

Nd:YAG LAZER UYGULANMASININ OSTEOLAST HÜCRE AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ

EFFECTS OF Nd:YAG LASER IRRADIATION ON OSTEOLAST CELLULAR ACTİVİTY

*Hacer DENİZ ARISU**

Emin TÜRKÖZ†

Oya BALA†

ÖZET

Amaç: Bu çalışmanın amacı Nd:YAG lazerlerin farklı frekans ve güçlerde uygulanmasının periapikal bölgede, özellikle alveoler kemik dokuda, hücresel boyutta meydana getirebileceği değişikliklerin hücre kültür yöntemleri kullanılarak incelenmesidir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada insan osteoblast benzeri devamlı hücre kültürü Saos-2 kullanıldı. Nd:YAG lazer hücre kültürleri üzerine temassız şekilde 20-120 mJ, 10-30 Hz ve 0.2-3.6 W ayarlarında 10 saniye süreyle uygulandı. Aynı şekilde Nd:YAG lazerin rehber ışığı olarak kullanılan He-Ne lazer, hücre kültürleri üzerine temassız şekilde 10 saniye süreyle uygulandı. 7, 14 ve 21 günlük inkübasyon döneminden sonra hücresel aktivite Alkalen fosfataz (ALP) ve osteokalsin ölçümleriyle değerlendirildi.

Bulgular: ALP aktiviteleri karşılaştırıldığında 20 mJ, 10 Hz, 10 saniye ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$). Diğer gruplar arasındaki fark anlamlı bulundu ($p<0.05$). ALP ve osteokalsin ortalama değerlerine göre bir değerlendirme yapıldığında, lazerin atım enerjisi ve enerji çıkışının artırılmasının osteoblast hücre kültürleri üzerinde negatif bir etki oluşturduğu görüldü.

Sonuç: Eğer atım enerji miktarı ve enerji çıkışı, amaçlanan tedavi için yeterliyse en düşük ayarları seçmek doğru yöntem olacaktır.

Anahtar kelimeler: Nd:YAG lazer, He-Ne lazer, ALP, osteokalsin, hücre kültürü

SUMMARY

Objective: The aim of this study was to evaluate the effects of Nd:YAG laser usage on alveolar bone at cellular level by using cell culture methods.

Material and Method: In this study we used Nd:YAG laser on human osteoblast like cell line Saos-2 in a non-contact mode for 10 seconds with 20-120 mJ, 10-30 Hz, and 0.2-3.6 W parameters. He-Ne laser which is the guide light of Nd:YAG laser was used in a non-contact mode for 10 seconds. After 7, 14 and 21 day incubation period, cellular activity was assessed with Alkaline phosphatase (ALP) and osteocalcin measurements.

Results: When ALP activities were compared, there was no statistically difference between 20 mJ, 10 Hz, 10 seconds and control group. The difference between all other groups were also significant ($p<0.05$). When average ALP and osteocalcin activities were compared, increase in the pulse energy and power output had a negative effect on human osteoblast like cell cultures.

Conclusion: It was concluded that; usage of the lowest parameters should be chosen if the pulse energy and power output was appropriate for the suggested therapy.

Key words: Nd: YAG laser, He-Ne laser, ALP, osteocalcin, cell culture

Makale Gönderiliş Tarihi : 17.04.2006

Yayına Kabul Tarihi: 24.07.2006

Bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu Sağlık Bilimleri Araştırma Grubu tarafından desteklenmiştir.

** Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Diş Hastalıkları ve Tedavisi Anabilim Dalı, Dr.*

† Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Diş Hastalıkları ve Tedavisi Anabilim Dalı, Prof. Dr.

GİRİŞ

Son yıllarda lazer diş hekimliği alanında sıklıkla kullanılan bir teknik haline gelmiştir^{21,26,35,36}. Özellikle Nd:YAG lazer sistemleri, lazer ışınının çok ince fiber optik kablolar yardımıyla iletilmesi nedeniyle, kök kanal tedavilerini de içeren pek çok alanda kullanılabilir. Nd:YAG lazerin kök kanallarını steril edebilmesi, smear ve debris uzaklaştırabilmesi ve dentin tübüllerini tıkayabilmesi bu cihazın sağladığı avantajların bir kısmıdır^{21,35,36}.

Değişik tipteki lazerlerin kök kanal sistemi üzerindeki etkileriyle ilgili pek çok araştırma yapılmış olmasına rağmen, bu lazerlerin hücresel düzeyde meydana getirdiği morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerle ilgili çok az araştırma mevcuttur^{15,16}. Bu etkilerin *in vivo* yerine, hücre kültürleri kullanılarak *in vitro* olarak değerlendirilmesi, standart deney işlemlerinin gerçekleştirilebilmesi, kısa sürede sonuç alınabilmesi, deneylerin maliyetlerinin daha düşük olması ve sayısal değerler elde edilebilmesi gibi avantajlar sağlamaktadır^{4,20,33}. Kemik dokusuyla ilgili *in vitro* biyoyumluluk deneylerinden pek çoğu, insan kaynaklı olmayan primer kemik hücreleriyle veya devamlı hücre kültürleriyle yapılmaktadır.

Kemik yapımının geleneksel ölçütü, total serum ALP aktivitesidir. ALP hücre membranlarının ekstrasellüler yüzeyindeki glukozil-fosfatidilinozitol kalıntılarına sıkıca bağlanan bir glukoproteindir. İskeletin ALP'ı osteoblastların membranında yerleşmiştir ve henüz anlaşılmayan bir mekanizma ile dolaşıma salgılanır¹⁰. Osteoblastlar aktif olarak kemik matriksini depolamaları sırasında, çok miktarda alkalen fosfataz salgırlar. Bu fosfatazın inorganik fosfat konsantrasyonunu arttırdığı ya da kollejen liflerini, kalsiyum tuzlarının depolanmasını sağlayacak şekilde aktive ettiği sanılmaktadır. Alkalen fosfataz düzeyi, genellikle kemik yapım hızının bir göstergesi olarak kabul edilmektedir¹⁹. Alkalen fosfataz enziminin temel rolü kemik yapımının başlatılmasını sağlamaktır¹².

Osteokalsin, kemiğe özgün kabul edilen ilk kemik matriksi proteinidir^{5,10,28}. Olgun osteoblastlar, odontoblastlar ve hipertrofik kondrositler tarafından sentezlenir, sonra kemik ve dentin matriksine sokulur ve hidroksilapatite bağlanır. Buna göre; yeni sentezlenen osteokalsin öncelikle kemiğin ekstrasellüler matriksinde depolanır, ancak küçük bir kısmı dolaşıma salgılanır ve normalde kemik rezorpsiyonu sırasında salgılanmadığından, osteoblastik aktiviteye özgün bir göstergedir¹¹.

Bu çalışmanın amacı kök kanallarını steril ederek periapikal dokuların iyileşmesine yardımcı olan Nd:YAG lazer sisteminin farklı frekans ve güçlerde uygulanmasının, diş kökleri etrafında bulunan alveoler kemik dokusunda

hücresel düzeyde meydana getireceği değişikliklerin, periapikal lezyonların iyileşmesi üzerinde olumlu bir etki sağlayıp sağlayamayacağını, insan osteoblast benzeri devamlı hücre hattı Saos-2 kullanılarak incelenmesidir. Çalışmada lazer uygulamasından sonra osteoblast hücrelerinden salınan alkalen fosfataz enzimi ve osteokalsin miktarları tayin edilerek bunun kalsifiye doku oluşumu üzerindeki etkilerinin yorumlanması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hücre Kültürünün Hazırlanması

Hücre kültürü çalışmalarının tümü steril laminar air-flow kabinlerinde gerçekleştirildi ve lazer uygulamaları da yine bu steril kabinler içinde yapıldı.

Çalışmada osteoblast benzeri devamlı hücre hattı Saos-2 (HTB- 85, ATCC, USA) kullanıldı. Hücre kültür vaseti olarak %10 Fetal sıgır serumu (Biochrom, Germany), %1 antibiyotik-antimikotik karışım içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) Ham's F12 (Sigma, USA) kullanıldı. Deneyler, hücreler 3 kez pasajlandıktan sonra gerçekleştirildi. Deneyler süresince hücreler güneşirı, faz-kontrast mikroskopta (Olympus CK 40, Japan) incelendi.

Lazer Uygulaması

Bu çalışmada dalga boyu 1064 nm olan, 320 µm çaplı fiber optik kablo iletim sistemli, elektromanyetik spektrumun yakın kızıl ötesi bölümünde bulunan, hard lazerlerden Nd:YAG lazer (Pulsmaster 600 IQ, American Dental Technologies, USA) kullanıldı. Cihaz 20 ila 200 mJ, 10 ila 30 Hz ve 0.2 ila 6 W seviyelerinde 100 µs atım aralığı ile çalışmaktadır. Cihazın rehber lazer ışını He-Ne lazer tarafından üretilmektedir. He-Ne lazerin dalga boyu 533 nm, gücü 1 mW'dır ve devamlı modda ışın üretmektedir. Hücreler ALP ve osteokalsin ölçümleri için hücre kültür plaklarına yerleştirildikten sonra lazer uygulaması gerçekleştirildi. Hücre kültür örneklerine 13 farklı güç ayarında Nd:YAG lazer uygulandı. Fiber optik kablonun ucu, hücre kültür plaklarının tabanından 2 mm uzaklıkta ve tabana dik olacak şekilde lazer uygulaması gerçekleştirildi. Gruplardan 1 tanesine He-Ne rehber lazer ışını uygulandı. Kontrol grubu olarak kullanılan grupta ise hiçbir lazer uygulaması gerçekleştirilmedi. Gruplara uygulanan lazer güç seviyeleri Tablo I'de verilmiştir. Lazer her güç ayarı için 10 saniye boyunca aktive edildi. Her uygulamanın sonunda fiber optik kablonun ucundaki karbonize artıklar steril bir gazlı bez yardımıyla uzaklaştırıldı ya da fiber optik kablonun ucu kesilerek uzaklaştırıldı.

Tablo I. Çalışmada kullanılan lazer güç ayarları

Gruplar	Lazer	mj	Hz	W	Süre(saniye)
Grup 1	Nd:YAG	20	10	0.2	10
Grup 2	Nd:YAG	60	10	0.6	10
Grup 3	Nd:YAG	80	10	0.8	10
Grup 4	Nd:YAG	120	10	1.2	10
Grup 5	Nd:YAG	60	15	0.9	10
Grup 6	Nd:YAG	80	15	1.2	10
Grup 7	Nd:YAG	120	15	1.8	10
Grup 8	Nd:YAG	60	20	1.2	10
Grup 9	Nd:YAG	80	20	1.6	10
Grup 10	Nd:YAG	120	20	2.4	10
Grup 11	Nd:YAG	60	30	1.8	10
Grup 12	Nd:YAG	80	30	2.4	10
Grup 13	Nd:YAG	120	30	3.6	10
Grup 14	He-Ne			0.1	10
Grup 15	Kontrol				

Alkalin Fosfatase ve Osteokalsinin Biyokimyasal Değerlendirilmesi

Bu çalışmaya 24 göznlü plaklarda 3×10^4 hücre/ml olacak şekilde başlandı. Her göze 2 ml hücre süspansiyonu kondu. Çalışmada 15 grubun her biri için 3 tekrar olacak şekilde her inkübasyon dönemi ve lazer uygulaması için 45 göz olmak üzere, toplam 270 göz (ALP değerlendirilmesi için 135 göz, osteokalsin değerlendirmesi için 135 göz) hazırlandı. Daha sonra hücreler 7, 14 ve 21 günlük inkübasyon dönemleri boyunca 37°C 'de ve %5 CO_2 'li etüvde bekletildi.

İnkübasyon dönemlerinin sonunda o güne ait gözler mikroskopta hücre tutunması ve yoğunluğu yönünden incelendi. Daha sonra gözlerdeki vasatlar eppendorf tüpleri içerisine toplandı ve gözlerle 1ml/göz versen-tripsin ilave edildi. Hücrelerin yüzeyden ayrıldığı mikroskopta gözlendikten sonra hücreler mikropipetler yardımıyla toplanıp kendi gözüne ait eppendorf tüpü içerisine ilave edildi.

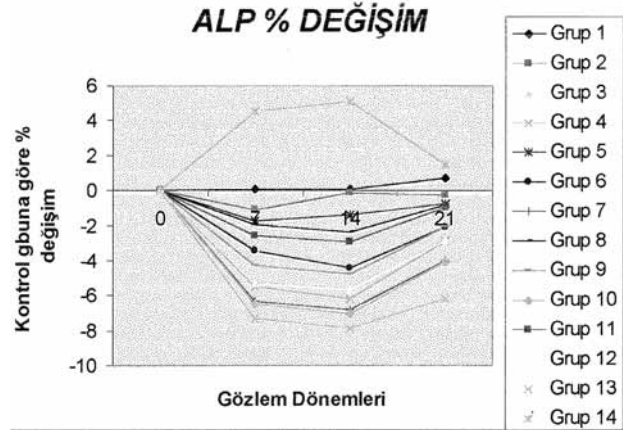
Daha sonra hücreler vasatlarıyla birlikte ultrasonik parçalayıcı ile yarım saat muamele edilerek parçalandı. Serum ALP ölçümleri amino-2 methyle-2 propanol (AMP) tampon ile p-nitro phenylphosphate bioMerieux ALP kit (BIOMERIEUX SA, France) ile Technicon Dax-48 analizöründe (Bayer Diagnostica, GERMANY) yapıldı.

ALP ölçümlerinin kontrol grubuna göre değişim yüzdesinin hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılmıştır:

Değişim yüzdesi = $\left[\frac{\text{deney gözlerinin ortalaması} - \text{kontrol gözlerinin ortalaması}}{\text{kontrol gözlerinin ortalaması}} \right] \times 100$

ALP değişim yüzdeslerini gösteren sonuçlar Grafik I'de gösterilmiştir .

Osteokalsin ölçümleri yapılırken önce hücreler vasatlarıyla birlikte ultrasonik parçalayıcı ile yarım saat mu-



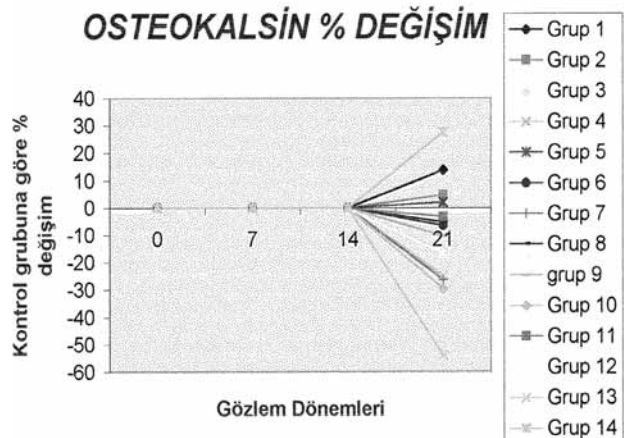
Grafik I. ALP aktivitesi değişim yüzdesinin gözlem dönemlerine göre karşılaştırılması

amele edilerek parçalandı ve parçalanmış hücrelerin serum osteokalsin miktarları ölçüldü. Serum osteokalsin ölçümü immunokemiluminesans tekniğiyle IMMULITE 1 (DPC Diagnostic Product Corporation LA,CA,USA) analizörü ile yapıldı.

Osteokalsin ölçümlerinin kontrol grubuna göre değişim yüzdesinin hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılmıştır:

Değişim yüzdesi = $\left[\frac{\text{deney gözlerinin ortalaması} - \text{kontrol gözlerinin ortalaması}}{\text{kontrol gözlerinin ortalaması}} \right] \times 100$

Osteokalsin değişim yüzdeslerini gösteren sonuçlar Grafik II'de gösterilmiştir.



Grafik II. Osteokalsin değişim yüzdeslerinin gözlem dönemlerine göre karşılaştırılması

İstatistiksel Analiz

ALP ve osteokalsin aktivitesi ortalamaları varyans analiziyle, çoklu karşılaştırmalar Tukey testi kullanılarak

p=0.05 seviyesinde değerlendirildi³⁴.

BULGULAR

ALP ölçümleri

Ölçümlerin ortalamalarına göre ALP seviyelerinin ortalama değerleri 7. günde 344.83-388.80 u/ml değerleri arasındayken, 14. günde 550,37-627,52 u/ml seviyelerine ulaşmaktadır. 21. günde yapılan ölçümlerin ortalamalarına göre bu değer tekrar gerilemektedir (440.56- 476.69 u/ml). ALP aktivitesi 14. günde en yüksek seviyesine ulaşmaktadır. Her üç gözlem periodunda da Grup 14'ün ALP aktivitesi diğer gruplar ve kontrol grubu gözlerinden daha yüksektir. Aynı şekilde Grup1 her üç gözlem periodunda da kontrol gözlerinden daha fazla ALP aktivitesi göstermiştir. Bunun dışındaki lazer uygulaması yapılan diğer grupların tamamında, her üç gözlem periodunda ALP aktivitesi kontrol gözlerinin ALP aktivitelerinden daha düşüktür.

ALP için yapılan varyans analizi sonuçlarına göre değerlendirme periodları karşılaştırıldığında fark anlamlı (p<0.05), atım enerji (mj) miktarları karşılaştırıldığında fark anlamlı (p<0.05), atım oranları (pps) karşılaştırıldığında fark anlamlı (p<0.05) ancak değerlendirme periodu ve atım oranı (pps) arasındaki ve atım enerjisi (mj) ve atım oranı (pps) arasındaki etkileşim anlamlı değildir (p>0.05).

Çoklu karşılaştırmalarda p=0.05 seviyesinde kullanılan Tukey testine göre gözlem periodlarının çoklu karşılaştırmalarında bütün periodlar arasındaki fark anlamlıdır (p<0.05) (Tablo II).

Tablo II. ALP aktivitesi ortalamaları için gözlem periodları karşılaştırılmasında yapılan anlamlılık tablosu.

	7	14	21
7	-	-	-
14	P<005	-	-
21	P<005	P<005	-

Atım enerjileri Tukey testiyle çoklu karşılaştırmaya tabi tutulduğunda yalnızca 20 mj atım enerjisi ve kontrol gözlerinin ALP ortalamaları arasındaki fark anlamlı değildir (p>0.05), diğer gruplar arasındaki fark anlamlı bulunmuştur (p<0.05) (Tablo III).

Tablo III. ALP aktivitesi ortalamaları için atım enerjileri (mj) değerleri karşılaştırıldığında ortaya çıkan anlamlılık tablosu.

	20	60	80	120	HeNe	Kontrol
20	-	-	-	-	-	-
60	P<0.05	-	-	-	-	-
80	P<0.05	P<0.05	-	-	-	-
120	P<0.05	P<0.05	P<0.05	-	-	-
HeNe	P<0.05	P<0.05	P<0.05	P<0.05	-	-
Kontrol	p>0.05	P<0.05	P<0.05	P<0.05	P<0.05	-

ALP ortalamalarına göre atım oranları karşılaştırıldı-

ğında yalnızca 15-20 pps atım oranları arasındaki farkın anlamlı olmadığı (p>0.05), diğer atım oranları arasındaki farkın ise anlamlı olduğu gözlenmiştir (p<0.05) (Tablo IV).

Tablo IV. ALP aktivitesi ortalamaları için atım oranları (pps) karşılaştırıldığında ortaya çıkan anlamlılık tablosu.

	10	15	20	30	HeNe	Kontrol
10	-	-	-	-	-	-
15	P<0.05	-	-	-	-	-
20	P<0.05	p>0.05	-	-	-	-
30	P<0.05	P<0.05	P<0.05	-	-	-
HeNe	P<0.05	P<0.05	P<0.05	P<0.05	-	-
Kontrol	P<0.05	P<0.05	P<0.05	P<0.05	P<0.05	-

Osteokalsin ölçümleri

Yapılan bu ölçümlerin ortalamalarına göre ilk iki gözlem periodunda yani 7 ve 14. günlerde osteokalsin miktarı ölçümünün en alt limiti olan 0.01 ngml⁻¹ vasatın altında olduğu gözlemlendi ve bu yüzden 0 kabul edildi. Bu bulgu bütün deney gözleri ve kontrol gözlerinden toplanan vasat ve hücreler için aynıydı. 21 günlük inkübasyon periodundan sonra gözlerden toplanan vasat ve hücreler osteokalsin ölçümlerine tabi tutulduğunda ortalama değerlerin 0.70 ila 1.94 ngml⁻¹ vasat arasında olduğu gözlemlendi.

Osteokalsin için yapılan varyans analizi sonuçlarına göre 7 ve 14. günlerde ölçüm osteokalsin değerleri ölçüm alt sınırının altında kaldığından herhangi bir değerlendirme yapılamamış bu nedenle de değerlendirme periodları karşılaştıralanamamıştır. Atım enerjisi (mj) miktarları, atım oranları (pps), atım enerjisi (mj) ve atım oranı (pps) arasındaki etkileşim karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunamamıştır (p>0.05). Bu nedenle Tukey testiyle yapılan çoklu karşılaştırmalar osteokalsin için yapılmamıştır.

TARTIŞMA

Bu çalışmada, endodontik amaçlarla kök kanalları içerisinde kullanılan Nd:YAG lazerlerin, periapikal bölgedeki alveoler kemik dokuda, hücresel boyutta meydana getirebileceği değişiklikler hücre kültürü yöntemleri kullanılarak araştırılmıştır.

Hücre kültürü çalışmaları yapılırken, hangi hücre tipinin seçilmesi gerektiğiyle ilgili genel bir doğru cevap yoktur. Diploid hücrelerin kullanılması laboratuvarlar arası karşılaştırmaların yapılmasında güçlükler çıkarmaktadır. Bu karşılaştırmaların yapılması, bütün dünyada kullanılacak devamlı hücre hatlarının kullanılmasıyla daha kolaydır³². Carvalho ve arkadaşları⁶, Ree ve arkadaşları²⁷, Zhang ve arkadaşları³⁸, primer insan osteoblastları ve insan osteoblast benzeri devamlı hücre hatları arasında çalışmaların sonuçları yönünden herhangi bir fark gözlenmediğini bildirmişlerdir.

Saos-2 hücreleri insan osteosarkoma devamlı hücre hattıdır. Bu hücreler kemik belirteçlerini yüksek seviyelerde göstermeleri nedeniyle insan osteoblastlarına çok benzemektedir. Bu hücreler osteoblastik fenotip gösterir, uzun süre yaşatılabilir ve *in vitro* olarak kemik oluşturabilirler. Abdullah ve arkadaşları¹, Ahmad ve arkadaşları² çalışmalarında Saos-2 insan osteoblast benzeri hücre hattını kullanmışlar ve bunun nedenini, hücrenin kültür ortamında mineralize olabilmesi ve osteoblastik belirteçler bakımından iyi karakterize edilebilmesi olarak bildirmişlerdir. Çalışmamızda ATCC'den temin edilen Saos-2 insan osteosarkom devamlı hücre hattı kullanıldı ve çalışmanın sonucunda bu hücrelerin osteoblastik kemik belirteçleri olan ALP ve osteokalsin üretimlerinin olduğunu, bunun hücrenin fenotipik özelliklerini yansıttığını gözlemledik.

Osteoblastik diferansiyasyon belirteci olarak kullanılan iki tipik parametre, spesifik ALP aktivitesi ve osteokalsin üretimidir. ALP rölatif olarak erken bir diferansiyasyon belirtecidir. Yaklaşık aynı dönemde, hücreler osteokalsin mRNA üretmeye başlarlar ve bu protein, kemiğin mineral fazına bağlanır^{14,25,29}.

ALP kemik metabolizmasıyla ve osteoblast diferansiyasyonu ile bağlantılı olduğu bilinen bir enzimdir. ALP aktivitesi, osteoblast diferansiyasyonu ve osteojenik özelliğin belirlenmesinde en sık kullanılan parametredir²³. ALP, bütün dünyada genel olarak kabul edilmiş kemik matriks enzimidir ve başlamış osteogenezin analizi için sıklıkla kullanılmaktadır⁸. ALP erken dönemde belirlenebilir bir kemik belirtecidir ve kemik mineralizasyonunda önemli rol oynamaktadır³⁸.

Osteokalsin kemik matriks proteindir ve diferansiyasyon osteoblastların biyokimyasal belirteci olarak kullanılmaktadır⁸. Osteoblastik ve fibroblastik fenotipler osteokalsin üretebilmeleri ve *in vitro* olarak mineralize olabilmeleriyle birbirlerinden ayrılırlar. Osteokalsin, mineralize olmuş olgun matrikste daha geç dönemde ortaya çıkmakta ve kemiğin yeniden yapılanmasında rol oynadığı düşünülmektedir³⁸.

Çalışmamızda da hücre karakterizasyonu belirlemek için ALP ve osteokalsin ölçümleri değerlendirildi.

Li ve arkadaşları¹⁸, Koh ve arkadaşları¹³, Aparicio ve arkadaşları³, Scotchford ve arkadaşları³⁰, Oliva ve arkadaşları²⁴, Kurachi ve arkadaşları¹⁷ hücre diferansiyasyonunu ve hücrelerin fenotipik karakterlerini belirlemek için ALP aktiviteleri ve osteokalsin üretimlerini incelemişlerdir.

Dalby ve arkadaşları⁹ osteoblast hücre proliferasyonu ile bağlantılı olarak ALP seviyesinde artış olduğu tespit etmişler, bunun normal osteoblast proliferasyonu ve

fenotipik aktivitesiyle uyumlu olduğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızın sonuçlarına göre de ALP ve osteokalsin gibi fenotipik enzim ve non-kollejen protein miktarlarındaki artış hücre proliferasyonunu takip etmektedir.

Yao ve arkadaşları³⁷, Snyder ve arkadaşları³¹ osteoblast hücre kültürleri üzerinde yaptıkları çalışmalarında osteokalsinin, kemik dokunun başlangıç oluşumunda gözlenmediğini hücrenin osteoblastik fenotipini gösteren geç belirteçi olduğunu bildirmişlerdir.

Morais ve arkadaşlarının²² primer osteoblast hücre kültürü ile yaptıkları çalışmalarında kontrol şartlarında hücreler inkübasyon süresince proliferasyon olmuşlar ve 21 günlük süre sonunda durgunluk fazına girmişlerdir. Kültürler yüksek seviyelerde ALP aktivitesi göstermişler ve en yüksek seviyelerine 14. gün civarında ulaşmışlardır. Bundan sonra enzim seviyesi belirgin olarak düşmüştür. Sonuçlarımız bu bulgularla da aynı doğrultudadır.

Ohbayashi ve arkadaşları²³ hücre kültürleri üzerinde lazer uygulamasının etkilerini inceledikleri çalışmalarında, osteokalsin üretimini piyasada bulunan bir kit yardımıyla incelemişler ve 18. gün civarında osteokalsin üretiminin pik yaptığını göstermişlerdir. Aynı çalışmada ALP aktivitesi 15. gün civarında artış göstermiştir. Bu çalışmada biositimülatör etkisi olduğu söylenen GaAlAr lazer kullanılmıştır. Çalışmanın sonucunda düşük güçte lazer uygulamasının insan diş pulpası hücrelerinde kalsifiye nodül oluşumunu uyardığı ve bu hücreleri dentinogenez yönünde diferansiyasyon ettiği bildirilmiştir. Çalışmamızın sonuçlarına göre de ALP aktivitesi 14. günde, osteokalsin aktivitesi ise 21. günde en yüksek seviyesine ulaşmıştır. Bu bulgular Morais ve arkadaşlarının²² ve Ohbayashi ve arkadaşlarının²³ bulgularıyla uyumludur. Bu bulgu, osteoblast diferansiyasyonu ve karakterizasyonuna uygundur. Osteokalsin 7 ve 14 günlük dönemlerde ölçüm değerlerinin en alt sınırı olan 0.01 ng/ml değerlerinin altında iken 21. günde, hücrelerde osteokalsin tespit edilebildi. Bu bulgu osteokalsinin, osteoblast hücrelerinin geç belirteci olduğu yönündeki tespitlerle uyumlu bir sonuçtur ve osteokalsinin ALP aktivitesinin artışı takip ettiği söylenebilir. Daha uzun inkübasyon dönemlerinde hücrelerdeki osteokalsin miktarının artış gösterip göstermeyeceğine dair çalışmalar yapılmalıdır.

Kreisler ve arkadaşları¹⁵ 809 nm diyod lazer kullandıkları çalışmalarında düşük güçteki lazer ışığının insan gingival fibroblastlarının proliferasyonu üzerinde aktive edici etkisi olduğunu bildirmişlerdir. Kreisler ve arkadaşları¹⁶ yaptıkları diğer bir çalışmada, 809 nm diyod lazer kullanmış ve yüksek ayarlardaki lazer uygulamalarının, hücre sayılarında azalmaya neden olduğunu bildirmişlerdir.

Chen ve arkadaşları⁷, Nd:YAG lazerin periodontal yenilenme üzerindeki etkilerini kültüre edilmiş insan gingival fibroblastları üzerinde değerlendirmişlerdir. Çalışmanın sonuçlarına göre 2 mm uzaklıktan 150 mj, 20 pps ve 10 saniye lazer uygulamasının hücre kültürünün canlılığını belirgin oranda azaltmadığını ancak güç ayarları 150 mj, 30 pps ve 10 saniye olarak uygulandığında SEM fotoğraflarında hücrelerde harabiyet gözlemlendiğini bildirmişlerdir. SEM incelemeleri hücre hasarının derecesinin lazer çıkış gücüne bağlı olarak değiştiğini göstermektedir. Bu sonuçlar güç ayarlarına bağlı olarak meydana gelen ısı artışı kaynaklı olabilir. Bizim çalışmamızın bulgularına göre lazer güç seviyeleri arttırıldıkça ALP aktivitesi ve osteokalsin miktarlarında gözlemlenen düşüşler atım enerjisi ve atım oranının arttırılmasının hücreler üzerinde negatif etkiler meydana getirdiğini göstermektedir. Her ne kadar hücre kültür gözlemlerinde oluşan ısı artışları ölçülmemiş olsa da bunun lazerin termal etkileri sonucunda meydana geldiğini düşünmekteyiz.

Bizim çalışmamızın sonuçlarına göre en yüksek ALP ve osteokalsin seviyeleri HeNe lazer uygulamasıyla elde edilmiştir. Bunun yanında 20 mj, 10 pps, 10 saniye lazer uygulamasının (Grup1) ALP ve osteokalsin seviyeleri HeNe lazerden daha az ancak kontrol grubundan daha yüksektir. Bu düşük güçlerde lazer uygulamasının hücre içi aktiviteleri arttırdığı yönündeki bulgularla uyumludur¹⁵. Bu güç seviyeleri dışındaki ayarlar hücrel aktivitede bir azalma meydana getirmektedir.

Grup 4 (120 mj, 10 pps), Grup 6 (80 mj, 15 pps) ve Grup 8 (60 mj, 20 pps)'in hepsinin enerji çıkışları 1.2 W'dır. Bu grupların ALP ortalamaları her üç gözlem periyodu için karşılaştırıldığında en yüksek ALP aktivitesi Grup 8'de yani 60 mj, 20 pps lazer uygulandığında ortaya çıkmaktadır. Bu bulgu, lazerin atım enerjisinin arttırılmasının aynı enerji çıkışlarında atım oranının arttırılmasına göre hücrelere negatif etkisinin daha fazla olduğunu göstermektedir.

Bu bulgu enerji çıkışları 1.8 W olan Grup 7 (120 mj, 15 pps) ve Grup 11 (60 mj, 30 pps) ve enerji çıkışları 2.4 W olan Grup 10 (120 mj, 20 pps) ve Grup 12 (80 mj, 30 pps) için de geçerlidir. Yine daha yüksek atım enerjisi kullanılan Grup 7 ve Grup 10'un ALP aktivite ortalama değerleri daha düşüktür.

Aynı şekilde ortalamalara göre bir değerlendirme yapıldığında cihazın çıkış gücü arttırıldıkça ALP seviyeleri düşmektedir. Bu her üç gözlem periyodu için de geçerlidir.

Aynı atım oranlarında, atım enerjileri arttırıldığında ve aynı atım enerjilerinde atım oranları arttırıldığında da

bu ortalama değerlerde bir düşüş gözlenmektedir.

Çalışmamızda lazerin fiber optik kablosunu, hücre kültür plağının tabanına dik olacak şekilde 2 mm mesafeden temassız uygulandı. Dik olarak uygulamamızın nedeni bütün gözlemlere lazer ışınının aynı şekilde ve eşit uygulanmasını sağlamaktır. Fiber optik kablo temasta ya da 2 mm'den daha az mesafede uygulandığında kültür plaklarında çok fazla ısınma, karbonizasyon ve erimeler meydana geldiğini gözlemledik. Bunun sebebi hücre kültür plaklarının polisterenden imal edilmiş olmasıdır. Bunun yanında Nd:YAG lazer endodontik amaçlarla kök kanalı içerisine uygulandığında kullanıma şekli, fiber optik kablunun ucunun apekten 1 mm mesafede konumlandırılması şeklindedir. Bu durumda fiber optik kablo ve periapikal dokular arasındaki etkileşim yine temassız biçimdedir.

Bu çalışmada Nd:YAG lazer Saos-2 insan osteoblast benzeri devamlı hücre hattı üzerine doğrudan uygulanmıştır. Ancak *in vivo* koşullarda kök kanalı içerisine uygulanan lazer ışınının bir kısmı kök kanal dentini tarafından absorbe edilmektedir. Bu nedenle periapikal alana iletilecek olan lazer enerji seviyeleri mutlaka daha düşük olacaktır. Ayrıca termal etkilerin, ALP ve osteokalsin değerlerinde azalmalara sebep olduğu düşünülecek olursa, *in vivo* koşullarda kök kanalı etrafındaki kan damarları ve yumuşak dokuların oluşan ısı artışını azaltma etkisi de göz ardı edilmemelidir.

Hücre kültürü çalışmaları, *in vivo* koşullarla direkt olarak karşılaştırılmamasına karşın, farklı güçlerde lazer uygulamalarının osteoblast hücre metabolizması üzerindeki etkileri bu yöntemle direkt olarak ölçülebilmektedir. Unutulmaması gereken nokta, *in vitro* hücre kültür tekniklerinin çok fazla hassas olduğu ve *in vivo* olarak görülecek cevapların daha düşük olacağıdır. Lazer uygulamasının hücrel düzeyde meydana getirdiği bu temel bulgular, diş hekiminin kök kanalı içerisinde Nd:YAG lazer uygulamaları sırasında, periapikal bölgedeki osteoblast hücrelerinde meydana gelebilecek etkileri anlaması yönünden faydalıdır. *In vivo* şartlarda oluşabilecek gerçek değişikliklerin incelenmesi için hayvan çalışmaları ve klinik deneylerin yapılması gerekmektedir.

SONUÇ

1. He-Ne lazer uygulaması ve 20 mj, 10 Hz, 10 saniye Nd:YAG lazer uygulaması, kontrol grubuna göre insan osteoblast benzeri hücre kültürlerinde ALP ve osteokalsin sentezlerini arttırmaktadır.

2. Nd:YAG lazerin atım enerjisinin arttırılması atım oranının arttırılmasına göre osteoblast benzeri hücreler üzerinde daha fazla olumsuz etkiye neden olmaktadır.

3. Cihazın çıkış gücü arttıkça hücrel aktiviteler azalmaktadır.

Eğer enerji çıkışı klinik amaçlar için yeterliyse komşu dokulardaki hasarı en aza indirmek için en düşük atım enerjisi seçilmelidir. Buna karşın lazerin enerji çıkışını azaltmanın amaçlanan tedavilerdeki etkinliği azaltıp azaltmayacağı araştırılmalıdır.

KAYNAKLAR

- Abdullah D, Pitt Ford TR, Pappasioannou S, Nicholson J, McDonald F. An evaluation of accelerated Potland Cement as a restorative material. *Biomaterials* 23: 4001-4010, 2002.
- Ahmad M, McCarthyl MB, Gronowicz G. An in vitro model for mineralization of human osteoblast-like cells on implant materials. *Biomaterials* 20: 211-220, 1999.
- Aparicio C, Gil FJ, Planell JA. Human osteoblast proliferation and differentiation on grit blasted and bioactive titanium for dental applications. *J Mater Sci Mater Med* 13: 1105-1111, 2002.
- Browne M, Tyas MJ. Biological testing of dental restorative materials in vitro-a review. *J Oral Rehabil* 6:365-374, 1979.
- Calvo MS, Eyre DR, Gundberg CM. Molecular basis and clinical application of biological markers of bone turnover. *Endocr Rev* 17: 333-368, 1996.
- Carvalho RS, Scott JE, Yen EH. The effect of mechanical stimulation on the distribution of α_1 integrin and expression of α_1 integrin mRNA in TE-85 human osteosarcoma cells. *Arch. Oral Biol* 40: 257-264, 1995.
- Chen YJ, Jeng JH, Lee BS, Chang HF, Chen KC, Lan WH. Effects of Nd:YAG laser irradiation on cultured human gingival fibroblasts. *Laser Surg Med* 27: 471-478, 2000.
- Cooper LF, Haris CT, Bruder SP, Kowalski R, Kadiyala S. Incipient analysis of mesenchymal stem-cell-derived osteogenesis. *J Dent Res* 80:314-320, 2001.
- Dalby MJ, Di Silvio L, Harper EJ, Bonfield W. Initial interaction of osteoblasts with the surface of a hydroxyapatite-poly(methylmethacrylate) cement. *Biomaterials* 22: 1739-1747, 2001.
- Delmas PD, Garnero P. Utility of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis. *Osteoporosis* 55: 1075- 1088, 1996.
- Doull I, Freezer N, Holgate S. Osteocalcin, growth and inhaled corticosteroids: a prospective study. *Arch Disease in Childhood* 74: 497- 501, 1996.
- Farley JR, Wergedal JE, Hall SE, Herring S, Tarbaux NM. Calcitonin has direct effects on 3 [H]- thymidine incorporation and alkaline phosphatase activity in human osteoblast-like cells. *Calcif Tissue Int* 48: 297-301, 1991.
- Koh ET, Torabinejad M, Pitt Ford TR, Brady K, McDonald F. Mineral trioxide aggregate stimulates a biological response in human osteoblasts. *J Biomed Mater Res* 37:432-439, 1997.
- Kolancı Ç. Oral teofilin tedavisindeki kişilerde kemik homeostazisinin osteoblastik/osteoklastik göstergeler ve serum pirolidaz aktivitesi ile araştırılması. Uzmanlık Tezi. İstanbul Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı. İstanbul- 1997.
- Kreisler M, Christoffers AB, Al-Haj H, Willershausen B, D'hoedt B. Low level 809 nm diode laser induced in vitro stimulation of the proliferation of human gingival fibroblasts. *Laser Surg Med* 30: 365-369, 2002.
- Kreisler M, Daublander M, Willershausen- Zönnchen B, D'hoedt B. Effects of diode laser irradiation on the survival rate of gingival fibroblast cell cultures. *Laser Surg Med* 28: 445-450, 2001.
- Kurachi T, Nagao H, Nagura H, Enomoto S. Effect of a titanium surface on bone marrow-derived osteoblastic cells in vitro. *Arch Oral Biol* 42: 465-468, 1997.
- Li JK, Chang WH, Lin CH, Ruaan RC, Liu HC, Sun JS. Cytokine release from osteoblasts in response to ultrasound stimulation. *Biomaterials* 24: 2379-2385, 2003.
- McKay GC, Macnair R, Macdonald C, Grant MH. Interactions of orthopaedic metals with an immortalized rat osteoblast cell line. *Biomaterials* 17: 1339-1344, 1996.
- Meryon SD, Browne RM. Evaluation of cytotoxicity of four dental materials in vitro assessed by cell viability and enzyme cytochemistry. *J Oral Rehabil* 10: 363-372, 1983.
- Midda M, Renton-Harper P. Lasers in dentistry. *Br Dent J* 168: 343-346, 1991.
- Morais S, Sousa JP, Fernandes MH, Carvalho GS. In vitro biomineralization by osteoblast-like cells I. Retardation of tissue mineralization by metal salts. *Biomaterials* 19: 13-21, 1998.
- Ohbayashi E, Matsushima K, Hosoya S, Ağabeyko Y, Yamazaki M. Stimulatory effect of laser irradiation on calcified nodule formation in human dental pulp fibroblasts. *J Endodon* 25 : 30-33, 1999.
- Oliva A, Della Ragione F, Salerno A, Riccio V, Tartoro G, Cozzolino A, D'amato S, Pontini G, Zappia V. Biocompatibility studies on glass ionomer cements by primary cultures of human osteoblasts. *Biomaterials* 17: 1351-1356, 1996.
- Owen TA, Aranow M, Shalhoub V, Barone LM, Wilming L, Tassinari MS. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol* 143: 420-430, 1990.
- Pick RM. Using lasers in clinical dental practice. *JADA* 124: 37-47, 1993.
- Ree S-H, Hwang M-H, Si H-J, Choi J-Y. Biological activities of osteoblasts on Poly (methyl methacrylate)/ silica hybrid containing calcium salt. *Biomaterials* 24: 901-906, 2003.
- Robey PG. Osteoporosis : Etiology, diagnosis, and management: Riggs L, Melton LJ. Biochemistry of bone. Mayo Foundation, Lippincott-Raven Publ. Philadelphia, 41-66, 1995.
- Schwartz Z, Lohmann CH, Oefinger J, Bonewald LF, Dean DD, Boyan BD. Implant surface characteristics modulate differentiation behavior of cells in osteoblastic lineage. *Adv Dent Res* 13: 38-48, 1999.
- Scotchford CA, Cascone MG, Downe S, Giusti P. Osteoblast responses to collagen-PVA bioartificial polymers in vitro: the effect of cross-linking method and collagen content. *Biomaterials* 19: 1-11, 1998.
- Snyder WR, Hoover J, Khoury R, Farach-Carson MC. Effect of agents used in perforation repair on osteoblastic cells. *J Endodon*

- 23 :158-161, 1997.
32. Spangberg LSW. The study of biological properties of endodontic biomaterials: Spangberg LSW. Experimental Endodontics. Florida: CRC Press, 1990, 173-210.
33. Tyas MJ, Browne RM. Biological testing of dental restorative materials. J Oral Rehabil 4: 275-290, 1977.
34. Ünsal A. Varyans Analizi (Tek Faktör- İki Faktör). Doçentlik Tezi. Gazi Üniversitesi, İktisadi İdari Bilimler Fakültesi, Ekonometri Bölümü, Ankara 1993.
35. Wigdor H, Abt E, Ashrafi S, Walsh JT. The effect of lasers on dental hard tissues. JADA 124: 65-70, 1993.
36. Wigdor HA, Walsh JT, Featherstone JDB, Visuri SR, Fried D, Waldvogel JL. Lasers in dentistry. Laser Surg Med 16: 103-133, 1995.
37. Yao KL, Todescan R, Sodek J. Temporal changes in matrix protein synthesis and mRNA expression during mineralized tissue formation by adult Rat bone marrow cells in culture. J Bone Miner Res 9: 231-240, 1994.
38. Zhang H, Ahmad M, Gronowicz G. Effects of transforming growth-factor-beta 1(TGF- β 1) on *in vitro* mineralization of human osteoblasts on implant materials. Biomaterials 24: 2013-2020, 2003.

Yazışma adresi

Hacer DENİZ ARISU
8. Cad. 82. Sok. Emek (06510)
Ankara, TÜRKİYE
Tel: 0 312 212 62 20 / 348-296- 345
0 532 646 12 44
E-posta: hdenz@yahoo.com,
hacer@gazi.edu.tr