



DİYOT LAZERİN TİP 2 DİYABETİK İNSAN DERMAL FİBROBLAST HÜCRELERİNİN ÇOĞALMA VE KOLLAJEN ÜRETİMİNE ETKİSİ

EFFECTS OF DIODE LASER ON TYPE 2 DIABETIC HUMAN DERMAL FIBROBLAST PROLIFERATION AND COLLAGEN SYNTHESIS

Candan Yılmaz Özdoğan^{1*}, Halime Kenar²

¹Kocaeli Üniversitesi, Deneysel ve Klinik Araştırmalar Merkezi, Diyabet ve Obezite Araştırma Laboratuvarı, Kocaeli, Türkiye, ²Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Tıp Mühendisliği Bölümü, İstanbul, Türkiye.

ORCID iD: Candan Yılmaz Özdoğan: 0000-0001-5885-4189; Halime Kenar: 0000-0003-0433-5513

***Sorumlu Yazar / Corresponding Author:** Candan Yılmaz Özdoğan, **e-posta / e-mail:** cndnylmz@gmail.com

Geliş Tarihi / Received: 22.02.2021

Kabul Tarihi / Accepted: 19.04.2021

Yayın Tarihi / Published: 29.05.2021

Öz

Amaç: Düşük seviyeli lazer terapisi, rejeneratif tıpta fonksiyonel anomalilerin yönetilmesi, iyileşme sürecini ve hücre fonksiyonları geliştirmek için düşük seviyeli lazerlerin kullanıldığı bir tedavi yaklaşımıdır. Çalışmada, bu tedavi yaklaşımının diyabetik hastalarda rastlanan en önemli problemlerden birisi olan diyabetik yaraların iyileşmesinde etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: İnsan derisinden izole edilmiş olan Tip 2 diyabetik ve normoglisemik insan dermal fibroblast hücrelerine belirli sürelerde (10-100 saniye) iki günde bir, 9 gün süresince 980 nm dalga boyundaki diyot lazer uygulanmış ve hücre sayıları ve sentezlenen Tip 1 kollajen miktarları karşılaştırılmıştır.

Bulgular: Her iki hücre tipinde de uygulanan sürelerdeki lazerin hücreler üzerinde herhangi bir sitotoksik etkiye yol açmadığı, ancak hücrelere 50 sn.'den fazla uygulanmasının anlamlı düzeyde hücre çoğalmasını yavaşlattığı tespit edilmiştir. Hücrelerde sentezlenen kollajen miktarları kıyaslandığında normoglisemik hücrelerde daha fazla sentez olduğu sonucuna varıldı. Tip 2 diyabetik insan dermal fibroblast hücrelerinde en yüksek kollajen sentezine 90 sn. lazer uygulaması sonucunda rastlanırken normoglisemik hücrelerde en yüksek kollajen sentezine 70 sn. lazer uygulamasında ulaşıldı.

Sonuç: Diyot lazerin olumlu etkilerinin görülmesinde uygulama sürelerinin hücre tipine göre değiştiği, hasta profiline göre uygun sürelerde uygulanan lazerin düşük maliyetle, hastaya en az zararlar, hastadaki yara iyileşme sürecini olumlu yönde etkileyebileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: 980 nm diyot lazer, Tip 2 diyabetik insan dermal fibroblast, Tip 1 kollajen

Abstract

Objective: Low-level laser therapy is a treatment approach in regenerative medicine that employs low-level lasers to manage functional abnormalities, improve the healing process, and the cellular functions. The aim of this study was to investigate the effectiveness of this treatment approach in healing diabetic wounds that is one of the most important problems encountered in diabetic patients.

Methods: Diode laser was applied on Type 2 diabetic and normoglycemic human dermal fibroblasts for a predetermined time period (10-100 seconds) every two days for total of 9 days, and cell numbers and the amounts of synthesized Type 1 collagen were compared.

Results: In both cell types, the laser did not cause any cytotoxicity at the applied time periods, but laser application for more than 50 sec. significantly slowed down cell proliferation. When the amount of synthesized collagen was compared, the normoglycemic fibroblasts were found to synthesize more. As the highest collagen synthesis was found in Type 2 diabetic cells at 90 sec. laser application, in normoglycemic cells it was achieved at 70 seconds.

Conclusion: It is thought that the optimum application times of the 980 nm diode laser vary according to the cell type, and that the laser applied at appropriate periods according to the patient's profile can positively affect the wound healing process with a minimal damage.

Keywords: 980 nm diode laser, Type 2 diabetic human dermal fibroblast, Type 1 collagen

Giriş

Düşük seviyeli lazer terapisi rejeneratif tıbbın farklı dallarında kullanılan yararlı, basit ve invaziv olmayan bir tekniktir. Temel olarak romatoid artrit, korneal ekstazi, dental hastalıklar,¹⁻⁷ büyüme faktörü salımının düzenlenmesi yoluyla ağrıların azaltılması⁸, fibroblast, keratinosit ve osteoblast gibi hücre hatları için hücre proliferasyonunun arttırılması, migrasyon, proliferasyon, apoptoz ve hücre farklılaşması gibi hücrel reaksiyonların uyarılmasıyla doku tamiri sürecinin düzenlenmesi⁹ ve enflamasyonun azaltılması¹⁰ gibi çeşitli patolojik koşullar üzerinde yararlı etkilere sahiptir. Düşük seviyeli lazer terapisi, düşük enerji yoğunluğundaki sabit bir ışın (0,04-60 J/cm²) ve 600-1100 nm dalga boylu lazer kullanımı olarak ifade edilir.⁸ Lazerin *in vitro* biyoyarım etkisi dalga boyu, lazer çıkış gücü ve enerji yoğunluğu gibi lazer ışın parametrelerine bağlıdır. Benzer parametreler kültüre edilmiş farklı hücreler üzerinde farklı etkilere sebep olabilir. Bu nedenle, lazer uygulanan hücreler üzerinde istenilen etkilere ulaşabilmek için bu parametrelerin doğru kombinasyonlarının bilinmesi önemlidir.^{11,12}

Lazerin hücrel seviyedeki biyoyarım aktivitesinin mekanizması pek çok reaksiyonun eş zamanlı aktivitesine bağlıdır. Biyolojik membranların yapısı ve fonksiyonu modifiye edilir, endorfinler salınır, hücre ve enzimlerin bağışıklık sistemi aktivitesinde bir artış gözlemlenir. Mitokondriyal membranda bulunan beş protein kompleksi arasındaki elektron transferiyle bir sinyal ağı başlatılır. Bu membran proteinleri arasında NADH dehidrogenaz, süksinat dehidrogenaz, sitokrom c redüktaz, sitokrom c oksidaz, ATP sentaz ve serbest moleküllerden sitokrom c bulunmaktadır. Lazer uygulaması mitokondrideki kromoforları uyararak ve ATP üretiminde artışa yol açan metabolik süreçleri aktive eder. Hücrel solunumun hızlanması, fibroblastlar gibi hücrelerin proliferasyonu, farklılaşması, göçü ve büyümesine katkıda bulunur. Büyüme faktörleri gibi fibroblastlar tarafından salınan biyoaktif araçlar, Tip 1 kollajen gibi ekstraselüler matriks bileşenlerinin sentezlenmesini uyararak hücre metabolizmasını olumlu yönde etkiler.¹³

Diabetes mellitus, insülin salımının tam ya da nispi eksikliği ya da insülin hedef organlarının işlevsizliği sonucu oluşan kronik metabolik bir hastalıktır ve sadece şeker metabolizmasında değil yağ, protein ve elektrolit metabolizmasında da problemlere yol açmaktadır. Glukoz seviyesinin kontrolündeki bozukluk diyabetik hastalarda sistemik problem riskini artırır. Bu hastalarda bozuk enflamasyon tepkisi ve enfeksiyonlara karşı azalan direnç yara iyileşme sürecini geciktirebilir.¹² Düşük seviyeli lazer terapisinin normal doku tamir süreci ya da yara iyileşmesi üzerindeki yararlı etkileri araştırılmasına rağmen optimum uygulama koşulları tam olarak belirlenememiştir.

Fibroblastlar yara iyileşme sürecinde yüksek oranda önem arz eden hücrelerdir ve *in vitro*'da fibroblast proliferasyonu ve aktivitesi üzerine lazer ışınlarının uyarıcı etkileri hala çok iyi bilinmemektedir. Bazı araştırmacılar lazerin fibroblast proliferasyonu ve aktivitesi üzerine etkisinin olmadığını ya da inhibe edici bir etkisi olduğunu ifade ederken diğerleri lazerin *in vitro* fibroblast proliferasyonunu geliştirmede rol oynadığını ve daha kısa lazer muamele süresinin daha yüksek proliferasyona yol açtığını ileri sürmüşlerdir. Farklı dalga boylarındaki lazerler fibroblastlar üzerinde farklı etkilere neden olurlar. Literatürde, yakın kızılötesi, kızılötesi ve görünür dalga boyları kullanılarak lazerin etkilerini

inceleyen pek çok deneysel çalışma mevcuttur¹¹ ancak mevcut çalışmalar sabit tedavi metodu olmaktan uzaktır.

Bu çalışmada farklı sürelerde uygulanan 5 W gücünde ve yüksek penetrasyon derinliğine sahip 980 nm dalga boyundaki diyot lazerin normoglisemik ve Tip 2 diyabetik insan dermal fibroblast hücrelerinin canlılıklarına ve Tip 1 kollajen sentezine olan etkileri araştırıldı.

Yöntem

İnsan Dermal Fibroblast Hücre İzolasyonu ve Karakterizasyonu

Dermal fibroblast hücreleri sezeryan ameliyatı sonrası biyolojik atık olarak değerlendirilen deriden eksplant kültür olarak literatüre uygun şekilde izole edildi.¹⁴ Dokular herhangi bir genetik hastalığı olmayan, 18-36 yaşları arasındaki normoglisemik (n=5) ve en az 4 yıldır diyabet hastası olan Tip 2 diyabetik (n=5) donörlerden Kocaeli Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun verdiği izinle (KOU KAEK 2015/236) alındı. Tüm donörler aydınlatılmış onam formları ile bilgilendirilip her bir donörden araştırma için atılacak dokuların kullanılabilirliğine dair izinleri alındı. Donörlerden izole edilen hücrelerle normoglisemik ve diyabetik hücre havuzları oluşturuldu, deneylerde farklı donörlerden izole edilmiş bu hücre karışımları kullanıldı. %2 penisilin/streptomisin içeren Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) içerisinde laboratuvara getirilen dokular steril koşullar altında yağ ve epidermis tabakasından ayrılıp neşter yardımıyla küçük parçalara (3x3 mm²) bölündü. Bölünen doku parçaları 6-kuyucuklu plakalarda eksplant olarak büyüme besiyeri (%5 insan kanı plazması [HP], 2 U/mL heparin, %0,1 primosin, 1 ng/mL bFGF, %1 penisilin/streptomisin ve %1 L-glutamin içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 [DMEM-F12, Gibco]) içinde, 37°C ve %5 CO₂ ihtiva eden inkübatörde (N-Biotek NB-203XL) kültüre edildi. Her 3 günde bir besiyeri yenilendi ve yeterli sayıda hücre dokudan çıktıktan sonra %0,05 tripsin-EDTA (Gibco) kullanılarak hücreler T25 flaska pasajlandı. Üçüncü pasaja gelen fibroblast hücreleri anti-vimentin ile floresan olarak boyanarak görüntülendi. Bunun için %4 paraformaldehit (PFA) ile sabitlenen hücreler öncelikle DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) ile yıkandıktan sonra %0,1 triton X-100 (Sigma Aldrich, USA) ile 15 dakika oda sıcaklığında permeabilize edildi. 30 dakika oda sıcaklığında yüzey serum ile bloke edildikten sonra hücreler 1 gece boyunca 4°C sıcaklıkta 1:100 seyreltilmiş anti-vimentin birincil antikor çözeltisi (Abcam anti-vimentin antibody [RV203] (ab8979) mouse monoclonal) içerisinde bekletildi. DPBS ile yıkanan hücreler 1:400 oranında seyreltilmiş FITC işaretli ikincil antikor (Alexa fluor 488 goat anti-mouse IgG) ile işaretlenip 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücreler çekirdek boyaması için 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Thermo Fisher Scientific) (1:1000 DPBS içerisinde) ile oda sıcaklığında 10 dakika muamele edildi. DPBS ile yıkandıktan sonra floresan mikroskopta (Olympus IX53) incelenip fotoğrafları çekildi.

Lazer ile Uyarım Protokolü

Diyot lazerin hücre çoğalmasına etkisinin belirlenmesi

Bu çalışmada, 5 W gücündeki 980 nm dalga boyundaki diyot lazer (Kenar Mühendislik Ltd.) farklı sürelerde uygulanarak lazerin normoglisemik ve Tip 2 diyabetik insan dermal fibroblast hücrelerinin canlılığına etkisi WST-1

(Roche, cell proliferation reagent) testi ile değerlendirildi. İzole edilmiş dermal fibroblast hücreleri 96-kuyucuklu plakaya 5×10^3 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilip büyüme besiyerinde 37°C 'de %5 CO_2 'li etüvde inkübe edildi. Diyot lazer (400 μm lazer fiber çaplı) 9 gün boyunca iki günde bir 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 saniye (sn.) süreyle hücrelere uygulandı. Lazer başlığı ve kuyucuk tabanı arasındaki mesafe her bir grup için 1 cm olarak belirlendi. Lazer uygulaması kuyucuklardan besiyeri çekildikten sonra yapıldı ve uygulama sonrasında tekrar tazelendi. Kontrol grubu olarak lazer uygulanmamış normoglisemik ve Tip 2 diyabetik insan dermal fibroblast hücreleri kullanıldı. Her bir örnek üç kopya şeklinde çalışıldı.

Diyot lazerin hücreler üzerindeki sitotoksik etkisinin değerlendirilmesi için 1.gün ve son lazer uygulamasının ertesi gününde WST-1 metabolizma testi yapıldı. Süre sonunda insan dermal fibroblast hücreleri %10 WST-1 solüsyonu, %5 insan plazması, %0,1 primosin, 2U/mL heparin içeren ve fenol kırmızısı içermeyen DMEM besiyeri içerisinde 2,5 saat 37°C sıcaklıkta, karanlıkta inkübe edildi. Süre sonunda 440 nm dalga boyunda absorban ölçümü yapıldı. Hücre sayıları aşağıdaki formül kullanılarak ve kontrol grubuna oranla hesaplandı:

$$\text{Hücre sayısı (\%)} = \left(\frac{\text{Örnek absorbanı}}{\text{Kontrol grubu absorbanı}} \right) \times 100$$

Diyot lazerin (980 nm dalga boyunda) kollajen sentezine olan etkisinin belirlenmesi

Diyot lazerin (5 W gücündeki 980 nm da) hücrelerdeki kollajen sentezine olan etkisini değerlendirmek için lazer normoglisemik ve Tip 2 diyabetik insan dermal fibroblast hücrelerine bir önceki bölümde belirlenen koşullarda 9 gün süresince iki günde bir 10-100 sn. arasında uygulandı.

Hücrelerin kollajen sentezi immünfloresan boyama ile kıyaslandı. Hücreler %4 PFA ile sabitlendikten sonra DPBS ile yıkayıp %3 sığır serum albümini (BSA) ile oda sıcaklığında 30 dakika bloke edildi. Ardından hücreler 1:100 olacak şekilde %0,1 BSA içerisinde hazırlanmış olan birincil antikor (Santa Cruz COL1A Antibody sc-59772) içerisinde bir gece 4°C sıcaklıkta inkübe edildi. Hücreler üç kez DPBS ile yıkandıktan sonra 1:200 oranında ikincil antikor (Alexa fluor 488 goat anti-mouse IgG (H+L)) içerisinde 37°C sıcaklıkta 1 saat daha inkübe edildi. İnkübasyon sonunda floresan mikroskop kullanılarak hücrelerin aynı ışık yoğunluğunda ve büyütmelede görüntüleri alındı. Üretilen kollajen miktarları, NIH ImageJ yazılımı ile yeşil floresan sinyalinin ölçülüp düzeltilmiş toplam hücre floresanının (DTHF) hesaplanmasıyla tespit edildi. Bunun için, floresan mikroskopta alınmış görüntünün siyah-beyaza dönüştürülmüş hali üzerinde yoğunluğu ölçülmek istenilen her bir hücre ayrı ayrı işaretlenip ışık yoğunlukları belirlendi. Analizde arka plan olarak floresan-ışımaya yapmayan bölge tercih edildi. Üretilen kollajen miktarları aşağıdaki formüle göre hesaplandı.¹⁵

$\text{DTHF} = \text{Tamamlanmış yoğunluk} - (\text{seçili hücre alanı} \times \text{ortalama arka plan floresanı})$

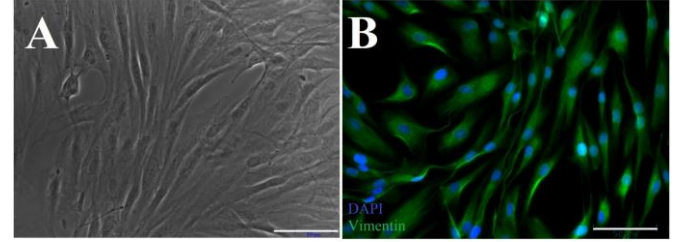
İstatistiksel Analiz

Veriler ortalama±standart sapma olarak ifade edildi. Ortalamalar Kruskal-Wallis testi kullanılarak $p < 0,05$ anlamlılık düzeyinde karşılaştırıldı. İstatistiksel analiz için IBM SPSS Statistics 20,0 yazılımı (IBM Corp., Armonk, NY, USA) kullanıldı.

Bulgular

İnsan Dermal Fibroblast Hücre Karakterizasyonu

Ameliyat sonrası biyolojik atık olan derilerden izole edilen hücrelerin fibroblast hücre olduğunu tespit etmek amacıyla üçüncü pasajdaki hücrelere anti-vimentin immünfloresan (IF) boyama yapıldı. Hücrelerin boyama öncesi görüntüleri ışık mikroskobunda (Çizim 1A) ve boyama sonrası görüntüleri floresan mikroskobu ile incelendi (Çizim 1B). Mikroskop görüntüleri hücrelerin iğ-benzeri morfolojiye sahip olduğunu gösterdi. İzole edilen hücre popülasyonunun tümünün bir fibroblast belirteci olan vimentin için pozitif olması¹⁶ ise bu hücrelerin kültüründe epidermis tabakasından herhangi bir hücre kontaminasyonunun olmadığını kanıtlamıştır.



Çizim 1. İnsan dermal fibroblast hücrelerinin, A) Işık mikroskobu, B) Floresan mikroskobu görüntüleri (yeşil: vimentin, mavi: hücre çekirdekleri), 20X büyütme, Skala: 50 μm

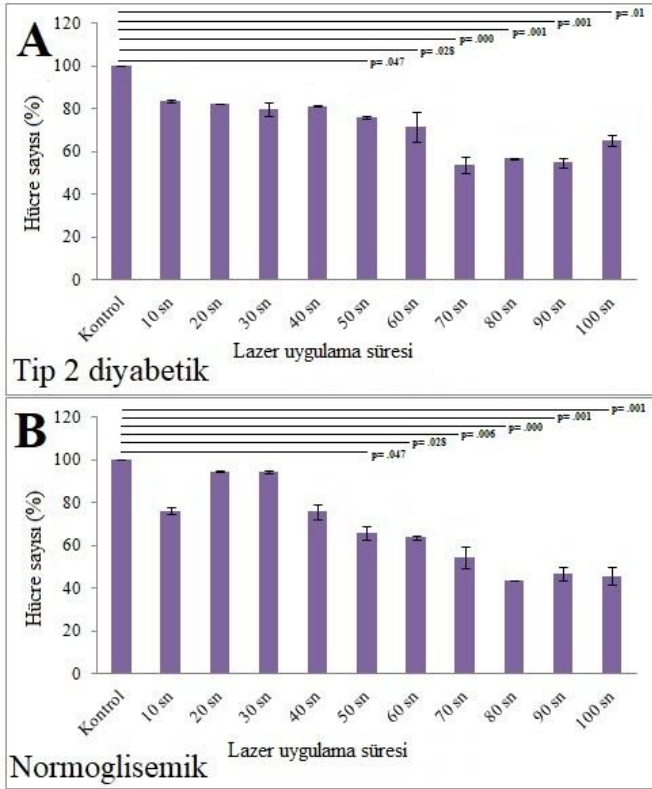
Lazer ile Uyarım

Diyot lazerin (980 nm) hücre çoğalmasına etkisi

Diyot lazerin normoglisemik ve Tip 2 diyabetik insan dermal fibroblast hücreleri üzerine etkisini belirlemek amacıyla hücrelere 9 gün boyunca iki günde bir belirli sürelerde lazer (5 W ve 980 nm) uygulandı, 10. günde yapılan WST-1 analiziyle bu uygulamanın hücre sayıları üzerindeki etkileri değerlendirildi.

WST-1 metabolizma testine göre 9. gün sonundaki kontrol grupları olan lazer uygulanmamış Tip 2 diyabetik ve normoglisemik insan dermal fibroblast hücrelerinin hücre canlılıkları %100 olarak kabul edilip diğer grupların hücre sayısı yüzdeleri belirlendi. İnkübasyonun başlangıcında kontrol gruplarının canlı hücre sayıları Tip 2 diyabetik insan dermal fibroblast hücrelerinde 9. gündeğinin %12,59±2,26'i iken normoglisemik fibroblastlarınki 9. gündeğinin %15,65±1,51 idi. Tip 2 diyabetik insan dermal fibroblastlarına 10 sn.-100 sn. diyot lazer uygulama sonucundaki 9. gün hücre sayısı yüzdeleri sırasıyla 83,83±0,64; 82,29±0,20; 79,83±3,24; 81,20±0,35; 76,01±0,64; 71,83±6,91; 53,60±3,80; 56,80±0,23; 54,82±2,34 ve 65,41±2,54 iken (Çizim 2A) normoglisemik insan dermal fibroblast hücrelerindeki aynı grupların değerleri aynı sırayla 76,18±1,45; 94,55±0,29; 94,26±0,73; 75,74±3,62; 66,05±3,04; 63,80±0,94; 54,26±5,00; 43,77±0,01; 46,81±3,04 ve 45,72±4,13 (Çizim 2B) olarak bulundu. Normoglisemik ve Tip 2 diyabetik insan dermal fibroblast hücrelerine 980 nm dalga boyundaki diyot lazerin 10, 20, 30 ve 40 sn. uygulandığı gruplardaki hücre sayısının 9. gün kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak farklı olmadığı ($p > 0,05$) ve dolayısıyla hücreler üzerinde bu sürelerde uygulanan diyot lazerin herhangi bir etkiye yol açmadığı görüldü. Her iki hücre tipi için de 40 sn.'den fazla diyot lazer uygulaması 9. gün kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak daha az hücre sayısına yol açmasına rağmen her iki hücre tipinde de 24. saatteki kontrol gruplarından daha fazla hücre olması diyot lazerin sitotoksik

bir etkiye yol açmadığını göstermiş olup görülen etki çoğalma hızında yavaşlama olarak değerlendirilmiştir.



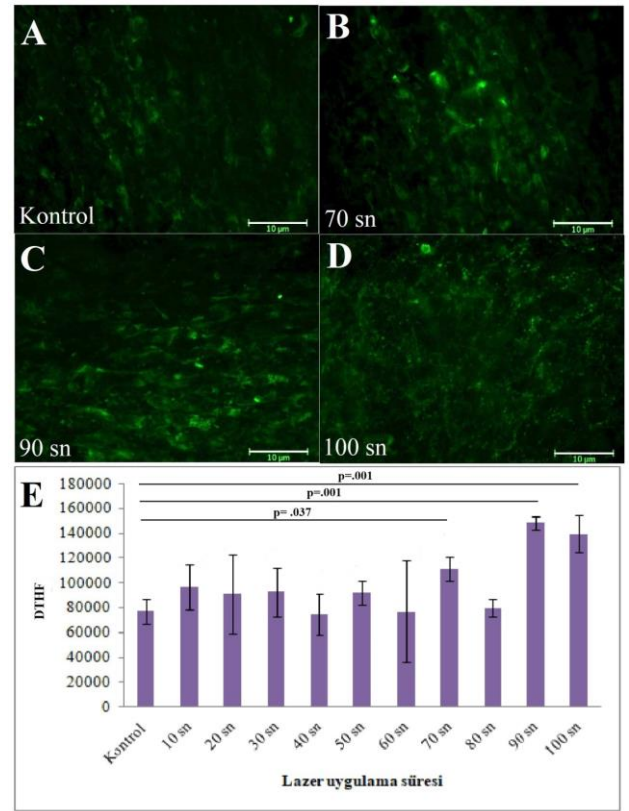
Çizim 2. Dokuz gün boyunca farklı sürelerde uygulanmış olan 980 nm dalga boyundaki lazerin dermal fibroblast hücrelerinin çoğalması üzerine etkisi. Veriler ortalama±standart sapmayı temsil etmektedir.

Diyot lazerin kollajen sentezine olan etkisi

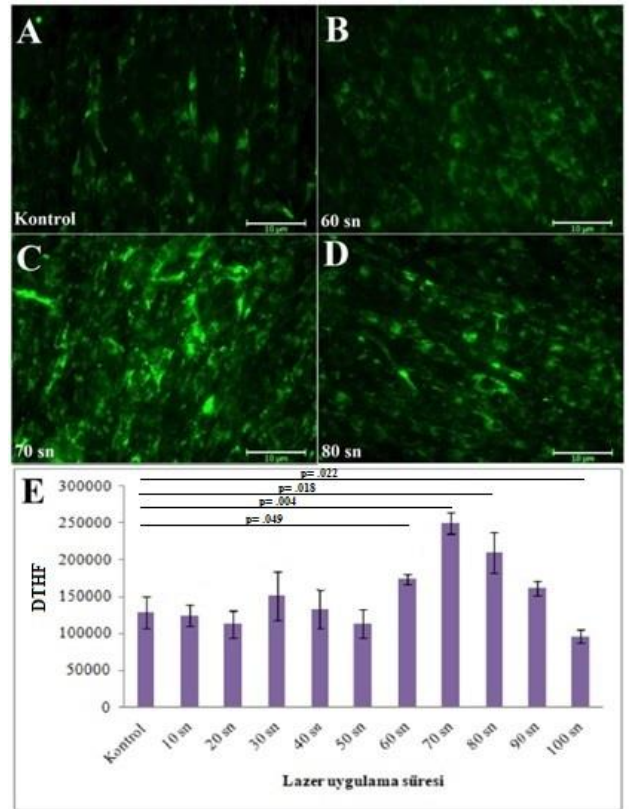
Hücreler tarafından salgılanan kollajen miktarını belirlemek amacıyla yapılan immünfloresan boyama sonucunda normoglisemik ve Tip 2 diyabetik insan dermal fibroblast hücrelerindeki Tip 1 kollajen varlıkları kıyaslandığında normoglisemik insan dermal fibroblast hücrelerinde daha fazla ışın olduğu, dolayısıyla da daha fazla miktarda kollajen varlığı tespit edildi (Çizim 3 ve Çizim 4).

Gruplar kendi içerisinde kıyaslandığında Tip 2 diyabetik insan dermal fibroblast hücrelerine 980 nm dalga boyundaki diyot lazerin 70, 90 ve 100 sn. uygulanmasının lazer uygulanmamış kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak ($p<0,05$) daha fazla Tip 1 kollajen sentezlediği, en fazla kollajen sentezine ise 90 sn. lazer uygulanmış grupta olduğu görüldü. Diğer gruplardaki kollajen sentezinde ise kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak bir farka rastlanmadı (Çizim 3E).

Normoglisemik insan dermal fibroblast hücrelerinde 60, 70 ve 80 sn. lazer uygulanan gruplardaki kollajen miktarının kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak ($p<0,05$) daha fazla olduğu, en yüksek kollajen sentezinin ise 70 sn. lazer uygulanan grupta olduğu tespit edildi. Süre 100 sn. olduğunda diyot lazerin hücreler üzerine uygulanmasının hücrelerde istatistiksel olarak ($p<0,05$) kollajen sentezini azalttığı gözlemlendi. Diğer gruplardaki kollajen sentezinde ise kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak bir farka rastlanmadı (Çizim 4E).



Çizim 3. Diyot lazerin 9 gün sonunda Tip 2 diyabetik insan dermal fibroblast hücrelerinde Tip 1 kollajen sentezindeki etkisi: A, B, C, D) immün floresan görüntüleri, Yeşil: Tip 1 kollajen (Orijinal büyütme: 20X, Skala: 10 µm). E) Ortalama düzeltilmiş toplam hücre floresansı değerlerinin uygulama gruplarına göre kıyaslanması. Veriler ortalama±standart sapmayı temsil etmektedir.



Çizim 4. Diyot lazerin 9 gün sonunda normoglisemik insan dermal fibroblast hücrelerinde tip 1 kollajen sentezindeki etkisi: A, B, C, D.) immün floresan görüntüleri, Yeşil: Tip 1 kollajen (Orijinal büyütme: 20X, Skala: 10 µm). E) Ortalama düzeltilmiş toplam hücre floresansı değerlerinin uygulama gruplarına göre kıyaslanması. Veriler ortalama±standart sapmayı temsil etmektedir.

Tartışma

Düşük seviyeli lazer terapisi, yaraları iyileştirmek için ışığın klinik olarak uygulandığı¹⁷, invazif olmayan bir tedavi yaklaşımıdır.¹⁸ Hayvan ve klinik çalışmalar düşük seviyeli lazer terapisinin lazer ışımından ışık enerjisini hücrelerde kimyasal enerjiye çevirip hücrel aktiviteyi uyarak yara iyileşmesini etkileme yoluyla hücreler üzerinde biyoyararıcı etkilere sahip olduğunu ve analjezik, dezenfekte edici ve anti-enflamatuvar etkiler gösterdiğini kanıtlamıştır.¹² Bu yararlı etkilerine rağmen lazerin optimum uygulama parametreleri üzerinde hala bir fikir birliğine varılamamıştır. Çalışmamızda farklı sürelerde uygulanan 5 W gücünde, 980 nm dalga boyundaki diyot lazerin normoglisemik ve Tip 2 diyabetik insan dermal fibroblast hücrelerinin canlılıklarına ve Tip 1 kollajen sentezine olan etkileri incelendi.

Diyot lazerin normoglisemik ve Tip 2 diyabetik insan dermal fibroblast hücrelerinin çoğalması üzerine etkilerine bakıldığında, lazerin hücrelerde herhangi bir sitotoksik etkiye yol açmadığı, ancak her iki hücre tipinde de 50 sn.'den fazla lazer uygulamasının hücrelerin çoğalma hızında yavaşlamaya sebep olduğu görülmüştür. Sterczala ve ark. da çalışmamızla uyumlu olarak gingival fibroblastlara 32 saniyeye kadar uyguladıkları 980 nm dalga boyundaki lazerin hücre üzerinde herhangi bir sitotoksik etki göstermediğini belirlemişlerdir.¹³ Crisan ve ark.¹¹ ise yaptıkları çalışmada 980 nm dalga boyundaki lazerin *in vitro*'da düşük dozlarda uygulanmasının hücrelerin mitokondriyal aktivitesi üzerinde uyarıcı bir etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir. Çalışmamızda uygulanan lazerin hücreleri proliferasyon edici bir etkisinin görülmemesinin nedeninin literatürdeki lazerin atımlı modda uygulanması olabileceği düşünülmektedir.

Pek çok çalışma lazerin fibroblast ve miyofibroblast gibi çeşitli hücre türlerinde reaktif oksijen türevi (ROT) üretimini arttırabildiğini göstermiştir. Bu fonksiyonu muhtemelen sitokromlar, flavinler ya da NADPH gibi endojen hücre kromoforlarının fotosensibilizasyonu yoluyla gerçekleşmektedir. Hücre fonksiyonu düzenleyiciler olarak çeşitli sinyal basamaklarını düzenleyen ROT'ların düşük seviyeli lazer terapisi tarafından üretilen ikincil mesajcılar olduğu düşünülmektedir. ROT, AP-1 ve NF-kB aktivasyonuna yol açan protein kinaz C (PKC)'nin yükselmesine sebep olan hücre içi Ca⁺² konsantrasyonunun yükselmesine sebep olur. Bunun yanı sıra ROT redoksa hassas, anti-apoptotik bir protein olan NF-kB'yi aktive ederek hücre proliferasyonuna neden olur. Hücre fonksiyonları üzerindeki ROT etkilerinin doza bağlı olduğu tespit edilmiştir. Düşük dozlarda ROT hücre proliferasyonu ve farklılaşmasında rol oynayan redoksa hassas proteinleri modifiye edebildiklerinden hücre sinyali için önemliyken yüksek seviyelerde ROT, hücreye zarar verebilir ve bozuk fizyolojik fonksiyonlara yol açabilir. Yüksek enerjili lazer hücreleri kronik oksidatif strese sürükleyen yüksek miktarda ROT üretimine sebep olurken düşük enerji seviyelerindeki lazer az miktarda ROT üretimine yol açar. Oksidatif stres PKC inaktivasyonu ve caspase 3 aktivasyonu yoluyla hücre proliferasyonunun inhibisyonuna sebep olmaktadır.^{8,17} Çalışmamızda uzun süre lazere maruz kalma sonucu 9. gün kontrol grubuna kıyasla canlı hücre sayısındaki azalmasının sebebi oluşan ROT miktarının fazla olması olabilir.

Düşük seviyeli lazer terapisinin temel hedefi ışık enerjisiyle hücrelere biyoyararıcı bir etki yaratmaktır. Lazer enerjisi, doku sıcaklığında önemli bir artışa yol açmadan hücre moleküllerini uyarır.¹⁹ Lazerin bu olumlu etkilerini inceleyebilmek için *in vitro*'da fibroblastlar, keratinositler,

mezenkimal kök hücreler ve osteoblastlar gibi pek çok farklı hücre hattı ile çalışılmıştır.^{9,19,20} Birçok literatür özellikle diyot lazerin hücre proliferasyonunu arttırdığını ifade etmesine rağmen Abergel ve ark.²¹ düşük seviyeli lazerin insan deri fibroblast kültürlerinde proliferasyonda etkisi yokken prokollajen üretimini uyardığını tespit etmişlerdir. Biz de bu literatür ışığında, farklı sürelerde uygulanan 980 nm dalga boyundaki diyot lazerin Tip 2 diyabetik ve normoglisemik insan dermal fibroblast hücrelerindeki Tip 1 kollajen sentezine etkisini incelediğimizde normoglisemik hücrelerde daha fazla kollajen sentezi olduğunu gördük. Lazerin biyoyararım etkisi dalga boyu, lazer çıkış gücü ve enerji yoğunluğu gibi lazer ışım parametrelerine bağlıdır. Benzer parametreler kültüre edilmiş farklı hücre hatları üzerinde farklı etkilere sahip olabilir.¹¹ Çalışmamızdaki normoglisemik ve Tip 2 diyabetik hücreler arasındaki sentezlenen kollajen miktarındaki farkın sebebi de diyabetik hücrelerdeki aşırı metalloproteinaz (MMP) aktivitesi ya da MMP inhibitör seviyesinin azlığı nedeniyle sentezlenen Tip 1 kollajenin bir kısmının parçalanıyor olması olabilir.²³

Tip 2 diyabetik insan dermal fibroblast hücrelerine 70, 90 ve 100 sn. diyot lazer uygulanmasının Tip 1 kollajen sentezini arttırdığı görüldü. Yapılan *in vitro* ve klinik çalışmalar da bulgularımızı desteklemektedir. Kawalec ve ark.²³ diyot lazerin yara iyileşmesi üzerindeki etkilerini inceledikleri bir çalışmada ülserli diyabetik hastalara 5W gücünde 980 nm dalga boyunda diyot lazeri ortalama 8 hafta boyunca 4 kez uygulamışlar ve diyabetik ülserlerin iyileşmesini arttırdığını tespit etmişler. Yara alanında fibroblastlar granülasyon dokusunun oluşumunda görev alırlar. Yara içerisinde fibroblastlar hücre dışı matrikste en bol protein olan ve yaranın mukavemetine katkıda bulunan kollajeni üretirler. Diyabetik fibroblastların, aynı doku kaynağından olan normoglisemik fibroblastlarla kıyaslandığında büyüme faktörü reseptör ekspresyonundaki bir eksiklikten kaynaklı olan büyüme faktörlerine karşı azalmış bir proliferasyon tepkisine sahip olduğu bilinmektedir. Diyabetik yara iyileşmesinde olan bozukluğun değişen kollajen metabolizması ve anormal granülasyon doku oluşumundan kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.²⁴ Diyabetik yaraların iyileştirilmesinde çalışmamızdaki gibi uygulama sayısı ve süresi uzatıldığı takdirde diyabetik yara iyileşmesinin daha da arttırılabileceği düşünülmektedir.

Normoglisemik insan dermal fibroblast hücrelerinde ise 60, 70 ve 80 sn. lazer uygulanmasının kollajen miktarını arttırdığı tespit edilirken 100 sn. uygulamanın sentezi azalttığı gözlemlenmiştir. Usumez ve ark.²⁵ yaptıkları çalışmada 980 nm dalga boyundaki diyot lazerin 10 sn. uygulanmasının büyüme faktörü salımını arttırarak kollajen sentezini yükselttiğini bulmuşlardır. Bu sonucun çalışmamızdakiyle uyumsuz olmasının sebebi literatürde bir hayvan modeliyle çalışılmış olması olabilir.

Çalışmamızda bazı limitasyonlar bulunmaktadır. Diyot lazerin diyabetik yaraların iyileşmesi üzerindeki etkinliğini değerlendirmek için 2-boyutlu bir ortam tercih edildi ancak bu ortam tam olarak doğal 3-boyutlu ortamı taklit edememektedir. İlerleyen çalışmalarda 3-boyutlu *in vitro* bir modelde lazerin hücre göçüne etkisi incelenerek daha etkili sonuçlara ulaşılabilecektir.

Düşük seviyeli lazer terapisi, birçok farklı hastalık ve anomaliyi tedavi etmek için kullanılabilen, yararlı terapötik etkiler üretmek için görünür kırmızı ya da kızılötesi ışığı kullanır. Bu tedavi yaklaşımı sıklıkla kullanılmasına rağmen lazer parametrelerinin optimum uygulama aralığı ve tam etki mekanizmaları halen belirlenememiştir. Biz de çalışmamızda farklı sürelerde uygulanan diyot lazerin

normoglisemik ve Tip 2 diyabetik insan dermal fibroblast hücrelerinin canlılıklarına, çoğalmasına ve Tip 1 kollajen sentezine olan etkilerini inceledik. Her iki hücre tipinde de uygulanan sürelerdeki diyot lazerin hücreler üzerinde herhangi bir sitotoksik etkiye yol açmadığı ancak 50 sn.'den sonra uygulanan lazerin hücre çoğalmasını yavaşlattığı tespit edildi. Tip 1 kollajen sentezi her iki hücre tipinde de 980 nm dalga boyundaki diyot lazerin uzun uygulama sürelerinde daha yüksek olarak belirlendi. Tip 2 diyabetik insan dermal fibroblast hücrelerinde en yüksek kollajen sentezine 90 sn. lazer uygulaması sonucunda rastlanırken normoglisemik hücrelerde en yüksek kollajen sentezine 70 sn. lazer uygulamasında ulaşıldı. Sonuç olarak, 980 nm dalga boyundaki diyot lazerin olumlu etkilerinin kullanılan hücre tipine göre farklı uygulama sürelerinde görüldüğü tespit edilmiştir. Hasta profiline göre uygun sürelerde uygulanan 980 nm dalga boyundaki diyot lazerin düşük maliyetle ve hastaya en az zararlar hastadaki yara iyileşme sürecini olumlu yönde etkileyebileceği düşünülmektedir.

Çıkar Çatışması Beyanı

Yazarlar arasında çıkar çatışması tarif eden herhangi biri bulunmamaktadır.

Etik Onay/Hasta Onamı

Çalışmamız için Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 03/09/2015 tarihinde 236 karar numarası ile etik kurul izni alınmıştır.

Maddi Destek

Bu araştırma Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje no: 2015/045).

Yazar Katkıları

CYÖ, HK: Çalışma tasarımı; CYÖ: Verilerin toplanması ve analizi; CYÖ, HK: Makale inceleme ve düzenleme; CYÖ, HK: Yayınlanacak versiyonun nihai onayı

Kaynaklar

1. Emilia de Abreu Chaves M, Piancastelli ACC, Rodrigues de Araujo A, Pinotti M. Effects of low-power light therapy on wound healing: LASER x LED. *An Bras Dermatol.* 2014;89(4):616-623. doi:10.1590/abd1806-4841.20142519
2. Osman AH, Kamel MM, Wahdan MH, Al-gazaly M. Assessment to the effects of low diode laser on wound healing in diabetic rats. *Life Sci. J.* 2013;10(2):1313-1320.
3. Yu W, Naim JO, Lanzafame J. Effects of photostimulation on wound healing in diabetic mice, *Lasers in Surg. Med.* 1997;20:56-63. doi:10.1002/(sici)1096-9101(1997)20:1<56:aid-lsm9>3.0.co;2-y
4. Colombo F, Neto AAPV, Cavalcanti de Sousa AP, Marchionni AMT, Pinheiro ALB, Regina de Almeida Reis S. Effect of low-level laser therapy (λ660 nm) on angiogenesis in wound healing: An immunohistochemical study in a rodent model. *Braz. Dent. J.* 2013;24(4):308-312. doi:10.1590/0103-6440201301867
5. Hawkins D, Abrahamse H. Phototherapy-a treatment modality for wound healing and pain relief. *African J. Biomed. Res.* 2007;10:99-109. doi:10.4314/ajbr.v10i2.50626
6. Kawalec JS, Hetherington VJ, Pfennigwerth TC, Dockery DS, Dolce M. Effect of a diode laser on wound healing by using

- diabetic and nondiabetic mice. *J. foot & Ankle Surg.* 2004;43(4):214-220. doi:10.1053/j.jfas.2004.05.004
7. Medrado ARAP, Pugliese LS, Reis SRA, Andrade ZA. Influence of low level laser therapy on wound healing and its biological action upon myofibroblasts. *Lasers Surg. Med.* 2003;32:239-244. doi:10.1002/lsm.10126
8. Migliario M, Pittarella P, Fanuli M, Rizzi M, Renò F. Laser-induced osteoblast proliferation is mediated by ROS production. *Lasers Med. Sci.* 2014;29:1463-1467. doi:10.1007/s10103-014-1556-x
9. Borzabadi-Farahani A. Effect of low-level laser irradiation on proliferation of human dental mesenchymal stem cells; a systemic review. *J. Photochem.&Photobio., B: Bio.* 2016;162:577-582. doi:10.1016/j.jphotobiol.2016.07.022
10. Rizzi M, Migliario M, Rocchetti V, Tonello S, Renò F. Pre-odontoblast proliferation induced by near-infrared laser stimulation. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2016;20:794-800.
11. Crisan B, Soritau O, Baciut M, Campian R, Crisan L, Baciut G. Influence of three laser wavelengths on human fibroblasts cell culture. *Lasers Med. Sci.* 2013;28:457-463. doi:10.1007/s10103-012-1084-5
12. Park JJ, Kang KL. Effect of 980 nm GaAlAs diode laser irradiation on healing of extraction sockets in streptozotocin-induced diabetic rats: a pilot study. *Lasers Med. Sci.* 2012;27:223-230. doi:10.1007/s10103-011-0944-8
13. Sterczala B, Grzech-Leśniak K, Michel O, Trzeciakowski W, Jurczyszyn K. Assessment of human gingival fibroblast proliferation after laser stimulation *in vitro* using different types and wavelengths (1064, 980, 635, 450 and 405 nm)-preliminary report. *J. Person. Med.* 2020;2020100600. doi:10.20944/preprints202010.0600.v1
14. Yılmaz Ozdogan C, Kenar H, Davun KE, Yucel D, Doger E, Alagoz S. An *in vitro* 3D diabetic human skin model from diabetic primary cells. *Biomed. Mater.* 2020;16(1):015027. doi:10.1088/1748-605X/abc1b1
15. Brechbuhl HM, Barrett AS, Kopin E, et al. Fibroblast subtypes define a metastatic matrixome in breast cancer. *JCI Insight.* 2020;5(4):e130751. doi:10.1172/jci.insight.130751
16. Alt E, Yan Y, Gehmert S, et al. Fibroblasts share mesenchymal phenotyped with stem cells, but lack their differentiation and colony-forming potential. *Bio. Cell.* 2011;103:197-208. doi:10.1042/BC20100117
17. Skopin MD, Molitor SC. Effects of near-infrared laser exposure in a cellular model of wound healing. *Photodermat., Photoimmun.&Photomed.* 2008;25:75-80. doi:10.1111/j.1600-0781.2009.00406.x
18. Kawalec JS, Pfennigwerth TC, Hetherington VJ, et al. A review of lasers in healing diabetic ulcers. *The Foot.* 2004;14:68-71. doi:10.1016/j.foot.2003.11.001
19. Amid R, Kadkhodazadeh M, Ahsaie MG, Hakakzadeh A. Effect of low level laser therapy on proliferation and differentiation of the cells contributing in bone regeneration. *J. Lasers Med. Sci.* 2014;5(4):163-169.
20. 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):161-166. doi:10.1089/pho.2005.23.161
21. Abergel RP, Lam TS, Meeker CA, Castel CJ, Dwyer RM, Uitto J. Biostimulation of procollagen by low energy lasers in human skin fibroblast cultures. *Clinical Res.* 1984;32:567-572. doi:10.1111/j.1524-4725.1987.tb00510.x
22. Moura LIF, Dias AMA, Carvalho E, de Sousa HC. Recent advances on the development of wound dressings for diabetic

- foot ulcer treatment-A review. *Acta Biomat.* 2013;9:7093-7114. doi:10.1016/j.actbio.2013.03.033
23. Kawalec JS, Reyes C, Penfield VK, et al. Evaluation of the Ceralas D15 diode laser as an adjunct tool for wound care: a pilot study. *The Foot.* 2001;11(2):68-73, doi:10.1054/foot.2001.0669
24. Al-Watban FH, Zhang XY, Andres BL. Low-level laser therapy enhances wound healing in diabetic rats: A comparison of different lasers. *Photomed. Laser Surg.* 2007;25(2):72-79. doi:10.1089/pho.2007.1094
25. Usumez A, Cengiz B, Oztuzcu S, Demir T, Aras MH, Gutknecht N. Effects of laser irradiation at different wavelengths (660, 810, 980 and 1064 nm) on mucositis in an animal model of wound healing. *Lasers Med. Sci.* 2014;29:1807-1813. doi:10.1007/s10103-013-1336-z