

ผลของเลเซอร์พลังงานต่ำต่อเซลล์สร้างกระดูกในฟันมนุษย์



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาทันตกรรมคลินิก

กันยายน 2560

ผลของเลเซอร์พลังงานต่ำต่อเซลล์สร้างกระดูกในฟันมนุษย์



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาทันตกรรมคลินิก

กันยายน 2560

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ผลของเลเซอร์พลังงานต่ำต่อเซลล์สร้างกระดูกในฟันมนุษย์



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาทันตกรรมคลินิก

กันยายน 2560

ณัฐริดา ตังคณิตานนท์. (2559). ผลของเลเซอร์พลังงานต่ำต่อเซลล์สร้างกระดูกเข้าพันมนุษย์

ปริญญาานิพนธ์ วท.ม ทันตรกรรมคลินิก (วิทยาเอ็นโดดอนต์). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย

มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาานิพนธ์:

อาจารย์ทันตแพทย์หญิง ดร. จารุมา ศักดิ์ดี

วัตถุประสงค์ เพื่อการศึกษาในห้องปฏิบัติการถึงผลของเลเซอร์พลังงานต่ำต่อการเพิ่มจำนวนและการทำงานของเซลล์สร้างกระดูกที่มาจากกระดูกเข้าพันมนุษย์

วิธีดำเนินการวิจัย ศึกษาการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างกระดูกเข้าพันมนุษย์ด้วย MTT assay ที่ระยะเวลา 1,3 และ 7 วัน ภายหลังฉายเลเซอร์พลังงานต่ำเป็นระยะเวลา 30 วินาที และ 60 วินาที เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ศึกษาผลของเลเซอร์พลังงานต่ำต่อการเพิ่มการทำงานของเซลล์สร้างกระดูกเข้าพันมนุษย์ ที่ระยะเวลา 7,14 และ 21 วัน ภายหลังฉายเลเซอร์พลังงานต่ำเป็นระยะเวลา 30 วินาที และ 60 วินาที เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมในสภาวะที่เหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อแข็ง ทดสอบความสามารถในการตกตะกอนแคลเซียมในจานเลี้ยงด้วยวิธีการย้อมสีอะลิซารินเรดเอสและตรวจสอบการแสดงออกของยีนออกซีโอแคลซินและคอลลาเจน ชนิดที่ 1 ด้วยวิธีเรียลไทม์พีซีอาร์

ผลการวิจัย การทดสอบความมีชีวิตของเซลล์สร้างกระดูกเข้าพันมนุษย์ที่ระยะเวลา 3 วัน มีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตแตกต่างจากที่ระยะเวลา 1 และ 7 วัน อย่างมีนัยยะสำคัญทางสถิติ ไม่พบความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มควบคุม หรือกลุ่มที่ได้รับการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำ 30 วินาที และ 60 วินาที ในทุกช่วงเวลาที่ทำการศึกษา พบการตกตะกอนของแคลเซียมในจานเลี้ยงอย่าง ชัดเจนที่ระยะเวลา 14 วัน และมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นที่ระยะเวลา 21 วัน แต่เมื่อเปรียบเทียบ ภายในแต่ละช่วงเวลาจะพบกว่ากลุ่มควบคุม หรือกลุ่มที่ได้รับการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำ 30 วินาที และ 60 วินาทีนั้นมีการติดสีแดงที่ใกล้เคียงกัน พบการแสดงออกในระดับเมสเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอของยีนออกซีโอแคลซินและคอลลาเจนชนิดที่ 1 เพิ่มสูงขึ้นในกลุ่มที่ได้รับการฉาย เลเซอร์พลังงานต่ำเป็นระยะเวลา 60 วินาที โดยยีนออกซีโอแคลซินจะพบสูงที่สุดที่ระยะเวลา 14 วัน และยีนคอลลาเจนชนิดที่ 1 จะพบการแสดงออกสูงสุดที่ระยะเวลา 21 วัน

บทสรุป เลเซอร์พลังงานต่ำมีผลช่วยในการกระตุ้นให้เกิดการเพิ่มจำนวนและการทำงานของเซลล์สร้างกระดูกเข้าพันมนุษย์จากการแสดงออกของยีนออกซีโอแคลซินและคอลลาเจนชนิดที่ 1 ที่เพิ่มขึ้น นำไปสู่การสร้างเนื้อกระดูกและการหายกระดูกต่อไป

EFFECTS OF LOW-LEVEL LASER THERAPY ON HUMAN ALVEOLAR OSTEOBLAST CELLS



Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Master of Science Degree in Endodontics
at Srinakharinwirot University

September 2017

Nattida Tangkanitanon. (2017). *Effects of Low-Level Laser Therapy on Human Alveolar Osteoblast Cells*. Master's thesis, M.S. (Endodontics). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee: Doctor Jaruma Sakdee.

Low-level laser therapy (LLLT) is a treatment that yields biostimulation effects to various kind of cells with several benefits, such as the reduction of pain and inflammation, angiogenesis and tissue healing.

Objectives: To investigate the effects of LLLT on cell proliferation and the differentiation of primary human osteoblast cells.

Materials and methods: Primary human osteoblast cells derived from human alveolar bone were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) and supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). Cell proliferation was investigated by MTT assay at one, three and seven days after applying LLLT at intervals of thirty and sixty seconds. Cell differentiation was evaluated by mineralization of calcium deposits, using alizarin red S staining and gene expression of Type One collagen (COL1) and osteocalcin by real time PCR at seven, fourteen and twenty-one days. The data were analyzed using two-way ANOVA Dunnett's correction ($P > 0.05$) and descriptive statistics.

Results: There were no significant differences between the control and the LLLT groups in term of cell proliferation ($P > 0.05$) and the mineralization of calcium deposits. The COL1 and osteocalcin gene expression was up-regulated in the LLLT group.

Conclusions: LLLT helped to increase the expression of COL1 and the osteocalcin gene in human primary osteoblast cells, which may lead to more bone matrix production and bone healing.

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความกรุณาและคำแนะนำจากคณาจารย์หลายท่าน รวมทั้งความช่วยเหลือจากบุคลากรในห้องปฏิบัติการ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ทันตแพทย์หญิง ดร. จารุมา ศักดิ์ดี อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์ที่กรุณาเสียสละเวลาอันมีค่ามาให้คำปรึกษา ข้อคิดเห็น และคำแนะนำต่างๆ แก่งานวิจัยของข้าพเจ้า

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ทันตแพทย์ ดร. วรณธนะ สัตตบรรณสุข ที่กรุณาเสียเวลาร่วมเป็นกรรมการสอบเค้าโครงและเป็นประธานกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ อาจารย์ทันตแพทย์หญิง ดร. ปรมารมภ์ จิวพัฒนกุล แก้วมณี ที่กรุณาเสียเวลาร่วมเป็นกรรมการสอบเค้าโครงและเป็นกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ทันตแพทย์ ดร. ณรงค์ศักดิ์ เหล่าศรีสิน ที่กรุณาเสียเวลาร่วมเป็นกรรมการสอบเค้าโครง และรองศาสตราจารย์ทันตแพทย์หญิง ดร. นිරดา ธเนศวร ที่กรุณาเสียเวลาร่วมเป็นกรรมการสอบเค้าโครงปริญญานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ทันตแพทย์หญิง อินทรา วงศ์เยาว์ฟ้า ที่กรุณาเอื้อเฟื้อเซลล์สร้างกระดูกเข้าพื้มนุษย์สำหรับใช้ทำการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ นอกจากนั้นขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ประจำภาควิชาโอบุสสุวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือและเอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำวิจัยเป็นอย่างดี

ขอกราบขอบพระคุณ มารดา บิดา ผู้เป็นที่รักยิ่งที่คอยแนะนำ และเป็นกำลังใจจนสำเร็จการศึกษา

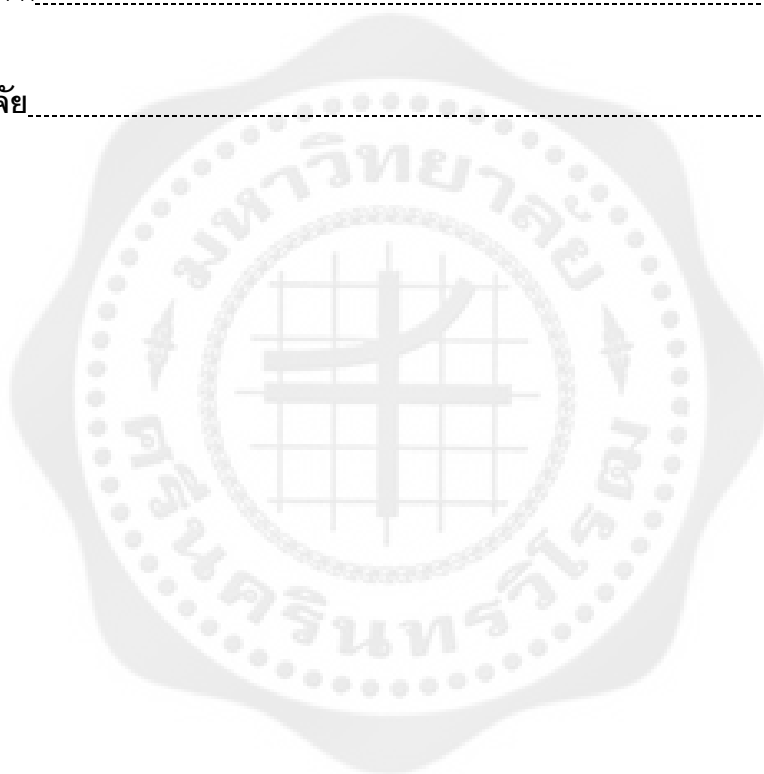
ณัฐธิดา ตังคณิตานนท์

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง.....	1
คำถามวิจัย.....	2
ความมุ่งหมายของการวิจัย.....	2
ความสำคัญของการวิจัย.....	2
ขอบเขตการวิจัย.....	3
นิยามศัพท์เฉพาะ.....	4
กรอบแนวคิดการวิจัย.....	5
สมมติฐานการวิจัย.....	5
2 การทบทวนวรรณกรรม.....	6
เซลล์สร้างกระดูก.....	6
เลเซอร์.....	9
เลเซอร์พลังงานต่ำ.....	11
3 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	16
การเพาะเลี้ยงเซลล์สร้างกระดูก.....	16
การทดสอบความมีชีวิตของเซลล์สร้างกระดูก.....	16
การทดสอบความสามารถในการตกตะกอนแคลเซียมในจานเลี้ยง.....	18
การทดสอบตัวบ่งชี้จำเพาะของเซลล์สร้างกระดูกด้วยออสทีโอแคลซินและ ยีนคอลลาเจนชนิดที่ 1.....	19
การวิเคราะห์ข้อมูล.....	20
4 ผลการวิจัยและการวิเคราะห์ข้อมูล.....	21
ผลของเลเซอร์พลังงานต่ำต่อความมีชีวิตของเซลล์สร้างกระดูก.....	21
ผลการทดสอบความสามารถในการตกตะกอนแคลเซียมในจานเลี้ยง ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีฤทธิ์เหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลง เป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง.....	22
ผลการแสดงออกของยีนออสทีโอแคลซินและยีนคอลลาเจนชนิดที่ 1 ด้วยวิธีเรียลไทม์พีซีอาร์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีฤทธิ์เหนี่ยวนำให้เกิดการ เปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง.....	24

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
5 สรุปผลและอภิปรายผลการวิจัย.....	26
บรรณานุกรม.....	31
ภาคผนวก.....	36
ภาคผนวก ก.....	37
ประวัติย่อผู้วิจัย.....	42



บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 ชนิดของเลเซอร์แบ่งตามชนิดตัวกลางที่ใช้ในงานทันตกรรม.....	10
2 ชนิดของเลเซอร์แบ่งตามความสามารถในการก่อให้เกิดอันตราย.....	11
3 การเตรียมไฟร์เมอร์ของออสทีโอแคลซิน, คอลลาเจนชนิดที่ 1.....	20



บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 กระบวนการซ่อมสร้างของกระดูก.....	8
2 ลักษณะของเซลล์สร้างกระดูก.....	8
3 วิธีการเพาะเซลล์ลงบนภาชนะชนิด 96 หลุม.....	17
4 วิธีการเพาะเซลล์ลงบนภาชนะชนิด 6 หลุม.....	18
5 วิธีการคำนวณร้อยละความมีชีวิตของเซลล์.....	22
6 แผนภูมิแท่งแสดงค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของเซลล์สร้างกระดูกบ่าพื้นมนุษย์ ที่ระยะเวลา 1,3 และ 7 วัน.....	22
7 ผลการทดสอบการตกตะกอนแคลเซียมในจานเลี้ยง.....	23
8 สัดส่วนการแสดงออกของยีนออกสทีโอแคลซิน.....	24
9 สัดส่วนการแสดงออกของยีนคอลลาเจนชนิดที่ 1.....	25

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

พยาธิสภาพรอบปลายรากฟันนั้นมักมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อภายในคลองรากฟัน, การติดเชื้อภายนอกคลองรากฟัน, ภาวะน้ำ หรือเป็นปฏิกิริยาต่อสิ่งแปลกปลอม เช่น ผลึกคอเลสเตอรอล (cholesterol crystal) จากร่างกาย^(1, 2) ซึ่งในกรณีที่มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อภายในคลองรากฟัน แต่ในบางกรณีการรักษาคลองรากฟันเพียงอย่างเดียวนั้นอาจไม่เพียงพอในการกำจัดสาเหตุต้นกำเนิดของโรคได้ จำเป็นที่จะต้องทำการผ่าตัดปลายรากฟันร่วมกับการอุดย้อนปลายรากฟันร่วมด้วย ซึ่งประมาณ 10%⁽³⁾ ของฟันที่มีพยาธิสภาพรอบปลายรากฟันนั้นมีความจำเป็นที่จะต้องทำการรักษาด้วยวิธีการผ่าตัดปลายรากฟัน เมื่อกำจัดสาเหตุในการเกิดโรคได้ พยาธิสภาพรอบปลายรากฟันเหล่านั้นก็จะเกิดการหายซึ่งเซลล์สำคัญที่มีบทบาทในการหายของกระดูกนั้นได้แก่เซลล์สร้างกระดูก (osteoblast) ที่มีบทบาทหน้าที่ในการสร้างกระดูก ดังนั้นความสำเร็จในการหายของพยาธิสภาพรอบปลายรากฟันหลังการผ่าตัดจึงขึ้นกับการทำงานของเซลล์สร้างกระดูกด้วย

เซลล์สร้างกระดูก เป็นเซลล์ที่เจริญมาจากเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ (mesenchymal stem cells) ที่มาจากไขกระดูกรูปร่างมีความหลากหลายขึ้นอยู่กับการทำงานของเซลล์ในเวลานั้นๆ โดยรูปร่างของเซลล์สร้างกระดูกที่มีการทำงานและเจริญเติบโตเต็มที่แล้วจะมีรูปร่างเป็นทรงสี่เหลี่ยม มีนิวเคลียสและ กอลจิแอปพาราตัส (golgi apparatus) ขนาดใหญ่ สามารถพบเซลล์สร้างกระดูกอยู่ที่ตำแหน่งผิวหน้าของกระดูก (bone surface) หน้าที่ของเซลล์สร้างกระดูกคือการผลิตและหลั่งเนื้อกระดูก (bone matrix) เพื่อให้เกิดการสะสมแร่ธาตุต่อไปในภายหลัง องค์ประกอบหลักของ bone matrix ที่ถูกสร้างจากเซลล์สร้างกระดูกนั้นได้แก่คอลลาเจนชนิดที่ 1 (collagen type 1) เป็นส่วนมาก นอกจากนั้นแล้วยังมีการหลั่งโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจน (non-collagenous protein) เช่น ออสทีโอแคลซิน (osteocalcin) ซึ่งมีบทบาทเป็นตัวชี้วัดการหมุนเวียนของกระดูก (bone turnover marker)⁽⁴⁾ เนื่องจากเป็นส่วนที่จะเหนี่ยวนำให้เกิดการตกตะกอนของแคลเซียมต่อไป⁽⁵⁾ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าเซลล์สร้างกระดูกนั้นมีบทบาทเป็นอย่างมากในขบวนการซ่อมสร้างของกระดูกไม่ว่าจะเป็นในภาวะปกติหรือภาวะที่เป็นโรคก็ตาม

การรักษาด้วยเลเซอร์พลังงานต่ำ (Low-level laser therapy, LLLT) นั้นเป็นรังสีอินฟราเรดที่มีความยาวคลื่น 600-1,100 นาโนเมตร และมีพลังงานส่งออก (output power) 1-500 มิลลิวัตต์ ความหนาแน่นของพลังงานที่ใช้อยู่ระหว่าง 0.04-50J/cm² เลเซอร์พลังงานต่ำนั้นสามารถป้องกัน

กระบวนการกำจัดตัวเองของเซลล์ (cell apoptosis) และส่งเสริมการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (cell proliferation), การย้ายถิ่นของเซลล์ (cell migration) และ การยึดติด (adhesion) ในเซลล์หลากหลายชนิดขึ้นอยู่กับปริมาณของพลังงานที่ใช้ โดยถ้าใช้พลังงานปริมาณต่ำ ($2\text{J}/\text{cm}^2$) จะกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ แต่เมื่อใช้พลังงานสูง ($16\text{J}/\text{cm}^2$) จะมีผลลดการเจริญและการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ดังนั้น จึงจัดได้ว่า ผลต่อ เซลล์ ของเลเซอร์พลังงานต่ำนั้นขึ้นอยู่กับปริมาณของพลังงาน รวมไปถึงชนิดของแหล่งกำเนิดแสงนั้นก็มีผลต่อเซลล์แตกต่างกันตามไปด้วย และเนื่องจากใช้พลังงานที่ต่ำ ทำให้ไม่มีผลเรื่องความร้อน, เสียง หรือ การสั่นสะเทือนต่อเซลล์⁽⁶⁾ จากการทบทวนวรรณกรรมนั้นพบว่า ผลของเลเซอร์พลังงานต่ำนั้นมีผลช่วยเพิ่มจำนวนและการทำงานของเซลล์ต่างๆรวมถึงเซลล์สร้างกระดูก⁽⁷⁻¹³⁾ แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาทดลองในเซลล์สร้างกระดูกที่มาจากกระดูกเบ้าฟันมนุษย์โดยตรงนั้นยังมีอยู่น้อย รวมไปถึงชนิดของเลเซอร์พลังงานต่ำนั้นมีความหลากหลาย โดยเครื่องเลเซอร์พลังงานต่ำที่ถูกใช้ในการศึกษาทดลองส่วนใหญ่นั้นไม่มีการนำเข้ามาใช้ในประเทศไทย ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกที่จะทำการวิจัยจากเซลล์สร้างกระดูกที่มาจากเบ้าฟันของมนุษย์ และเลือกเลเซอร์พลังงานต่ำที่มีการนำเข้ามาใช้ในประเทศไทยเพื่อให้มีความใกล้เคียงกับความเป็นจริงมากที่สุด เพื่อให้สามารถนำความรู้และผลที่ได้จากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ไปประยุกต์ใช้ในทางคลินิกและพัฒนาขั้นตอนการรักษาเพื่อให้ผลการรักษานั้นมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

คำถามวิจัย

เมื่อเซลล์สร้างกระดูกที่ถูกเพาะเลี้ยงมาจากกระดูกเบ้าฟันมนุษย์ได้รับการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำเป็นเวลาที่แตกต่างกัน จะมีผลช่วยเพิ่มจำนวนและการทำงานของเซลล์สร้างกระดูกที่มาจากกระดูกเบ้าฟันมนุษย์หรือไม่

ความมุ่งหมายของการวิจัย

เพื่อทำการศึกษาในห้องปฏิบัติการ ถึงผลของเลเซอร์พลังงานต่ำต่อการเพิ่มจำนวนและการทำงานของเซลล์สร้างกระดูกที่มาจากกระดูกเบ้าฟันมนุษย์

ความสำคัญของการวิจัย

เมื่อเกิดพยาธิสภาพรอบปลายรากฟันไม่ว่าจะมาจากสาเหตุใดก็ตามกระดูกเบ้าฟันที่ล้อมรอบปลายรากฟันขึ้นนั้นจะถูกทำลายโดยเซลล์สลายกระดูกซึ่งเป็นผลมาจากกระบวนการอักเสบ กระบวนการรักษาคดลองรากฟันรวมถึงการผ่าตัดปลายรากฟันและอุดยอนปลายรากฟันนั้นเป็นการรักษาโดยการกำจัดสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรค แต่อย่างไรก็ตาม การหายของพยาธิสภาพนั้นจะเกิดได้

ค่อนข้างช้าเนื่องจากต้องอาศัยการสร้างกระดูกขึ้นมาทดแทนจากเซลล์สร้างกระดูก ดังนั้นหากมีวิธีการรักษาที่สามารถเพิ่มจำนวนหรือประสิทธิภาพในการทำงานของเซลล์สร้างกระดูก การหายของพยาธิสภาพควรจะใช้เวลาที่ลดลง ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพและความสำเร็จของการรักษาได้ ซึ่งจากการทบทวนวรรณกรรมก็พบว่าการนำเลเซอร์พลังงานต่ำที่มีคุณสมบัติช่วยในการเพิ่มจำนวนของเซลล์ชนิดต่างๆ รวมไปถึงมีการทดลองของเลเซอร์พลังงานต่ำกับเซลล์สร้างกระดูกที่มาจากสัตว์ทดลอง, human osteoblastic cell-line^(9, 11, 12) ที่ได้มาจาก human osteogenic sarcoma และ human osteoblast cells^(8, 10, 13) โดยการศึกษาเซลล์สร้างกระดูกมนุษย์นั้นส่วนมากจะได้มาจากกระดูกหน้าแข้งซึ่งเป็นกระดูกยาว (long bone) ซึ่งมีแหล่งกำเนิดและการเจริญที่แตกต่างจากกระดูกขากรรไกรและกระดูกเบ้าฟัน ทำให้มีความสามารถในการแบ่งตัว การสะสมแร่ธาตุและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่ต่างกัน การศึกษาทดลองที่ทำในเซลล์สร้างกระดูกที่มาจากขากรรไกรนั้นยังมีการศึกษาที่น้อย และแม้ว่าผลการศึกษาส่วนใหญ่จะพบว่าเลเซอร์พลังงานต่ำสามารถช่วยเพิ่มจำนวนและเพิ่มประสิทธิภาพในการสร้างเนื้อเยื่อแข็งของเซลล์สร้างกระดูกได้ แต่ชนิดของเลเซอร์พลังงานต่ำนั้นมีความหลากหลาย โดยที่เครื่องหมายการค้าของเลเซอร์พลังงานต่ำที่ถูกใช้ในการศึกษาทดลองส่วนใหญ่ยังไม่มีการนำเข้ามาใช้ในประเทศไทย ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกที่จะทำการวิจัยจากเซลล์สร้างกระดูกที่มาจากเบ้าฟันของมนุษย์ และเลือกเลเซอร์พลังงานต่ำที่มีการนำเข้ามาใช้ในประเทศไทยเพื่อให้ความใกล้เคียงกับความเป็นจริงมากที่สุด เพื่อให้สามารถนำความรู้และผลที่ได้จากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ไปประยุกต์ใช้ในทางคลินิกและพัฒนาขั้นตอนการรักษาเพื่อให้ผลการรักษานั้นมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

ขอบเขตของการวิจัย

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาวิจัยพื้นฐาน (basic research) ในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์ โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์กระดูกจากกระดูกเบ้าฟันมนุษย์ เพื่อมาทำการศึกษาถึงผลของการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำต่อการเพิ่มจำนวนและการทำงานของเซลล์สร้างกระดูกจากกระดูกเบ้าฟันมนุษย์

ตัวแปรที่ศึกษา

1. ตัวแปรอิสระ ได้แก่
 - 1.1 ระยะเวลาที่ฉายเลเซอร์พลังงานต่ำ
 - 1.2 ระยะเวลาที่ทำการศึกษา
2. ตัวแปรตาม แบ่งเป็น
 - 2.1 ปริมาณเซลล์สร้างกระดูกที่เพิ่มขึ้น

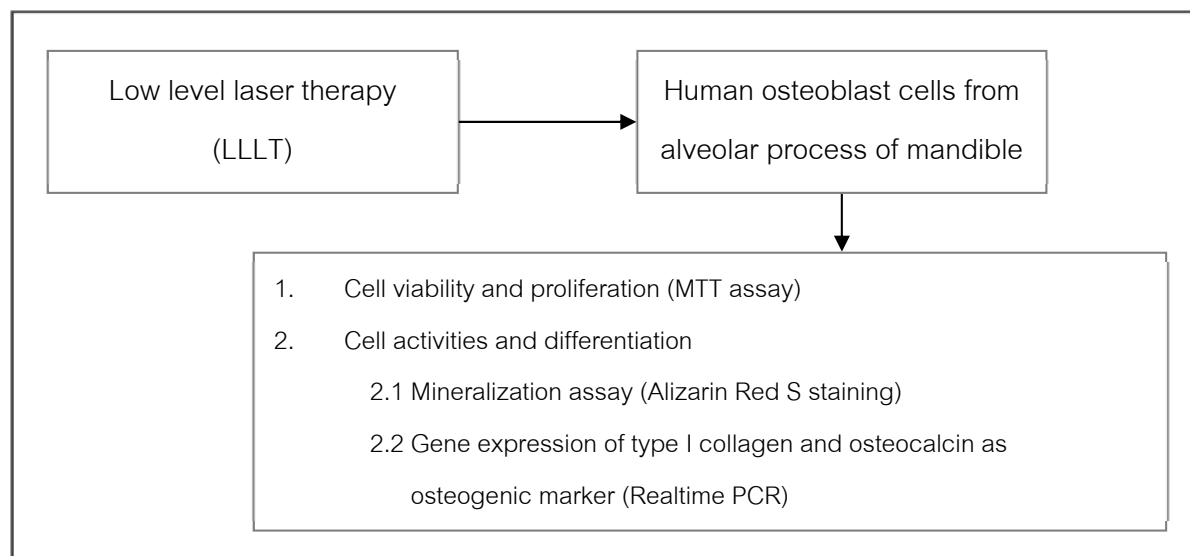
- 2.2 ปริมาณแคลเซียมที่ตกตะกอน
- 2.3 การแสดงออกของออสทีโอแคลซิน
- 2.4 การแสดงออกของคอลลาเจนชนิดที่ 1

นิยามศัพท์เฉพาะ

- 1. Human alveolar bone หมายถึง กระดูกขาโพรงมนุษย์
- 2. Osteoblast หมายถึง เซลล์สร้างกระดูก
- 3. Osteoclast หมายถึง เซลล์สลายกระดูก
- 4. Low-level laser therapy หมายถึง การรักษาด้วยเลเซอร์พลังงานต่ำ
- 5. Osteocalcin หมายถึง ออสทีโอแคลซิน
- 6. Collagen type 1 หมายถึง คอลลาเจนชนิดที่ 1



กรอบแนวคิดวิจัย



สมมติฐานการวิจัย

H_0 : 1) เซลล์สร้างกระดูกเบ้าฟันมนุษย์ที่ได้รับการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำเป็นระยะเวลาที่แตกต่างกัน มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม

2) เซลล์สร้างกระดูกเบ้าฟันมนุษย์ที่ได้รับการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำเป็นระยะเวลาที่แตกต่างกัน มีการเพิ่มการทำงานของเซลล์ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม

H_1 : 1) เซลล์สร้างกระดูกเบ้าฟันมนุษย์ที่ได้รับการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำเป็นระยะเวลาที่แตกต่างกัน มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์แตกต่างจากกลุ่มควบคุม

2) เซลล์สร้างกระดูกเบ้าฟันมนุษย์ที่ได้รับการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำเป็นระยะเวลาที่แตกต่างกัน มีการเพิ่มการทำงานของเซลล์แตกต่างจากกลุ่มควบคุม

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

พยาธิสภาพรอบปลายรากฟันนั้นมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อภายในคลองรากฟัน, การติดเชื้อภายนอกคลองรากฟัน, หนองน้ำ หรือเป็นปฏิกิริยาต่อสิ่งแปลกปลอม เช่น ฝังคัลเลอร์สเตอรอลจากร่างกาย^(1, 2) ซึ่งในกรณีที่มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อภายในคลองรากฟัน แต่ในบางกรณีการรักษาคลองรากฟันเพียงอย่างเดียวนั้นอาจไม่เพียงพอในการกำจัดสาเหตุต้นกำเนิดของโรคได้ จำเป็นที่จะต้องทำการผ่าตัดปลายรากฟันร่วมกับการขูดยอนปลายรากฟันร่วมด้วย ซึ่งประมาณ 10%⁽³⁾ ของฟันที่มีพยาธิสภาพรอบปลายรากฟันนั้นมีความจำเป็นที่จะต้องทำการรักษาด้วยวิธีการผ่าตัดปลายรากฟัน เมื่อกำจัดสาเหตุในการเกิดโรคได้ พยาธิสภาพรอบปลายรากฟันเหล่านั้นก็จะเกิดการหายซึ่งเซลล์สำคัญที่มีบทบาทในการหายของกระดูกนั้นได้แก่เซลล์สร้างกระดูกที่มีบทบาทหน้าที่ในการสร้างกระดูก ดังนั้นความสำเร็จในการหายของพยาธิสภาพรอบปลายรากฟันหลังการผ่าตัดจึงขึ้นกับการทำงานของเซลล์สร้างกระดูกด้วย

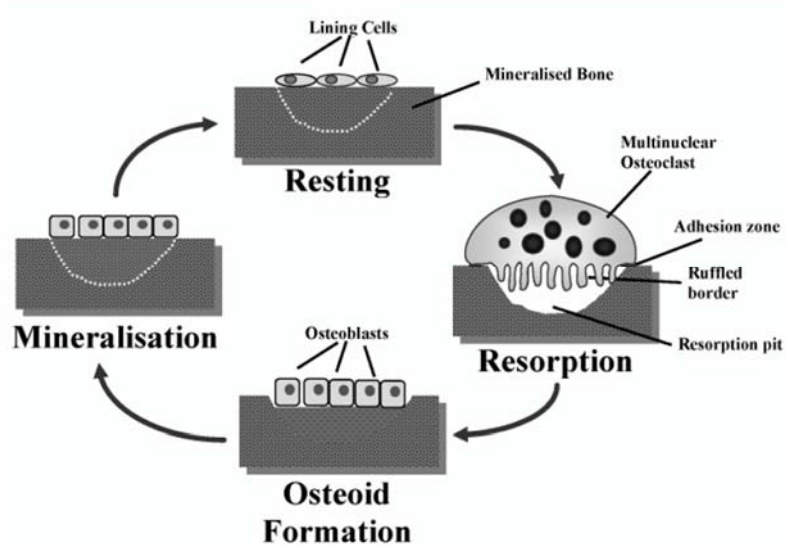
เซลล์สร้างกระดูก (Osteoblast)

เมื่อกระดูกเข้าฟันถูกทำลายไม่ว่าจะมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อในหรือนอกคลองรากฟัน, พยาธิสภาพที่เป็นหนองน้ำ หรือเกิดความพิการของกระดูก เซลล์ที่มีหน้าที่ในการสร้างกระดูกขึ้นมาทดแทนได้แก่เซลล์สร้างกระดูกซึ่งเป็นเซลล์ที่เจริญมาจากเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ (mesenchymal stem cells) ที่มาจากไขกระดูกสเต็มฐานวิทยาของเซลล์สร้างกระดูกมีความหลากหลายขึ้นอยู่กับการทำงานของเซลล์ในเวลานั้นๆ รูปร่างของเซลล์สร้างกระดูกที่มีการทำงานและเจริญเติบโตเต็มที่แล้วจะมีรูปร่างสี่เหลี่ยมเป็นเซลล์นิวเคลียสเดี่ยว (mononucleated cell) มีกอลจีแอฟพาราตัสขนาดใหญ่ สามารถพบเซลล์สร้างกระดูกเรียงตัวเป็นแถวเดี่ยวอยู่ที่ตำแหน่งผิวหน้าของกระดูก (bone surface) เชื่อมต่อระหว่างเซลล์ด้วยไทท์จังชัน (tight junction) การเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกถูกควบคุมโดยการถอดรหัสยีน (transcription factor) โดยโมเลกุลหลายชนิดที่สำคัญได้แก่ Cbfa1 (core-binding factor α -1) โดยหากมีความผิดปกติหรือขาดหายไปของ Cbfa1 จะไม่มีการสร้างกระดูก⁽¹⁴⁾ Runx-2 (runt-related transcription factor 2) เกี่ยวข้องกับการเพิ่มการแสดงออกของยีนสร้างโปรตีนเมตริกของกระดูก ได้แก่ คอลลาเจนชนิดที่ 1 (collagen type 1), ออสทีโอพอนติน (osteopontin), โบนาไซอะโลโปรตีน (bone sialoprotein) และ ออสทีโอแคลซิน (osteocalcin)⁽¹⁵⁾ และทำหน้าที่เพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างกระดูกที่โตไม่เต็มที่ (immature osteoblast) จากเซลล์ต้นกำเนิด ซึ่งหากมีความผิดปกติของ Runx-2 จะไม่เกิดการสร้างกระดูกเนื่องจากไม่มีเซลล์สร้างกระดูก นอกจากนี้ยังมี transcription factor ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการแบ่งตัว (proliferation) และเจริญเติบโตเต็มที่ (maturation) อีกหลายชนิด เช่น osterix (Osx), canonical wntless (Wnt/ β -catenin) และ proto-oncogenes เช่น *c-myc*, *c-jun* และ *c-fos* เป็นต้น

กระบวนการเริ่มสร้างกระดูกจะเกิดจากการที่เซลล์สร้างกระดูกหลังส่วนที่เป็นเมตริกนอกเซลล์ (extracellular matrix/ ECM) หรือ ออสทีอยด์ (osteoid) ซึ่งเป็นส่วนที่ยังไม่มีการสะสมแร่ธาตุ (nonmineralize organic matrix) ได้แก่ คอลลาเจนชนิดที่ 1 (collagen type 1) เป็นส่วนประกอบหลัก นอกจากนั้นแล้วยังมีการหลั่งโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจน (non-collagenous protein) เช่น ออสทีโอพอนติน (osteopontin), โบนาไซอะโลโปรตีน (bone sialoprotein) และออสทีโอแคลซิน (osteocalcin) หลังจากนั้นเซลล์สร้างกระดูกจะกระตุ้นให้เกิดกระบวนการสะสมแร่ธาตุ (mineralization) จนเสร็จเกิดเป็นเนื้อเยื่อกระดูกที่มีความแข็งแรง

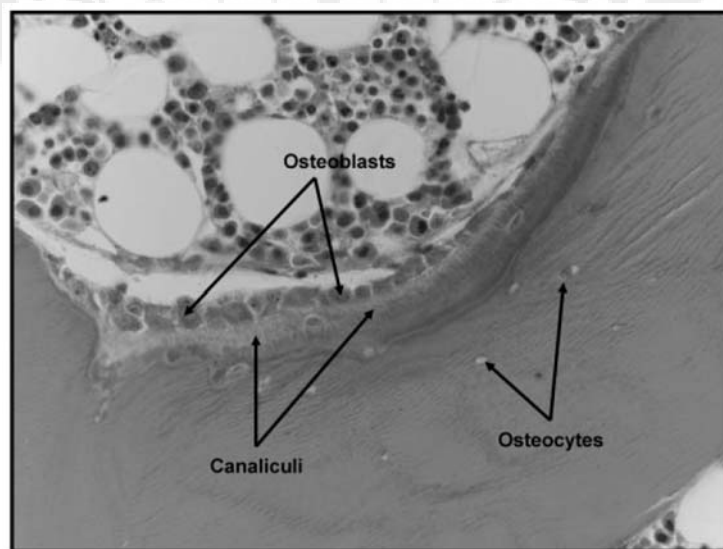
เมื่อกระบวนการแบ่งตัวของเซลล์สร้างกระดูกลดลง มีการเจริญและโตเต็มที่ของเซลล์สร้างกระดูก จะมีการแสดงออกของโมเลกุลซึ่งมีบทบาทเป็นตัวชี้วัดการทำงานของเซลล์สร้างกระดูก (bone markers) เนื่องจากเป็นโปรตีนที่หลั่งจากเซลล์ที่มีความจำเพาะเช่น อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (alkaline phosphatase/ALP), โบนาไซอะโลโปรตีน (bone sialoprotein), ออสทีโอพอนติน (osteopontin) และออสทีโอแคลซิน (osteocalcin) เป็นต้น⁽¹⁶⁾ ออสทีโอแคลซินนั้นเป็นตัวชี้วัดการทำงานของเซลล์สร้างกระดูกที่มีความจำเพาะ คือสามารถพบการแสดงออกได้ในเซลล์สร้างกระดูก, เซลล์สร้างเนื้อฟัน (odontoblast) และเซลล์กระดูกอ่อน (chondrocyte) เท่านั้น⁽⁴⁾ จึงนิยมใช้เป็นตัวชี้วัดการทำงานของเซลล์สร้างกระดูก

เมื่อสิ้นสุดกระบวนการสร้างกระดูกซึ่งใช้เวลาโดยประมาณ 4-6 เดือน เซลล์สร้างกระดูกร้อยละ 50-70 จะตายและมีบางส่วนที่เหลืออยู่บริเวณผิวจะพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ปกคลุมกระดูก (bone lining cell) ส่วนที่อยู่ลึกลงไปจะพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกแข็ง (osteocyte)⁽¹⁷⁾ โดย bone lining cell มีหน้าที่ควบคุมปลดปล่อยแร่ธาตุสามารถเปลี่ยนแปลงกลับไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกที่สามารถสร้าง osteoid ได้ ขึ้นกับฮอร์โมน เช่น พาราไทรอยด์ฮอร์โมน และการรับแรงทางกายภาพเกิดกระบวนการซ่อมสร้าง (bone remodelling) ของกระดูกอยู่ตลอดเวลาเพื่อคงความแข็งแรงของกระดูกและปรับสภาวะสมดุลของแร่ธาตุภายในร่างกาย ขบวนการ bone remodelling นั้นสามารถเกิดขึ้นได้ตลอดชีวิต แสดงดังภาพ 1⁽⁴⁾



ภาพประกอบ 1 แสดงกระบวนการซ่อมสร้างของกระดูก (bone remodelling)⁽⁴⁾

ในส่วนของเซลล์ osteocyte จะฝังอยู่ในเมตริกของกระดูกมีการยื่นแขนง (cell process) ใช้ในการติดต่อสื่อสารระหว่างเซลล์ทำหน้าที่รับรู้แรงกระทำเชิงกล (mechanical stress and strain sensors) ของกระดูกแสดงดังภาพ 2⁽⁵⁾



ภาพประกอบ 2 แสดงลักษณะของเซลล์สร้างกระดูกและเซลล์กระดูก⁽⁵⁾

การสร้างกระดูกใหม่ในตำแหน่งที่กระดูกเก่าถูกสลาย (bone resorption) เพื่อให้เกิดการเจริญเติบโตและการซ่อมแซมของกระดูกนั้น เซลล์สร้างกระดูกนั้นมีบทบาทเป็นอย่างมากในขบวนการซ่อมสร้างของกระดูกไม่ว่าจะเป็นจากสาเหตุจากการเปลี่ยนแปลงของร่างกายตามธรรมชาติ หรือเกิดจากโรคก็ตาม โดยสามารถสร้าง รีเซปเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟนิวเคลียแฟคเตอร์แคปปาบีไลแกนด์ (receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand/RANKL) และ ออสทีโอโปรทีเจอริน (osteoprotegerin/OPG) มีความสำคัญในกระบวนการพัฒนาเปลี่ยนแปลงและกระตุ้นการทำงานของเซลล์สลายกระดูก (osteoclast) ผ่าน RANKL dependent pathway/ RANK-RANKL-OPG system⁽¹⁸⁾ ดังนั้นจึงมีนักวิจัยให้ความสนใจในการนำเซลล์สร้างกระดูกนี้มาทำการศึกษาเพื่อค้นหาวิธีการเพิ่มจำนวนเซลล์สร้างกระดูกเพื่อหวังผลให้เกิดการหายของกระดูก (bone healing) ได้เร็วยิ่งขึ้น ซึ่งการใช้เลเซอร์ก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ได้รับการนิยมนำมาใช้ในการศึกษาทดลองและใช้งานกันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน

เลเซอร์ (Laser)

เลเซอร์ (Laser) ย่อมาจาก Light Amplification Stimulated Emission of Radiation ซึ่งหมายถึงการขยายสัญญาณของแสงโดยการกระตุ้นให้เกิดการปล่อยรังสีออกมา เลเซอร์คือลำแสงที่มีพลังงานสูง เลเซอร์เป็นคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่มนุษย์สร้างขึ้น มีความยาวคลื่นในย่านรังสีอินฟราเรด (infrared) และแสงที่มองเห็น (visible light) ลักษณะที่สำคัญของเลเซอร์ที่มีความแตกต่างกับแสงปกติคือเป็นรังสีที่มีคลื่นเดียว (monochromatic) ลำแสงเลเซอร์ที่ส่งออกมาจะไม่กระจายเหมือนแสงปกติ แต่จะส่องไปในทิศทางเดียวกันหมด และเป็นคลื่นแสงอาพันธ์ คือมีเฟสของคลื่นตรงกันและความเร็วของคลื่นเท่ากัน พลังงานของเลเซอร์จะขึ้นอยู่กับความยาวคลื่นและกำลังส่งออก (output power) แสงเลเซอร์บางชนิดสามารถมองเห็นและบางชนิดไม่สามารถมองเห็นขึ้นกับชนิดตัวกลางที่ใช้ทำแหล่งกำเนิดแสง

เลเซอร์ที่ใช้ในทางการแพทย์และทางทันตกรรมนั้นสามารถแบ่งเป็นกลุ่มตามกำลังส่งออกได้เป็น 2 กลุ่มคือ เลเซอร์พลังงานสูง (high power laser) และเลเซอร์พลังงานต่ำ (low level laser) โดยเลเซอร์พลังงานสูงนั้นสามารถเปลี่ยนแปลงหรือทำลายเนื้อเยื่อด้วยผลของความร้อนจากรังสี ในทางการแพทย์นิยมใช้แทนมีดในการผ่าตัด เช่นการผ่าตัดเนื้องอก และเรตินาของดวงตา เป็นต้น ความแรงของเลเซอร์พลังงานสูงทำให้อุณหภูมิของเนื้อเยื่อเพิ่มสูงขึ้น เนื้อเยื่อเกิดอาการขาดน้ำ (dehydration), โปรตีนรวมเป็นก้อน (coagulation of protein), การแยกสลายของเซลล์ (thermolysis) และเกิดการระเหิด (evaporation) นอกจากนั้นผลของเลเซอร์ยังขึ้นอยู่กับค่าการดูดซึมการหักเหและการส่งผ่านรังสีของเนื้อเยื่อ ความเข้มของลำแสงเลเซอร์ ความเร็วของเลเซอร์ ความเร็วและปริมาณของระบบ

ไหลเวียนโลหิตของเนื้อเยื่อในบริเวณนั้น และระดับความตึงของเนื้อเยื่อบริเวณที่ทำการผ่าตัด เครื่องเลเซอร์พลังงานสูงดังกล่าวได้แก่ เลเซอร์ชนิด Co_2 , Argon และ Nd:YAG นอกจากนี้ แบ่งชนิดของเลเซอร์ตามระดับพลังงานแล้วยังสามารถแบ่งชนิดของเลเซอร์สามารถแบ่งออกได้ตาม ชนิดตัวกลางของเลเซอร์ เช่น ก๊าซเลเซอร์ (gas), เลเซอร์ของแข็ง (solid state), เลเซอร์ของเหลว (liquid) และ เลเซอร์กึ่งตัวนำ (semiconductor) แสดงดังตาราง 1⁽¹⁹⁾ หรือสามารถแบ่งตามระดับ ความสามารถในการก่อให้เกิดอันตราย แสดงดังตาราง 2⁽¹⁹⁾

ตาราง 1 แสดงชนิดของเลเซอร์แบ่งตามชนิดตัวกลางที่ใช้ในทางทันตกรรม⁽¹⁹⁾

ชนิดของเลเซอร์	ชนิดของ ตัวกลาง	ความยาวคลื่น	ระบบนำส่ง (delivery system)
อาร์กอน	ก๊าซ	488,515 นาโนเมตร	เส้นใยนำแสง (optical fiber)
เคทีพี(KTP)	ของแข็ง	532 นาโนเมตร	เส้นใยนำแสง (optical fiber)
ฮีเลียมนีออน (HeNe)	ก๊าซ	633 นาโนเมตร	เส้นใยนำแสง (optical fiber)
ไดโอด(diode)	สารกึ่งตัวนำ	635,670,810,830,980 นาโนเมตร	เส้นใยนำแสง (optical fiber)
Nd:YAG	ของแข็ง	1064 นาโนเมตร	เส้นใยนำแสง (optical fiber)
Er,Cr:YSGG	ของแข็ง	2780 นาโนเมตร	เส้นใยนำแสง (optical fiber)
Er:YAG	ของแข็ง	2940 นาโนเมตร	เส้นใยนำแสง (optical fiber), ท่อนำคลื่น (wave guide), อาร์ทิกคิวเลทอาร์ม (articulated-arm)
คาร์บอนไดออกไซด์ (Co_2)	ก๊าซ	9600,10600 นาโนเมตร	เส้นใยนำแสง (optical fiber), ท่อนำคลื่น (wave guide), อาร์ทิกคิวเลทอาร์ม (articulated-arm)

ตาราง 2 แสดงชนิดของเลเซอร์แบ่งตามความสามารถในการก่อให้เกิดอันตราย⁽¹⁹⁾

ประเภท	ความเสี่ยง	ตัวอย่างที่ใช้ในทางทันตกรรม
I	อยู่ในระบบปิดทั้งหมด	Nd:YAG ที่ใช้ในห่องปฏิบัติการทางทันตกรรม
II	เลเซอร์พลังงานต่ำที่สามารถมองเห็นได้และถูกป้องกันด้วยการกะพริบตา (blink reflex)	เลเซอร์สีแดงที่ใช้ในการทำการผ่าตัด
IIIa	เลเซอร์ที่สามารถมองเห็นได้ที่มีพลังงานมากกว่า 1 มิลลิวัตต์	ไม่มีใช้ในทางทันตกรรม
IIIb	เลเซอร์ที่มีพลังงานสูง (อาจมีพลังงานสูงได้ถึง 0.5 วัตต์) ซึ่งอาจมองเห็นหรือมองไม่เห็น แต่การจ้องมองด้วยตาเปล่าสามารถก่อให้เกิดอันตรายต่อดวงตาได้	เลเซอร์พลังงานต่ำ (50 มิลลิวัตต์)
IV	เป็นอันตรายต่อดวงตาและผิวหนัง	เลเซอร์ที่ใช้ในการผ่าตัดภายในช่องปาก, ฟอกสีฟัน และการเตรียมโพรงฟัน

เลเซอร์พลังงานต่ำ (Low-level laser therapy, LLLT)

เลเซอร์พลังงานต่ำ (Low-level laser) นั้นเป็นรังสีอินฟราเรดที่มีความยาวคลื่น 600-1,100 นาโนเมตร และมี output power 1-500 มิลลิวัตต์ ความหนาแน่นพลังงานที่ใช้อยู่ที่ระหว่าง $0.04-50 \text{ J/cm}^2$ และให้พลังงานประมาณ 35 J/cm^2 ผลการรักษาไม่ก่อให้เกิดผลจากความร้อนของลำแสง ทำให้บางครั้งสามารถเรียกเลเซอร์ชนิดนี้ได้ว่าเป็นเลเซอร์เย็น (cold laser) หรือ เลเซอร์ชนิดอ่อน (soft laser) เลเซอร์พลังงานต่ำนั้นมักอยู่ในช่วงที่มองเห็นได้ ในกรณีที่แหล่งกำเนิดแสงเป็น ฮีเลียมนีออน (helium-neon/HeNe) จะให้แสงสีแดงซึ่งจะไม่ทำให้อุณหภูมิของเนื้อเยื่อเปลี่ยนแปลง แหล่งกำเนิดแสงของเลเซอร์พลังงานต่ำได้แก่ ฮีเลียมนีออน (helium-neon/HeNe), กาเลียมอาร์เซไนด์ (gallium-arsenide/GaAs), กาเลียมอะลูมิเนียมอาร์เซไนด์ (gallium-aluminium-arsenide/GaAlAs) และ อาร์กอน เป็นต้น

การรักษาด้วยเลเซอร์พลังงานต่ำ (Low-level laser therapy/LLLT) ถูกนำมาใช้ในการรักษาทั้งในทางการแพทย์และในทางทันตกรรมอย่างหลากหลาย เช่น ใช้ในการลดภาวะเนื้อฟันไวเกิน (dentin sensitivity) โดยผลของเลเซอร์จะไปเปลี่ยนแปลงการส่งผ่านกระแสประสาท (neuronal transmission) ภายในเนื้อเยื่อใน (dental pulp) ใช้เพื่อลดอาการเจ็บปวดของผู้ป่วยเมื่อทำการเคลื่อนฟันด้วยการรักษาทางทันตกรรมจัดฟัน ซ้ำเชื้อจุลินทรีย์รักษาอาการปวดเรื้อรังที่มีสาเหตุมาจากกล้ามเนื้อและลดปวด⁽²⁰⁾ ช่วยให้เกิดการหายของแผล โดยจะพบว่ามีเกิดการเกิดเนื้อเยื่อแกรนูเลชัน (granulation tissue) เพิ่มขึ้น มีการงอกขยายของเยื่อบุผิวเร็วขึ้น (early epithelization) เซลล์สร้างเส้นใย (fibroblast) เพิ่มจำนวนมากขึ้นและส่งเสริมการเกิดเส้นเลือดใหม่ ส่งผลให้เกิดการหายของแผลได้เร็วมากขึ้นช่วยให้เกิดการหายของเส้นประสาทที่มีอาการบาดเจ็บ เป็นต้น แต่เลเซอร์พลังงานต่ำนั้นไม่มีผลในการช่วยรักษาอาการเหงือกอักเสบ, โรคปริทันต์, โพรงอากาศอักเสบ, กระดูกขากรรไกรอักเสบ และ ไม่มีผลช่วยลดการก่อตัวของคราบจุลินทรีย์บนผิวฟัน ส่วนการรักษาอาการเจ็บปวดบริเวณใบหน้าช่องปาก และข้อต่อขากรรไกร (orofacial pain), พยาธิสภาพที่ข้อต่อขากรรไกร, ผลในการรักษาอาการปวดภายหลังการถอนฟันและผลในการส่งเสริมการงอกใหม่ของกระดูกนั้นยังให้ผลที่ไม่แน่นอน⁽²¹⁾

กลไกที่แท้จริงในการทำงานของเลเซอร์พลังงานต่ำนั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดแต่จากการศึกษาพบว่าผลของเลเซอร์นั้นมีผลกระตุ้นสามารถช่วยเพิ่มการทำงานของไมโทคอนเดรีย⁽⁹⁾, ช่วยในการหายจากการบาดเจ็บของเส้นประสาท, ลดปวด, เพิ่มการสร้างเส้นเลือด, ควบคุมการอักเสบ, เกิดการขยายตัวของหลอดเลือด และ ส่งผลให้เกิดการหายของเนื้อเยื่อหรือแผล⁽⁸⁾ และสามารถป้องกันกระบวนการขจัดตัวเองของเซลล์ และส่งเสริมการเพิ่มจำนวนของเซลล์, การย้ายถิ่นของเซลล์ และ การยึดติด (adhesion) ได้ในเซลล์หลายชนิด⁽²²⁾ ขึ้นอยู่กับปริมาณของพลังงานที่ใช้ โดยถ้าใช้พลังงานต่ำ ($2\text{J}/\text{cm}^2$) จะกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์แต่เมื่อใช้พลังงานสูง ($16\text{J}/\text{cm}^2$) จะมีผลลดการเจริญและการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ดังนั้นจึงจัดได้ว่าผลต่อเซลล์ของ เลเซอร์พลังงานต่ำนั้นขึ้นอยู่กับปริมาณของพลังงานที่ใช้รวมไปถึงชนิดของแหล่งกำเนิดแสงนั้นก็มีผลต่อเซลล์แตกต่างกันตามไปด้วยและเนื่องจาก LLLT นั้นใช้พลังงานที่ต่ำ ทำให้ไม่มีผลเสียเรื่องความร้อน, เสียง หรือ การสั่นสะเทือนต่อเซลล์

กลไกที่เกี่ยวข้องกับการหายของเนื้อเยื่อนั้นเป็นผลมาจากการเพิ่มการหมุนเวียนของเซลล์ และ เพิ่มการสังเคราะห์คอลลาเจน และเมื่อใช้ความหนาแน่นพลังงานและช่วงความยาวคลื่นที่เหมาะสม พลังงานจากเลเซอร์สามารถแทรกซึมเข้าไปภายในเนื้อเยื่อและเซลล์ได้ เกิดผลกระตุ้นการทำงานทางชีวภาพ (biomodulation effects) ต่อเซลล์และเนื้อเยื่อโดยกลไกที่แท้จริงนั้นยังไม่สามารถระบุได้อย่างแน่ชัด แต่พบว่าเกี่ยวกับการที่สารสีภายในเซลล์ (intracellular chromophores) จะทำการ

ดูดกลืนพลังงานจากเลเซอร์เอาไว้แล้วเปลี่ยนไปเป็นพลังงานเมแทบอลิซึม (metabolic energy) ซึ่งจะถูกนำไปใช้ในขบวนการหายใจระดับเซลล์ภายในไมโทคอนเดรียเกิดการสร้างอะดีโนซีนไตรฟอสเฟต (Adenosine triphosphate) หรือ เอทีพี (ATP) ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีพลังงานสูงและเป็นสารที่พร้อมจะแตกตัวเพื่อปล่อยพลังงานออกมาใช้ในกิจกรรมต่างๆ ที่เซลล์ต้องการ , เพิ่มการทำงานของดีเอ็นเอ, เพิ่มการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอและโปรตีนที่จำเป็นต่อเซลล์ส่งผลให้ท้ายที่สุดแล้วมีการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (cell proliferation)^(6, 22)

การศึกษาเกี่ยวกับเลเซอร์พลังงานต่ำต่อเซลล์สร้างกระดูกนั้นมีการศึกษาอย่างหลากหลาย ตั้งแต่การศึกษาทดลองในเซลล์กระดูกของสัตว์ทดลองภายในห้องปฏิบัติการ การศึกษาในเซลล์สร้างกระดูกมนุษย์ที่มาจากเซลล์มะเร็ง (human osteoblastic cell line SaOS-2) ที่ได้มาจากการสังเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ รวมไปถึงเซลล์สร้างกระดูกมนุษย์ แต่อย่างไรก็ตาม เซลล์กระดูกที่มาจากแหล่งกำเนิดและกระบวนการสร้างกระดูกที่แตกต่างกันนั้นจะมีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน โดยการศึกษาของ Aghaloo และคณะ ในปี 2010⁽²³⁾ ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างกระดูกขากรรไกรและกระดูกหน้าแข้งของหนู พบว่าเซลล์กระดูกที่มาจากกระดูกขากรรไกรมีความสามารถในการเปลี่ยนสภาพเซลล์ไปเป็นกระดูก (osteogenic differentiation potential) ได้ดีกว่าเซลล์ที่มาจากกระดูกหน้าแข้ง เนื่องจากเซลล์กระดูกที่มาจากกระดูกขากรรไกรนั้นพัฒนามาจากเซลล์นิวรัลเครสต์ (neural crest cells) และมีการสร้างกระดูกแบบอินทราเมมเบรนาส (intramembranous ossification) ในขณะที่กระดูกหน้าแข้งนั้นพัฒนามาจากเซลล์มีโซเดิร์ม (mesoderm cells) และสร้างกระดูกแบบเอนโดคอนดรอล (endochondral ossification) สอดคล้องกับการศึกษาของ Reichert และคณะในปี 2013⁽²⁴⁾ ที่พบว่าเซลล์สร้างกระดูกที่ได้มาจากกระดูกหน้าแข้งของหนูนั้นมีความสามารถในการเพิ่มจำนวนตัว, การสะสมแร่ธาตุ และการแสดงออกของยีน แตกต่างจากเซลล์สร้างกระดูกที่มาจากกระดูกขากรรไกร โดยเซลล์สร้างกระดูกที่มาจากกระดูกหน้าแข้งของหนูที่มีอายุน้อยจะมีความสามารถในการเพิ่มจำนวนได้มากกว่า ในขณะที่เซลล์สร้างกระดูกที่มาจากกระดูกขากรรไกรของหนูที่มีอายุน้อยจะมีความสามารถในการสะสมแร่ธาตุและการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (alkaline phosphatase) มากกว่า ซึ่งเหตุผลดังกล่าวมานี้อาจสามารถนำมาอธิบายถึงความแตกต่างกันระหว่างการหายของกระดูกที่แตกต่างกันระหว่างกระดูกขากรรไกรและกระดูกยาว (long bone) เช่น กระดูกหน้าแข้ง เป็นต้น ดังนั้นการศึกษาวิจัยที่ใช้เซลล์กระดูกต่างชนิดกันก็อาจได้ผลการศึกษาวิจัยที่ต่างกันตามไปด้วย

ปริมาณพลังงานของเลเซอร์นั้นส่งผลโดยตรงต่อการกระตุ้นหรือยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์โดยจากการศึกษาของ Bolton และคณะในปี 1995⁽²⁵⁾ พบว่าเมื่อทำการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำที่มีความยาวคลื่น 860 นาโนเมตรไปยังเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่มาจากมนุษย์ (human fibroblast) ด้วยความหนาแน่นพลังงานที่ต่างกัน คือ 16 J/cm^2 และ 2 J/cm^2 พบว่าที่ความหนาแน่นพลังงาน 2 J/cm^2 นั้นมีผลช่วยเพิ่มจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ในขณะที่ความหนาแน่นพลังงาน 16 J/cm^2 นั้นมีผลลดจำนวนของเซลล์ดังกล่าว รายงานการทบทวนวรรณกรรมของ AlGhamdi และคณะในปี 2011⁽⁶⁾ ได้สรุปไว้ว่าระดับความหนาแน่นพลังงานที่เหมาะสมกับการเอื้อให้เกิดการเพิ่มจำนวนของเซลล์นั้นคือ $0.5 - 4.0 \text{ J/cm}^2$ โดยใช้ช่วงความยาวคลื่นอยู่ระหว่าง 600 - 700 นาโนเมตร

Khadra และคณะในปี 2005⁽¹³⁾ ได้ทำการศึกษาทดลองผลของเลเซอร์พลังงานต่ำต่อการยึดติด การเพิ่มจำนวนและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์สร้างกระดูกบนแผ่นไทเทเนียม (titanium disc) โดยเซลล์สร้างกระดูกในการทดลองนี้ได้มาจากกระดูกขากรรไกรที่ปราศจากพยาธิสภาพใดๆ ใช้เลเซอร์ที่มีความยาวคลื่น 830 นาโนเมตร, พลังงานส่งออก (output energy) จากตัวเครื่อง 84 มิลลิวัตต์ ฉายด้วยความยาวคลื่นต่อเนื่อง (continuous wave) ที่ความหนาแน่นพลังงาน 1.5 J/cm^2 และ 3 J/cm^2 โดยผลการศึกษาทดลองพบว่าเซลล์ที่ได้รับการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำมีแนวโน้มที่เพิ่มการยึดติดกับแผ่นไทเทเนียม มีการเพิ่มจำนวน การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ และสร้าง transforming growth factor beta 1 (TGF- β_1) ที่มากขึ้นกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อทำการฉายเลเซอร์ด้วยความหนาแน่นพลังงาน 3 J/cm^2 ในขณะที่ความหนาแน่นพลังงาน 1.5 J/cm^2 นั้นให้ผลที่ไม่แตกต่างกันกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ฉายเลเซอร์พลังงานต่ำ

Stein และคณะในปี 2008⁽¹²⁾ ได้ทำการศึกษาผลของเลเซอร์พลังงานต่ำต่อการเจริญเติบโต และการเปลี่ยนสภาพของเซลล์สร้างกระดูกมนุษย์ที่ได้มาจาก human osteogenic sarcoma cell line โดยใช้เลเซอร์ที่มีความยาวคลื่น 670 นาโนเมตร, พลังงานส่งออกจากตัวเครื่อง 400 มิลลิวัตต์ ฉายด้วยความยาวคลื่นต่อเนื่องเป็นเวลา 30 วินาที และ 1 นาที ที่ความหนาแน่นพลังงาน 1 J/cm^2 และ 2 J/cm^2 พบว่าที่ระดับความหนาแน่นพลังงาน 1 J/cm^2 นั้น เซลล์สร้างกระดูกที่ได้รับการฉายเลเซอร์จะมีการเพิ่มจำนวนเมื่อตรวจวัดด้วย metabolic XTT assay , พบการทำงานเพิ่มขึ้นของอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (alkaline phosphatase), การแสดงออกของออสทีโอพอนทิน (osteopontin) และ เอ็มอาร์เอ็นเอของคอลลาเจน ชนิดที่ 1 (collagen type 1 mRNA) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการฉายเลเซอร์ ส่วนกลุ่ม 2 J/cm^2 นั้นพบว่าความมีชีวิตของเซลล์สร้างกระดูกมีปริมาณลดลงในช่วง 48 ชั่วโมงแรก รวมถึงมีการทำงานของอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสที่น้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่ม 1 J/cm^2 และที่ 72 ชั่วโมงจะพบว่าผลการทดลองของทั้ง 3 กลุ่มมีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งผลจากการศึกษาวิจัยนี้พบว่าเลเซอร์พลังงานต่ำนั้นมีผล กระตุ้นการทำงานทางชีวภาพต่อเซลล์สร้างกระดูกมนุษย์ในระยะ 72 ชั่วโมงแรกหลังการได้รับพลังงาน

การศึกษาของ Oliverira และคณะในปี 2016⁽⁸⁾ ทำการศึกษาวิจัยผลของเลเซอร์พลังงานต่ำ 3 ชนิดที่มีแหล่งกำเนิดแสงแตกต่างกัน ต่อการเพิ่มจำนวนและการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์สร้างกระดูกมนุษย์ โดยไม่ได้ระบุว่ามีมาจากกระดูกส่วนใด ทำการเพาะเลี้ยงและทดสอบเซลล์สร้างกระดูกภายใต้เลเซอร์พลังงานต่ำชนิดเลเซอร์สีแดงที่มีความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร, รังสีอินฟราเรด ที่ความยาวคลื่น 780 นาโนเมตร และกลุ่มสุดท้ายเป็น แสง LED ที่ความยาวคลื่น 637 ± 15 นาโนเมตร โดยทุกกลุ่มจะใช้พลังงานส่งออกจากตัวเครื่อง 40 มิลลิวัตต์ ฉายด้วยความยาวคลื่นต่อเนื่องเป็นเวลา 10 และ 50 วินาที ที่ความหนาแน่นพลังงาน 10 และ 50 J/cm² ผลของการศึกษานี้พบว่า เลเซอร์พลังงานต่ำชนิดเลเซอร์สีแดงนั้นมีการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์ และมีการแสดงออกของยีน COL1A1 ซึ่งมีหน้าที่ผลิตคอลลาเจนชนิดที่ 1 เพิ่มมากขึ้น ในขณะที่ LED นั้นให้ผลที่ต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

แม้ว่าจะมีหลายการศึกษาวิจัยที่บ่งชี้ว่าเลเซอร์พลังงานต่ำมีผลช่วยเพิ่มจำนวนของเซลล์ ส่งผลให้เกิดการหายของแผลที่เร็วขึ้น แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีแนวทางในการรักษาที่ชัดเจนถึงระดับความหนาแน่นพลังงานและค่าความยาวคลื่นที่เหมาะสมกับเซลล์สร้างกระดูกที่มาจากกระดูกเข้าพื้นมนุษย์โดยตรง ดังนั้นการนำเซลล์สร้างกระดูกที่มาจากกระดูกเข้าพื้นมนุษย์โดยตรงนั้นอาจให้ผลการศึกษาที่มีความชัดเจนสำหรับแนวทางการใช้เลเซอร์พลังงานต่ำในทางทันตกรรมเพื่อหวังผลช่วยเพิ่มการเจริญและการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์สร้างกระดูกในทางคลินิกต่อไป

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การเพาะเลี้ยงเซลล์สร้างกระดูกเบ้าฟันมนุษย์

นำเซลล์สร้างกระดูกจากกระดูกเบ้าฟันมนุษย์ cell passage ที่ 3-8 ที่ได้รับความอนุเคราะห์มาจากการศึกษาวิจัยของ ผศ.ทพญ.อินทรา วงศ์เยาว์ฟ้า ซึ่งได้รับความเห็นชอบจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมในงานวิจัยคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เลขที่ 21/2558 มาทำการเพาะเลี้ยงต่อในสารอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็ม (Dulbecco's Modified Eagle Medium : DMEM , Gibco[®], Carlsbad, CA, USA) ที่มีส่วนผสมของซีรัม จากลูกอ่อนวัวร้อยละ 10 (10% fetalBovine serum: FBS, Gibco[®]) กลูตามีน (L-glutamine, Invitrogen, NY) ยาปฏิชีวนะและยาต้านเชื้อรา (100 IU/ml. penicillin G, 50µg/ml. streptomycin และ amphotericin B 2.5 µg/ml) ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้บัพที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 รอกจนเซลล์สร้างกระดูกมีการเพิ่มจำนวนเจริญเต็มพื้นที่ของจานเลี้ยงเซลล์ (confluence) จึงทำการย้ายเซลล์ลงสู่จานเลี้ยงเซลล์ใหม่ (Subculture) ในอัตราส่วน 1:2 (หว่านเซลล์ 1 ใน 2 ของเซลล์ทั้งหมดจากจานเลี้ยงเซลล์เดิมสู่จานเลี้ยงเซลล์ใหม่ 1 จาน) โดยใช้ทริปซิน-อีดีทีเอ (trypsin-EDTA, Gibco[®]) จากนั้นเลี้ยงเซลล์ในสารอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด ดีเอ็มอีเอ็ม (Dulbecco's Modified Eagle Medium: DMEM, Gibco[®]) ที่มีส่วนผสมของซีรัมจากลูกอ่อนวัวร้อยละ 10 (10% fetal calf serum: FCS, Gibco[®]) จนได้เซลล์ปริมาณมากพอที่จะนำมาใช้ในการวิจัย

การทดลองนั้นประกอบด้วย 3 การทดลองด้วยกัน ได้แก่

1. MTT assay เพื่อทดสอบความมีชีวิตและการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างกระดูกที่มาจากกระดูกเบ้าฟันมนุษย์
2. Mineralization assay เพื่อทดสอบการทำงานและการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์สร้างกระดูกที่มาจากกระดูกเบ้าฟันมนุษย์
3. Real time PCR เพื่อทดสอบการทำงานและการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์สร้างกระดูกที่มาจากกระดูกเบ้าฟันมนุษย์

การทดสอบความมีชีวิตของเซลล์สร้างกระดูก

ทำการนำเซลล์สร้างกระดูกมาเพาะเลี้ยงในถาดแบบ 96 หลุมแต่ละหลุมมีความหนาแน่น 2×10^3 cells/well พร้อมอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด ดีเอ็มอีเอ็มผสม 10% ซีรัมอ่อนจากลูกวัว นำไปเพาะเลี้ยงในตู้บัพเป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำถาดเลี้ยงเซลล์ออกมาจากตู้บัพ ทำการล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ปราศจากเชื้อ 2 ครั้ง แบ่งเซลล์ออกเป็น 3 กลุ่มการทดลอง ได้แก่

1. กลุ่มควบคุม ไม่ได้รับการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำ
2. กลุ่มทดลองที่ 1 ได้รับการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำ (Helbo, Bredent, Germany) ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร พลังงานส่งออกจากตัวเครื่อง 100 มิลลิวัตต์ ฉายด้วยความยาวคลื่นต่อเนื่อง 30 วินาที
3. กลุ่มทดลองที่ 2 ได้รับการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำ (Helbo, Bredent, Germany) ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร พลังงานส่งออกจากตัวเครื่อง 100 มิลลิวัตต์ ฉายด้วย ความยาวคลื่นต่อเนื่อง 60 วินาที

โดยขณะที่ทำการการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำจะป้องกันการรบกวนระหว่างแต่ละหลุมที่ทำการทดลองด้วยการใส่เซลล์ลงในถาดหลุม 1 หลุม และเว้นว่างอีก 2 หลุม ดังแสดงในภาพประกอบ 3 โดยเครื่องหมาย X แสดงถึงหลุมที่ทำการเพาะเซลล์

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
กลุ่มควบคุม	A											
	B	X			X			X				
	C											
ฉาย 30	D	X			X			X				
	E											
ฉาย 60	F	X			X			X				
	G											
	H											

ภาพประกอบ 3 แสดงวิธีการเพาะเซลล์ลงในถาดชนิด 96 หลุม

หลังจากฉายเลเซอร์พลังงานต่ำแล้วทำการดูดฟอสเฟตบัพเฟอร์ชาไลน์ปราศจากเชื้อออกแล้วเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด ดีเอ็มอีเอ็มผสม 10% ซีรัมอ่อนจากลูกวัว นำกลับเข้าไปเพาะเลี้ยงในตู้บัพที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 3 วัน

ทำการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์สร้างกระดูกที่เวลา 1,3 และ 7 วันหลังจากได้รับการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำด้วย MTT assay (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) เซลล์จะถูกล้างด้วยฟอสเฟตบัพเฟอร์ชาไลน์ปราศจากเชื้อ แล้วหยดสารละลาย MTT ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นำไปเพาะเลี้ยงในตู้บัพที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นถาดหลุมออกจากตู้บัพ หยดสาร ดีเอ็มเอสโอ (DMSO) แล้วแปรผลด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) ที่ความยาว

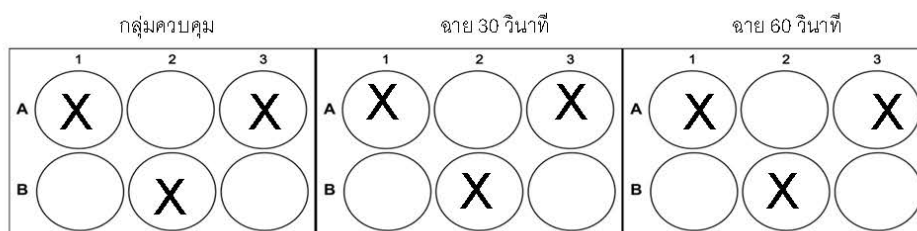
คลื่น 570 นาโนเมตร โดยแต่ละกลุ่มจะถูกนำมาทดลองแบบเดียวกันซ้ำ 3 ครั้ง (triplicate) ในทุกขั้นตอนของการวิจัย

การทดสอบความสามารถในการตกตะกอนแคลเซียมในจานเลี้ยง

นำเซลล์สร้างกระดูกมาเพาะเลี้ยงในถาดแบบ 12 หลุมแต่ละหลุมมีความหนาแน่น 4×10^4 cells/well พร้อมอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด ดีเอ็มอีเอ็มผสม 10% ซีรัมอ่อนจากลูกวัว นำไปเพาะเลี้ยงในตู้บ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำถาดเลี้ยงเซลล์ออกมาจากตู้บ่ม ทำการล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ปราศจากเชื้อ 2 ครั้ง แบ่งเซลล์ออกเป็น 3 กลุ่มการทดลอง ได้แก่

1. กลุ่มควบคุม ไม่ได้รับการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำ
2. กลุ่มทดลองที่ 1 ได้รับการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำ (Helbo, Bredent, Germany) ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร พลังงานส่งออกจากตัวเครื่อง 100 มิลลิวัตต์ ฉายด้วยความยาวคลื่นต่อเนื่อง 30 วินาที
3. กลุ่มทดลองที่ 2 ได้รับการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำ (Helbo, Bredent, Germany) ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร พลังงานส่งออกจากตัวเครื่อง 100 มิลลิวัตต์ ฉายด้วยความยาวคลื่นต่อเนื่อง 60 วินาที

หลังจากฉายเลเซอร์พลังงานต่ำแล้วทำการดูดฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ปราศจากเชื้อออก เปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีฤทธิ์เหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง (Osteogenic media) ซึ่งมีส่วนผสมของกรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid, Gibco[®], USA) 50 µg/ml, เบต้ากลีเซอโรฟอสเฟต (β-glycerophosphate, Gibco[®], USA) 1.08 mg/ml และเดกซาเมธาโซน (Dexamethasone, Gibco[®], USA) 0.1 µg/ml นำกลับเข้าไปเพาะเลี้ยงในตู้บ่มที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ทำการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำทุกๆ 7 วันและทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 3 วัน โดยขณะที่ทำการการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำจะป้องกันการรบกวนระหว่างแต่ละหลุมที่ทำการทดลองด้วยการใส่เซลล์ลงในถาดหลุม 1 หลุม และเว้นว่าง อีก 1 หลุม ดังแสดงในภาพประกอบ 4 โดยเครื่องหมาย X แสดงถึงหลุมที่ทำการเพาะเซลล์



ภาพประกอบ 4 แสดงวิธีการเพาะเซลล์ลงในถาดชนิด 6 หลุม

ทำการทดสอบความสามารถในการตกตะกอนแคลเซียมในจานเลี้ยงที่ 7, 14 และ 21 วัน ด้วยวิธีการย้อมสีอะลิซารินเรดเอส (Alizarin Red S, Sigma, USA) โดยดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมออกล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ปราศจากเชื้อ เติม 4% ฟอร์มาลีน ทิ้งไว้ 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง ล้างออกด้วยน้ำกลั่น เติมสีอะลิซารินเรด ความเข้มข้น 2% ทิ้งไว้ 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง ล้างออกด้วยน้ำกลั่น 4 ครั้ง ครึ่งละ 5 นาที โดยแต่ละกลุ่มจะถูกนำมาทดลองแบบเดียวกันซ้ำ 3 ครั้ง (triplicate) ในทุกขั้นตอนของการวิจัย

การทดสอบตัวบ่งชี้จำเพาะของเซลล์สร้างกระดูกด้วยออสทีโอแคลซิน (Osteocalcin), ยีนคอลลาเจนชนิดที่ 1 (Collagen type I)

นำเซลล์สร้างกระดูกมาเพาะเลี้ยงในถาดแบบ 6 หลุมแต่ละหลุมมีความหนาแน่น 2×10^4 cells/well พร้อมอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด ดีเอ็มอีเอ็มผสม 10% ซีรัมอ่อนจากลูกวัว นำไปเพาะเลี้ยงในตู้อบเป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำถาดเลี้ยงเซลล์ออกมาจากตู้อบ ทำการล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ปราศจากเชื้อ 2 ครั้ง แบ่งเซลล์ออกเป็น 3 กลุ่มการทดลอง ได้แก่

1. กลุ่มควบคุม ไม่ได้รับการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำ
2. กลุ่มทดลองที่ 1 ได้รับการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำ (Helbo, Bredent, Germany) ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร พลังงานส่งออกจากตัวเครื่อง 100 มิลลิวัตต์ ฉายด้วยความยาวคลื่นต่อเนื่อง 30 วินาที
3. กลุ่มทดลองที่ 2 ได้รับการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำ (Helbo, Bredent, Germany) ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร พลังงานส่งออกจากตัวเครื่อง 100 มิลลิวัตต์ ฉายด้วยความยาวคลื่นต่อเนื่อง 60 วินาที

โดยขณะที่ทำการการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำจะป้องกันการรบกวนระหว่างแต่ละหลุมที่ทำการทดลองด้วยการใส่เซลล์ลงในถาดหลุม 1 หลุม และเว้นว่างอีก 1 หลุม ดังแสดงในภาพประกอบ 4 โดยเครื่องหมาย X แสดงถึงหลุมที่ทำการเพาะเซลล์หลังจากฉายเลเซอร์พลังงานต่ำแล้วทำการดูดฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ปราศจากเชื้อออกเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีฤทธิ์เหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง (Osteogenic media) ซึ่งมีส่วนผสมของกรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid, Gibco®, USA) 50 µg/ml, เบต้ากลีเซอโรฟอสเฟส (β-glycerophosphate, Gibco®, USA) 1.08 mg./ml. และเดกซาเมธาโซน (Dexamethasone, Gibco®, USA) 0.1 µg/ml) นำกลับเข้าไปเพาะเลี้ยงในตู้อบที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ทำการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำทุกๆ 7 วันและทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 3 วัน

ที่เวลา 7,14 และ 21 วัน ทำการตรวจสอบการแสดงออกของออสทีโอแคลซิน⁽²⁶⁾ และ ยีนคอลลาเจนชนิดที่ 1⁽⁸⁾ ด้วยวิธีเรียลไทม์พีซีอาร์ทำการเพิ่มขยายจำนวนดีเอ็นเอด้วยน้ำยาสำเร็จรูป (real-time PCR master mix, LightCycle[®] 480 SYBR Green I Master, Roach Diagnostics Corporation, IN, USA) ตามคำแนะนำโดยผู้ผลิต โดยไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษานี้ ได้แก่ ออสทีโอแคลซิน และคอลลาเจนชนิดที่ 1 แสดงดังตาราง 3 โดยแต่ละกลุ่มจะถูกนำมาทดลองแบบเดียวกันซ้ำ 3 ครั้ง (triplicate) ในทุกขั้นตอนของการวิจัย

ตาราง 3 แสดงการเตรียมไพรเมอร์ของออสทีโอแคลซิน, คอลลาเจนชนิดที่ 1

ไพรเมอร์	ลำดับเบส	แหล่งที่มา
GAPDH	Forward; 5'-TGGCAAAGTGGAGATTGTTGC-3' Reverse; 5'-GCAAAGAAGTGGCAGGAAGA-3'	(8)
Osteocalcin	Forward; 5'-AGCGAGGTAGTGAAGAGAC-3' Reverse; 5'-GAAAGCCGATGTGGTCAG-3'	(26)
COL1A1	Forward; 5'-CAGGTCTCGGTCATGGTACCT-3' reverse; 5'-GTCGAGGGCCAAGACGAA -3'	(8)

การวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์สร้างกระดูก แสดงผลข้อมูลเป็นค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่วัดได้จากเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ นำข้อมูลที่ได้มาทำการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยซอฟต์แวร์ SPSS statistics Ver.22 (IBM corp.) ด้วยสถิติชนิด two-way ANOVA และ Dunnett's correction โดยมีค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$

ผลการทดสอบความสามารถในการตกตะกอนของแคลเซียมในจานเลี้ยงและการทดสอบตัวบ่งชี้จำเพาะของเซลล์สร้างกระดูกด้วยออสทีโอแคลซิน, ยีนคอลลาเจนชนิดที่ 1 นำเสนอด้วยภาพประกอบและสถิติเชิงพรรณนา

บทที่ 4

ผลการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการวิจัยในห้องปฏิบัติการแบ่งออกเป็น 3 ส่วนด้วยกัน ได้แก่ การศึกษาถึงผลของเลเซอร์พลังงานต่ำต่อความมีชีวิตของเซลล์สร้างกระดูกเข้าพื้มนุษย์ด้วย MTT assay และผลของเลเซอร์พลังงานต่ำต่อการทำงานของเซลล์สร้างกระดูกเข้าพื้มนุษย์ด้วยการย้อมสีอะลิซาริน เรดเอส และตรวจสอบการแสดงออกของยีนฮีสทีโอแคลซินและยีนคอลลาเจนชนิดที่ 1 ด้วยวิธีเรียลไทม์พีซีอาร์

ผลของเลเซอร์พลังงานต่ำต่อความมีชีวิตของเซลล์สร้างกระดูกเข้าพื้มนุษย์

ทำการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์สร้างกระดูกเข้าพื้มนุษย์ที่ระยะเวลา 1, 3 และ 7 วัน ด้วย MTT assay ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จะมีค่าแปรผันตรงกับปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ สามารถนำมาคำนวณร้อยละความมีชีวิตของเซลล์โดยใช้สูตรแสดงดังภาพประกอบที่ 5 ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของเซลล์สร้างกระดูกเข้าพื้มนุษย์ที่ระยะเวลา 1, 3 และ 7 วันแสดงดังภาพประกอบ 6

ที่ระยะเวลา 1 วัน กลุ่มควบคุมมีค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย 0.31 ± 0.10 ร้อยละความมีชีวิตของเซลล์เท่ากับร้อยละ 100.00 กลุ่ม LLLT 30 วินาที 0.40 ± 0.09 ร้อยละความมีชีวิตของเซลล์เท่ากับร้อยละ 132.84 และกลุ่ม LLLT 60 วินาที 0.38 ± 0.10 ร้อยละความมีชีวิตของเซลล์เท่ากับร้อยละ 127.37

ที่ระยะเวลา 3 วัน กลุ่มควบคุมมีค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย 0.77 ± 0.06 ร้อยละความมีชีวิตของเซลล์เท่ากับร้อยละ 100.00 กลุ่ม LLLT 30 วินาที 0.88 ± 0.04 ร้อยละความมีชีวิตของเซลล์เท่ากับร้อยละ 114.40 และกลุ่ม LLLT 60 วินาที 0.67 ± 0.17 ร้อยละความมีชีวิตของเซลล์เท่ากับร้อยละ 86.54

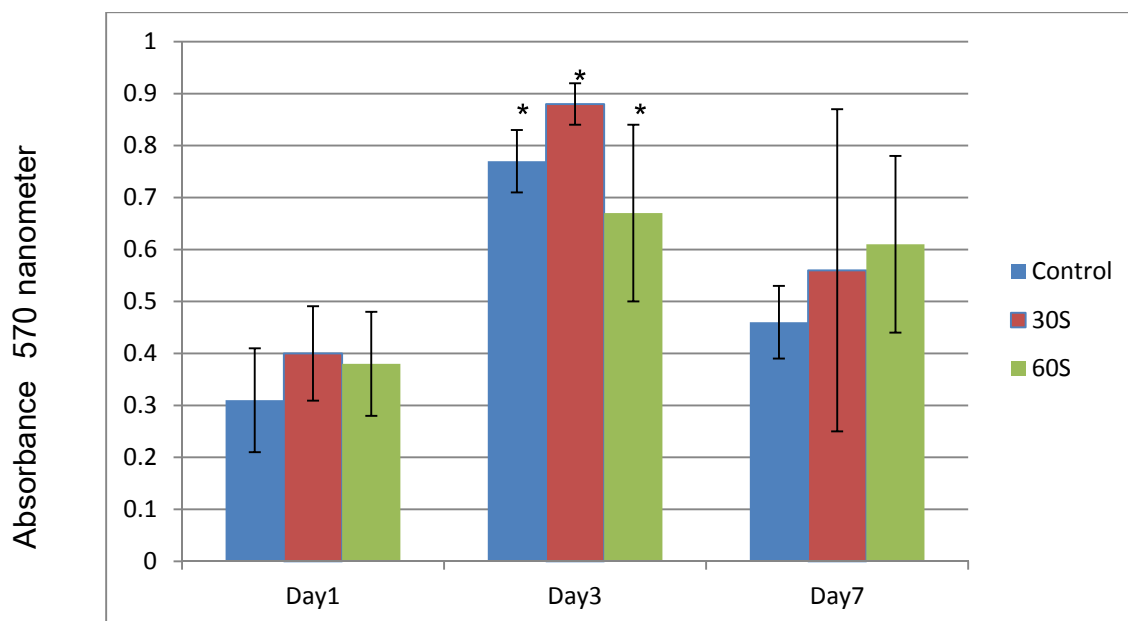
ที่ระยะเวลา 7 วัน กลุ่มควบคุมมีค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย 0.46 ± 0.07 ร้อยละความมีชีวิตของเซลล์เท่ากับร้อยละ 100.00 กลุ่ม LLLT 30 วินาที 0.56 ± 0.31 ร้อยละความมีชีวิตของเซลล์เท่ากับร้อยละ 124.00 และกลุ่ม LLLT 60 วินาที 0.61 ± 0.17 ร้อยละความมีชีวิตของเซลล์เท่ากับร้อยละ 135.29

พบว่าที่ระยะเวลา 3 วันภายหลังจากได้รับการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำจะมีปริมาณของเซลล์ที่มีชีวิตอยู่มากที่สุด กลุ่มที่ได้รับการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำเป็นเวลา 30 วินาทีที่มีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตอยู่มากกว่า กลุ่มที่ได้รับการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำเป็นเวลา 60 วินาทีและกลุ่มควบคุมตามลำดับ

ภายหลังทำการวิเคราะห์ทางสถิติชนิด two-way ANOVA และ Dunnett's correction กำหนดค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$ พบว่า ที่ระยะเวลา 3 วันมีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตแตกต่างจากที่ระยะเวลา 1 และ 7 วัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตที่ระยะเวลา 1 และ 7 วัน นั้นพบว่ามีค่าแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ และไม่พบความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มควบคุม หรือกลุ่มที่ได้รับการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำ 30 วินาที และ 60 วินาทีในทุกช่วงเวลาทำการทดสอบ

$$\% \text{ cell viability} = \frac{\text{OD (sample)} - \text{OD (blank)}}{\text{OD (control)} - \text{OD (blank)}}$$

ภาพประกอบ 5 แสดงวิธีการคิดค่าร้อยละความมีชีวิตของเซลล์

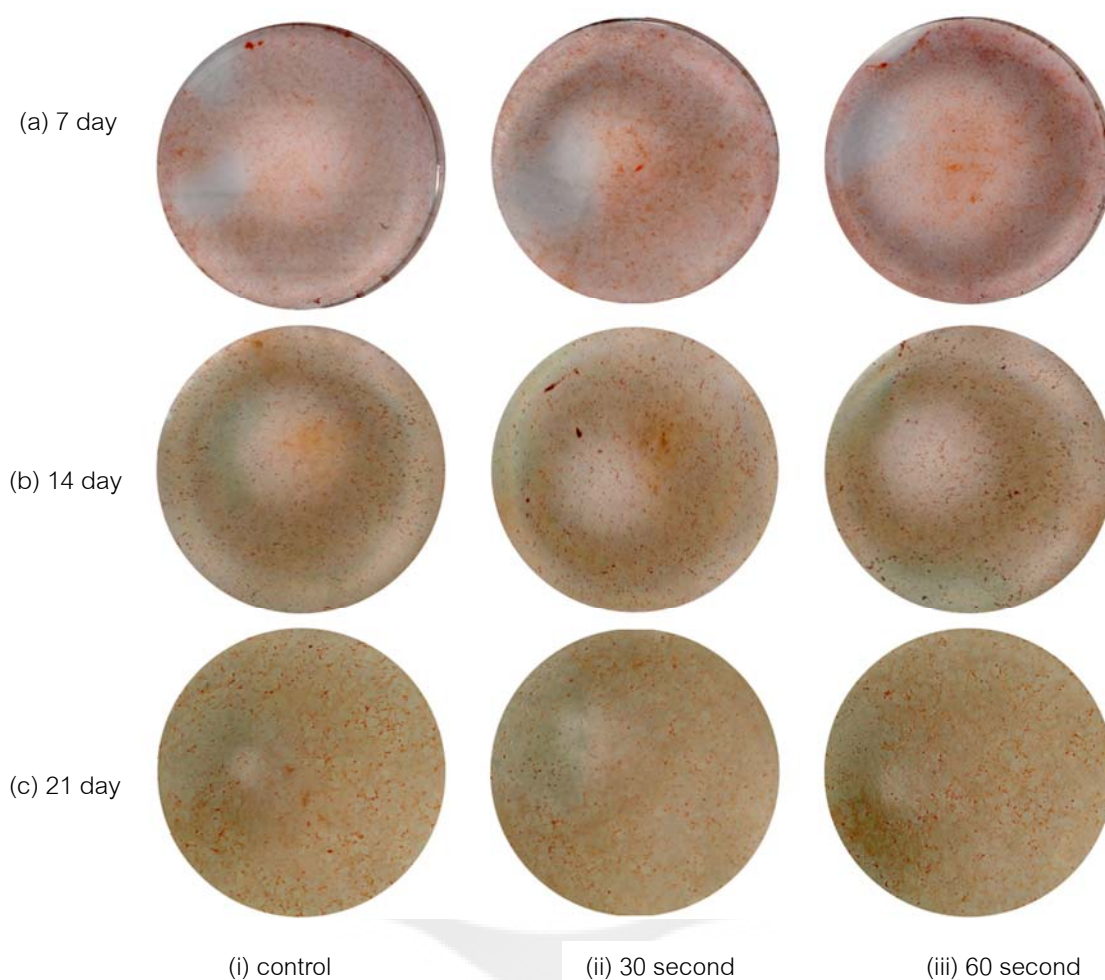


ภาพประกอบ 6 แผนภูมิแท่งแสดงค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของเซลล์สร้างกระดูกเข้าพันมนุษย์ ที่ระยะเวลา 1, 3 และ 7 วัน เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม กลุ่มที่รับการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำ เป็นระยะเวลา 30 วินาที และ 60 วินาทีตามลำดับ (* แสดงค่านัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$)

ผลการทดสอบความสามารถในการตกตะกอนแคลเซียมในจานเลี้ยงในอาหารเลี้ยง เซลล์ที่มีฤทธิ์เหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง

นำเซลล์สร้างกระดูกเข้าพันมนุษย์มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีฤทธิ์เหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง นำกลับเข้าไปเพาะเลี้ยงในตูบที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ทำการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำทุกๆ 7 วันและทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยง เซลล์ทุก 3 วัน หลังจากนั้นนำมาตรวจสอบการตกตะกอนของแคลเซียมด้วยการย้อมสีอะลิซารินเรดเอส ที่ระยะเวลา 7, 14 และ 21 วัน โดยตะกอนแคลเซียมจะย้อมติดสีแดง แสดงดังภาพประกอบ 7 เมื่อเปรียบเทียบจะพบว่า ที่ระยะเวลา 21 วันจะมีการติดสีแดงเข้มชัดเจนที่สุด ตะกอนแคลเซียมมีลักษณะ เป็นกลุ่มก้อนขนาดใหญ่กระจายอยู่โดยทั่วภาชนะ ร่องลงมาคือระยะเวลา 14 วัน ที่พบตะกอนแคลเซียม

เป็นจุดขนาดเล็กกระจายโดยทั่วผาคลุม และที่ระยะเวลา 7 วันมีการติดสีแดงน้อยที่สุด พบตะกอนแคลเซียมที่ย้อมติดสีแดงเพียงเล็กน้อย และเมื่อเปรียบเทียบภายในแต่ละช่วงเวลาจะพบกว่ากลุ่มควบคุม หรือกลุ่มที่ได้รับการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำ 30 วินาที และ 60 วินาทีนั้นมีการติดสีแดงที่ใกล้เคียงกัน

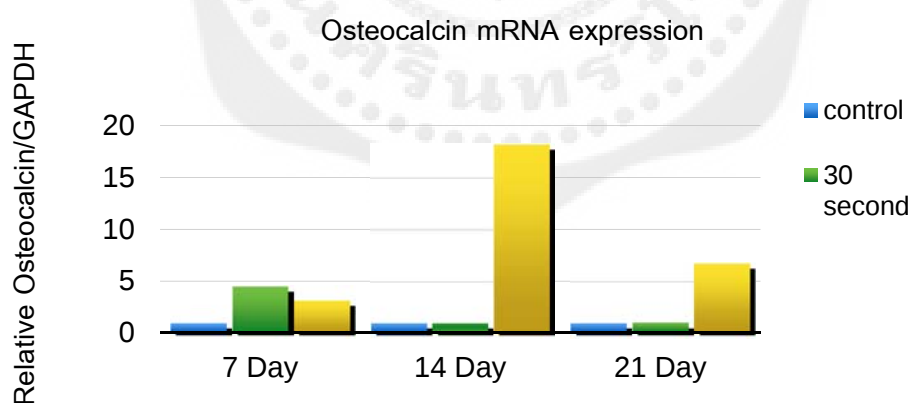


ภาพประกอบ 7 แสดงผลการทดสอบการตกตะกอนแคลเซียมในจานเลี้ยงโดยการย้อมสีอะลิซารินเรดเอส เปรียบเทียบระหว่าง 3 ช่วงเวลา คือ (a) 7 วัน (b) 14 วัน (c) 21 วัน แต่ละช่วงเวลาประกอบด้วย 3 กลุ่มการทดลอง คือ (i) กลุ่มควบคุม (ii) กลุ่มที่ได้รับการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำ 30 วินาที (iii) กลุ่มที่ได้รับการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำ 60 วินาที

ผลการแสดงออกของยีนออสทีโอแคลซินและยีนคอลลาเจนชนิดที่ 1 ด้วยวิธีเรียลไทม์พีซีอาร์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีฤทธิ์เหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง

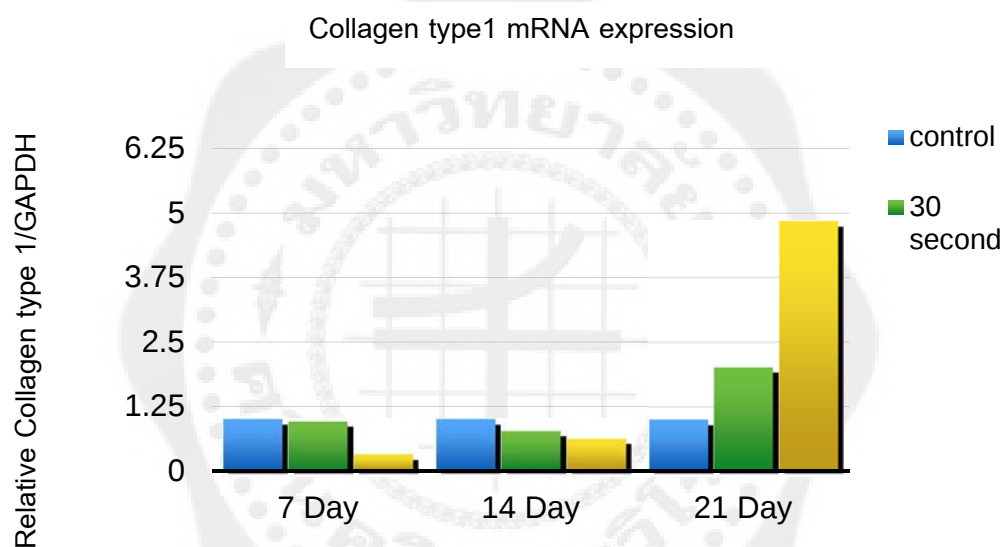
การแสดงออกของยีนออสทีโอแคลซินและยีนคอลลาเจนชนิดที่ 1 ในเซลล์สร้างกระดูกบ่าฟันมนุษย์เปรียบเทียบกับยีนควบคุมจีเอฟพีดีเอชด้วยวิธีเรียลไทม์พีซีอาร์ ณ เวลา 7, 14 และ 21 วัน เปรียบเทียบระหว่าง 3 กลุ่มการทดลอง คือ กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำ 30 วินาที และ กลุ่มที่ได้รับการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำ 60 วินาที พบกว่ามีการแสดงออกของยีนออสทีโอแคลซินและยีนคอลลาเจนชนิดที่ 1 ในทุกช่วงเวลาที่ทำการศึกษาวิจัย

ภายหลังการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำ พบการแสดงออกของยีนออสทีโอแคลซินที่แตกต่างกันตามช่วงเวลาและระยะเวลาที่ทำการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำ แสดงดังภาพประกอบที่ 8 โดยที่ 7 วัน จะพบการแสดงออกของยีนออสทีโอแคลซินในกลุ่มที่ได้รับการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำ 30 วินาทีเพิ่มขึ้น 4.46 เท่าสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำ 60 วินาทีที่มีการเพิ่มขึ้น 3.11 เท่า ที่ 14 วัน พบการแสดงออกของยีนออสทีโอแคลซินในกลุ่มที่ได้รับการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำ 60 วินาทีเพิ่มขึ้น 18.24 เท่าสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำ 30 วินาทีที่มีการเพิ่มขึ้น 1.01 เท่า ที่ 21 วัน พบการแสดงออกของยีนออสทีโอแคลซินในกลุ่มที่ได้รับการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำ 60 วินาทีเพิ่มขึ้น 6.74 เท่าสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำ 30 วินาทีที่มีการเพิ่มขึ้น 1.04 เท่า



ภาพประกอบ 8 แสดงสัดส่วนการแสดงออกของยีนออสทีโอแคลซินที่ระยะเวลา 7, 14 และ 21 วัน เปรียบเทียบระหว่าง 3 กลุ่มการทดลอง คือ กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำ 30 วินาที และ กลุ่มที่ได้รับการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำ 60 วินาทีเปรียบเทียบกับยีนจีเอฟพีดีเอช และปรับให้กลุ่มควบคุมมีค่าเท่ากับ 1

การแสดงออกของยีนคอลลาเจนชนิดที่ 1 แตกต่างกันตามช่วงเวลาและระยะเวลาที่ทำการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำ แสดงดังภาพประกอบที่ 9 โดยที่ 7 วันจะพบการแสดงออกของยีนคอลลาเจนชนิดที่ 1 ในกลุ่มที่ได้รับการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำ 30 วินาทีลดลง 0.96 เท่ามากกว่ากลุ่มที่ได้รับการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำ 60 วินาทีที่มีการลดลง 0.33 เท่า ที่ 14 วัน พบการแสดงออกของยีนคอลลาเจนชนิดที่ 1 ในกลุ่มที่ได้รับการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำ 30 วินาทีลดลง 0.77 เท่า มากกว่ากลุ่มที่ได้รับการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำ 60 วินาทีที่มีการลดลง 0.62 เท่า ที่ 21 วัน พบการแสดงออกของยีนคอลลาเจนชนิดที่ 1 ในกลุ่มที่ได้รับการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำ 60 วินาทีเพิ่มขึ้น 4.84 เท่าสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำ 30 วินาทีที่มีการเพิ่มขึ้น 2.01 เท่า



ภาพประกอบ 9 แสดงสัดส่วนการแสดงออกของยีนคอลลาเจนชนิดที่ 1 ที่ระยะเวลา 7, 14 และ 21 วัน เปรียบเทียบระหว่าง 3 กลุ่มการทดลอง คือ กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำ 30 วินาที และ กลุ่มที่ได้รับการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำ 60 วินาทีเปรียบเทียบกับยีนจีเอฟพีดีเอช และปรับให้กลุ่มควบคุมมีค่าเท่ากับ 1

บทที่ 5

อภิปรายผล และ บทสรุปผล

หลายการศึกษาได้กล่าวถึงผลของเลเซอร์พลังงานต่ำที่มีผลกระตุ้นการทำงานทางชีวภาพต่อเซลล์ สามารถช่วยเพิ่มการทำงานของไมโทคอนเดรีย⁽⁹⁾, ช่วยในการหายจากการบาดเจ็บของเส้นประสาท, ลดปวด, เพิ่มการสร้างเส้นเลือด, ลดการอักเสบ, เกิดการขยายตัวของหลอดเลือด และส่งผลให้เกิดการหายของเนื้อเยื่อหรือแผล⁽⁶⁾ สำหรับเซลล์สร้างกระดูกเข้าพันมนุษย์เองก็มีการศึกษาอย่างแพร่หลายแต่ผลของการศึกษานั้นยังมีความขัดแย้งกันอยู่ และเซลล์สร้างกระดูกเข้าพันมนุษย์ที่เป็นเซลล์ปฐมภูมินั้นยังมีการศึกษาที่น้อย ทำให้ผู้วิจัยมีความสนใจที่จะทำการศึกษาเพิ่มเติมซึ่งเป็นการศึกษาในห้องปฏิบัติการถึงผลของเลเซอร์พลังงานต่ำที่มีต่อเซลล์สร้างกระดูกเข้าพันมนุษย์ซึ่งเป็นเซลล์ปฐมภูมิในแง่ของการเพิ่มจำนวนและเพิ่มการทำงานของเซลล์สร้างกระดูกเข้าพันมนุษย์

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าความมีชีวิตของเซลล์สร้างกระดูกเข้าพันมนุษย์ที่ได้รับการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำเป็นระยะเวลา 30 วินาที สูงกว่าเซลล์สร้างกระดูกเข้าพันที่ได้รับการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำเป็นระยะเวลา 60 วินาที และกลุ่มควบคุมที่ระยะเวลา 1 และ 3 วัน แต่อย่างไรก็ตามพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยยะสำคัญทางสถิติ และพบการแสดงออกของยีนคอลลาเจนชนิดที่ 1 และออกสทีโอแคลซินในระดับเมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอเพิ่มมากขึ้นเมื่อได้รับการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำเป็นระยะเวลา 60 วินาทีเมื่อเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีฤทธิ์เหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง ในขณะที่ไม่พบความแตกต่างของการเหนี่ยวนำให้เกิดการตกตะกอนแคลเซียมในจานเลี้ยงระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำที่เวลา 30 และ 60 วินาทีเมื่อกระตุ้นให้มีการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง

ผลการศึกษาในครั้งนี้เป็นไปในแนวทางการศึกษาก่อนหน้าของ Stein และคณะ⁽¹²⁾ ที่พบว่าเลเซอร์พลังงานต่ำนั้นมีผลกระตุ้นการทำงานทางชีวภาพต่อเซลล์สร้างกระดูกมนุษย์ในระยะ 72 ชั่วโมงแรกหลังการได้รับพลังงาน แต่ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยยะสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม เช่นเดียวกับการศึกษาของ Coombe และคณะในปี 2001⁽⁷⁾ ที่ไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ฉายเลเซอร์พลังงานต่ำที่ระดับพลังงานต่างๆกัน ในการกระตุ้นให้เกิดการเพิ่มจำนวนและการทำงานของเซลล์สร้างกระดูกมนุษย์ สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Bouvet-Gerbetaz และคณะ⁽²⁷⁾ ที่ไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำในการกระตุ้นให้เกิดการเพิ่มจำนวนและเปลี่ยนแปลงรูปร่างจากเซลล์ต้นกำเนิดไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกแต่อย่างใด ในขณะเดียวกันผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ก็มีความขัดแย้งกับบางการศึกษา^(8, 11, 28) ที่พบว่าเลเซอร์พลังงานต่ำชนิดเลเซอร์สีแดงมีผลกระตุ้นการทำงานทางชีวภาพ

ต่อเซลล์สร้างกระดูกกระตุ้นให้เซลล์มีการเพิ่มจำนวนมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยยะสำคัญทางสถิติ ผลที่ขัดแย้งกันนี้อาจมีสาเหตุมาจากระดับพลังงาน, ความยาวคลื่น, ความถี่ในการฉายเลเซอร์ของแต่ละการศึกษา อื่นๆ ซึ่งประสิทธิภาพของเลเซอร์นั้นขึ้นอยู่กับ 3 ปัจจัย คือ ความยาวคลื่น, ความหนาแน่นพลังงาน และ ความถี่ในการฉายเลเซอร์ โดยเลเซอร์ที่มีความยาวคลื่นสูง (830 นาโนเมตร) จะให้ผลในการกระตุ้นการทำงานของไมโทคอนเดรียได้มากกว่าเลเซอร์ที่มีความยาวคลื่นต่ำ (685 นาโนเมตร)⁽²⁹⁾ ส่วนความหนาแน่นพลังงานที่สูงมากกว่า 2 วัตต์ จะส่งผลเสียต่อเซลล์สร้างกระดูกได้เนื่องจากพลังงานที่สูงเกินไปจะทำให้เกิดสารอนุมูลอิสระ (free radicals) ไปรบกวนภาวะสมดุล (homeostasis) ภายในเซลล์^(11, 30) และจะไม่พบการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างกระดูกเมื่อทำการฉายเลเซอร์เพียงครั้งเดียว เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมหรือกลุ่มที่ได้รับการฉายเลเซอร์มากกว่า 1 ครั้ง⁽³¹⁾ ซึ่งสามารถนำมาอธิบายผลการทดลอง MTT assay ในการศึกษาครั้งนี้ที่พบว่ากลุ่มทดลองที่ได้รับการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำมีการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมเนื่องจากได้รับการฉายเลเซอร์เพียง 1 ครั้งก่อนจะทำการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์สร้างกระดูกเข้าพื้นมนุษย์ที่ระยะเวลา 1, 3 และ 7 วันภายหลังการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำ

ปริมาณความมีชีวิตของเซลล์ที่ลดลงที่ระยะเวลา 7 วัน เมื่อทำการทดสอบด้วย MTT assay อาจจะเป็นผลมาจากการเพาะเซลล์เริ่มต้นด้วยความหนาแน่น 2×10^3 cells/well⁽⁸⁾ หลังจากนั้นรอให้เซลล์เกิดการยึดเกาะเป็นเวลา 2 วัน ก่อนเริ่มทำการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำ จำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาจนมากเกินความจุของถาดเลี้ยงเซลล์แบบ 96 หลุมจนทำให้เซลล์บางส่วนไม่มีพื้นที่ยึดเกาะและตายไป รวมถึงระยะเวลาที่ทำการศึกษาได้แก่ 1, 3 และ 7 วัน ซึ่งระยะเวลาโดยรวมนานกว่าการศึกษาส่วนใหญ่ที่ทำการศึกษาความมีชีวิตของเซลล์ด้วย MTT assay ที่ระยะเวลา 1, 2 และ 3 วันเท่านั้น^(8, 10-12, 28, 32)

การตกตะกอนของแคลเซียมด้วยการย้อมสีอะลิซารินเรดเอส นั้นเริ่มพบการย้อมติดสีแดงของตะกอนของแคลเซียมอย่างชัดเจนที่ระยะเวลา 14 วัน สอดคล้องกับการศึกษาของ Dortbudak และคณะ⁽³³⁾ ที่รายงานว่าพบการเพิ่มขึ้นของการสร้างเนื้อกระดูกอย่างชัดเจนระหว่างวันที่ 12 และ 16 วัน หลังฉายเลเซอร์ ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้ก็ได้ผลการศึกษาที่สอดคล้อง คือพบการตกตะกอนของแคลเซียมอย่างชัดเจนที่ระยะเวลา 14 วัน และพบการตกตะกอนเพิ่มมากขึ้นที่ระยะเวลา 21 วัน แต่ไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำเป็นระยะเวลา 30 วินาที และ 60 วินาทีแต่อย่างใด ซึ่งการวัดปริมาณของแคลเซียมที่ตกตะกอนอย่างละเอียดเพื่อศึกษาผลของเลเซอร์พลังงานต่ำต่อการกระตุ้นให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อแข็งนั้นอาจจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในอนาคต

การแสดงผลออกในระดับเมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอของยีนออกัสทีโอแคลซินและคอลลาเจนชนิดที่ 1 จัดว่าเป็นตัวชี้วัดการทำงานของเซลล์สร้างกระดูกที่มีความจำเพาะ การแสดงผลออกของยีนที่เพิ่มขึ้นเป็นตัวบ่งชี้ว่าเซลล์สร้างกระดูกมีการทำงานเพิ่มขึ้น โดยในการศึกษาครั้งนี้พบว่าในกลุ่มที่ได้รับการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำเป็นระยะเวลา 60 วินาที จะมีการแสดงผลออกในระดับเมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอของยีนออกัสทีโอแคลซินและคอลลาเจนชนิดที่ 1 เพิ่มขึ้น โดยยีนออกัสทีโอแคลซินจะพบสูงที่สุดที่ระยะเวลา 14 วัน และยีนคอลลาเจนชนิดที่ 1 จะพบการแสดงผลออกสูงสุดที่ระยะเวลา 21 วัน สำหรับกลุ่มที่ฉายเลเซอร์พลังงานต่ำเป็นระยะเวลา 30 วินาที พบว่ามีการการแสดงผลออกในระดับเมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอของยีนออกัสทีโอแคลซินเพิ่มขึ้นที่ระยะเวลา 7 วัน ส่วนที่ระยะเวลา 14 และ 21 วันมีการแสดงผลออกของยีนออกัสทีโอแคลซินไม่ต่างจากกลุ่มควบคุม การแสดงผลออกที่เพิ่มขึ้นสำหรับยีนคอลลาเจนชนิดที่ 1 ที่ระยะเวลา 7 และ 14 วันไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ในขณะที่ระยะเวลา 21 วันมีการแสดงผลออกเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่น้อยกว่ากลุ่มที่ฉายเป็นระยะเวลา 60 วินาที สอดคล้องกับการศึกษาของ Oliverira และคณะ⁽⁸⁾ และ Stein และคณะ⁽¹²⁾ ที่พบการแสดงผลออกของในระดับเมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอของยีนคอลลาเจนชนิดที่ 1 เพิ่มขึ้นเมื่อได้รับการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม สำหรับการแสดงผลออกของในระดับเมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอของออกัสทีโอแคลซินสำหรับกลุ่มที่ได้รับการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำเป็นระยะเวลา 30 วินาทีนั้น สอดคล้องกับการศึกษาของ Bouvet-Gerbettaz และคณะ⁽²⁷⁾ ที่พบว่าการแสดงผลออกของในระดับเมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอของออกัสทีโอแคลซินไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ระยะเวลา 14 วัน แต่ผลสำหรับกลุ่มที่ได้รับการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำเป็นระยะเวลา 60 วินาทีนั้นมีความขัดแย้งคือพบการแสดงผลออกของในระดับเมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอของออกัสทีโอแคลซินสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ระยะเวลา 14 วัน ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากความถี่ในการฉายเลเซอร์, ความยาวคลื่น และปริมาณพลังงานของเลเซอร์ที่แตกต่างกัน

กลไกของเลเซอร์ในการกระตุ้นการทำงานทางชีวภาพต่อเซลล์นั้นยังไม่ทราบแน่ชัด แต่จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเลเซอร์สามารถส่งผลให้เกิดการเพิ่มขนาดและจำนวนของไมโทคอนเดรีย⁽³⁴⁾ ทำให้อัตราส่วนระหว่างเอดีพีต่อเอทีพี (ADP:ATP) เปลี่ยนแปลง, มีการเพิ่มขึ้นของอัตราส่วนระหว่างดีเอ็นเอต่ออาร์เอ็นเอ (DNA:RNA), เกิดการกระตุ้นนิวคลีโอไทด์ (nucleotide activation) ภายในเซลล์, เกิดการจัดรูปแบบใหม่ของเส้นใยโครมาติน (chromatin rearrangement)^(35, 36) ทำให้ไมโทคอนเดรียมีการสังเคราะห์โปรตีนและเอทีพีเพิ่มขึ้น ซึ่งการเปลี่ยนแปลงระดับเซลล์ที่เกิดขึ้นส่งผลให้เกิดการเพิ่มจำนวนหรือเพิ่มการทำงานของเซลล์ได้⁽⁹⁾ แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Yamada และคณะ⁽³⁷⁾ พบว่าไม่ใช่เซลล์ทุกชนิดจะมีการตอบสนองต่อเลเซอร์เหมือนกัน แต่ขึ้นอยู่กับระยะของเซลล์ในเวลานั้นๆ โดยเลเซอร์จะมีผลกระทบกระตุ้นทำงานทางชีวภาพต่อเซลล์ที่อยู่ในระยะเติบโต (growing phase) ได้มากกว่า สอดคล้องกับการศึกษาที่พบว่าเลเซอร์พลังงานต่ำสามารถกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลง

จาก non-differentiated mesenchymal cells ไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกได้อย่างรวดเร็ว ในขณะที่จะไม่มีผลกระตุ้นในเซลล์ที่อยู่ในสภาวะปกติ หรืออาจกล่าวได้คือ หากทำการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำไปยังบริเวณที่มีอาการบาดเจ็บหรืออักเสบ เช่นกระดูกหัก จะมีการหลั่งโกรทแฟคเตอร์, การสร้างเนื้อกระดูกและเส้นเลือดใหม่เพิ่มมากขึ้นส่งผลให้เกิดการหายของเนื้อเยื่อที่เร็วขึ้น⁽³⁸⁾ ในขณะที่หากทำการฉายเลเซอร์ไปยังบริเวณของเนื้อเยื่อที่ปกติจะไม่พบการเปลี่ยนแปลงนั่นเอง ซึ่งในกรณีนี้ทำการผ่าตัดปลายรากฟันนั้น เนื้อเยื่อกระดูกในบริเวณที่มีพยาธิสภาพจะมีการอักเสบอยู่ก่อนแล้ว แต่เซลล์ที่ใช้ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้อยู่ในสภาวะที่ปกติไม่มีการกระตุ้นด้วยสารอักเสบใดๆ ดังนั้นผลการศึกษาในห้องปฏิบัติการอาจไม่สามารถจำลองลักษณะและการตอบสนองของเซลล์สร้างกระดูกในทางคลินิกได้อย่างแม่นยำและจำเป็นต้องได้รับการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปในอนาคต

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้เลเซอร์พลังงานต่ำชนิดไดโอดเลเซอร์ (Helbo, Bredent, Germany) ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร พลังงานส่งออกจากตัวเครื่องโดยเฉลี่ย 100 มิลลิวัตต์ ความหนาแน่นพลังงาน 8 จูลต่อตารางเซนติเมตร พลังงานโดยรวมทั้งหมด 6 จูล เมื่อฉายด้วยความยาวคลื่นต่อเนื่อง (continuous wave) เป็นระยะเวลา 60 วินาที⁽³⁹⁾ และเมื่อฉายเป็นระยะเวลา 30 วินาที พลังงานโดยรวมทั้งหมดคือ 3 จูล วัตถุประสงค์หลักของไดโอดเลเซอร์ชนิดนี้คือการใช้เป็นโฟโตไดนามิกเทอราปีร่วมกับสารไวต่อแสง (photosensitizer) เพื่อกำจัดเชื้อแบคทีเรียหรือเซลล์เป้าหมาย โดยมีหลักการคือให้สารไวต่อแสงซึ่งเป็นสารเคมีที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเนื้อเยื่อถูกดูดซึมเข้าสู่เนื้อเยื่อเป้าหมายที่จำเพาะด้วยความเข้มข้นต่ำ จากนั้นฉายเลเซอร์พลังงานต่ำในช่วงคลื่นที่สารไวต่อแสงสามารถดูดซับพลังงานในช่วงนั้นจากเลเซอร์ได้ทำให้เกิด ปฏิกิริยาการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอนระหว่างสารไวต่อแสงกับโมเลกุลของสารอินทรีย์ในเซลล์จุลชีพทำให้เกิดสารอนุมูลอิสระ จากนั้นสารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับโมเลกุลออกซิเจนที่อยู่ภายในเกิดเป็น reactive oxygen species ซึ่งมีผลทำลายเซลล์เป้าหมาย⁽⁴⁰⁾ แต่เนื่องจากช่วงระดับพลังงานและความยาวคลื่นของเลเซอร์อยู่ในช่วงของเลเซอร์พลังงานต่ำ ทำให้ผู้วิจัยมีความสนใจที่จะนำเครื่องเลเซอร์ชนิดนี้มาทำการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมถึงประโยชน์ นอกเหนือจากการนำมาใช้เพื่อกำจัดเชื้อจุลชีพในทางทันตกรรมด้วยวิธีโฟโตไดนามิก แนวคิดนี้ถูกสนับสนุนด้วยการศึกษาของ Usumez และคณะ⁽³⁹⁾ ที่นำเลเซอร์พลังงานต่ำชนิดนี้ (Helbo, Bredent, Germany) มาใช้ในการรักษาเยื่อเมือกอักเสบ (mucositis) ในหนูโดยไม่ได้ใช้สารไวต่อแสงร่วมด้วยเปรียบเทียบกับเลเซอร์ที่มีความยาวคลื่นต่างกันและกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการฉายเลเซอร์ พบว่าการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำที่มีความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เป็นระยะเวลา 60 วินาทีทุกวันเป็นเวลา 4 วันสามารถกระตุ้นการหลั่งของโกรทแฟคเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการหายของแผลเพิ่มมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการฉายเลเซอร์ เป็นต้น สอดคล้องกับหลายการศึกษา^{(13, 32)(8)} ที่พบว่าเลเซอร์พลังงานต่ำมีผลเพิ่มการแสดงออกของยีนออกซาลิเจน, ยีนคอลลาเจนชนิดที่ 1 และทรานสฟอร์มมิงโกรทแฟคเตอร์เบต้า 1 (TGF-β1) เพื่อให้เกิดการหายของกระดูก

เลเซอร์พลังงานต่ำเป็นอีกหนึ่งเครื่องมือที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์และในทางทันตกรรมได้เนื่องจากเป็นขั้นตอนที่ง่าย ไม่ซับซ้อน และไม่ทำให้ได้รับบาดเจ็บ (noninvasive) จากขบวนการรักษา ซึ่งอาจสามารถนำมาประยุกต์ใช้ประโยชน์ในทางคลินิก เช่นการผ่าตัดปลายรากฟัน การฉายเลเซอร์พลังงานต่ำไปยังบริเวณกระดูกที่ทำการผ่าตัดอาจช่วยกระตุ้นให้เกิดการหายของกระดูกรวมไปถึงเนื้อเยื่ออ่อนในบริเวณนั้นได้ดียิ่งขึ้น ความสำเร็จในการฉายเลเซอร์นั้นเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการตอบสนองของเซลล์ แต่อย่างไรก็ตามในแง่ของการผ่าตัดปลายรากฟันการฉายเลเซอร์โดยตรงไปยังเซลล์กระดูกนั้นสามารถทำได้เพียงหนึ่งครั้งคือครั้งที่ทำการผ่าตัดเท่านั้น แต่หากพิจารณาในแง่ของเนื้อเยื่ออ่อนในบริเวณที่ทำให้เกิดการการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำไปยังบริเวณดังกล่าวสามารถทำได้หลายครั้งและสามารถกระตุ้นให้เกิดการหายของเนื้อเยื่ออ่อนได้ดีมากยิ่งขึ้น นอกจากนี้ยังจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงการนำเลเซอร์พลังงานต่ำไปใช้ในการรักษาคลองรากฟัน เช่น การนำมาใช้ร่วมกับการรักษากรณีที่มีการละลายของรากฟัน เป็นต้น

แต่อย่างไรก็ตามในปัจจุบันผลการศึกษาของเลเซอร์พลังงานต่ำต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างกระดูกนั้นยังไม่สามารถสรุปได้แน่ชัดเนื่องจากแหล่งกำเนิดแสงเลเซอร์, ความยาวคลื่น, ปริมาณพลังงานส่งออก, ระยะเวลา, ขั้นตอนในการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำ, ชนิดของอาหารเลี้ยงเซลล์ รวมถึงชนิดของเซลล์สร้างกระดูกมนุษย์ในแต่ละศึกษานั้นยังมีความหลากหลายและแตกต่างกันไม่สามารถนำมาเปรียบเทียบกันได้อย่างชัดเจน รวมไปถึงยังมีข้อจำกัดในเรื่องของเลเซอร์บางยี่ห้อที่ไม่มีการจัดจำหน่ายให้ใช้ในประเทศไทย ทำให้ยังไม่สามารถได้ข้อสรุปหรือกระบวนการที่เป็นมาตรฐานสำหรับการศึกษาวิจัยหรือนำไปประยุกต์ใช้ในทางคลินิกเพื่อส่งเสริมให้เกิดการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างกระดูกและการสร้างกระดูกทดแทนในตำแหน่งที่มีพยาธิสภาพหรือการวิการของกระดูก ส่งเสริมให้เกิดการหายและเพิ่มอัตราการความสำเร็จในการรักษาต่อไป

บทสรุป

ภายใต้สภาวะของการวิจัยในครั้งนี้พบว่า เลเซอร์พลังงานต่ำความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร พลังงานส่งออกจากตัวเครื่องโดยเฉลี่ย 100 มิลลิวัตต์ ความหนาแน่นพลังงาน 8 จูลต่อตารางเซนติเมตร มีผลช่วยในการกระตุ้นให้เกิดการเพิ่มจำนวนและการทำงานของเซลล์สร้างกระดูกเข้าพินมนุษย์จากการแสดงออกของยีนออกสทีโอแคลซินและคอลลาเจนชนิดที่ 1 ที่เพิ่มขึ้น นำไปสู่การสร้างเนื้อกระดูกและการหายกระดูกต่อไป



บรรณานุกรม

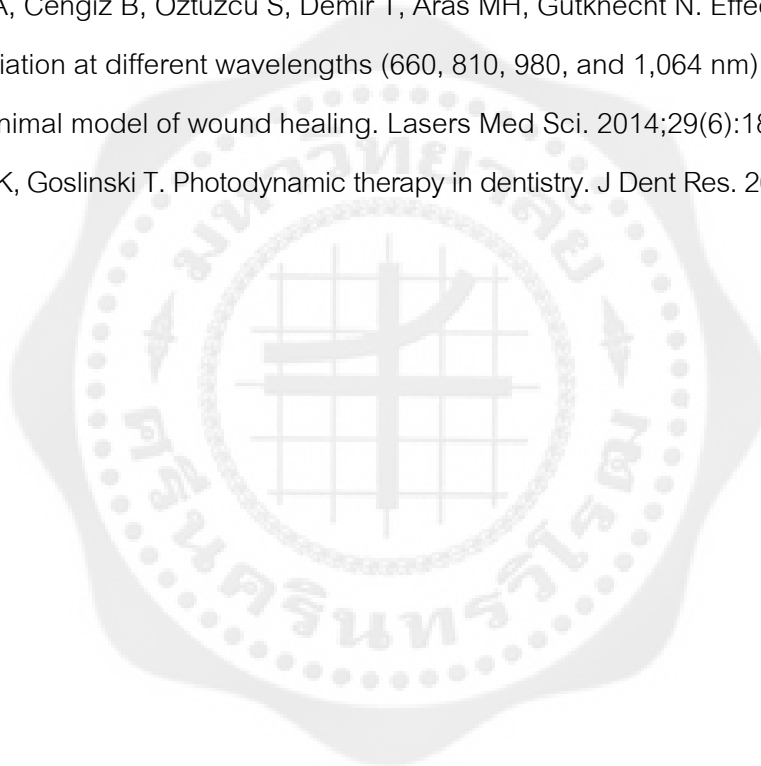
บรรณานุกรม

1. Siqueira JF, Jr. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *Int Endod J.* 2001;34(1):1-10.
2. P.N. N. Non-microbial etiology: foreign body reaction maintaining post-treatment apical periodontitis. *Endodontic Topics.* 2003;6(1):114-34.
3. Kim S, Kratchman S. Modern endodontic surgery concepts and practice: a review. *J Endod.* 2006;32(7):601-23.
4. Seibel MJ. Biochemical markers of bone turnover: part I: biochemistry and variability. *Clin Biochem Rev.* 2005;26(4):97-122.
5. Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008;3 Suppl 3:S131-9.
6. AlGhamdi KM, Kumar A, Moussa NA. Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. *Lasers Med Sci.* 2012;27(1):237-49.
7. Coombe AR, Ho CT, Darendeliler MA, Hunter N, Philips JR, Chapple CC, et al. The effects of low level laser irradiation on osteoblastic cells. *Clin Orthod Res.* 2001;4(1):3-14.
8. Oliveira FA, Matos AA, Santesso MR, Tokuhara CK, Leite AL, Bagnato VS, et al. Low intensity lasers differently induce primary human osteoblast proliferation and differentiation. *J Photochem Photobiol B.* 2016;163:14-21.
9. Pires Oliveira DA, de Oliveira RF, Zangaro RA, Soares CP. Evaluation of low-level laser therapy of osteoblastic cells. *Photomed Laser Surg.* 2008;26(4):401-4.
10. Xu Y, Young MJ, Battaglino RA, Morse LR, Fontana CR, Pagonis TC, et al. Endodontic antimicrobial photodynamic therapy: safety assessment in mammalian cell cultures. *J Endod.* 2009;35(11):1567-72.
11. Huertas RM, Luna-Bertos ED, Ramos-Torrecillas J, Leyva FM, Ruiz C, Garcia-Martinez O. Effect and clinical implications of the low-energy diode laser on bone cell proliferation. *Biol Res Nurs.* 2014;16(2):191-6.
12. Stein E, Koehn J, Sutter W, Wendtlandt G, Wanschitz F, Thurnher D, et al. Initial effects of low-level laser therapy on growth and differentiation of human osteoblast-like cells. *Wien Klin Wochenschr.* 2008;120(3-4):112-7.

13. Khadra M, Lyngstadaas SP, Haanaes HR, Mustafa K. Effect of laser therapy on attachment, proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells cultured on titanium implant material. *Biomaterials*. 2005;26(17):3503-9.
14. Hoshi K, Komori T, Ozawa H. Morphological characterization of skeletal cells in Cbfa1-deficient mice. *Bone*. 1999;25(6):639-51.
15. Neve A, Corrado A, Cantatore FP. Osteoblast physiology in normal and pathological conditions. *Cell Tissue Res*. 2011;343(2):289-302.
16. Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Barone LM, Wilming L, Tassinari MS, et al. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol*. 1990;143(3):420-30.
17. Franz-Odenaal TA, Hall BK, Witten PE. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn*. 2006;235(1):176-90.
18. Graves DT, Oates T, Garlet GP. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *J Oral Microbiol*. 2011;3.
19. Walsh LJ. The current status of laser applications in dentistry. *Aust Dent J*. 2003;48(3):146-55; quiz 98.
20. Walsh LJ. The current status of low level laser therapy in dentistry. Part 2. Hard tissue applications. *Aust Dent J*. 1997;42(5):302-6.
21. Walsh LJ. The current status of low level laser therapy in dentistry. Part 1. Soft tissue applications. *Aust Dent J*. 1997;42(4):247-54.
22. Ginani F, Soares DM, Barreto MP, Barboza CA. Effect of low-level laser therapy on mesenchymal stem cell proliferation: a systematic review. *Lasers Med Sci*. 2015;30(8):2189-94.
23. Reichert JC, Gohlke J, Friis TE, Quent VM, Huttmacher DW. Mesodermal and neural crest derived ovine tibial and mandibular osteoblasts display distinct molecular differences. *Gene*. 2013;525(1):99-106.
24. Reichert JC, Gohlke J, Friis TE, Quent VM, Huttmacher DW. Mesodermal and neural crest derived ovine tibial and mandibular osteoblasts display distinct molecular differences. *Gene*. 2013;525(1):99-106.

25. Bolton P, Young S, Dyson M. The Direct effect of 860 nm Light on cell proliferation and on succinic dehydrogenase activity of human fibroblasts in vitro. *Laser Therapy*. 1995;7:55-60.
26. Shimauchi H, Takayama S, Miki Y, Okada H. The change of periapical exudate prostaglandin E2 levels during root canal treatment. *J Endod*. 1997;23(12):755-8.a
27. Bouvet-Gerbettaz S, Merigo E, Rocca JP, Carle GF, Rochet N. Effects of low-level laser therapy on proliferation and differentiation of murine bone marrow cells into osteoblasts and osteoclasts. *Lasers Surg Med*. 2009;41(4):291-7.
28. Stein A, Benayahu D, Maltz L, Oron U. Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. *Photomed Laser Surg*. 2005;23(2):161-6.
29. de Castro JL, Pinheiro AL, Werneck CE, Soares CP. The effect of laser therapy on the proliferation of oral KB carcinoma cells: an in vitro study. *Photomed Laser Surg*. 2005;23(6):586-9.
29. de Castro JL, Pinheiro AL, Werneck CE, Soares CP. The effect of laser therapy on the proliferation of oral KB carcinoma cells: an in vitro study. *Photomed Laser Surg*. 2005;23(6):586-9.
30. Howard D, Sturtevant B. In vitro study of the mechanical effects of shock-wave lithotripsy. *Ultrasound Med Biol*. 1997;23(7):1107-22.
31. Ozawa Y, Shimizu N, Kariya G, Abiko Y. Low-energy laser irradiation stimulates bone nodule formation at early stages of cell culture in rat calvarial cells. *Bone*. 1998;22(4):347-54.
32. Pyo SJ, Song WW, Kim IR, Park BS, Kim CH, Shin SH, et al. Low-level laser therapy induces the expressions of BMP-2, osteocalcin, and TGF-beta1 in hypoxic-cultured human osteoblasts. *Lasers Med Sci*. 2013;28(2):543-50.
33. Dortbudak O, Haas R, Mallath-Pokorny G. Biostimulation of bone marrow cells with a diode soft laser. *Clin Oral Implants Res*. 2000;11(6):540-5.
34. Carnevalli CM, Soares CP, Zangaro RA, Pinheiro AL, Silva NS. Laser light prevents apoptosis in Cho K-1 cell line. *J Clin Laser Med Surg*. 2003;21(4):193-6.
35. Bortoletto R, Silva NS, Zangaro RA, Pacheco MT, Da Matta RA, Pacheco-Soares C. Mitochondrial membrane potential after low-power laser irradiation. *Lasers Med Sci*. 2004;18(4):204-6.

36. Karu T, Pyatibrat L, Kalendo G. Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. *J Photochem Photobiol B*. 1995;27(3):219-23.
37. Yamada K. Biological effects of low power laser irradiation on clonal osteoblastic cells (MC3T3-E1). *Nihon Seikeigeka Gakkai Zasshi*. 1991;65(9):787-99.
38. Pinheiro AL, Gerbi ME. Photoengineering of bone repair processes. *Photomed Laser Surg*. 2006;24(2):169-78.
38. Pinheiro AL, Gerbi ME. Photoengineering of bone repair processes. *Photomed Laser Surg*. 2006;24(2):169-78.
39. Usumez A, Cengiz B, Oztuzcu S, Demir T, Aras MH, Gutknecht N. Effects of laser irradiation at different wavelengths (660, 810, 980, and 1,064 nm) on mucositis in an animal model of wound healing. *Lasers Med Sci*. 2014;29(6):1807-13.
40. Konopka K, Goslinski T. Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res*. 2007;86(8):694-707.



ภาคผนวก



ภาคผนวก ก

การวิเคราะห์ข้อมูลการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์สร้างกระดูกเข้าพื้มนุษย์
เมื่อได้รับการฉายเลเซอร์พลังงานต่ำ

ตารางสถิติเชิงพรรณนา

Descriptive Statistics

Dependent Variable: OD

Time	Group	Mean	Std. Deviation	N
1day	control	.31233	.102632	3
	30S	.40200	.091935	3
	60S	.38767	.106959	3
	Total	.36733	.096677	9
3day	control	.77467	.061720	3
	30S	.88033	.043317	3
	60S	.67500	.178065	3
	Total	.77667	.131361	9
7day	control	.46300	.074478	3
	30S	.56500	.319700	3
	60S	.61333	.175420	3
	Total	.54711	.197609	9
Total	control	.51667	.216035	9
	30S	.61578	.269230	9
	60S	.55867	.188788	9
	Total	.56370	.222133	27

ตารางการวิเคราะห์หลายกลุ่มด้วยสถิติพหุคูณอะโนวา

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: OD

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Corrected Model	.870 ^a	8	.109	4.745	.003	.678
Intercept	8.580	1	8.580	374.208	.000	.954
Time	.758	2	.379	16.524	.000	.647
Group	.045	2	.022	.971	.398	.097
Time * Group	.068	4	.017	.741	.576	.141
Error	.413	18	.023			
Total	9.862	27				
Corrected Total	1.283	26				

a. R Squared = .678 (Adjusted R Squared = .535)

ตารางการเปรียบเทียบคุณ

Post Hoc (Dunnett's correction) : time

Multiple Comparisons

Dependent Variable: OD

Dunnett t (2-sided)^a

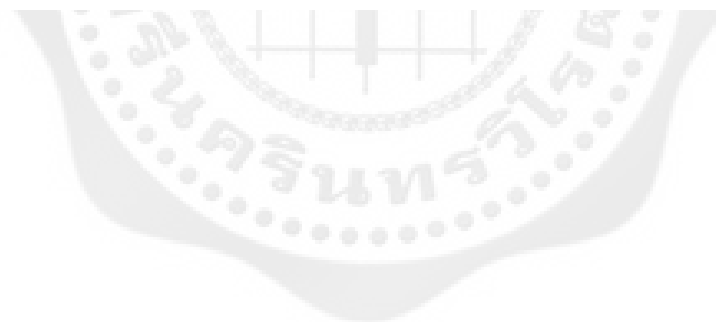
(I) Time	(J) Time	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1day	7day	-.17978 [*]	.071379	.039	-.35098	-.00857
3day	7day	.22956 [*]	.071379	.009	.05835	.40076

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .023.

*. The mean difference is significant at the

a. Dunnett t-tests treat one group as a control, and compare all other groups against it.



ตารางการเทียบพหุคูณ

Post Hoc (Dunnett's correction) : group

Multiple Comparisons

Dependent Variable: OD

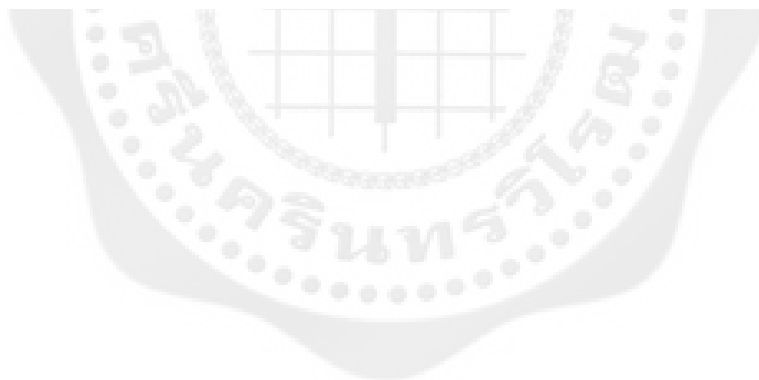
Dunnett t (2-sided)^a

(I) Group	(J) Group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
control	60S	-.04200	.071379	.783	-.21321	.12921
30S	60S	.05711	.071379	.645	-.11410	.22832

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .023.

a. Dunnett t-tests treat one group as a control, and compare all other groups against it.





ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	ณัฐริดา ตังคณิตานนท์
วัน เดือน ปีเกิด	19 สิงหาคม 2531
สถานที่เกิด	ขอนแก่น
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	480/57 ซอยเพชรบุรี 18 เขตราชเทวี กรุงเทพมหานคร 10400
ตำแหน่งหน้าที่การทำงาน	ทันตแพทย์
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	คลินิกเอกชน
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ.2549	ระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย จาก โรงเรียนเตรียมอุดมศึกษา
พ.ศ. 2555	ระดับปริญญาตรี ทันตแพทยศาสตรบัณฑิต คณะทันตแพทยศาสตร์ จาก มหาวิทยาลัยมหิดล
พ.ศ.2560	ระดับปริญญาโท วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (ทันตกรรมคลินิก) (วิทยาเอ็นโดดอนต์) คณะทันตแพทยศาสตร์ จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ