้วย 3t3 และ 3t3+ small molecule Bออกจากกันอย่างชัดเจน และพบว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงด้วยระบบ 3t3+ small molecule B ส่วนใหญ่จะมีขนาดเล็ก แสดงดังรูปที่5 ซึ่งจากการนำเซลล์ที่แยกได้นั้นไปศึกษาผลของ colony-forming

efficiency พบว่าเซลล์ที่ทำการเพาะเลี้ยงด้วยระบบ 3t3+small molecule B กลุ่มเซลล์ขนาดเล็ก ให้เปอร์เซ็น colony-forming efficiency สูงสุด รองลงมาคือ กลุ่มเซลล์ขนาดใหญ่ที่เพาะเลี้ยงด้วย 3t3+ small molecule B กลุ่มเซลล์ขนาดเล็ก ที่เพาะเลี้ยงด้วย 3t3 และกลุ่มเซลล์ขนาดใหญ่ที่เพาะเลี้ยงด้วย 3t3 ตามลำดับ แสดงดังรูปที่6



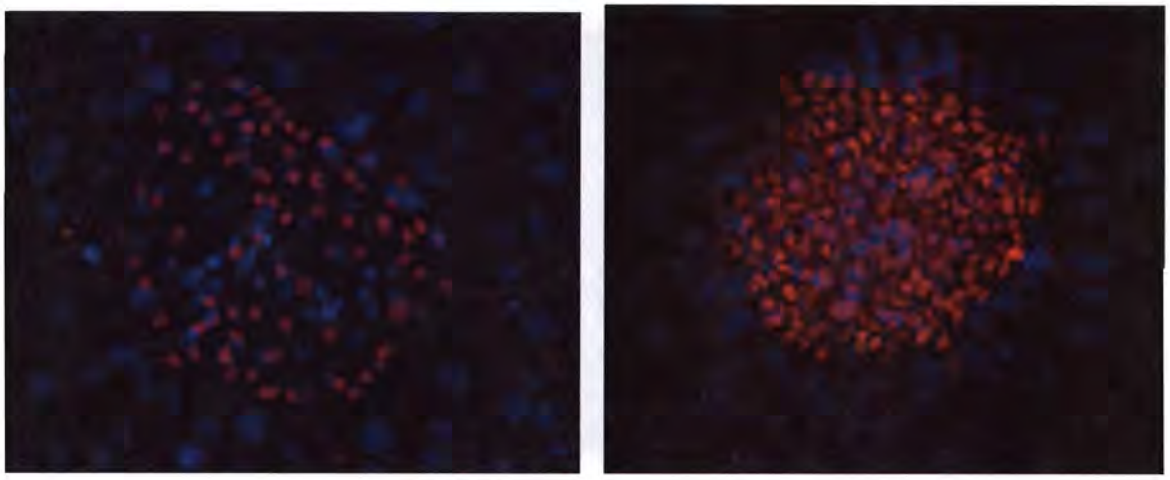
รูปที่5 แสดงผลการแยกขนาดเซลล์โดย flow cytometry โดยระบบเพาะเลี้ยงต่างๆ
A: ระบบเพาะเลี้ยงด้วย 3t3
B: ระบบเพาะเลี้ยงด้วย 3t3+small molecule B



รูปที่6 แสดงผล colony-forming efficiency จากเซลล์ที่ผ่านการแยกขนาดโดย flow cytometry ที่ทำการเพาะเลี้ยงด้วยระบบ 3t3 และ 3t3+small molecule B

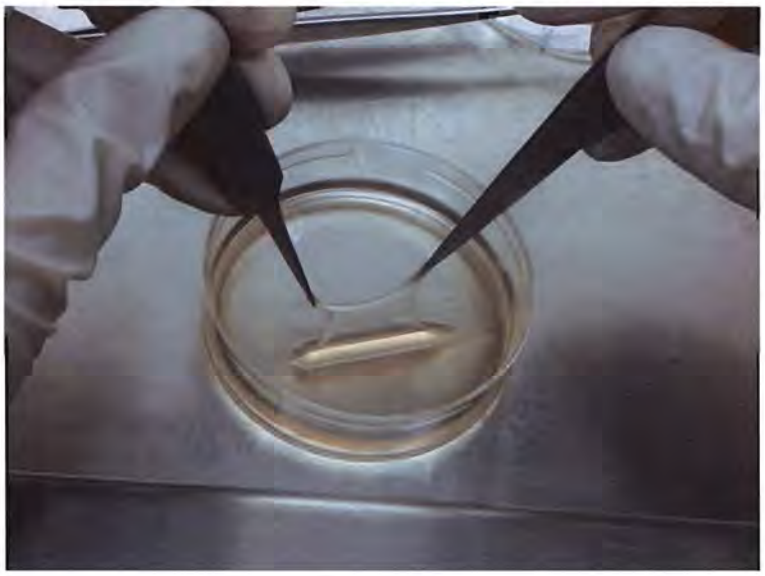
จากการทดลองพบว่า limbal stem cell ที่เพาะเลี้ยงด้วย 3t3+small molecule B เซลล์ส่วนใหญ่จะมีขนาดเล็ก เมื่อเทียบกับระบบเพาะเลี้ยงด้วย 3t3 และพบว่ากลุ่มเซลล์ที่มีขนาดเล็กเหล่านี้ยังมีความสามารถในการเจริญเป็น colony ได้ดีที่สุด และเมื่อนำมาย้อมด้วย P63 ซึ่งเป็น marker ของ stem cell พบว่า ระบบที่เพราะด้วย3t3+small molecule B สามารถย้อมติด P63 แสดงดังรูปที่7 จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าระบบการเพาะเลี้ยงด้วย 3t3+small molecule B นั้นช่วยให้ limbal stem cell คงคุณสมบัติการเป็น stem cell เมื่อทำการเพาะเลี้ยงภายนอกร่างกาย และสามารถเพาะเลี้ยงได้เป็นระยะเวลานาน

A B



รูปที่ 7 ผลการย้อม stem cell marke,A:3t3,B:3t3+small molecule B

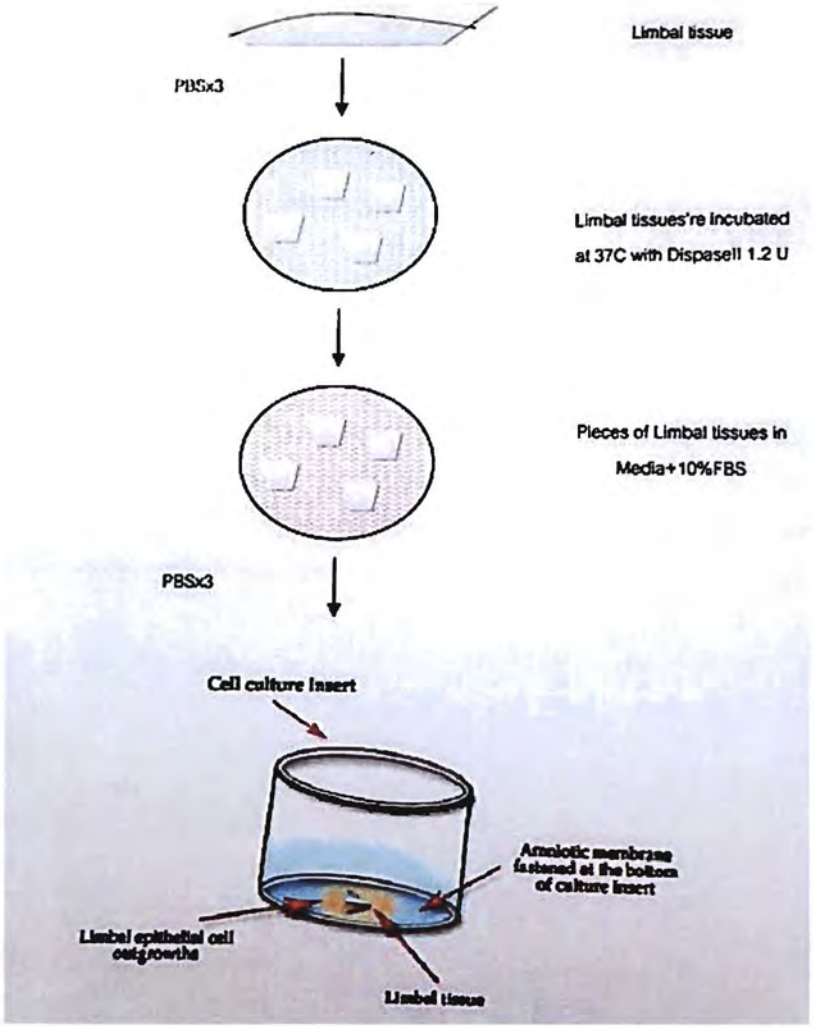
จากการศึกษาพบว่าการเพาะเลี้ยงด้วยระบบดังกล่าวสามารถทำให้ limbal stem cell เจริญจนเต็มภาชนะจนสามารถเป็นแผ่นและขึ้นชั้นได้จำนวนหลายชั้นและสามารถทำการลอกเป็นแผ่นได้



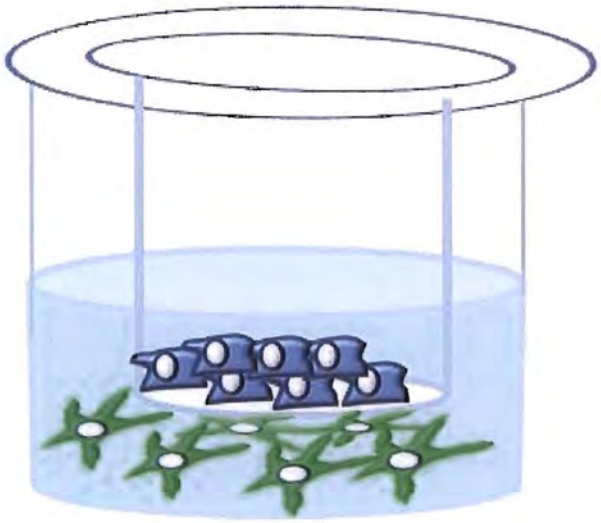
รูปที่8 แสดงแผ่น limbal stem cell ที่ทำการเพาะเลี้ยงด้วยระบบ 3t3+small molecule B

3. วิธีการเพาะเลี้ยงและการเพิ่มจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดกระจกตาจากชิ้นเนื้อที่มีขนาด 2 x 2 มม.

ชิ้นเนื้อขนาด 2x2 มม. จะเป็นขนาดที่ผ่าตัดจากคนไข้ (Autologous tissue) โดยวิธีดั้งเดิมนั้นจะนำขึ้นนื้อบนรก แต่จากการศึกษพบว่ามีการเจริญของเซลล์ fibroblast ปนอยู่ด้วย ดังนั้นเพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว ผู้วิจัยจึงได้ทดลองทำการแยกเซลล์ต้นกำเนิดกระจกตาจากชิ้นเนื้อที่มีขนาด 2x2 มม. ออกมาเป็นเซลล์เดี่ยวๆ จากนั้นนำไปเลี้ยงบนเซลล์พี่เลี้ยงร่วมกับ small molecule B เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดกระจกตา โดยเซลล์ต้นกำเนิดกระจกตาจะเจริญเป็นโคโลนีบนเซลล์พี่เลี้ยง เป็นเวลาประมาณ 10-14 วัน จากนั้นทำการย่อยเซลล์ที่เจริญเป็นโคโลนีเลี้ยงบนภาชนะ (cell insert) โดยที่จะมีเซลล์พี่เลี้ยงอยู่ด้านล่าง เปรียบเทียบกับวิธีดั้งเดิมแสดงดังภาพที่9

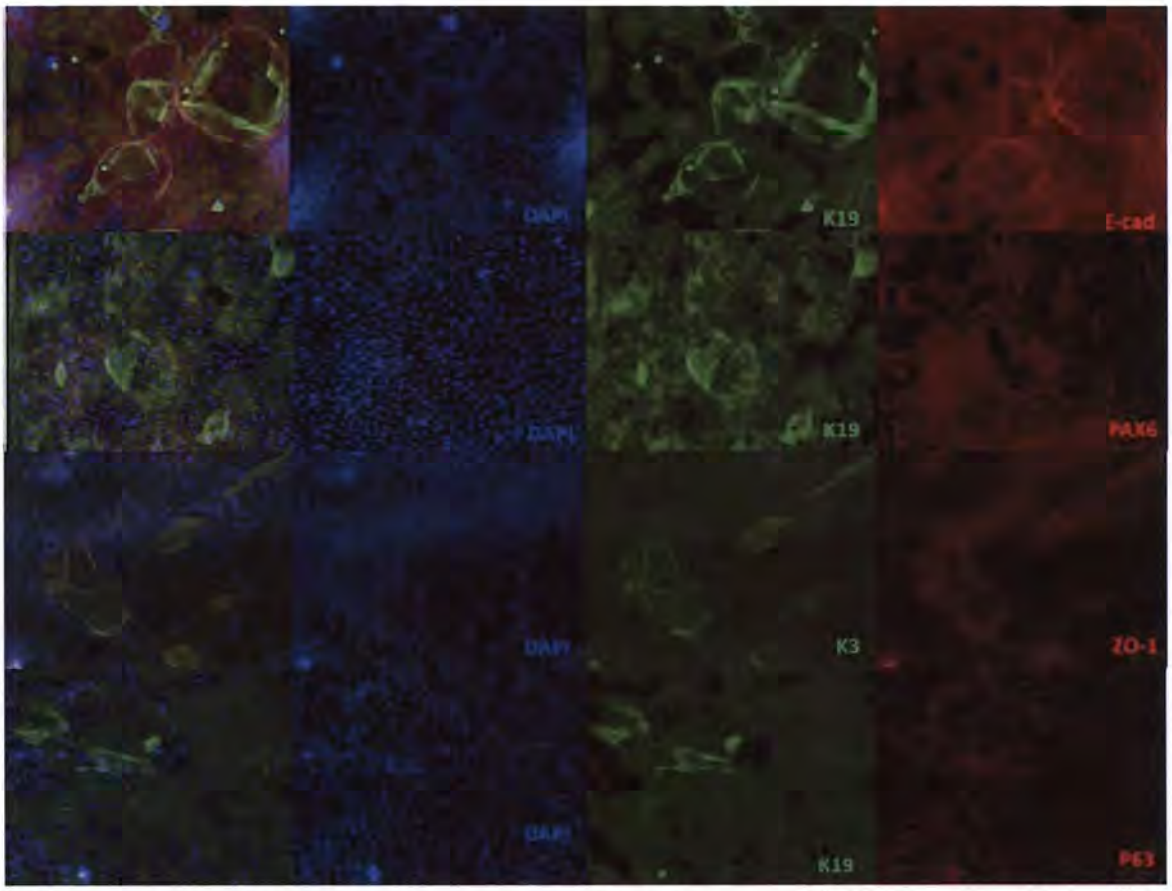


รูปที่9 แสดงการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดกระจกตาวิธีดั้งเดิมโดยเพาะเลี้ยงบนรก



รูปที่10 แสดงวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดวิธีใหม่

จากการศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดกระจกตาด้วยวิธีการใหม่ เปรียบเทียบกับวิธีการเดิม จากชิ้นเนื้อขนาด 2x2 ม. จำนวนตัวอย่าง 5 ตัวอย่าง พบว่าการเพาะเลี้ยงด้วยวิธีดั้งเดิมโดยการนำชิ้นเนื้อที่ผ่านการย่อยมาวางบนรกนั้นมีเพียง 1 ตัวอย่างเท่านั้นที่เซลล์ต้นกำเนิดกระจกตาเจริญเต็มภาชนะโดยไม่มีเซลล์ fibroblast ปน สำหรับวิธีเพาะเลี้ยงแบบใหม่พบว่าสามารถแยกเซลล์ต้นกำเนิดกระจกตาออกมาเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนเจริญจนได้เซลล์ปฐมภูมิสำเร็จจำนวน 4 ตัวอย่าง และเมื่อนำเซลล์ปฐมภูมิที่ได้ทำการย่อยและนำไปเลี้ยงบนภาชนะ (cell insert) ที่มีเซลล์พี่เลี้ยงเจริญอยู่ด้านล่าง โดยพบว่าเซลล์สามารถเจริญเป็นแผ่น โดยจากการตรวจสอบการแสดงออก stem cell marker เช่น P63α, K19 พบว่าในเซลล์ที่เจริญเป็นแผ่นยังพบการแสดงอออกของ stem cell marker แสดงให้เป็นว่าการเพาะเลี้ยงด้วยวิธีใหม่นี้สามารถคงคุณสมบัติ เป็นเซลล์ต้นกำเนิดได้ ดังรูปที่ 11

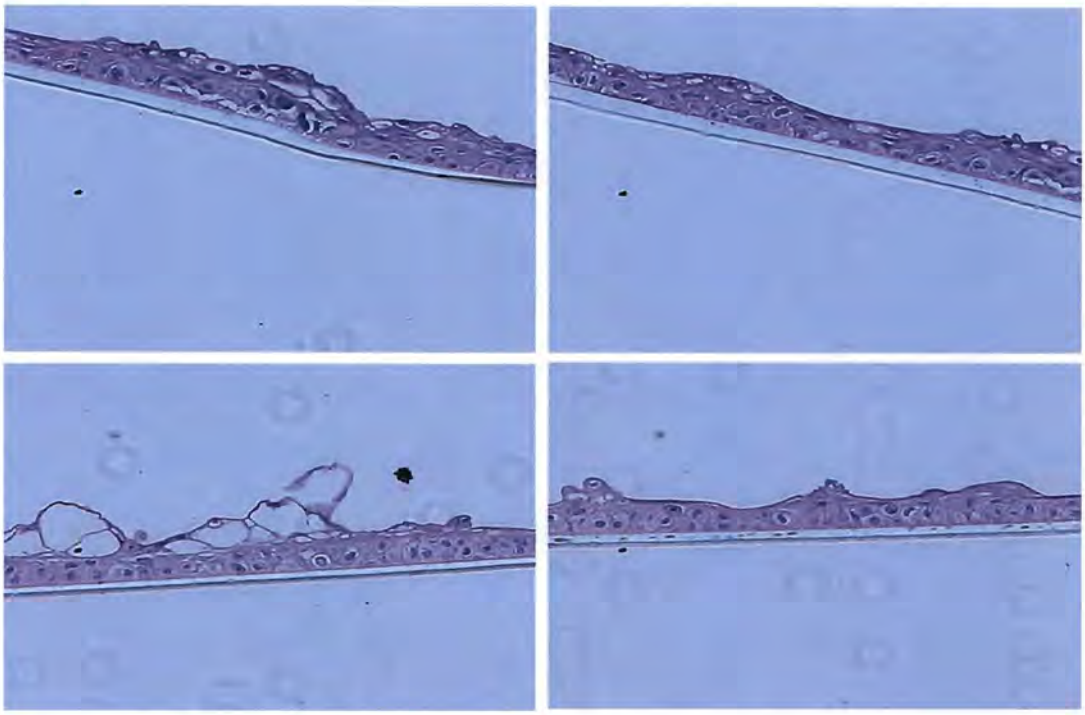


รูปที่11 แสดงผลการย้อมติด stem cell marker เซลล์ต้นกำเนิดกระจกตาที่เจริญเป็นแผ่นด้วยวิธีเพาะเลี้ยงแบบใหม่

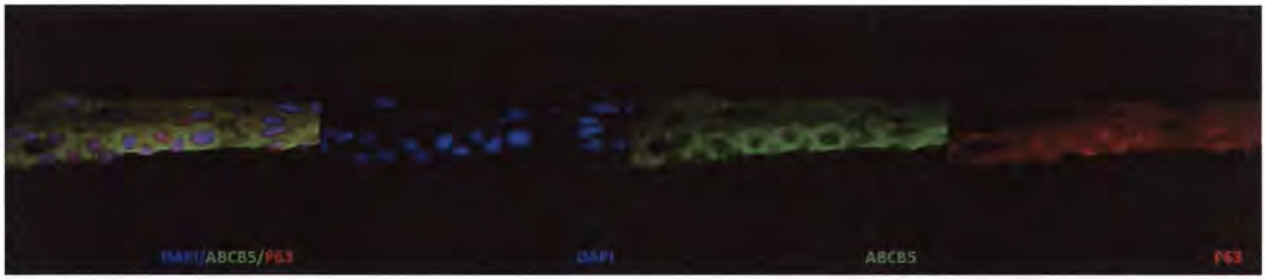
จากการศึกษายังพบว่าวิธีการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดกระจกตาด้วยวิธีใหม่นี้สามารถที่จะเพิ่มจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดกระจกตาได้แล้ว ยังสามารถทำให้เซลล์เจริญขึ้นชั้นได้ไม่น้อยกว่า 3 ชั้น จากเซลล์ปฐมภูมิจำนวน 4 ตัวอย่าง สามารถเจริญขึ้นชั้นได้ทั้งหมด 4 ตัวอย่าง แสดงดังรูปที่12 และเมื่อนำเซลล์ที่ขึ้นชั้นดังกล่าวมาย้อม

i27832843

stem cell marker คือ P63 และ ABCB5 พบว่าบริเวณชั้นล่างยังคงติด P63 และ ABCB5 แสดงให้เห็นว่าเซลล์ดังกล่าวยังคงคุณสมบัติเซลล์ต้นกำเนิด แสดงดังรูปที่13



รูปที่12 แสดงการเจริญเป็นแผ่นขึ้นชั้นของ limbal stem cell จากชิ้นเนื้อที่ biopsy จำนวน 4 อย่าง



รูปที่13 แสดงผลการย้อมติด stem cell marker เซลล์ต้นกำเนิดกระจกตาที่เจริญขึ้นชั้นด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงแบบใหม่

3 อภิปรายผลการทดลอง

Limbal stem cell จัดเป็น adult stem cell ซึ่งจะเจริญไปเป็นกระจกตา สามารถสร้างเซลล์กระจกตาขึ้นมาใหม่เพื่อทดแทนเซลล์ที่เสียหายได้ ภาวะขาดแคลนเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์ผิวกระจกตาดำ (Limbal Stem Cell Deficiency-LSCD) เกิดในโรคบางชนิด หรืออุบัติเหตุที่เกิดขึ้นกับดวงตามีผลทำให้มีการทำลายของเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์ผิวกระจกตา ส่งผลทำให้เกิดการงอกของเยื่อบุตาขาว (Conjunctival invasion) พร้อมเส้นเลือดลุกล้ำเข้าไปในกระจกตา (Corneal vascularization) เราเรียกภาวะนี้ว่าผิวตาล้มเหลว (Ocular surface failure) หรือโรคผิวกระจกตา (Ocular surface diseases) ผลที่ตามมาจาก

สภาวะดังกล่าวทำให้กระจกตาขุ่นและผู้ป่วยสูญเสียการมองเห็นในที่สุด สำหรับการรักษาจำเป็นต้องฟื้นฟูน limbal stem cell ที่เสียหายก่อน โดยการปลูกถ่าย limbal stem cell

การนำ limbal stem cell มาเพาะเลี้ยงภายนอกร่างกายนั้นจำเป็นจะต้องมี microenvironment ที่เหมาะสมสำหรับการคงคุณสมบัติการเป็น stem cell และยังสามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างไม่จำกัดภายนอกร่างกาย จึงทำการศึกษาเพื่อหา microenvironment ที่เหมาะสม ซึ่งมีรายงานวิจัยที่ผ่านมามีการนำ 3t3 feeder ซึ่งใช้เป็นเซลล์พี่เลี้ยงที่ดีในการเพาะเลี้ยง limbal stem cell แต่ยังมีข้อจำกัดคือสามารถทำ Serial passage ได้ไม่เกิน 3 passage เท่านั้น ดังนั้นทางกลุ่มวิจัยนี้จึงมุ่งหาระบบการเพาะเลี้ยง limbal stem cell แบบใหม่เพื่อคงคุณสมบัติการเป็น stem cell และสามารถเพิ่มการทำ Serial passage ในการเพาะเลี้ยง limbal stem cell ภายนอกร่างกายได้

งานวิจัยนี้คณะผู้วิจัยมุ่งหาวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดกระจกตาให้มีประสิทธิภาพและประสบความสำเร็จในทุกๆครั้งที่ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดกระจกตาจากผู้ป่วย ทั้งนี้เพื่อแก้ไขปัญหาเซลล์ fibroblast ที่เจริญปนมาในขณะทำการเพาะเลี้ยงทำให้เซลล์ที่ได้เมื่อนำไปปลูกถ่ายให้ผู้ป่วยไม่ได้ผลดี ในการนี้คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาหา small molecule หลายๆเพื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดกระจกตาร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยง 3t3 จนทำให้พบ small molecule ที่ทำให้สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดกระจกได้อย่างจำนวนมาก และยังเซลล์คงคุณสมบัติเซลล์ต้นกำเนิดในระยะยาวในหลอดทดลองไว้ได้ จากการพบ small molecule นี้จึงนำไปสู่การเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดกระจกตาแบบใหม่ โดยการแยกเซลล์ต้นกำเนิดกระจาตาจากชิ้นเนื้อขนาด 2X2 ม. เพิ่มจำวนวนได้เป็นเซลล์ปฐมภูมิโดยเลี้ยงบนเซลล์พี่เลี้ยงร่วมกับ small molecule จากนั้นจึงนำเซลล์ปฐมภูมิมาเลี้ยงจนเจริญแผ่นและสามารถขึ้นแผ่นด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดกระจกตาระบบใหม่ได้สำเร็จ

4 สรุปผลการวิจัย

จากการทดลองคณะผู้วิจัยสามารถเพาะเลี้ยงและเพิ่มจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดกระจกตาได้อย่างไม่จำกัดในหลอดทดลอง โดยการเพาะเลี้ยงบนเซลล์พี่เลี้ยงร่วมกับ small molecule B และวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดกระจกตาระบบใหม่ยังสามารถทำให้เซลล์ต้นกำเนิดกระจกตาที่แยกได้จากชิ้นเนื้อขนาดเล็ก (2X2 ม.) เจริญเป็นแผ่นและขึ้นชั้นได้จำนวน 4 ตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบกับวิธีเพาะเลี้ยงแบบดั้งเดิมซึ่งสามารถเพาะเลี้ยงสำเร็จเพียง 1 ตัวอย่างเท่านั้น จากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 5 ตัวอย่าง

บรรณานุกรม

1) รายงานผลการสำรวจสภาวะตาบอด และสายตาเลือนราง โรคตาที่เป็นปัญหาสาธารณสุข ครั้งที่ 4 พ.ศ. 2549 -2550
2) Tseng SC. Regulation and application of limbal stem cells. Eye 1989;3:141-57.
3) Puagnsricharern V, Tseng SC. Cytologic evidence of corneal diseases with limbal stem cell deficiency. Ophthalmology 1995;102:1476-1485.
4) Kenyon KR, Tseng SC. Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. Ophthalmology 1989;96:709-722.
5) Tsai RJ, Tseng SC. Human allograft limbal transplantation for corneal surface reconstruction. Cornea 1994;13:389-400.
6) Pellegrini G, Traverso CE, Franzi AT, et al. Long-term restoration of damaged corneal surface with autologous cultivated corneal epithelium. Lancet 1997;349:990-993.
7) Cauchi PA, Ang GS, Azuara-Blanco A, Burr JM. A systematic literature review of surgical interventions for limbal stem cell deficiency in humans. Am J Ophthalmol. 2008;146:251-259.
8) Shortt AJ, Secker GA, Notara MD, Limb GA, Khaw PT, Tuft SJ, et al. Transplantation of ex vivo cultured limbal epithelial stem cells: a review of techniques and clinical results. Surv Ophthalmol. 2007;52(5):483-502.
9) Rama P, Matuska S, Paanoni G, et al. Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration. N Engl J Med 2010 Jul8;363(2):147-155.
10) Sangwan VS, Basu S, Vemuganti GK, Sejpal K, Subramaniam SV, Bandyopadhyay S, et al. Clinical outcomes of xeno-free autologous cultivated limbal epithelial transplantation: a 10-year study. Br J Ophthalmol. 2011 Sep 2. [Epub ahead of print]
11) Pauklin M, Fuchsluger TA, Westekemper H, Steuhl KP, Meller D. Midterm results of cultivated autologous and allogeneic limbal epithelial transplantation in limbal stem cell deficiency. Dev Ophthalmol. 2010;45:57-70.

ประวัตินักวิจัยและคณะ

ประวัติผู้วิจัย ผศ. พญ. วิลาวัณย์ พวงศรีเจริญ

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางวิลาวัณย์ พวงศรีเจริญ
   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mrs. Vilavun Puangsricharern
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3-9299-00396-96-7
3. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ระดับ 8
4. หน่วยงานที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail
   ภาควิชาจักษุวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
   ถนนพระราม 4 เขตปทุมวัน กทม 10330
   โทรศัพท์ 02-2564424 โทรสาร 02-2528290
   Email vilavun@hotmal.com
5. ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2522 - 2528 แพทยศาสตร์บัณฑิต เกียรตินิยมอันดับสอง จากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

พ.ศ. 2531 - 2532 ประกาศนียบัตรชั้นสูงทางคลินิกจักษุวิทยา จาก จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2531 - 2534 การฝึกอบรมแพทย์ประจำบ้าน สาขาจักษุวิทยา จาก โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย

พ.ศ. 2538 หลักสูตรแพทย์ปฏิบัติงานทางวิจัย (Research Fellows) สาขากระจกตาและโรคทางตา จากสถาบัน Bascom Palmer Eye Institute เมืองไมอามี รัฐฟลอริดา ประเทศสหรัฐอเมริกา

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

Ocular Surface Diseases & Surgery, Dry eyes, Corneal Diseases & Surgery, Refractive Surgery

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย

   7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : -

   7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย :

   12) A Comparative Study of 0.5% Carboxymethylcellulose with 0.005% Stabilized Oxychlorocomplex (PURITE™) versus 0.5% Carboxymethylcellulose in the Treatment of Dry Eye: A Randomized Controlled Trial

   13) Comparison of amniotic membrane transplantation and conventional treatment for acute management of ocular surface involvement in Stevens-Johnson syndrome.

   14) การเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์ผิวกระจกตา (Limbal Stem Cell) บนเยื่อหุ้มรก

   15) Comparison of efficacy, safety and anti-inflammatory effect between topical 0.05% cyclosporine A emulsion and REFRESH® in patients with moderate to severe dry eyes

16) Limbal stem cells and oral mucosal culture for corneal repair

17) Sensitivity and specificity of confocal microscopy for diagnosis of fungal keratitis

18) Risk factors for dry eye after hematopoietic stem cell transplantation

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว: ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน (อาจมากกว่า 1 เรื่อง)

1. Puangsricharern V, Nantawan P, Anantaphruti MT. ELISA seropositive ocular Toxocariasis : a case report. Chula Med J 1991 Jun;35(6):381-6.
2. Prachakvej P, Yaisawang S, Puangsricharern V. Intraocular lens Implantation in the year 1982 - 1988 at Chulalongkorn University Hospital, Bangkok. Chula Med J 1989 Dec;33(12):923 - 32.
3. Prachakvej P, Puangsricharern V. Stages of development in cataract surgery at the Chulalongkorn University Hospital (From 1982 to 1987). Thai J Ophthalmol 1988 Jun;2(1):35 - 7.
4. Puangsricharern V, Tseng SCG. Cytologic evidence of corneal diseases with limbal stem cell deficiency. Ophthalmology 1995102:1476 - 85.
5. Pires RTF, Tseng SCG, Prabhasawat P, Puangsricharern V, Maskin SL, Kim JC, Tan DTH. Amniotic membrane transplantation for symptomatic bullous keratopathy. Arch Ophthalmol 1999:117:1291-7.
6. Pires RTF, Tseng SCG, Prabhasawat P, Puangsricharern V, Maskin SL, Kim JC. Amniotic membrane transplantation for symptomatic bullous keratopathy. Invest Ophthalmol Vis Sci 1999;40(4):1736B644.
7. Kasetsuwan N, Puangsricharern V, Pariyakanok L. Excimer laser photorefractive keratectomy and laser in situ keratomileusis for myopia and astigmatism. J Med Assoc Thai 2000; 83: 182-92.
8. Kasetsuwan N, Puangsricharern V, Pariyakanok L. Excimer laser phototherapeutic keratectomy for corneal diseases. J Med Assoc Thai 2000; 83: 474-82.
9. Boonpasart S, Kasetsuwan N, Puangsricharern V, Pariyakanok L, Jittpoonkusol T. Infectious keratitis at King Chulalongkorn Memorial Hospital: A-12-year retrospective study of 391 cases. J Med Assoc Thai 2002; 85(Suppl1): S217-S230.
10. Erjongmanee S, Kasetsuwan N, Phusitphoykai N, Puangsricharern V, Pariyakanok L. Clinical evaluation of ophthalmic lomefloxacin 0.3% in comparison with fortified cefazolin and gentamicin ophthalmic solutions in the treatment of presumed bacterial keratitis. J Med Assoc Thai 2004;87(Suppl2):S83-90.
11. ทัศวรินทร์ วิชญคุปต์, คุณตีรา วงศ์พิทยาดิศัย, กษพร ชัยประกิจ, ภาสกร พฤกษะวัน, กัมปนาท สุนทรวิภาต, ปราณี ตันติวนิช, วิลาวัณย์ พวงศรีเจริญ การใช้เยื่อหุ้มรกของมนุษย์รักษาบาดแผลหลุมลึกที่กระจกตาสุนัข เวชชสารสัตวแพทย์ ปีที่ : 35 ฉบับที่ 4 เลขหน้า: 97-102 ปีพ.ศ. 2548

12. Hirunwiwatkul P, Puangsricharern V, Sothornwit N, Rojana Pongpun P, Sawatdiwithayayong J, Hirunwiwatkul P. Eye Diseases associated with obstructive sleep apnea syndrome in an Asian population. Asian Biomedicine 2010; 4(4):645-50.
13. Prommajan K, Aysavarat S, Srichaomthong C, Puangsricharern V, Suphapeetiporn K, Shotelersuk V. A novel p. E276K IDUA mutation decreasing α-L-iduronidase activity causes mucopolysaccharidosis type I. Mol Vis 2011 Feb11;17:453-60.
14. Puangsricharern V, Yeetong P, Charumalai C, Suphapeetiporn K, Shotelersuk V. Two novel mutations including a large deletion of the SLC4A11 gene causing autosomal recessive hereditary endothelial dystrophy. Br J Ophthalmol 2014;98(10):1460-62.

7.4. งานวิจัยที่กำลังทำ: ชื่อข้อเสนอการวิจัย แหล่งทุน และสถานภาพในการทำวิจัยว่าได้ทำการวิจัยลุล่วงแล้วประมาณร้อยละเท่าใด

ประวัติผู้วิจัย ผศ. พญ. งามจิตต์ เกษตรสุวรรณ

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นาย นาง นางสาว ยศ
ผศ.พญ.งามจิตต์ เกษตรสุวรรณ
ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr, Mrs, Miss, Rank
Ngamjit Kasetsuwan, M.D.
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน
หมายเลข 3 1007 00452 92 7
3. ตำแหน่งปัจจุบัน
ผู้ช่วยศาสตราจารย์
4. หน่วยงานที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail
ภาควิชาจักษุวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โทรศัพท์ 02-2564424 โทรสาร 02-2528290
5. ประวัติการศึกษา
- Bachelor degree in Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, 1987
- Master degree of Clinical Science in Ophthalmology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, 1991
- Diploma in Ophthalmology, The Royal College of Ophthalmologists of Thailand, 1993
- Certificate in Cornea and Refractive Surgery, Doheny Eye Institute, University of Southern California, USA, 1997
- Certificate in Mini MBA in Health, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, 2002
6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย

7.1. ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ชื่อแผนงานวิจัย

-

7.2. หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย

7.2.1 การประเมินผลการใช้ยาหยอดตา 0.5% levofloxacin เปรียบเทียบกับการใช้ยาหยอดตา fortified cefazolin ร่วมกับ fortified amikacin ในการรักษาผู้ป่วยที่ได้รับการตาเชื้อแบคทีเรียที่กระจกตา

7.2.2 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการรักษาภาวะเยื่อบุตาอักเสบชนิดไจแอนท์แป็บปิลลาลี่ ที่เกิดจากการใช้เลนส์สัมผัส ระหว่าง 0.025% ketotifen fumarate และ 0.1% lodoxamide

7.2.3 ยาหยอดตาบำบัดภูมิคุ้มกัน: ทางเลือกใหม่สำหรับผู้ป่วยภูมิแพ้ Local Conjunctival Immunotherapy: New Treatment for Allergic Patients.

7.2.4 ยาหยอดตา bevacizumab 0.05% ในการป้องกันต้อเนื้อกลับเป็นซ้ำ

7.2.5 อุบัติการณ์ของการพบเชื้อเริมทีเยื่อบุตาในผู้ป่วยที่เป็นต้อเนื้อ

7.2.5 ภาวะตาแห้งหลังผ่าตัดต้อกระจก

7.3. งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน (อาจมากกว่า 1 เรื่อง)

1. Kasetsuwan N, Pangilinan RT, Moreira LB, Shah SS, Sanchez, Schallhorn S, McDonnell PJ. Real-time intraocular pressure changes during keratomileusis. Invest Ophthalmol Vis Sci. [Suppl] 1997;38:418.
2. Wang H, Chang WV, Moreira L, Sanchez D, Kasetsuwan N, Bryant MR, McDonnell PJ. Ultrasonic measurement of the biomechanical properties of the rabbit sclera. Invest Ophthalmol Vis Sci. [Suppl] 1997;38:290.
3. Kwun R, Pangilinan R, Moreira L, Kasetsuwan N, Sanchez D, Shah S, Schallhorn S, McDonnell PJ. Variability of lamellar corneal flap thickness at different suction ring vacuum settings during keratomileusis. Invest Ophthalmol Vis Sci. [Suppl] 1997;38:418.
4. Bryant MR, Kasetsuwan N, Wang H, Sanchez D, Shah S, McDonnell PJ. PRK-induced anisometropia in the rabbit as a model of myopia. Invest Ophthalmol Vis Sci [Suppl], 1998;39:506.
5. Bryant MR, Kampmeier J, ErH, Kasetsuwan N, Sanchez-dimartino D, Shah SS, McDonnell PJ. PRK- induced anisometropia in the rabbit as a model of myopia. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmology 1999;237:161-165.
6. Kasetsuwan N, Francis MW, Hsie F, Sanchez D, McDonnell PJ. Effect of topical ascorbic acid on free radical tissue damage and inflammatory cell influx in the cornea after excimer laser corneal surgery. Arch Ophthalmol 1999;117:649-652.
7. Moreira LB, Kasetsuwan N, Sanchez D, Shah SS, Labree L, McDonnell PJ. Toxicity of topical anesthetic agents to human keratocytes in vivo. J Cataractt Refract Surg 1999;25(7):975-980.
8. Kasetsuwan N, Puangsricharern V, Pariyakanok L. Excimer Laser Photorefractive Keratectomy and Laser in situ keratomileusis for myopia and astigmatism. J Med Assoc Thai 2000;83:182-192.
9. Kasetsuwan N, Puangsricharern V, Pariyakanok L. Excimer laser phototherapeutic keratectomy for corneal diseases. J Med Assoc Thai 2000; 83:474-482.
10. Hirunwiwatkul P, Tulvatana W, Kasetsuwan N, Nuchprayoon I. Eosinophilic granuloma presenting as periorbital cellulitis. Chula Med J 2000 Aug; 44(8):607-13.
11. Kasetsuwan N, Pangilinan P, Moreira L, et.al. Real-time intraocular pressure and lamellar corneal flap thickness in keratomileusis. CORNEA 2001;20(1):41-44.
12. Boonpasart S, Kasetsuwan N, Puangsricharern V, Pariyakanok L, Jittpoonkusol T. Infectious keratitis at King Chulalongkorn Memorial Hospital: A 12 year retrospective study of 391 cases. J Med Assoc Thai 2002;85 (Suppl):S217-30.

13. Erjongmanee S, Kasetsuwan N, Phusiphoykai N, Puangsricharern V, Pariyakanok L. Clinical Evaluation of Ophthalmic Lomefloxacin 0.3% in Comparison with Fortified Cefazolin and Gentamicin Ophthalmic Solutions in the Treatment of Presumed Bacterial keratitis. J Med Assoc Thai 2004;87 (Suppl 2):S83-90.
14. Kasetsuwan N, Sophonthanaruk S. Pigmented Corneal Mass: a Clue to Diagnose of Fungal Corneal Ulcer. Chula Med J 2004 Oct; 48(10):679-85.
15. Jariyapongskul A, Rungjaroen T, Kasetsuwan N, Pathumraj S, Niimi H. Chronic changes of the iris microvasculature of streptozotocin-induced diabetic rats using fluorescence videomicroscopy. Clin Hemorheol Microcirc. 2006;34(1-2):283-93.
16. Prabhasawat P, Tesavibul N, Kasetsuwan N. Performance profile of sodium hyaluronate in patients with lipid tear deficiency: randomized, double-blind, controlled, exploratory study. Br J Ophthalmol. 2007 Jan;91(1):47-50. Epub 2006 Sep 14.
17. Jariyapongskul A, Rungjaroen T, Kasetsuwan N, Patumraj S, Seki J, Niimi H.Long-term effects of oral vitamin C supplementation on the endothelial dysfunction in the iris microvessels of diabetic rats. Microvasc Res. 2007 Jul;74(1):32-8. Epub 2007 Mar 23.
18. Kasetsuwan N, Reinprayoon U, Jariyakosol, S. Corneal changes in long-term chlorpromazine therapy. Asian Biomedicine .Volume 3, Issue 4, August 2009, 425-431.
19. Kasetsuwan N, Chatchatee P, Reinprayoon U. Efficacy of local conjunctival immunotherapy in allergic conjunctivitis. Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology, Volume 28, Issue 4, December 2010, 237-24120
20. Kasetsuwan N, Tanthuvanit P, Reinprayoon U. The efficay and safety of 0.5% Levofloxacin versus fortified Cefazolin and Amikacin ophthalmic solution for the treatment of suspected and culture-proven cases of infectious bacterial keratitis: a comparative study. Asian Biomedicine, Vol.5, No.1 February 2011, 77-83.
21. Kasetsuwan N, Gorvanich S, Erjongmanee S, Thienprasiddhi P, Jitapunkul S. Prevalence of dry eyes in elderly Thai population (the Romklao eye study). Asian Biomedicine, Vol.6, No. 6 December 2012, 875-82.
22. Kasetsuwan N, Tangmonkongvoragul C. Concomitant herpes simplex virus and cytomegalovirus endotheliitis in immunocompetent patient. BMJ Case reports. 10 May 2013, 1-5.
23. Reinprayoon U, Kasetsuwan N, Permpalung N, Plongla R, Mendoza L, Chindamporn A. Lagenidium sp. ocular infection mimicking ocular pythiosis. Journal of Clinical Microbiology. J Clin Microbiol, 51(8) Aug 2013; 2778-2780.
24. Kasetsuwan N, Sukharoch P, Meesoupong P, Reinprayoom U, Puangsricharern V, Pariyakanok L. Efficacy and safety of ethyl-2-cyanoacrylate adhesives for corneal gluing. Asian Biomedicine, Vol. 7 No. 3 June 2013; 437-441.
25. Kasetsuwan N, Satitpitakul V, Changul T, Jariyakosol S. Incidence and pattern of dry eye after cataract surgery. PLoS One, 8(11) Nov 2013; 1-6.

26. Reinprayoon U, Sitthanon S, Kasetsuwan N, Chongthaleong A. Bacteriological findings and antimicrobial susceptibility pattern of isolated pathogens form visualthreatening ocular infections. J Med Assoc Thai 2015;S77.
27. Sudaw Lertwisuttipaiboon, Tepanata Pumpaibool, Karl J. Neeser, Ngamjit Kasetsuwan. Associations of preventive strategies with symptoms of eye strain among Open University staff in Thailand. J Health Res. vol.30 no.1 February 2016.
28. Usanee Reinprayoon, MD, Nipaporn Maneerat, MD, Sunee Chansangpetch, MD, BPH, Somruk. Suntibenchakul, MD, Jittapan Chureeganon, MD, Ngamjit Kasetsuwan, MD. Eye Donation Project: Differences Between Donors Versus Refusers. International Journal of Eye Banking. Vol 3, No 1 (2015).

7.4. งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อข้อเสนอการวิจัย แหล่งทุน และสถานภาพในการทำวิจัยว่าได้ทำการวิจัยลุล่วงแล้วประมาณร้อยละเท่าใด

ประวัติผู้วิจัย นพ.ดร. นิพัญจน์ อิศรเสนา ณ อยุธยา

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นพ.ดร. นิพัญจน์ อิศรเสนา ณ อยุธยา
   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Nipan Israsena MD., Ph.D.
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 1008 00589 93 2
3. ตำแหน่งปัจจุบันผู้ช่วยศาสตราจารย์ระดับ 8
4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก

หน่วยวิจัยเซลล์ต้นกำเนิดและเซลล์บำบัด
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
อาคาร อ.ป.ร. ชั้น 9
ถนน ราชดำริ ลุมพินี ปทุมวัน กรุงเทพ 10330
โทรศัพท์ 02-256-4000 ต่อ 3590
โทรสาร 02-251-1965
Email nipan.i@chula.ac.th, inipan@gmail.com

3. ประวัติการศึกษา

1989- 1995	MD	Chulalongkorn University Hospital, Bangkok, Thailand
1995- 1996		Neurology Fellow Chulalongkorn University Hospital, Bangkok, Thailand
1997- 2003	PhD	Neuroscience, Albert Einstein college of Medicine New York, USA Northwestern University, Chicago, USA (research fellow)

4. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
Neuroscience – Neural and embryonic stem cell biology

5. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย

a. หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย

-

b. งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่

1. Vejjasilpa K, Nasongkla N, Manaspon C, Larbcharoensub N, Boongird A, Hongeng S, Israsena N. Antitumor efficacy and intratumoral distribution of SN-38 from polymeric depots in brain tumor model. Exp Biol Med (Maywood). 2015 Jun 16.

2. Ingrungruanglert P, Amarinthnukrowh P, Rungsiwiwut R, Maneesri-le Grand S, Sosothikul D, Suphapeetiporn K, Israsena N, Shotelersuk V. Wiskott-Aldrich syndrome iPS cells produce megakaryocytes with defects in cytoskeletal rearrangement and proplatelet formation. Thromb Haemost. 2015 Apr;113(4):792-805.

3. Sudwilai T, Ng JJ, Boonkrai C, Israsena N, Chuangchote S, Supaphol P. Polypyrrole-coated electrospun poly(lactic acid) fibrous scaffold: effects of coating on electrical conductivity and neural cell growth. J Biomater Sci Polym Ed. 2014;25(12):1240-52.
4. Israsena N, Mahavihakanont A, Hemachudha T. Rabies virus infection and microRNAs. Adv Virus Res. 2011;79:329-44.
5. Jalali A, Bassuk AG, Kan L, Israsena N, Mukhopadhyay A, McGuire T, Kessler JA. HeyL promotes neuronal differentiation of neural progenitor cells. J Neurosci Res. 2011 Mar;89(3):299-309. doi: 10.1002/jnr.22562. Epub 2011 Jan 5. PubMed
6. Israsena N, Supavonwong P, Ratanasetyuth N, Khawplod P, Hemachudha T. Inhibition of rabies virus replication by multiple artificial microRNAs. Antiviral Res. 2009 Oct;84(1):76-83. Epub 2009 Jul 29.
7. Laothamatas J, Wacharapluesadee S, Lumlertdacha B, Ampawong S, Tepsumethanon V, Shuangshoti S, Phumesin P, Asavaphatiboon S, Worapruekjaru L, Avihingsanon Y, Israsena N, Lafon M, Wilde H, Hemachudha T. Furious and paralytic rabies of canine origin: neuroimaging with virological and cytokine studies. J Neurovirol. 2008 Apr;14(2):119-29..
8. Kan L, Israsena N, Zhang Z, Hu M, Zhao LR, Jalali A, Sahni V, Kessler JA. Sox1 acts through multiple independent pathways to promote neurogenesis. Dev Biol. 2004 May 15;269(2):580-94.
9. Israsena N, Hu M, Fu W, Kan L, Kessler JA. The presence of FGF2 signaling determines whether beta-catenin exerts effects on proliferation or neuronal differentiation of neural stem cells. Dev Biol. 2004 Apr 1;268(1):220-31.
10. Israsena N, Kessler JA. Msx2 and p21(CIP1/WAF1) mediate the proapoptotic effects of bone morphogenetic protein-4 on ventricular zone progenitor cells. J Neurosci Res. 2002 Sep 15;69(6):803-9.
11. Israsena N, Phanthumchinda K, Sinsawaiwong S, Lerdlum S. Spontaneous carotid dissection. J Med Assoc Thai. 1997 Jun;80(6):406-10.

ประวัติผู้วิจัยพญ.อุษณีย์ เหรียญประยูร

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นาย นาง นางสาว ยศ
นางสาว อุษณีย์ เหรียญประยูร ผศ.พญ.
ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr, Mrs, Miss, Rank
Miss Usanee Reinprayoon

8. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน
เลขหมาย 3 1012 02316 02 0

3. ตำแหน่งปัจจุบัน
จักษุแพทย์ ฝ่ายจักษุวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์
อาจารย์แพทย์ ภาควิชาจักษุวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. หน่วยงานที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail
ภาควิชาจักษุวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โทรศัพท์ 02-2564421
โทรสาร 02-2528290
Email usaneer@gmail.com

5. ประวัติการศึกษา
1992-1997 M.D., Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand
2000-2003 Residency in Ophthalmology, King Chulalongkorn Memorial Hospital, Bangkok, Thailand
2003-2005 Clinical Fellowship in Cornea and Refractive Surgery, King Chulalongkorn Memorial Hospital, Bangkok, Thailand

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย

7.1. ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ชื่อแผนงานวิจัย

7.2. หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย

7.3. งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน (อาจมากกว่า 1 เรื่อง

1. Kasetsuwan N, Reinprayoon U, Jariyakosol S. Corneal changes in long-term chlorpromazine therapy. Asian Biomedicine 2009;3:425-31.
2. Kasetsuwan N, Sukharoch P, Meesoupong P, et al. Efficacy and safety of ethyl-2-cyanoacrylate adhesives for corneal gluing. Asian Biomedicine 2013;7:437-41.
3. Kasetsuwan N, Tanthuvanit P, Reinprayoon U. The efficacy and safety of 0.5% Levofloxacin versus fortified Cefazolin and Amikacin ophthalmic solution for the treatment of suspected and culture-proven cases of infectious bacterial keratitis: A comparative study. Asian Biomedicine 2011;5:77-83.

4. Kasetsuwan N, Reinprayoon U. A sodium hyaluronate ophthalmic solution for reducing dry eye and enhancing corneal wound healing after photorefractive keratectomy. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research 2015;8:226-31.
5. Kasetsuwan N, Chatchatee P, Reinprayoon U. Efficacy of local conjunctival immunotherapy in allergic conjunctivitis. Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology 2010;28:237-41.
6. Reinprayoon U, Permpalung N, Kasetsuwan N, et al. Lagenidium sp. ocular infection mimicking ocular pythiosis. Journal of Clinical Microbiology 2013;51:2778-80.
7. Reinprayoon U, Sitthanon S, Kasetsuwan N, et al. Bacteriological findings and antimicrobial susceptibility pattern of isolated pathogens from visual threatening ocular infections. Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet thangphaet 2015;98:S70-S6.
8. Reinprayoon U, N Maneerat, MD, S Chansangpetch, MD, BPH, S Suntibenchakul, MD, J Chureeganon, MD, N Kasetsuwan, MD Eye Donation Project: Differences Between Donors Versus Refusers International Journal of Eye Banking 2015;3(1).

7.2.งานวิจัยที่กำลังทำ: ชื่อข้อเสนอการวิจัย แหล่งทุน และสถานภาพในการทำวิจัยว่าได้ทำการวิจัยลุล่วงแล้วประมาณร้อยละเท่าใด