

157-564

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DİŞ HASTALIKLARI VE TEDAVİSİ ANABİLİM DALI

**Nd: YAG LAZERLERİN FARKLI FREKANS VE GÜÇLERDE UYGULANMASININ
İNSAN OSTEOLAST HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Dt. HACER DENİZ ARISU

TEZ YÖNETİCİSİ

Prof. Dr. EMİN TÜRKÖZ

ANKARA, 2004

İÇİNDEKİLER

	<u>SAYFA</u>
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	5
GEREÇ VE YÖNTEM	53
BULGULAR	61
TARTIŞMA	89
SONUÇ	107
ÖZET	109
SUMMARY	111
KAYNAKLAR	113
ÖZGEÇMİŞ	134
TEŞEKKÜR	135

GİRİŞ VE AMAÇ

Periapiks ileri derecede değişim yeteneği ve aktif fizyolojisi olan bir dokudur. İltihap sonucu kök kanalının apikal bölümünde, dentinde ve sementte düzensiz rezorbsiyon alanları oluşabilmektedir. İltihabın apikalde periodontal membrana doğru genişlemesi, alveoler kemikte rezorbsiyona ve rezorbe alanların granülasyon dokusu ile dolmasına neden olmaktadır. Kanal tedavisi esnasında apikal bölümde, fazla mekanik ve kimyasal irritasyon yapmadan ve bu dokuyu enfekte etmekten kaçınılarak çalışılır ve ideal apikal tıkama sağlanırsa, iltihabi reaksiyon geriler ve tamir gerçekleşir. Granülasyon dokusu yerine fibröz doku oluşur ve sonradan bunun da yerini kemik dokusu alır. Kökteki rezorbsiyon alanlarında kalsifiye doku birikimi, kanalın apikal bölümünü tedrici olarak daraltır. Fakat kalsifiye dokuyla tamamen kapanma oluşmaz.

Endodontik başarının histolojik değerlendirilmesi, kolay uygulanabilir bir teknik değildir. Bununla beraber kök kanal tedavisini takiben iltihabın bulunmadığı ve kemik rejenerasyonunun bulunduğu olgularda klinik başarı oranının arttığı da bir gerçektir. Periapikal dokularda histolojik olarak kabul edilebilir bir iyileşmede:

1. İltihap olmaması
 2. Periodontal lif rejenerasyonu
 3. Foramen apikale bölgesinde yeni sement tabakalarının oluşumu
 4. Sağlıklı osteoblastlarla yeni kemik yapımı
- oluşması gerekmektedir.

İyileşen periodontal dokuların histolojik incelenmesinde sement birikimi, artan vaskülerite ve artan fibroblastik ve osteoblastik aktivite görülür.

Periapikal iyileşme enzimatik faaliyetlerle başlar:

1. Eozinofillerden gelen histaminaz enzimi histamini ve kininaz bradikininini, süperoksitdismutaz ise dokuda biriken süperoksit radikallerini azaltır.

2. Intraseküler siklik adenosin monofosfat (cAMP) oranı siklik guanidin monofosfat (cGMP) miktarından daha fazlaysa iltihap artar. İyileşmekte olan periapikal dokularda cGMP miktarı daha fazladır.

3. Histamin salınır ve Mast hücrelerinin H₂ reseptörlerine tutunarak iltihaba karşı koyan bir reaksiyonu başlatır.

Periapikal dokularda enzimatik olaylar başladığında rejenerasyon veya fibrozis şeklinde iki farklı olay meydana gelir.

Konak tarafından ilk önce rejenerasyon denir. Başarısız olduğunda fibrozis başlar. Periapikal dokular, kök yüzeyi ve kemik dokusu arasında yer alan sinir lifleri ve kan damarlarından oluşmuştur. Bütün bu dokuların rejenerasyon kabiliyeti vardır. Mevcut osteoblastlar aktive olur veya fibroblastlar osteoblasta dönüşerek yeni kemik yapımı başlar. Rejenerasyon tam olarak başarısız olduğunda, arta kalan fibrin-fibronektin matriksi üzerine kollajen yığılır. Bu olayda fibroblastlar tarafından salgılanan kollajen, normal dokulardaki gibi Tip I değil Tip III (protokollajen) kollajendir. Oluşan bu fibröz dokunun içerisinde zengin bir damar ağı oluşur ve bu yeni dokuya granülasyon dokusu denir.

Periapikal iyileşme sırasında oluşan granülasyon dokusu kalsifiye olabilir. Buradaki T lenfositlerin aktivitesi nedeniyle ve akut faz proteinlerinden açığa çıkan kallikrein ve kininaz II, hem osteoblastları hem de osteoklastları uyarır. Bu maddeler ortamda polimorfonükleer lökosit (PML), cAMP ve T helper lenfosit (Th) varlığında osteoklastları daha fazla uyarır. Ancak iltihabi durum ortadan kalktığında, periapekte bu

enzim ve hücreler bulunmaz. Bu nedenle osteoblastik aktivite diğerinin önüne geçer. Kalsifikasyon granülasyon dokusunun merkezinde birkaç noktadan başlar, periferik doğru yayılır. Sonra bu kalsifikasyon odakları birleşir.

Ancak bu durum her zaman böyle gerçekleşmeyebilir. Granülasyon dokusu fibroepitelyal dejenerasyon gösterebileceği gibi en başa dönerek iltihabi bir odak da oluşturabilir ¹.

Son yıllarda lazer diş hekimliği alanında sıklıkla kullanılan bir teknik haline gelmiştir. 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.

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. 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. Kemik dokusuyla ilgili in vitro biyoyumluluk deneylerinden pek çoğu, insan kaynaklı olmayan primer kemik hücreleriyle veya devamlı hücre kültürleriyle yapılmaktadır. İnsan kemik hücreleriyle elde edilen primer kültürlerle yapılmış çok az araştırma mevcuttur. Bu çalışmada insan kaynaklı osteoblast modeli olarak, devamlı hücre kültürü Saos-2 kullanılmıştır. Bu hücreler osteoblastik fenotip gösterir, uzun süre yaşatılabilir ve in vitro olarak kemik oluşturabilirler.

Bu çalışmanın amacı Nd:YAG lazer sisteminin kök kanallarını steril ederek periapikal dokuların iyileşmesine yardımcı olması yanında, diş kökleri etrafında

bulunan alveoler kemik dokusunda hücresel düzeyde meydana getireceği değişikliklerin, bu lezyonların iyileşmesi üzerinde olumlu bir etki sağlayıp sağlayamayacağını insan osteoblast devamlı hücre kültürü kullanılarak incelenmesidir. Çalışmada lazer uygulamasının osteoblast hücreleri üzerinde meydana getirdiği etkiler farklı değişkenler açısından incelenmiştir. Bu lazer sisteminin çalışmada uygulanan güç, süre ve frekanslarda, osteoblastlarda sayısal olarak bir artış meydana getirip getirmediği araştırılmıştır. Bunun yanında biyokimyasal ve sitokimyasal incelemelerle bu hücrelerden salınan alkalen fosfataz enzimi ve osteokalsin miktarları tayin edilerek bunun kalsifiye doku oluşumu üzerindeki etkilerinin yorumlanması amaçlanmıştır.



GENEL BİLGİLER

KEMİK

KEMİĞİN TEMEL BİYOLOJİSİ VE BİYOKİMYASI

Kemik, durmaksızın yapısını yenileyen ve metabolik olarak değişen aktif bir dokudur. Kemik iskelet, organları koruma, vücuda destek olma ve hareket imkanı sağlama yanında, çeşitli fonksiyonlar için gerekli kalsiyum, fosfat, magnezyum, sodyum ve karbonat gibi minerallere dinamik bir depo olma görevini de üstlenmiş, organik ve inorganik bileşenlerden meydana gelmiş bir bağ dokusudur. Organik kısım kollejen ve kollejen dışı proteinlerden oluşan matriks ve kemik hücrelerinden oluşur. İnorganik kısım ise hidroksi apatit kristallerinden, kalsiyum, sodyum, magnezyum ve florid gibi iyonlar ile karbonattan oluşmuştur².

KEMİĞİN YAPISI

KEMİK TİPLERİ VE KEMİK HÜCRELERİ

Kemiğin başlıca iki tipi, süngerimsi görünümlü trabeküler (kansellöz) kemik ve katı yapıli kortikal kemiktir. Trabeküler kemik, uzun kemiklerin merkezini ve metafizlerini oluşturur. Kıkırdak türevlidir ve iskeletin en büyük damar donanımına sahiptir. Trabeküler kemik hayat boyunca son derece aktiftir. Osteoporozun trabeküler bölgelerde daha fazla ve erken meydana gelmesinin nedenlerinden biri bu aktivitedir. Yapısal farklara ek olarak, trabeküler ve kortikal kemik arasında, hücrelerin üç boyutlu düzenlenimi, mineralleşmiş matrikslerinin yoğunluğu, kan damarlarının ve kemik hücrelerini saran ve besleyen kemik iliğinin dağılımı bakımından da fark vardır. Trabeküler kemik, kortikal kemikten daha büyük bir yüzeye sahiptir ve metabolik olarak daha aktiftir³.

Tüm kemik yüzeyleri belirli morfolojik ve fonksiyonel özellikleri olan hücrelerle kaplıdır. Kemikte dört tip hücre bulunur: 1) osteoblastlar 2) osteoklastlar, 3) osteositler ve 4) osteoprogenitor hücreler.

Osteoblastlar ve osteoklastlar metabolik olarak aktiftir ve hem kortikal hem de trabeküler (kansellöz) kemik boyunca bulunsalar da asıl yoğunluk trabeküler kemiktedir ⁴. Osteositler, mineralleşmiş doku içinde gömülü bulunurlar ve genellikle osteoblastların diferansiyasyonu ile oluşurlar. Kan damarları ve ekstrasellüler sıvılarla ilişkileri sınırlıdır ³. Osteositlerin kemiğin metabolik aktivitesine önemli derecede katıldığı düşünülmemektedir ⁴. Özellikle uzun kemiklerin yüzeyini saran ve örten kemik astar hücrelerinin, osteoblast benzeri hücreler olduğu düşünülmektedir fakat metabolik aktiviteleri çok azdır ⁴.

Osteoblastlar

Osteoblastlar, kemik iliği ve endosteal tabakadaki prekürsör hücrelerin değişime uğramasıyla meydana gelirler. Kemik yüzeyinde kümeler halinde bulunan bu hücreler, metabolik olarak aktiftir ve kemik oluşumundan sorumludurlar. Ekstrasellüler matriks için kollejen, osteokalsin, osteonektin ve alkalen fosfataz sentezlerler. Matriks mineralizasyonunda rol alırlar. Mineralizasyondan sonra bazı osteoblastlar kemik yüzeyinde kalır ve dinlenen (resting) osteoblast ya da kemik astar (bone-lining) hücreleri olarak adlandırılır. Osteoblastların fonksiyonları, bazı hormonlar ve faktörler tarafından düzenlenir.

Osteoblast fonksiyonlarının düzenlenmesinde önemli rolü olan paratiroid hormonu, iyon ve amino-asit geçişine aracılık eder, kollejen sentezini düzenler ve spesifik bir reseptöre bağlanır. 1.25-dihidroksi vitamin D₃ ise osteoblasttaki bir reseptöre bağlanarak matriks oluşumunu, alkalen fosfataz sentezini ve kemiğe ait özel proteinlerin sentezini stimüle eder. Osteoblastlar östrojen ile ilgili reseptör içerirler ⁵⁻⁹.

Osteoklastlar

Orjinleri kemik iliği veya dolaşımdaki makrofajlardır. Endosteal kemik yüzeylerinde ve Haversian kanallarında genellikle tek tek bulunan çok çekirdekli dev hücrelerdir. Bu hücreler kemik rezorbsiyonundan sorumludur. Kemik yüzeylerine yapışır, hidrojen iyonları veya lizozomal enzimleri salgılayarak mineralize kemiği yıkarlar. Sistemik hormonlardan paratiroid hormonu ve 1.25 dihidroksi vitamin D₃ kemik rezorbsiyonu için osteoklastı aktive ederken, kalsitonin kemik rezorbsiyonunu durdurur. Fiziolojik kemik rezorbsiyonu ve normal kemik remodelinginin başlatılmasında ise lokal hormonların rolünün sistemik hormonlardan fazla olduğu düşünülmektedir.

Osteoklast üzerine direkt stimulan etkisinin olduğu bilinen faktörlerden biri Vitamin A'dır. Transforming growth faktör-alfa (TGF- α), prostoglandinler, lökotrienler ve tiroid hormonlarının osteoklastik aktiviteyi stimüle ettiği muhtelif in vitro ve in vivo çalışmalarda gösterilmesine rağmen rezorbsiyondaki kesin rolleri hala araştırılmaktadır².

Osteositler

Kalsiyum tuzlarının birikmesiyle mineralize olan kemik matriksi içinde hapsolan osteoblastlara osteosit denir. Dolayısıyla osteositler, olgun kemiğin esas hücreleridir. Osteositin hücre gövdesi içinde bulunduğu lakün adı verilen boşluğun şekline uyar. Yassı bir yapıya sahip olan bu hücreler ince stoplazmik uzantılara sahiptir. Bu uzantılar kanaliküli denilen küçük kemik kanalcıkları içinden geçerek komşu osteositlerin uzantılarıyla ilişki kurar. Uzantıların kanaliküliler içinde ne kadar mesafeye ulaştıklarını ışık mikroskobuyla anlamak mümkün değildir. Ancak elektron mikroskop çalışmalarıyla hücrelerin, uzantıların birbirlerine değme noktalarında, iletişim bağlantıları ile bağlandıkları tespit edilmiştir. Bu durum, kemik hücrelerinin lakünleri içinde tek başlarına hapsolmadıklarını, hücre-hücre bağlantı özellikleriyle birbirleriyle ilişki halinde olduklarını

gösterir. İletişim bağlantıları oldukça düşük elektrik direncinde, küçük molekül ve iyonların geçişine izin verebilecek özelliktedir. Bu bulgu, kemiğin kalsifiye olmuş matriksi içinde gömülü bulunan osteositlerin kan yoluyla gelen hormonlarla nasıl uyarıldığını izah edebilmektedir.

Işık mikroskobu incelemelerinde, osteositlerin çekirdek ve sitoplazmik özellikleri, Golgi bölgesi hariç, hemen hemen osteoblastlarınkıyla aynıdır. Osteositlerde Golgi bölgesi daha az belirgindir. Sitoplazmaları bazik boyalarla daha hafif boyanır. Kemik matriksinin daha derinlerinde bulunan osteositlerdeki Golgi, Endoplazmik Retikulum, ve Mitokondri gibi organellerin oldukça azaldığı görülür. Bu hücreler protein sentezi açısından daha az aktif görünmelerine rağmen metabolik olarak tamamen inaktif değildirler.

Osteositlerin kemiğin diğer hücre tiplerine dönüşebilme özelliği vardır; kemik yıkımı sırasında, içinde bulundukları lakünler açılınca dinlenme halindeki osteoprogenitor hücrelere, bunlar da osteoblastlara dönüşebilir.

Osteosit, kemik matriksiyle çevrili bir osteoblasttan başka birşey değildir. Bulunduğu lakün içinde yavaş yavaş sitolojik değişime uğrarken, aktivitesini azalarak da olsa devam ettirir.

Osteoliz olayı aktif fizyolojik bir olay olup, osteosit etrafındaki kemik matriksinin değişime uğratılması ve kemik minerallerinin geri emilmesidir⁵⁻⁹.

Osteoprogenitor hücreler

Diğer destek dokular gibi, kemik dokusu da mezenşimden gelişir. Doğum sonrasında mitoz bölünme yapabilecek, yapı ve işlev bakımından daha gelişkin, farklılaşmamış hücre topluluklarına sahiptir. Bu hücrelere osteoprogenitor veya osteojenik hücreler denir. Bunlar kemik hücresi olma yönünde koşullanmış mezenşim hücreleridir. Osteoprogenitor hücreler açık renkli, oval veya uzunca çekirdekli, hafif asidofil veya çok

soluk bazofil sitoplazmalı hücrelerdir. Sekonder kemiklerin zarlarında (periostium ve endosteum), bu kemiklerin içerdikleri Havers ve Volkmann kanallarının örtüsünde ve büyüyen kemiklerin metafizindeki kıkırdak matrisi içerisinde bulunurlar.

Osteoprogenitor hücreler kemiklerin normal büyümesi sırasında aktiftirler. Erişkinlerde de yukarıdaki söz konusu bölgelerde inaktif durumdayken, kemikte yaralanma olduğunda ve kırıkların iyileşme bölgelerinde aktif hale geçerek mitozla bölünüp çoğalırlar. Çoğalan bu hücrelerin bir bölümü, kemiği oluşturan osteoblastlara dönüşür. Osteogenez durduğunda osteoblastlar da osteoprogenitor hücrelere dönüşebilirler⁵⁻⁹.

ALVEOLER KEMİK

Alveoler kemik, alveolü sınırlayan kemik tabakasıdır. Kompakt yüzeyi radyografide radyopak bir çizgi olarak görülür ve lamina dura olarak adlandırılır. Bu radyopakitenin yoğunluğu X-ışınlarının açısına ve kökün çapına bağlı olarak değişir. Alveoler kemiğin büyük bölümü lamelli kemikten oluşmuştur. Lameller, periodontal ligaman boşluğunun yüzeyine dik olacak şekilde, küçük Havers sistemleri içerisinde birbirlerine paralel olarak dizilmiştir. Alveoler kemiği tanımlamak için yüzeyinin kalburumsu görünümünden dolayı "kribriform plaka" terimi kullanılmaktadır. Açıklıkların pek çoğu, interalveoler sinirlerin ve kan damarlarının periodonsiyuma girişi ile ilgilidir. Kalburumsu yapıdan dolayı iltihap basıncından kaynaklanan ağrı, pulpa ağrısından daha düşük düzeydedir. Basıncın sürekli olduğu ödemli dönemlerde, osteoklastik hücrelerin bu boşluğu genişlettiği anlaşılmıştır. Mevcut periapikal iltihap periapikal lamina duranın rezorbsiyonuna neden olur. Bu kompakt kemiğin devamlılığının bozulmasının radyografik olarak saptanması önemli bir teşhis kriteridir. Periradiküler iltihabi lezyonların erken evrelerinde lamina dura bir aralık oluşmaz. Bu nedenle radyografik görüntü, histolojik doku harabiyetinin gerçek miktarını göstermeyebilir. Radyografide lezyonların görülür hale gelebilmesi için kemiğin en az %30 ila %50 oranında mineral kaybına uğramış

olması gerekmektedir. Bender ve Seltzer deneysel kemik lezyonlarıyla ilgili çalışmalarında şunları göstermişlerdir:

1. Eğer bir lezyon kortikal ve süngerimsi kemik arasındaki birleşimi geçmiyorsa, radyografda görülmez.

2. Klinik lezyonlarda yıkım veya tamirin doğru olarak değerlendirilebilmesi X-ışınlarının doğru olarak açıklanılmasına bağlıdır.

Trabeküler (süngerimsi) kemikte, kemik lamellerinin septal ya da labirent tarzında düzenlendiği görülür. Kemik iliğinin gevşek bağ dokusu, periodontal ligamentin gevşek bağ dokusu ile bir süreklilik gösterir. Trabeküler boşluklarda ağrı reseptörleri yoktur ¹⁰.

KEMİK METABOLİZMASININ BİYOKİMYASAL GÖSTERGELERİ:

Metabolik kemik hastalıklarının değerlendirilmesi için üç tanı yöntemi vardır: 1. Kemik dansitesi, 2. Kemik biopsileri, 3. Kemik yapım-yıkımının biyokimyasal göstergeleri. Kemik dansitesi, osteoporoz tanısı için temel tanısal yoldur, fakat kemik yapımı ve rezorbsiyonunun dinamikleri hakkında bilgi sağlamaz. Bu bilgiyi kemik biyopsileri ve biyokimyasal bulgular verir. Kemik biyopsileri invaziv işlemler olduğundan, osteoporozlu hastaların izlenmesinde günlük tetkiklerde kullanılamaz ¹¹. Kemik yapımı ve kemik yıkımının biyokimyasal göstergeleri Tablo 1'de verilmiştir.

Kemik Yapımı	Kemik Yıkımı
Serum: - Osteokalsin (Bone Gla Protein = BGP) - Total alkali fosfataz (TALP) ve alkali fosfatazın kemik izoenzimi - Prokollajen 1 karboksiterminal uzantı enzimi	Serum: - Tartara dirençli asit fosfataz - Piridinolin ve piridinolinli peptitler İdrar: - Piridinolin(pyr), Deokspiridinolin (dpy) ve bunları içeren peptitler - Hidroksiprolin (OH-P) - Hidroksilizin glukozidleri - Açlık idrar Ca^{2+} u

Tablo 1: Kemik yapım-yıkımının biyokimyasal göstergeleri

Alkalen Fosfataz (Alp)

Kemik yapımının geleneksel ölçütü, total serum ALP aktivitesidir. ALP hücre membranlarının ekstrasellüler yüzeyindeki glukozil-fosfatidilinozitol kalıntılarına sıkıca bağlanan bir glukoproteindir. Enzim membrana bağlı iken bir tetramerdir, ancak dolaşıma katıldığında diamerdir. İskeletin ALP'ı osteoblastların membranında yerleşmiştir ve henüz anlaşılamayan bir mekanizma ile dolaşıma salgılanır ¹². Serum total ALP'ı sıklıkla kullanılan kemik yapımı göstergesi olduğu halde, birçok dokuda bulunduğu için hassasiyeti ve özgünlüğü zayıftır. Paget hastalığı, raşitizm, osteomalasi ve renal osteodistrofi gibi kemik metabolizması ile ilgili bozukluklarda, enzim aktivitesi değişiklikleri tedavi gidişatını yansıtır ve yeni kırıkların iyileşmesinin izlenmesi açısından yararlı bir göstergedir ^{12,13,14}.

Kemik ALP'nın kesin fonksiyonu bilinmemesine rağmen, hipofosfatazi defektlerinden anlaşıldığına göre enzim, mineralizasyonda çok önemli rol oynar ¹⁵. ALP, mineralleşme başlangıcının odağı olduğuna inanılan membrandaki matriks keseciklerinde bol miktarda bulunur. Kıkırdakta kalsiyum pirofosfat dihidrat kristallerinin çözülüşünde de rolü olduğu düşünülmektedir.

Osteoblastlar aktif olarak kemik matriksini depolamaları sırasında, çok miktarda alkalin fosfat salgılarlar. Bu fosfatın inorganik fosfat konsantrasyonunu arttırdığı ya da kollejen liflerini, kalsiyum tuzlarının depolanmasını sağlayacak şekilde aktive ettiği sanılmaktadır. Alkalin fosfat düzeyi, genellikle kemik yapım hızının bir göstergesi olarak kabul edilmektedir ¹⁶. Alkalin fosfat enziminin temel rolü kemik yapımının başlatılmasını sağlamaktır ¹⁷.

Osteokalsin (Bone gla Protein= BGP)

Kemikteki bazı proteinlerin amino asitleri, 17, 21, 24. konumlarda K vitaminine bağlı enzimlerin katalizi ile karboksillenerek gama-karboksi glutamik asit (Gla) oluşturmak üzere değişikliğe uğrarlar. Bu tür değişikliğe uğramış amino asit, proteinlere Ca^{2+} bağlama yeteneği kazandırır.

BGP, kemiğe özgün kabul edilen ilk kemik matriksi proteindir ^{3,12,18}. 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 göstergedir ¹⁹. Kemikte en bol bulunan kollajen dışı proteinlerden biridir. Total proteinin %1-2'si kadardır. 49 aminoasitli küçük bir proteindir ve birçok türlerinde Ca^{2+} bağlayıcı aminoasit olan üç Gla kalıntısı bulunur. Kesin fonksiyonu henüz tam olarak belirlenememiştir. Histomorfometrik ve Ca^{2+} kinetik araştırmaları ile BGP'in kemiğin yıkımı ve yapımının eşgüdümlü olduğu hallerde

güvenilir bir yapım yıkım göstergesi, fakat eşgüdümlü olmadığı durumlarda özgün bir kemik yapım göstergesi olduğuna inanılır ¹⁸.

İn vitro çalışmalara göre, osteokalsin sentezi, matriks sentezinden çok matriksin mineralizasyonu ile olur. Matriks sentezi ve mineralizasyonu birçok klinik durumla bağlantılı olduğundan, BGP ile ilgili bilgileri kemik yapımı değişiklikleri bakımından yorumlamak uygun olur ³.

LAZER

“Laser” (Lazer) kelimesi aslında “Light Amplification by the Stimulated Emission of Radiation” tanımının baş harflerinden oluşmakta ve “radyasyonun uyarılmasıyla (tetiklenmesiyle) ışık şiddetinin artırılması” anlamına gelmektedir ²⁰.

LAZERİN TARİHÇESİ

İlk lazer ya da o zamanki adıyla ‘Maser’ Theodore H. Mainman tarafından 1960 yılında geliştirilmiştir. Maser “Microwave Amplification by Stimulated Emission of Radiation” tanımının baş harflerinden meydana gelen bir kısaltmadır. Goldman’a göre bu prensipler ilk kez 1958 yılında Schawlow ve Towness tarafından Massachusetts Teknoloji Enstitüsü’nde yayınlanmış ancak ilk lazerin geliştirilmesi nedeniyle verilen Nobel ödülünü 1964 yılında Towness, Basov ve Prokhorov almıştır. Radyasyonun spontan ve uyarılmış salınımı fikrinin ilk kez 1916 yılında Einstein’ın “Zur Quantum Theorie Der Stralung” (Quantum Teorisi) ile ortaya atıldığı kabul edilmektedir ²¹.

LAZER FİZİĞİ VE TEMEL PRENSİPLERİ

Lazer, radyasyonun uyarılmış salınımıyla ışığın güçlendirilmesi anlamına gelmektedir.

Işık elektromanyetik bir enerji formudur ve dalgalar halinde sabit hızda hareket etmektedir. Bu radyant enerjinin temel birimi foton ya da ışık partikülü olarak

adlandırılır. Fotonlardan oluşan dalga iki temel özellikle tanımlanabilir. Bunlardan ilki amplitüddür ve dalga salınımının en üst noktasıyla en alt noktası arasındaki mesafeyi belirtir. Bu, dalganın enerji miktarının ölçümüdür. Amplitüd ne kadar genişse iş yapabilen enerji miktarı o kadar fazladır. Jul(J) enerji birimidir ve dişhekimliği kliniğinde kullanılan pek çok lazerin enerji seviyesi 1 J den daha azdır. Bu nedenle enerji birimi olarak milijul kullanılmaktadır ve bu da 1/1000 J a eşittir. Dalganın ikinci özelliği ise dalga boyudur ve dalga üzerinde birbirine benzer iki nokta arasındaki uzaklıktır. Yani elektriksel alan bir tam salınım yaptığında fotonun kat ettiği mesafedir. Dalga boyu metre cinsinden ölçülür. Bu ölçümün daha küçük birimleri mikrometre (μm) ($=10^{-6}$ m) ve nanometredir (nm) ($=10^{-9}$ m). Işık morötesi, görünür ışık ya da kızıl ötesi olabilir. Bu sınıflama dalga boyuna göre yapılmaktadır. Planck ve Einstein gibi fizikçilerin ortaya koyduğu denklemlerde ve aşağıdaki denklemde de görüldüğü gibi kısa dalga boylarında fotonların taşıdığı enerji miktarı daha fazladır:

$$E=h \cdot c/\lambda$$

E: fotonun jul cinsinden enerjisi

h: Planck sabiti

c: ışığın metre cinsinden saniyedeki hızı

λ : ışığın metre cinsinden dalga boyu

Lazer ışığının hızı diğer ışıklar gibi boşlukta saniyede 300.000 kilometredir²².

Dalganın, dalga boyuyla bağlantılı özelliği frekanstır. Frekans; bir saniyede dalganın yaptığı salınım sayısıdır. Frekans dalga boyuyla ters orantılıdır. Dalga boyu kısaldıkça frekans artar, dalga boyu uzadıkça frekans azalır. Bugünkü lazer

teknolojisinde genellikle dalga boyu 0.1 ile 10 μ m (mikron) arasındaki lazer ışınları kullanılmaktadır.

LAZER EMİSYONU (SALINIMI)

RADYASYONUN KENDİLİĞİNDEN VE UYARILMIŞ SALINIMI

Normal koşullar altında atom en alt enerji seviyesinde bulunur. Bu 'dinlenme' halindeki enerji seviyesidir ve 'kararlılık hali' olarak adlandırılır. Atomlar kararlılık halindeyken dışarıdaki bir enerji kaynağından enerji verildiğinde bu enerji atom tarafından emilir ve elektronların daha yüksek bir enerji seviyesine çıkmasına neden olur. Atomlar 'uyarılmış' haldeyken, kararlı hale dönmeye çalışırlar ve bu yüksek enerji seviyesinde uzun süre kalamazlar. Elektronlar kararlılık haline kendiliğinden düşerken önceden soğurdukları fazla enerjiyi ışık fotonu olarak dışarıya verirler. Bu şekilde ışık üretimine kendiliğinden salıverme adı verilir ve beyaz ışık ya da floresan ışık kaynağı gibi pek çok ışık kaynağının ürettiği ışığı tanımlar.

Einstein, yüksek enerji seviyesindeki bir atomun ek bir enerji kuantumu daha soğurabildiğini ve bunun iki fotonun salınımıyla sonuçlanacağı teorisini ortaya atmıştır. Bu enerji, birbirinin aynı iki foton olarak yol alır, salınır ya da 'irradie' olur. Bu fotonlar daha sonra aynı özellikte fotonlar salabilecek olan daha fazla sayıda atoma enerji verebilir. Bu durum, ışık şiddetinin artırılması (güçlendirilmesi) ve lazer ışınının oluşmasıyla sonuçlanır.

Lazer radyasyonu üretmek için lazer cihazının üç temel bölümü bulunmaktadır:

Aktif Ara Madde (Lazer Aktif Maddesi)

Aktif ara madde aktive edilen dış bir kaynak tarafından oluşturulan enerjiyi soğurma ve bu enerjiyi oluşturan moleküller, atomlar veya iyonlar düzeyinde

subatomik düzenlemelerde değişiklikler oluşturarak, bu enerjiyi ışığın fotonları olarak dışarıya verme özelliğine sahip materyallerdir. Bu genellikle elektronların daha yüksek enerji seviyelerine çıkartılması ve daha sonra bu elektronların daha düşük enerji bantlarına inerken saldıkları fotonların yayılmasıyla oluşmaktadır. Aktif ara madde gaz, sıvı, katı ya da yarı iletken olabilmektedir.

Lazer üretimi için kullanılan aktif ara maddenin seçimi çok önemlidir. Çünkü lazerin içerisinde bulunan aktif ara madde, cihazın dalga boyunu ve eğer radyasyon görünür radyasyonsa rengini belirler. Bu yüzden yapılan araştırmalarda lazerin tipini belirtmek için lazer cihazının dalga boyu yerine aktif ara maddenin ismi belirtilir ve lazer buna göre adlandırılır:

- a- Katı maddeler (Granit, Yakut, Alexandrit, Yttrium-Aliminium-Garnet kristalleri)
- b- Gazlar (Argon, CO₂)
- c- Uyarılmış asal gazlar (Excimer lazer: Xenon/Flor, Argon/Klor)
- d- Boya tanecikleri (Dye lazerler)
- e- Yarı iletkenler (Diyot lazerler)

Enerji Kaynağı

Enerji kaynağı, lazer radyasyonu oluşturmak için gerekli olan aktif ara maddenin daha yüksek enerji seviyelerine çıkartılması için kullanılmaktadır. Bunun için genellikle şehir şebekesindeki elektrik enerjisi kullanılmaktadır. Taşınılabılır lazer sistemlerinde ise elektrik enerji kaynağı yanında şarj edilebilir güç birimleri kullanılmaktadır.

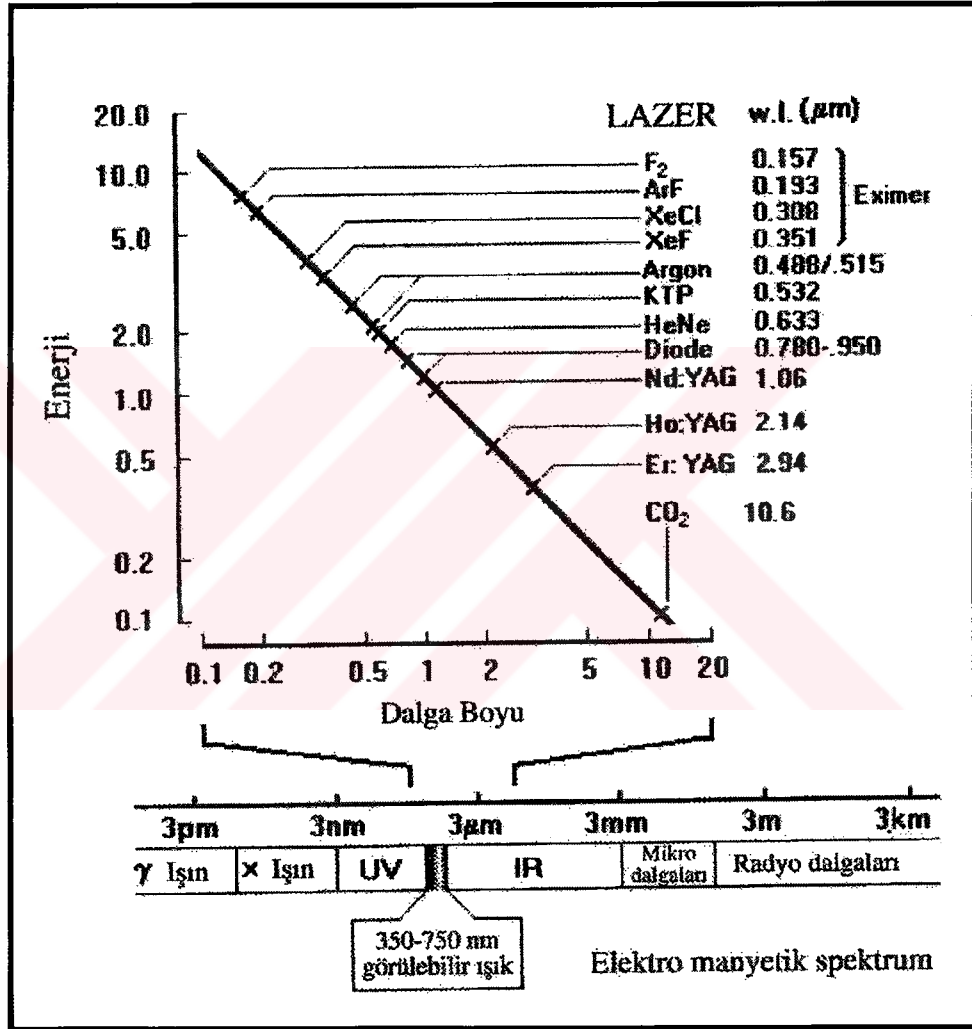
Mekanik Yapı (Rezonans Odası)

Mekanik yapı, her iki ucunda ayna bulunan ve aktif ara maddeyi içeren merkezi bir bölme içermektedir. Bu aynalar, cihaz tarafından oluşturulan ışığın dalga boyuna 'seçici' yansıtıcı özelliğe sahiptir ve aralarındaki mesafe lazerin dalga boyunun iki katı olacak şekilde birbirlerine paralel yerleştirilmişlerdir. Bu düzenleme ışığın fotonlarının bölmenin içinde ileri ve geri hareketine izin verir. Neticede ara madde içinde keskin foton rezonansı oluşur. Bu iki aynadan birinin yansıtması %100 iken, diğerinin yansıtması küçük miktarda daha azdır. Bu iki ayna çok küçük yüzdelerde fotonun çıkmasına izin vermektedir ve buna cihazın "çıkış gücü" denmektedir.

Yarı iletken lazer aktif ara maddelerde, diodun uçları (p-n bağlantısı) ayna görevi görmesi için cilalanmıştır. Ek olarak, bu tip lazerlerde birimin içsel bir parçası olarak bağımsız lensler bulunmaktadır. Bu tip lensler, diode lazerlerin çıkış gücünü hedef dokuda daha küçük alanlarda yoğunlaştırarak ışınlanan dokudaki foton yoğunluğunu arttırmaktadır^{20,22,23}.

ELEKTROMANYETİK SPEKTRUM VE LAZER SINIFLAMASI

Çeşitli lazer sistemlerinin dalga boylarına göre elektromanyetik spektrumdaki yerleri Tablo 2'de verilmiştir.



Tablo 2: Çeşitli lazer sistemlerinin elektromanyetik spektrumdaki yerleri

Lazer sistemlerinin sınıflaması başlıca dört şekilde yapılabilir. Bunlar:

1-Lazer aktif maddesine göre

a) Katı maddeler

b) Gazlar

c) Uyarılmış asal gazlar

d) Boya tanecikleri

e) Yarı iletkenler

2- Lazer ışınlarının hareketine göre

a) Devamlı ışın verenler (continuous)

b) Atımlı ışın verenler (pulse)

c) Dalgalı akım olarak ışın verenler,

3-Dalga boyuna göre

a) Ultraviole ışınlar

b) Infrared (kızıl ötesi) ışınlar

c) Görünen ışık spektrumundaki ışınlar

4- Işınların enerjisine göre

a) Soft lazerler

b) Mid lazerler

c) Hard lazerler

Bu sınıflandırmalardan lazer ışınının enerjisine göre yapılan sınıflandırma daha yaygın olarak kullanılmaktadır ²⁴.

Soft Lazerler: Bunlar termal etki göstermeyen düşük enerjili lazerlerdir.

Bu tip lazerlerin hücresel aktiviteyi stimüle ettiği bildirilmektedir.

Bunlar, ağrının giderilmesi, enflamasyon ve ödemin azaltılması ve iyileşmeyi hızlandırmak amacıyla kullanılırlar^{25,26,27}.

Klinikte kullanılan yumuşak lazer tipleri, Helium-Neon (He-Ne), Galium-Arsenid (Ga-As) ve Galium- Aliminium-Arsenid (Ga-Al-As) lazerlerdir. Farklı dalga boyuna sahip bu lazerler içinde en sık kullanılanı 632.8 nm dalga boyundaki He-Ne lazerlerdir.

Mid Lazerler: Bu tip lazer sistemleri tıbbi tedavi amacıyla çok sanayi amaçlı üretilmiş sistemlerdir. Diş hekimliğinde daha çok ağrılı lezyonlarda (herpes vb.) ve nevralji belirtilerinin ortadan kaldırılmasında alternatif tedavi olarak kullanılmışlardır.

Hard Lazerler: Bu lazerler yüksek enerjili, dokuda termal etki oluşturan lazerlerdir. Dişhekimliğinde en çok kullanılan sert lazer tipleri karbondioksit (CO₂), Neodymium: Yttrium-Aliminium-Garnet (Nd:YAG) , Erbium: Yttrium-Aliminium-Garnet (Er:YAG), Argon ve Eximer lazerlerdir.

LAZER-DOKU ETKİLEŞİMLERİ

Lazer ışını dokuya çarptığında farklı oranlarda ve kombinasyonlarda emilir, yansır, saçılır veya daha derin dokulara ulaşır^{28,29,30,31}.

Yansıma (Reflection): yansıyan lazer enerjisi miktarı ve zararı, uygulanan dokuya ve enerji miktarına göre değişir. Şayet yansıyan enerji miktarı fazlaysa ya da uygulanan yüzey ışığı soğurmayacak nitelikteyse çevre dokulara zarar verilebilir. Özellikle amalgam ve protez gibi parlak metal yüzeyler etrafında çalışılırken ya da ağız aynası kullanıldığında yansıyan ışıklar çevre yumuşak dokularda hasar meydana getirebilir.

Geçiş (Transmission): dalga boyuyla ilgili olarak lazer ışınının doku içerisinde hiçbir etki göstermeden geçerek ulaştığı maksimum penetrasyon derinliğidir.

Saçılma (Scattering): etraftaki dokuya yayılma ya da sıçramadır. Lazer enerjisinin hedeflenen doku ya da noktadan farklı yönlere sapan kısmıdır. Saçılma lazer ışınının güç yoğunluğunu azaltan bir faktördür.

Soğurma (Absorbtion): doku içinde soğurulan lazer enerjisi dokuda çoğunlukla termal enerjiye dönüşüp, buharlaşma ya da kömürleşmeye sebep olabilir. Bazen de soğurulan lazer ışını dokuda sadece termal etki göstermeyip hücreler arası moleküler bağları kırarak etki gösterir. Doku içinde lazer enerjisinin azalıp, artık biyolojik etki göstermediği noktaya soğurma derinliği denmektedir. Nd:YAG lazer özellikle siyah, koyu pigmente dokularda daha fazla soğurulur.

Dokuya uygulanan lazer ışınının etkisini önemli ölçüde etkileyen faktörler şunlardır:

- I) Lazer ışınının özellikleri
 1. Dalga boyu
 2. Enerji yoğunluğu
 3. Işınlama süresi
 4. Temaslı ya da temassız uygulanması
 5. Sürekli veya atımlı olarak kullanılması
- II) Dokunun biyolojik yapısı
 1. Soğurma özellikleri
 2. Yoğunluğu
 3. Kan dolaşımı

4. Mineral ve su oranları

Soğurulma fotonlardaki enerjinin dokuya aktarılmasıdır ve bu şekilde dalga boyu ve ışın içerisindeki fotonlardaki enerjiye bağlı olarak termal ya da termal olmayan reaksiyonlar açığa çıkmaktadır. Bazı dalga boylarındaki lazerlerin, pigmentlere yüksek oranda afinitesi vardır ve pigmente alanlar, pigmente olmayan alanlara göre daha fazla soğurma göstermektedir. Dokular, özel hücre ve moleküllerden oluşmaktadır. Radyasyonun kendi özelliklerine ve bu hücre ve moleküllerin dokularda farklı derinliklerdeki yoğunluklarına bağlı olarak, radyasyon yüzeysel ve derin dokular tarafından soğurulabilmektedir. Daha derin seviyelerde toplanan enerji, yüzeysel seviyelerden fazla olabilmektedir. Termal olmayan etkiler fotokimyasal ve fotoayırışma olarak sınıflandırılabilir. Biyostimülasyonu da içine alan fotokimyasal etkiler çok az anlaşılabilmiş olmasına karşın milivatlarla ölçülen lazer güçlerindeki ışınlamayla, çok az veya hiç ısı etkisi oluşturmada atom ve moleküllerin özelliklerinde kimyasal ve fiziksel değişiklikler oluşturulmasıdır. Eğer enerji yoğunlukları arttırılırsa fotokimyasal etkileşimler fototermal etkiye dönüşebilir. Fotoayırışma etkileşimi, fotoablasyon ve fotoboşuşmayı içermektedir. Fotoablasyon, komşu dokulara zarar vermeden, hedef dokunun atomik ve moleküler bağlarının kopmasıdır. Sadece Eximer lazerler (ultraviole), bu şekilde atomik ve moleküler bağları parçalayacak yeterli güçte enerji oluşturmaktadır. Fotoboşuşma, çok yüksek enerji ve çok kısa atım aralığı olan lazer kullanımıyla oluşmaktadır. 'Plazma' (nötr iyonize partiküllerden oluşmuş buhar) oluşumuyla ikinci bir şok dalgası oluşturarak dokuyu mekanik olarak parçalamaktadır²⁹.

Lazer salınımının biyolojik yapılardaki etkisi, basit anlamda radyant ışık enerjisinin maddeye olan etkisi gibidir. Dokunun lazer ışınlarına gösterdiği reaksiyonlar ise daha komplekstir. Bu yüzden, dokuların biyolojik özelliklerini ve lazer ışınının fiziksel özelliklerini bilmek klinisyenin klinik uygulamalar sırasında daha kontrollü ve daha bilinçli olmasını sağlayacaktır.

Lazer-doku etkileşiminde, lazerle karşılaşacak dokuların yapısında bulunan farklı doku elemanlarının optik özelliklerini çok iyi bilmek gerekmektedir. Doku elemanlarının optik özellikleri soğurma, yansıma, saçılma ve daha derin dokulara iletilme sırasında oluşabilecek olan doku cevabının karakterini ve derecesini belirleyecektir. Diğer faktörler ise, dokuların enflamatuar cevabı, doku kanlanması ve tamir mekanizmaları gibi enerji transformasyonları sonucu ortaya çıkan faktörlerdir.

Bunun dışındaki, güç yoğunluğu, atım süresi, atım tekrar aralığı ve atım tekrar oranı klinisyenin kontrolünde olan faktörlerdir. Bunları uygun kombinasyonlarda kullanarak ve doku için uygun dalga boyunu seçerek dokuda istenilen etki elde edilebilir.

DOKULARIN OPTİK ÖZELLİKLERİ VE DALGA BOYLARI

Radyant enerji dokuyla dört şekilde temas eder:

1. Işının bir kısmı dokuya penetre olmadan (doku tarafından soğurulmadan) veya ışık enerjisi dokuyla temas etmeden yansır.
2. Işığın bir kısmı, doku lazer ışınına geçirgense dokunun içinden geçer.
3. Işığın bir kısmı dokunun bir bölümü tarafından soğurulur (emilir) ve ancak bu durumda bir enerji transferi söz konusu olur.
4. Işın doku içine penetre olur ve dokuda kayda değer bir etki oluşturmadan doku içinde dağılır.

Özel dalga boylarına ve ışık enerji spektrumlarına yüksek soğurma etkisi gösteren doku elemanlarına *kromofor* denmektedir. Bu nedenle, her madde lazer ışınına nasıl reaksiyon vereceğini belirleyen özel bir absorpsiyon spektrumuna sahiptir. Örneğin

dokulardaki hemoglobin, melanin gibi kromoforlar, radyant enerjiye dokunun verdiği cevapta önemli bir etkiye sahiptir.

Radyant enerji doku tarafından soğurulduğunda dört tip etkileşim ortaya çıkar:

1. Fotokimyasal etkileşim
2. Fototermal etkileşim
3. Fotomekanik etkileşim
4. Fotoelektriksel etkileşim

Fotokimyasal Etkileşimler

Fotokimyasal etkileşimler dokularda iyileşme ve yenilenme gibi olayları biyokimyasal ve moleküler düzeyde stimüle eden (biyositimülasyon) etkileşimlerdir.

Bu etkileşimlerden patolojik olguların tedavisinde (fotodinamik terapi) ve doku floresansı yoluyla diagnostik amaçla yararlanılmaktadır.

Fototermal Etkileşimler

Fototermal etkileşimler pek çok cerrahi lazerin temelidir. Fototermal etkileşimlerde radyant ışık enerjisi doku elemanları ve molekülleri tarafından absorbe edilir ve ısı enerjisine dönüştürülür.

Fototermal etkileşimler dokunun buharlaştırılarak uzaklaştırılması, doku sıvılarının en üst düzeyde ısınması, hemostaz ve koagülasyonu içermektedir. Ayrıca fotopiroliz denilen dokunun yakılarak uzaklaştırılması da bir fototermal etkileşimdir.

Fotomekanik ve Fotoelektriksel Etkileşimler

Fotoparçalanma, fotoayırışma, fotoplazmoliz ve fotoakustik etkileşimler çok kısa atımlarda (10^{-6} sn) ve yüksek enerji yoğunluklarında lazer-doku etkileşimleri sonucu ortaya çıkan termal olmayan etkileşimlerdir. Fotoablasyon sırasında ortaya çıkan yüksek enerji seviyeleri ve hızlı soğurma, moleküller arası bağları ya da atomik bağları kopartacak hızlı bir genleşme veya şok dalgalarının oluşmasına neden olur. Akustik şok dalgalarıyla maddenin mekanik olarak parçalanması veya ayrışması yüksek yoğunluktaki ışık enerjisinin vibrasyonel kinetik enerjiye dönüşmesiyle oluşmaktadır. Termal olmayan fotoablasyonun oluşması için çok yüksek enerji seviyeleri ve çok kısa atımlar gerektiğinden, Excimer lazerler gibi yalnızca yüksek foton enerjili ve kısa dalga boylu lazerler (<319 nm) bu etkiyi yaratabilmektedir. Fotoayırışma, ancak lazer kaynaklı fotonun enerjisi, hedef dokudaki atomik ya da moleküller arası bağların enerjisinden daha yüksekse ortaya çıkmaktadır.

Fotoayırışma birbiriyle ilişkili üç fazdan ya da mekanizmadan oluşmaktadır: 1. iyonizasyon, 2. plazma oluşumu ve 3. şok dalgalarının oluşumu. Işının oluşturduğu elektriksel alanın kuvveti atomları iyonize edecek kadar yüksekse doku içerisinde iyonizasyon oluşmaktadır. İyonizasyon oluştuktan sonra, serbest elektronlardan ve pozitif iyonlardan oluşan elektrik yüklü sıcak bir gaz veya plazma oluşur. Plazma, lazer ışınının enerjisini soğurarak 15.000 °C'nin üzerine çıkar. Bu ısıya çıkan plazma içindeki elektronlar, vibrasyon yapmaya ve hızla genişleyip daralan alanlar yaratmaya başlarlar ve bu da şok dalgalarının oluşmasına neden olmaktadır. Bu şok dalgalarının oluşturduğu basınç hedef dokuda mekanik bir parçalanma oluşturmaktadır. Plazma tüm dalga boyları için iyi bir soğurucu olduğundan burada bir kalkan görevi görerek dokunun daha fazla ışın almasını engeller.

Yalnızca doku tarafından soğurulması yüksek olan ve çok yüksek güç yoğunluğu oluşturan lazerler, fotoplazmoliz oluşumu için gerekli enerji seviyelerini

oluşturabilmektedir. Pek çok biyolojik doku ultraviyole spektrumdaki radyant enerjiyi soğurulabilir. Bu özellikteki excimer lazerler gibi lazerler, diş sert dokularına uygulandıklarında minimal termal etki oluştururlar. Q-switched YAG lazerler gibi yüksek enerji seviyeleri ve çok kısa atımı olan lazerler de diş sert dokularında termal olmayan fotoablasyon yapabilirler³².

ERKEN DÖNEM LAZER ARAŞTIRMALARI

Mainman tarafından geliştirilen ilk lazer 0.694 μm dalga boyunda atımlı ruby lazerdir. Bundan bir yıl sonra, 1961 yılında Snitzer Neodymium lazeri geliştirmiştir. Erken dönem lazer araştırmalarının neredeyse tümü ruby lazer kullanılarak gerçekleştirilmiş ve bu da dişhekimliğinde lazer uygulamalarını geciktirmiştir²¹.

RUBY (YAKUT) LAZER

İlk dental lazer araştırmaları 1963 yılında California Üniversitesi'nde, Los Angeles Dişhekimliği Okulu'nda Ralph H. Stern ve Reidar F. Sognaes tarafından gerçekleştirilmiştir. İlk lazer çalışmaları Ruby lazerin sert dokular (mine, dentin) ve restoratif materyaller üzerindeki termal etkilerine yoğunlaşmıştır. Araştırmacılar 500 ila 2000 J/cm²'lik güç yoğunluğunda, krater oluşumu, minenin camsı füzyonu, dentine penetrasyon ve dentinde kararma oluştuğunu bildirmişlerdir. Daha ileriki araştırmalarda Ruby lazerle belirli güçlerde ışınlama yapıldığında, minede asit penetrasyonuna karşı artmış bir direnç oluştuğu ve bunun çürük önlemede kullanılabileceği bildirilmiştir²¹.

Lazerin vital insan dişi üzerine ilk kullanımı 1965 yılında, bir fizikçi olan Leon Goldman tarafından, dişhekimi olan kardeşi Bernard Goldman üzerinde gerçekleştirilmiştir. Goldman'ın 1965'te yayınladığı araştırmada ilk lazer hastasının hiç ağrı hissetmediği ve kronda yüzeysel bir hasar oluştuğu bildirilmiştir. Ruby lazerin diş pulpası üzerindeki histolojik etkileri ise ilk olarak Tylor ve arkadaşları tarafından incelenmiştir. Deney hayvanlarının kesici dişlerinde 3 milisaniyelik atım ve 35 ila 55 J'lük

enerjiyle ilk in vivo araştırmalarda yaygın hemorajik nekroz ve odontoblastik tabakada hasar gözlenmiştir. Lazer ışınının saçılmasıyla komşu dişte ve çevre dokularda da hasar meydana geldiği bildirilmiştir. Ruby lazerin bildirilen bu olumsuz etkileri daha sonra Adrian ve arkadaşları tarafından yapılan araştırmalarda çok düşük güçler kullanılmasına rağmen doğrulanmıştır. 1960'ların sonunda, pek çok araştırmacı Ruby lazerle diş yapılarının uzaklaştırılması için çok yüksek enerji seviyelerine ihtiyaç duyulduğunu ve bunun oral kavitedeki vital dokularda termal hasara neden olacağı fikrinde birleşmişlerdir ²¹.

KARBON DİOKSİT LAZER (CO₂)

1960'lardan 1980'lerin başlarına kadar sert doku uygulamaları için daha uygun tipte bir lazer geliştirmek için çalışmalar devam etti. CO₂ lazer 10.6 μm lik dalga boyu nedeniyle mine tarafından soğurulabildiğinden, bu tip bir lazerin pit ve fissürlerin kapatılması, seramik materyallerin mineye kaynaştırılması veya diş çürüklerini önlemek için daha uygun olacağı düşünölmüştür ²¹.

Bir seri araştırmayla tarama electron mikroskop, X-ray difraksiyon, elektron-prob mikroanaliz teknikleriyle mineye CO₂ lazer uygulanması sonrasındaki fiziksel ve kimyasal değişiklikler incelenmiştir. Bu alışmalar devam ederken CO₂ lazerin minenin asit penetrasyonuna direncini arttırması, bu lazerin pit ve fissürlerin kapatılması ve hidroksilapatit gibi materyallerin mineye kaynaştırılması gibi çalışmaları başlatmış ancak bu işlem sırasında oluşan yüzey ısısının çok yüksek olması nedeniyle başarı sağlanamamıştır ²¹. Aynı zamanlarda Melcer ve arkadaşları çürüğün buharlaştırılmasında CO₂ lazerin klinik kullanımı üzerinde çalışmalar gerçekleştirmiş ve 1000'den fazla hastada çürük uzaklaştırmada başarılı sonuçlar aldıklarını açıklamışlardır ³³. Bundan sonra yaptıkları in vivo hayvan deneylerinde lazerin sekonder dentin oluşumunu başlattığı, dentin ve açılmış pulpa dokusunu steril ettiğini bildirmişlerdir ³⁴.

NEODYMIUM LAZER (Nd:YAG)

Vital oral dokulara ilk lazer uygulaması Japonya'da Tohoku Üniversitesi Dişhekimliği Okulu'nda Yamamoto ve Ooya tarafından deney hayvanları üzerinde gerçekleştirilmiştir ³⁵. Bir seri araştırma sonucunda Yamamoto, Nd:YAG lazerin hem in vitro hem de in vivo olarak başlangıç çürüklerinin oluşmasının önlenmesinde etkin bir araç olduğunu bildirmiştir ^{36,37}. Aynı tarihlerde Adrian Nd:YAG lazerin diş üzerinde ve dental alaşımların tamirinde kullanılmasıyla ilgili çalışmalar gerçekleştirmiştir.

1990 yılında FDA American Dental Laser firmasına dLase 300 modelinin diş hekimliğinde yumuşak doku cerrahisinde kullanılması için satış izni vermiştir. Bu lazerin sert dokularda kullanılması için FDA tarafından onay ancak 1997 yılında verilmiştir ²¹.

Nd:YAG LAZERİN KLİNİK KULLANIMI

1977 yılında Adrian ve arkadaşları Nd:YAG lazerin dental pulpa üzerindeki etkilerini Rhesus maymunları üzerinde incelemişlerdir. Yayınları ilk deneme şeklinde olsa da, araştırmacılar bu lazerin gelecekteki kullanımı yönünden olumlu düşüncelere sahiptirler. Bunu takip eden sert doku çalışmaları, CO₂ lazer gibi Nd:YAG lazerin de sert doku üzerinde pozitif etkileri olduğunu bildirmişlerdir. Başlangıçta Nd:YAG lazer büyük patolojik olguların çıkarılmasında kullanılmış olmasına karşın, direkt kontaktlı iletim sistemi olan fiberoptik kablunun geliştirilmesiyle yalnızca kesme değil aynı zamanda steril etme ve örtme işlemi çok düşük güçlerde yapılabilir hale gelmiştir. Amaç her zaman en düşük enerjiyle tedavi edici etki elde etmek olduğundan, işlemleri çok düşük güç ayarlarında yapmak atımlı Nd:YAG lazerlerin olumlu bir özelliğidir.

Fiberoptik kontak iletim sistemlerinin ve buna bağlı cerrahi tekniklerin geliştirilmesiyle Nd:YAG lazer, karaciğer rezeksiyonu, mastektomi, hemoroidektomi gibi

yüksek derecede vasküler dokularda, yumuşak doku kesme uygulamalarında tıbbi cerrahi alanda kullanılmıştır.

Dişhekimliğinde Nd:YAG lazerin kullanımıyla ilgili olarak, çevre diş minesine zarar vermeden çürük lezyonların uzaklaştırılması ve bu işleme bağlı oluşan rahatsızlığın minimum olması yönünde araştırmalar yayınlanmıştır. Teorik olarak pek çok intraoral yumuşak doku lazerle fiberoptik kontak iletim sistemi kullanılarak kesilebilir ya da çıkartılabilir. Fiberoptik kontak iletim sisteminin ucunda ortaya çıkan lazer dalga boyu ve enerji yoğunluğu ile doku arasında meydana gelen etkileşim dokuların kesilmesini ve bunu takiben koagülasyon oluşmasını sağlar. Burada lazerin kontak fiber ucu bistüriyle ulaşılması zor olan alanlarda bir elektrocerrahi ucu gibi kullanılabilir.

Lazer araştırmaları endodonti alanında da kullanılmış ve Nd:YAG lazerin kök kanallarını sterilize edebildiği dentin duvarlarını örttüğü, gösterilmiştir. Su ve hava soğutmalı atımlı Nd:YAG lazerlerin fotoakustik etki (şok dalgaları) oluşturabilmelerinden dolayı endodontik uygulamalarda kullanılabileceği bildirilmiştir. Hava-su soğutması fiber optik kablonun ucunda Nd:YAG lazer enerjisini azaltarak çevre dokulara zarar verebilecek potansiyel termal etkilerin azalmasını da sağlamaktadır³⁸.

Nd:YAG LAZER FİZİĞİ

Nd:YAG lazerin aktif ara maddesi yttrium-aliminyum-garnet kristalidir ve bu kristal düzenli olarak küçük miktarda neodymium (Nd) elementiyle güçlendirilmiştir. Bu lazerin dalga boyu 1,064 nm dir.

1,064 nm elektromanyetik spektrumun kızıl ötesi bölümünde bulunmaktadır. Bu tip bir lazer, iyonize olmayan karakterde olduğundan mutojenik değildir. Bu dalga boyu gözle görülemeyen özellikte olduğundan, sistemin bir iç parçası olarak her zaman ek bir lazer ışını ya da beyaz ışık rehber ışık olarak kullanılmaktadır.

He-Ne lazer ışını kırmızı renktedir ve piyasada bulunan Nd:YAG lazer sistemlerinde rehber ışın olarak kullanılmaktadır³⁸.

LAZERLERİN ENDODONTİDE KULLANIMI

Ruby lazerle yapılan başlangıç deneylerinden sonra argon, CO₂ neodmiyum –yitrium aliminyum garnet (Nd:YAG) ve erbium YAG (Er:YAG) lazerler gibi değişik lazerler de klinikte kullanılmaya başlanmıştır. Lazerin endodontik tedavilerde ilk kullanımı, in vitro olarak yüksek güçte infra red CO₂ lazer kullanılarak apikal foremenin kapatılması amacıyla. Amaçlarına ulaşamamış olsalar da ileriki çalışmalar için pek çok ilginç veri elde etmişlerdir. Lazerin dentin üzerindeki etkileri hakkında pek çok bilgi edinilmiş olsa da lazerlerin endodontik amaçlı kullanımı o zaman için uygun değildi. O tarihten itibaren bu konuda pek çok çalışma yapılmıştır. Lazerin endodontik uygulamalarıyla ilgili pek çok çalışma mevcuttur ve bu konuda çok fazla bilgi edinilmiştir^{39,40,41,42}.

PULPADAKİ KAN AKIŞININ TESPİTİ

Laser Doppler Flowmeter (LDF), retina, renal korteks ve deri gibi mikrovasküler sistemlerin kan akışını değerlendirmek üzere geliştirilmiştir. Tekniğin orijinali 632.8 nm dalga boyunda bir HeNe (Helium-Neon) lazer cihazından çıkan ışının alyuvarların hareketiyle saçılmasına ve bunun Doppler prensibiyle oluşturduğu frekansın ölçülmesine dayanır yani ışınlanan alandan geri yansıyan ışınların frekansı ölçülür. Bu metod hayvanların ve insanların sağlıklı dişlerindeki kan akışını gözlemek üzere adapte edilmiştir^{43, 44}. Bu işlem için yarı iletken lazerlerin diğer dalga boyları da 780 nm⁴⁵ ve 780-820 nm^{46, 47} kullanılmıştır. Odor ve arkadaşları⁴⁸ 810 nm dalga boyunun hassasiyetinin çok iyi olduğunu ancak seçiciliğinin zayıf olduğunu, 633 nm dalga boyunun seçiciliğinin iyi olmasına karşılık hassasiyetinin zayıf olduğunu bildirmişlerdir. Genelde infrared ışının (780-810 nm) mine ve dentine penetrasyonu, daha kısa dalga boylarından (632.8nm) daha iyidir. LDF tekniği pulpanın sinir cevapları yerine vasküler durumu hakkında bilgi

verdiğinden, pulpa vitalitesi hakkında elektriksel pulpa testlerinden daha değerli bilgiler vermektedir. LDF için kullanılan lazerler genellikle düşük güç seviyesinde olduklarından (1 veya 2 mW), bu yöntemle pulpada hasar meydana geldiğine dair bir bilgi yoktur.

DENTİN HASSASİYETİ

Dentin hassasiyeti yanlış diş fırçalama, diş eti çekilmeleri, uygun olmayan diyet gibi faktörlerden dolayı ortaya çıkmaktadır. Hastaların %18'inde çeşitli derecelerde hassasiyet olduğu ve bu durumu gidermek için çeşitli tedavi yöntemlerine başvurulduğu bildirilmiştir. Ağrı hissinin kök yüzeyinde bulunan, açılmış, smear tabakayla kaplanmamış dentin tübülleriyle bağlantılı olduğu düşünülmektedir. Hassas dişteki dentinde stimulus iletimi hidrodinamik mekanizmayla izah edilmektedir. Grosman bu durumun tedavisi için birkaç önemli nokta olduğunu bildirmiştir. Bunlar günümüzde de geçerliliğini korumaktadır. Tedavi pulpayı irrite edici olmamalıdır, uygulama sırasında ağrısız olmalıdır, kolay uygulanmalıdır, hızlı etki göstermelidir, uzun süre etkinliğini korumalıdır, boyama etkisi olmamalıdır. Bugüne kadar uygulanan tedavi yöntemleri bu kriterlerin tamamını sağlamakta yeterli etkinliği gösterememiştir, buna karşın bazı araştırmacılar lazerin bu konuda %90'a varan oranlarda başarı sağladığını bildirmişlerdir. Diş hassasiyeti tedavisinde kullanılan lazerler iki ana grupta toplanabilir: 1. Düşük güçteki He-Ne ve Ga.Al.As. lazerler ve 2. Orta güçteki Nd-YAG ve CO₂ lazerler.

Dentin hassasiyetinin tedavisinde kullanılan parametreler 6mW ve 1-3 dakikadır. Etkinliği %90'a kadar çıkabilmektedir. Galyum aliminyum arsenid lazerlerde en çok kullanılan dalga boyları 780 nm ve 830 nm dir. Kullanılan değerler 0.5 ila 5 dakika süreyle 30 mW dır. Etkinliği %80 oranındadır ⁴⁹. Daha sonra 1064 µm dalga boyundaki Nd:YAG lazer kullanılmıştır. Toplam enerji çıkışı 1.8 ila 25 J'dür. Bu çalışmalar %72 oranında etkinlik göstermektedir ⁵⁰. Bu tedavi için kullanılan güçler 0.5 ila 3 W dır ve %90 oranında başarı bildirmişlerdir. Dentin hassasiyetinin tedavisinde kullanılan lazerlerin listesi Tablo 3'de gösterilmiştir ⁴⁹.

Lazer	Değerler	Etkinlik oranı(%)
HeNe (632.8 nm)	6 mW 2-3 dakika	84
	6 mW 1-3 dakika	90
GaAlAs (780 nm)	30 mW 0.5-3 dakika	>85
	30 mW 0.5- 3 dakika	94.6
GaAlAs (830 nm)	30 mW 0.5-3 dakika	83.9
	30 mW 5 dakika	58
Nd:YAG lazer (1064 nm)	10W 0.5 ila 2.5 saniye	100
	10-100 mJ 2 dakika	100
CO ₂ (10.6µm)	0.5W 3 ila 30 saniye	98.6
	1W 5ila 10 saniye	100

Tablo 3: Günümüze kadar dentin hassasiyetinin giderilmesinde kullanılan lazer tipleri

Hassasiyette azalmaya neden olan mekanizmanın büyük bölümü tam olarak bilinmemektedir, ancak her lazer için mekanizmanın farklı olduğu düşünülmektedir. Düşük güçteki lazerlerde (He-Ne ve GaAl As), lazer enerjisinin küçük bir bölümü mine ve dentinden iletilerek pulpa dokusuna ulaşmaktadır. He-Ne lazer uygulamasının elektrik aktivitesini (aksiyon potansiyelini) etkilediği ve periferik A δ veya C fibrilleri receptörlerini etkilemediği düşünülmektedir ⁵¹. GaAlAs lazer emisyonunun 904 nm de kedilerin dilinde analjezik etki gösterdiği bildirilmesine rağmen mekanizması açık değildir ⁵². 1064 nm deki (Nd:YAG lazer) lazer enerjisi dentine iletilir, termal olarak etki gösterir ve pulpal analjezi oluşturur ⁵³. CO₂ lazerin orta seviyelerdeki güçlerde kullanımıyla termal olarak dentin tübüllerinin tıkanması ve permeabilitenin azalması sağlanır ⁵⁴. CO₂ lazer irradiasyonu dentinal tıkanma sağlayarak dentin hassasiyetine geçici bir klinik çözüm oluşturur ⁵⁵. Nd-YAG lazer irradiasyonu ile sağlanan tıkanma derinliğinin 4µm'den küçük olduğu bildirilmiştir ⁵⁶.

Bu tip lazer uygulamalarının pulpa üzerine etkilerini araştıran çalışmalar, 780 nm dalga boyunda ve 30 mW çıkış gücü olan GaAlAs lazerin 3 dakika uygulanması sonucunda maymunlarda pulpa dokusunda bir hasar meydana geldiğini bildirmektedir. Ancak 50 mJ/atım, 10 Hz, 30 saniye (toplam enerji 15J) ayarlarında Nd:YAG lazer uygulandıktan sonra herhangi bir histolojik cevap oluşmadığı gözlenmiştir⁵⁷. 10 W ve 0.3 sn lik bir çıkış gücünde devamlı dalga modunda (toplam enerji yoğunluğu 31J/ cm²) lazer uygulanmasında ise uygulamadan hemen sonra pulpada hiperemiyle birlikte, eksüdatif inflamatuvar değişiklikler ve odontoblastların lokal dejenerasyonu görülmüştür. Maymunlar ve köpeklerde pulpaya devamlı dalga modunda 3 W ve 2 sn süreyle CO₂ lazer uygulanması sonucunda herhangi bir hasar bildirilmemiştir⁵⁸.

Genelde lazer uygulamaları diğer hassasiyet tedavilerine göre daha etkilidir ancak bazı ciddi vakalarda daha az etki oluşturmaktadır. Bu nedenle dentin hassasiyetinin derecesi lazer uygulamasından önce belirlenmelidir⁵⁹.

PULPA KUAFAJI VE AMPUTASYONU

Yetişkin insan dişlerinde, geleneksel pulpa tedavileri pulpa kapaklaması (kuafajı) ve kök kanal tedavisini de kapsamaktadır. Direkt ya da indirekt pulpa kuafajının başarısı önceden tahmin edilemez ve başarı oranının %44 ila 97 arasında olduğu bildirilmiştir. Pulpa ekstirpasyonu ve kök kanal tedavisi pulpa kuafajı işlemi endike olmadığı zaman yapılır. Daimi dişler oluşumunu tamamlamadığında, apeks formasyonu ve kapanması tamamlanmadan devitalizasyon ve kök kanal tedavisi önerilmez. Bu durumda seçilecek olan endodontik tedavi yöntemi pulpotomi ve yara yüzeyinin kalsiyum hidroksit ile kapatılmasıdır. Eğer bu işlem için lazer kullanılırsa, lazerin doku buharlaştırması ve küçük kan damarlarını koagüle edip tıkamasıyla kansız bir alan elde etmek daha kolaydır. Bunun yanında tedavi edilen yara yüzeyi de steril edilmiş olur.

Melcer ve arkadaşları⁶⁰ ilk kez köpeklerde CO₂ lazer kullanılarak ekspozite pulpa dokusunu lazer ile tedavi etmişler ve hemostaz sağlamışlardır. Moritz ve

arkadaşları ⁶¹, insanlarda, direkt pulpa kuafajında CO₂ lazerin değerli bir araç olduğunu bildirmiştir.

Lazerle ilk pulpotomy 1985 yılında Shoji tarafından köpeklerde CO₂ lazer ile gerçekleştirilmiş ⁶², 1997'de Jukic ⁶³, 1997'de Wilder- Smith ⁶⁴ ve 1998'de Dang ⁶⁵ benzer çalışmalar yapmışlardır. Nd:YAG lazerle benzer çalışmalar köpekler ve ratlar üzerinde gerçekleştirilmiştir.

CO₂ lazer uygulanan pulpaların, radiküler bölümlerinde göze çarpan bir hasar gözlenmemiştir ⁶². Nd:YAG lazer uygulanan pulpalardaki yara iyileşmesinin 1. haftada kontrol grubuna göre iyi olduğu ve lazer uygulanan pulpalarda dentin köprüsü oluşumunun 4 ila 12 hafta içinde olduğu bildirilmiştir. CO₂ lazerin köpeklerde ^{64,65}, pulpadaki direkt etkileri incelenmiş ve lazer uygulanan dokunun altındaki dokularda hiçbir lazer hasarı olmadığı, tersiyer dentin oluşumu ve muntazam bir odontoblast tabakası olduğu bildirilmiştir. Wilder-Smith ve arkadaşları ⁶⁴, Dang ve arkadaşları ⁶⁵ CO₂ lazer pulpotomisinin birkaç gün boyunca bakteri kontaminasyonuna uğramış, geniş perforasyonlu dişlerde bile çok başarılı olduğunu bildirmişlerdir.

Pulpa kuafajı ve pulpotomide lazer uygulanmasında uygun parametreler seçilmelidir. Eğer lazer enerjisi gereğinden güçlü olursa, tedavi başarısız olacaktır.

KÖK KANAL DUVARLARININ SMEARDEN ARINDIRILMASI VE TEMİZLENMESİ

Endodontik enstrümantasyon, kök kanal duvarlarında organik ve mineral debris ve smear tabaka oluşturmaktadır. Bu smear tabaka, tübüllerin tıkanmasıyla permeabiliteyi azaltmayı sağlayarak faydalı olsa da bakteri ve bakteriyel ürünleri içerebilmektedir ⁶⁶. Bu nedenlerden ötürü, smear tabakanın bir lazerle uzaklaştırılması ve kontamine olmayan kimyasal bir sealantla yer değiştirmesi ya da dentin yüzeyinin eritilmesiyle bir tıkkama sağlanması önemli bir amaç olmuştur.

CO₂ lazer uygulandıktan sonra, dentin permeabilitesi azalmakta ve çok farklı morfolojik değişiklikler gözlenmektedir ^{67,68}. Bunun yanında, diamin gümüş florid (Ag(NH₃)₂F) debrislerin uzaklaştırılmasını ve morfolojik değişikliklerin oluşmasını kolaylaştırmaktadır. 9.3-10.49 µm aralığında CO₂ lazer uygulaması lazer ayarlarına bağlı olarak kompozit rezinlerin dentine bağlanma güçlerini arttırmaktadır ⁶⁹.

Nd:YAG lazer için ince fiber optik kabloların geliştirilmesiyle, kök kanallarında kullanımı başlamıştır. Nd:YAG lazerin kök kanal preperasyonunda kullanımıyla ilgili pek çok yayın mevcuttur ^{70,71,72,73}. Debris ve smear tabaka, uygun lazer parametreleri kullanılarak uzaklaştırılmış ^{74,75} ve dentin permeabilitesi azaltılmıştır ^{66,72}. Nd:YAG lazerin absorpsiyonu siyah mürekkep kullanımıyla artar bu da kök kanallarında lazerin etkisini artırır ⁷⁶. Argon lazer uygulamasıyla, enstrümante edilmiş kök kanallarında yeterli bir temizlik sağlanabilmektedir ^{68,77} ve diamin gümüş florid solusyonunun varlığı bu etkiyi arttırmaktadır. Er:YAG lazer uygulamaları smear tabaka ve debrisin kök kanal duvarlarından uzaklaştırılmasında Ar veya Nd:YAG lazerden daha etkilidir ^{78,79}.

Potasyum titanil fosfat (KTP) lazer (532 nm dalga boyunda) uygulaması, kök kanallarından smear tabaka ve debrisin uzaklaştırılmasını sağlamaktadır ^{80,81}. 532 nm dalga boyunda, nanosaniye atımlı ve çift frekanslı Nd:YAG lazer uygulamasının smear tabakanın tamamen uzaklaştırılmasını sağladığı bildirilmiştir ⁸². Buna karşın yapılan çalışmalardaki sonuçlar birbiriyle uyumlu değildir ve yüksek enerji seviyelerinde termal hasar meydana gelebilmektedir.

Dalga boyu 308 nm olan Xenonklorid (XeCl) lazer belli güçlerde dentin yüzeyini eritir ve açık dentin tübüllerini tıkar ^{83,84}. 193 nm dalga boyunda ArF excimer lazerler relatif olarak yüksek akımda (10-15 J/cm²) uygulandığına SEM incelemelerinde peritübüler dentinde belirgin bir uzaklaştırma, erime ve dentinal smear tabakada çözünme oluşturmaktadır ^{85,86,87}.

2.10µm dalga boyunda Ho:YAG lazer uygulamasının etkileri, bu lazerin dentin ablasyonu için etkin bir aygıt olduğu ve dentini kesmek için uygun olduğunu göstermektedir ⁸⁸. 1340 nm dalga boyundaki Neodymium-yitrium aliminyum perovskite (Nd:YAP) lazerlerin tekrarlanan endodontik tedavilerde kök kanal preperasyonunda kullanılmak için etkin bir cihaz olduğunu bildirilmiştir ⁸⁹.

Smear tabaka ve debrisin lazerlerle uzaklaştırılması mümkündür ancak bütün kanal duvarlarının temizlenmesi güçtür çünkü lazerin düz bir çizgide ilerlemesi lateral kanal duvarlarına lazer uygulamasını imkansız kılmaktadır. Bunun için fiber optik kabloların uçlarının belirli açılarla kesilmesi önerilmektedir.

KÖK KANALLARININ STERİLİZASYONU

CO₂ lazer ve Nd:YAG lazer ^{90,91,92} kullanılarak kök kanallarının steril edilmesi hakkında pek çok çalışma mevcuttur. Bu konuda Nd:YAG lazer daha yaygın olarak kullanılmaktadır. Çünkü dar kanallara girmek ince fiber optik kablo sistemiyle mümkün olabilmektedir. 308 nm dalga boyundaki XeCl ⁹³ 2640 nm dalga boyundaki Er:YAG lazerler, 810 nm dalga boyundaki diode lazerler ⁹⁴, 1340 nm dalga boyundaki Nd:YAP lazerler ⁸⁹ gibi değişik lazerler de bu amaç için kullanılmıştır. Bütün lazerler, yüksek enerji seviyelerinde bakterisidal etkiye sahiptir. Ancak bu lazerlerin kullanılmaları sırasında, oluşan duman vasıtasıyla bu bakteriyel kontaminasyonu kök kanalından hastaya, hekime ve yardımcılara bulaştırmak gibi etkileri olabilir ⁹⁵. Bunun için kök kanallarında lazer kullanırken enfeksiyonu yaymamak için güçlü bir vakum sistemi ve küçük gözenekli maske önlem olarak kullanılmalıdır ⁹⁶. Kök kanallarının lazer ile sterilizasyonu periodontal dokularda termal hasar meydana getirebileceğinden uygun güç, süre ve enerji yoğunluklarının seçilmesine özen gösterilmelidir.

KÖK KANALLARININ ŞEKİLENDİRİLMESİ VE TIKANMASI

Kök kanal şekillendirilmesi, organik dokuların uzaklaştırılmasını ve irrigasyon ve tıkanmanın kolaylaştırılmasını amaçlayan endodontik işlemler için önemli bir basamaktır. Kanal duvarlarındaki düzensizlikleri gidermek için pek çok değişik yöntem önerilmiştir.

Er:YAG lazer kullanılarak kök kanal girişleri şekillendirilmiştir. Er:YAG lazerle işinlamadan sonra kanal duvarları ışık mikroskopuyla incelendiğinde düzgün ve SEM'de incelendiğinde balık pulu gibi görünmektedir. Nd:YAG lazer uygulamasından sonra temiz ve düzgün kök kanal duvarları elde edilebildiğinden beri, bu tipte lazer uygulamasıyla kök kanallarının şekillendirilmesi önerilmektedir ⁷¹.

Kök kanal dolgusu için kullanılabilecek kamforo kinonla aktive edilebilen rezinlerin fotopolimerizasyonlarının 477 ila 488 nm dalga boyundaki Ar lazerlerle yapılabildiği bulunmuştur ^{97,98}. Bu sonuçlar, fiber optik kablo ilave edilen Ar lazerlerin endodontik tedavi için uygun bir model olduğunu göstermektedir. Benzer çalışmalar AH-26 ve kompozit rezinle gerçekleştirilmiştir ⁹⁹. Ar, CO₂ ve Nd:YAG lazerler gutta perkanın yumuşatılmasında kullanılmış ve sonuçlar Ar lazerin iyi bir tıkama oluşturduğunu ve bu amaçla kullanılabileceğini göstermiştir ^{100,101}.

Kök kanal duvarlarına lazer uygulamak zordur; lazer uygulamasından sonra duvarlar pürüzlüdür. Fiber optik kablonun ucunu şekillendirmek ve kök kanal duvarlarının bütün yüzeylerine lazer uygulayabilmek için tekniğin geliştirilmesi gereklidir.

PERİODONTAL DOKULARDAKİ ETKİLERİ:

Dişin kökü, periodontal ligaman ve membran aracılığıyla alveoler kemikle bağlantılıdır. Kanal içi uygulamalar sırasında lazer kullanıldığında, periodontal dokularda termal hasar oluşabilmektedir. Pulpada lazerden kaynaklanan termal etkilerin incelenmesi hakkında pek çok araştırma olmasına rağmen kök kanalı içerisinde kullanılan lazer

enerjisinin periradiküler dokular üzerine etkileri hakkında çok az çalışma mevcuttur. Eriksson ve Albrektsson ¹⁰² kemiğin korunması için eşik değerin 1 dk için 47°C olduğunu bildirmişlerdir.

Nd:YAG lazerin periodontal dokular üzerindeki etkileri ilk kez, 1992 yılında Bahcall tarafından köpekler üzerinde yapılan bir çalışmada bildirilmiştir ¹⁰³. Bu çalışmanın sonuçlarına göre lazer uygulanan dişlerde ankiloz, semental lizis ve major kemik yeniden şekillenmesi gözlenmiştir. Bu çalışmada kullanılan değerler 3 W, 25 pps ve 30 sn dir ve bunlar çok yüksek değerlerdir. Bu çalışmadan sonra lazerlerin periodontal dokulardaki etkilerini incelemek için köpekler ve ratlar üzerinde pek çok çalışma yayınlanmıştır ^{85,86}. Eğer uygun değerler seçilirse lazerin periodontal dokular üzerinde geri dönüşümsüz bir etkisi yoktur. Lazer sistemleri, devamlı dalga, atım, kırılmış dalga ve Q-switched gibi farklı modlarda kullanılabilir. Hedef ve çevre dokulardaki ısı artışını en aza indirmek için Q-switched modun kullanılması önerilmektedir ¹⁰⁴.

Eğer kanal içinde Ho:YAG lazer, 1 W, 50 Hz ve toplam enerji 58 J'lük değerlerin altında kullanılırsa, kök yüzeyindeki ısı artışı 2.2°C altında olmaktadır ¹⁰⁵.

Tedavinin başarısı için lazer uygulamalarının periodontal dokulardaki etkisi değerlendirilmelidir. Bunun için uygun değerlerin ve beklenen tedavi etkisine uygun lazer sisteminin seçilmesi çok önemlidir.

KÖK KANAL TEDAVİSİ

Klinik endodontik tedaviler için Nd:YAG lazer pek çok araştırmacı tarafından incelenmiştir. Enfekte dişlerin lazer uygulamasını takiben doldurulmasından sonraki 3 veya 6 aylık gözlemlerde postoperatif hassasiyet ve ağrıda, lazer uygulanmayan gruba oranla belirgin oranda azalma olduğu görülmüştür ¹⁰⁶. Nd:YAG lazer uygulamasının, apikal postoperatif eksüdatif durum üzerindeki etkisinin incelendiği bir çalışmada sonuçlar, lazer uygulanan vakaların %60'ında çok az ya da hiç enflamasyon

görülmeyişi, buna karşılık lazer uygulanmayan vakaların %70'inde ciddi enflamasyon gözlemlendiği bildirilmiştir. Nd:YAG lazerin kurutma etkisi, kanamadan sonra kanal içerisinde kalan artık materyallerin çökmesiyle oluşan eksudanın lazer uygulamasıyla buharlaşmasına ve iyileştirme etkisi periapikal lezyonun eksüdatif durumunun inhibe edilmesine bağlıdır.

Endodontik başarı oranlarını arttırmak için lazerlerin konvansiyonel yöntemlerle birlikte ve mümkün olan en düşük güç seviyelerinde kullanılması önerilmektedir.

APISEKTOMİ

Apisektomi, kök apeksinin komşu periodontal dokularla birlikte uzaklaştırılması ve bu alanın kürete edilmesini içeren cerrahi bir işlemdir. Rezeksiyon için endikasyon genelde daha önce yapılmış olan kök kanal tedavisinin başarısız olmasıdır. Cerrahi için lazer kullanılması, lazerin dokuları buharlaştırması ve küçük kan damarlarını tıkayıcı etkisi sonucunda, daha kolaylıkla kansız bir cerrahi yüzey elde edilmesini sağlayacaktır. Eğer kesi yüzeylerine lazer uygulanırsa, yüzey sterilize edilir ve tıkanır. Buna ek olarak, Er:YAG lazerin sert dental dokuları termal veya yapısal hasara neden olmadan kesebilmesi, mekanik frezlere olan gereksinimi ortadan kaldırabilir.

Lazerin apikosektomide kullanılmasına dair klinik araştırmalar, CO₂ lazerle başlamıştır ¹⁰⁷. Bu lazerin kullanılmasıyla, kökün apikal bölümündeki dentin tübüllerinin tıkanması ve enfekte alanın sterilizasyonu amaçlanmıştır. Hemen arkasından, CO₂ lazerin apikosektomi amacıyla kullanımının uygunluğu çekilmiş dişlerde in vitro olarak ¹⁰⁸ ve köpeklerde in vivo olarak ^{109,110} araştırılmıştır. Cerrahi işlemler sırasında lazer kullanımının tedavi sonuçlarını etkilemediği veya iyileşmeyi engellemediği görülmüştür. Buna rağmen, apikosektomi ihtiyacı olan hastalarda bu lazer uygulandığında, iyileşme sürecini kısaltmadığı da saptanmıştır ¹¹¹. Bundan sonraki klinik çalışmalar Nd:YAG lazer üzerine yoğunlaşmıştır. İn vitro olarak çekilmiş dişlerin

kullanıldığı çalışmalarda Nd:YAG lazerin apisektomi yapılan köklerde boya ve bakteri penetrasyonunu azalttığı bulunmuştur ^{112,113}. Bu çalışmalarda lazer kök rezeksiyonundan sonra kullanılmıştır. Lazer rezeksiyon için kullanıldığındaysa, ratlarda in vivo ¹¹⁴ olarak kök yüzeylerindeki doku iyileşmesinin, frezle rezeke edilenlerle karşılaştırıldığında geciktiği gözlemlenmiştir. Çekilmiş dişlerde rezeksiyonda Er:YAG lazer uygulanan in vitro çalışmalarda yanıksız, düzgün, temiz kök yüzeyleri elde edilmiştir ¹¹⁵. Klinik olarak bu lazerin kullanımı, iyileşmenin hızlanmasını ve postoperatif hassasiyetin azalmasını sağlamaktadır ¹¹⁶.

ENDODONTİK TEDAVİLERDE FARKLI KULLANIM ALANLARI

540 nm dalga boyunda atımlı boya (dye) lazeri Rocca ve arkadaşları ¹¹⁷ tarafından 1994 yılında kalsifiye yapışık dentikelin uzaklaştırılması için kullanılmıştır. Bu uzaklaştırmadan sonra yapılan SEM incelemesinde dentikelin tabanında keskin bir yüzey gözlenmiştir.

CO₂ ve Nd:YAG lazerler kök kırıklarının tedavisi için kullanılmış ancak reaproksimasyon tekniklerine, lazer tipine, enerjiye ve kullanılan diğer değişkenlere rağmen fraktüre kök segmentlerinin füzyonu sağlanamamıştır¹¹⁸.

Ar, CO₂, Nd-YAG lazerler dental enstrümanların sterilizasyonunda başarıyla kullanılmaktadır ^{119,120,121}. Sonuçlar her üç tip lazerin de seçilmiş dental enstrümanların sterilizasyonunda başarılı olduğunu göstermesine rağmen argon lazer en düşük enerji seviyesinde (1 W, 2 dakika) uygulama ile bunu sağlayabilmektedir. Bu bilgilerin kliniğe aktarılabilmesi için uygun ışınlama sistemleri geliştirilmelidir.

BIYOLOJİK CEVABIN STİMÜLE EDİLMESİ (BİYOSTİMÜLASYON)

Biyoinhibisyonu da içine alan biyostimülasyon, klinik bir etki elde etmek için düşük enerjideki lazer ışığının dokular üzerinde kullanılmasıdır. Biyostimülasyon klinikte ağrının azaltılması ve yara iyileşmesinin hızlandırılması için kullanılmaktadır.

Düşük enerjili ya da soft (yumuşak) lazerler memeli dokularında görünür bir hasar oluşturmayacak enerji seviyelerinde ve frekanslarında çalışmaktadırlar. Buna örnek olarak kırmızı renkli ışını olan 632.8 nm dalga boyundaki He-Ne lazer ve 820 nm dalga boyundaki Ga-As lazer verilebilir.

İn vitro çalışmalar bu tip lazerlerin kültür dokularında bazı etkilere sahip olduğunu ve fibroblast proliferasyonunu stimüle edebildiğini göstermektedir. Bu, bazı araştırmacıları düşük enerjili lazerlerin klinik kullanımı yönünde araştırma yapmaya yönlendirmiştir. Helyum-Neon lazerlerin hipersensitif dentin , gingivitis, pulpa kapaklaması yapılmış dişler, herpes labialis ve aftöz ülserler üzerinde herhangi bir avantajı gösterilmemiş olmasına rağmen hastaların bu tekniğin uygulanmasıyla ilgili düşünceleri olumludur. Hamsterler üzerinde yapılan bir çalışmada Helyum-Neon lazerlerin plak oluşumunu engellediği bildirilmiştir ¹²².

Biyostimülasyonun temel mekanizması, moleküler seviyelerde meydana gelmektedir. Lazer ışığı dokuya penetre olur ve kromofora ya da fotohassas bir moleküle (mitokondri içindeki sitokrom) çarpar. Bundan başka, görme için gerek duyulan rodopsin, fotosentez için klorofil ve fotodinamik tedavi (PDT) için kullanılan fotohassas moleküller de vardır. Mitokondrial sitokromlar Adenozin difosfatı (ADP) Adenozin trifosfata (ATP) çevirebilirler. Bu da hücreye enerji sağlar ve hücresel metabolizmayı harekete geçirir. Lazer ışığının hedef molekülleri etkilemesi biyolojik molekülün absorpsiyon spektrumuna ve dokunun optik özelliklerine bağlıdır. 500 ila 1200 nm arasında majör soğurucular yoktur. Yaklaşık 1µm civarındaki dalga boyları doku içine en iyi şekilde penetre olmaktadır ancak daha kısa dalga boyları kromofor tarafından daha iyi soğurulmaktadır.

Biyositimülasyon 300 ila 400 mW/cm² nin altındaki güç yoğunluklarında meydana gelmektedir. Bu enerji seviyelerinde, CO₂ lazerlerde olduğu gibi termal bir etki değil PDT'de olduğu gibi fotokimyasal bir etki meydana gelmektedir. Çünkü düşük enerjili lazer ışığı hücresel metabolizmayı hızlandırarak, ATP üretimini artırır.

Biyostimülasyon, endotelial hücre ve fibroblastların hücre replikasyonlarını hızlandırmada da etkilidir. Bu klinik olarak özellikle diabetik hastaların yara iyileşmesini hızlandırması bakımından önemlidir.

DİŞHEKİMLİĞİNDE LAZER UYGULAMALARI SIRASINDA DİKKAT EDİLMESİ GEREKEN NOKTALAR

Dental lazerler bilinçli ve kurallarına uygun bir biçimde kullanıldıklarında diş hekimliğinde pek çok avantajlar sağlamaktadır. Ancak bilinçli olarak kullanılmadıklarında hasta, hekim ve çalışan personel için bir tehlike kaynağı oluşturabilmektedir. Lazer ışığının gücüne veya dalga boyuna göre meydana getirebileceği hasarlar, tehlikeli ışık üretmeyenlerden, cilt ve gözler için tehlike oluşturabilenlere kadar dört ayrı tehlike sınıfına ayrılır ¹²⁷.

Diş hekimliğinde lazerlerin kullanımları sırasında ortaya çıkabilecek tehlikeler şu şekilde sınıflandırılmıştır:

- Oküler yaralanmalar
- Doku hasarları
- Solunumla ilgili problemler
- Yangın ve patlama riski
- Elektrik çarpması

Oküler Yaralanmalar:

Gözde oluşabilecek hasarlar lazer ışınının direk göze gelmesiyle ya da ayna benzeri parlak yüzeylere çarparak göze gelmesi sonucu ortaya çıkar. Dişhekimliğinde kullanılan pek çok alet hasta ve hekimi tehlikeye sokacak bu tür yansımalarla neden olabilecek türdendir. Lazer uygulamaları sırasında herhangi bir

yansıma yaratmayacak matlaştırılmış, karbonize edilmiş aletlerin kullanımı önerilmektedir. Lazer uygulanması sırasında gözde oluşabilecek yaralanmaların başında retina ve kornea tabakasının yanması gelmektedir ^{123,124}.

Doku Hasarları:

Normal vücut ısısı olan 37°C'nin 21°C üzerinde hücresel enzimler ve yapısal proteinlerin denaturasyonu, hücre yıkımı meydana gelmektedir. Histolojik olarak 400 nm dalga boyu üzerindeki absorbe edilen radyant enerji termal koagülasyon nekrozuna sebep olmaktadır. 1 saniyeden daha kısa süreli lazer uygulamaları fizyolojik limitlerde bir ısı oluşturmaktadır.

Termal olmayan diğer doku hasarları ise fotokimyasal ve fotoakustik yollarla ortaya çıkmaktadır. Bu tip hasarlar tek ya da tekrar eden çok kısa süreli (10µsn) atımlarla ortaya çıkmaktadır. Bugüne kadar lazer uygulaması sonucunda ortaya çıkmış kanser oluşumu bildirilmemişse de, hücresel DNA'nın moleküler bağlarının kopartılmasıyla mutajenik değişiklikler ortaya çıkabileceği bildirilmiştir ^{123,124}.

Solunumla İlgili Tehlikeler:

Diğer bir tehlike ise lazer doku etkileşimleri sırasında inhalasyon yoluyla tehlike oluşturabilecek maddelerin açığa çıkmasıdır. Bu maddeler özellikle cerrahi işlemler sırasında ortaya çıkabileceği gibi, lazerin kendi yapısında bulunan toksik gazların kaza sonucu açığa çıkmasıyla da oluşabilir. Örneğin Excimer lazerler, Florin ve hidrojen klorit gibi toksik gazlarla karışık argon, kripton ve zenon gibi inert gazlar içermektedir. Ayrıca bazı lazer sistemlerinin uygulanması sırasında toksik boyalar ve çözeltiler kullanılmaktadır. Fotodinamik tedavi esnasında kullanılan ilaçlar da toksik gazlar açığa çıkarabilmektedir ^{123,124}. Lazer dumanındaki kimyasal maddeler; su, formaldehit, akrolein, siyanat, karbondioksit, benzen, metan, aseton, sikloheksan, yağ asiti esterleri, ksilen, tolien ve asetaldehittir.

Yangın ve Patlama Tehlikesi:

Lazer kullanılan alanlarda bulundurulmuş yanıcı ve patlayıcı maddeler kaza sonucu lazer ışınıyla karşılaşır ve kolayca tutuşabilir. Bu nedenlerle bu alanlarda tutuşmayan malzemelerin kullanılması önerilmektedir. Kağıt ürünler, plastik maddeler, ölçü maddeleri ve rezinler, metil metakrilat, oksijen, etanol dişhekimliğinde kullanılan ve tutuşabilecek malzemelerdir.

Genel anestezi altındaki hastalarda kullanılan intübasyon tüpü içinden yanıcı, patlayıcı gaz geçtiğinden, lazer ışınını soğurmaması için bunun abzorban olmayan alüminyum bant gibi bir materyalle kaplanması gerekir ^{123,124}.

Elektriksel Tehlikeler:

Lazerle ilgili elektriksel tehlikeler, kullanıcıdan ziyade teknik servis personeli ile ilgilendirilmeli ve birlikte, bazı hususların herkes tarafından bilinmesinde yarar vardır. Pek çok lazer sistemi yüksek voltaja çalıştığından, ölümcül kazalar ortaya çıkabilir. Bu nedenlerle dental lazerlerin kullanıldığı yerlerde lazerler iletken sıvılardan uzak tutulmalıdır. Lazer sisteminde herhangi bir arıza meydana geldiğinde hekim hiçbir şekilde kendisi sorunu halletmeye çalışmamalı veya gerekli eğitimi almamış bir teknisyene bu onarımı yaptırmamalıdır ^{123,124}.

HÜCRE KÜLTÜRÜ

Hücrelerin, dokudan mekanik yollarla ve bunu takiben de proteolitik enzimlerle muamele edilerek tek hücre veya küçük kümeler halinde ayrıştırılmasına ve bunların bir besiyeri ile cam veya plastik şişelerde doku ile bağlantısı olmadan in vitro olarak çoğaltılmasına hücre kültürü denir ¹²⁵.

Temelde biyolojik özellikleri değerlendirmenin iki yöntemi vardır. Bunlar in vitro ya da in vivo olabilir. Hangi soruya yanıt aradığımıza bağlı olarak bir yöntem diğerine tercih edilebilir. İn vitro deneylerin, deney faktörlerinin kontrol edilebilmesinin kolay olması gibi bir avantajı vardır. Bu, özellikle in vivo deneylerin gerçekleştirilmesi sırasındaki en büyük problemlerden biridir. Bunun yanında in vitro deneyler, materyal ve konak doku arasındaki kompleks etkileşimleri çalışmak istediğimizde işe yaramamaktadır.

'Doku ve organ kültürü' deyiminden, doku ve organ parçalarının genel özellik ve normal fonksiyonlarını korumak şartı ile in vitro olarak korunmaları ve kültüre edilmeleri anlaşılır ^{125,126,127}.

Hücre ve doku kültürlerinin kullanılmasıyla moleküler biyoloji ve tıp alanlarında son yıllarda büyük aşamalar sağlanmış, hastalıkların epidemiyolojisi, patogenezi, teşhis ve tedavisinde büyük aşamalar kaydedilmiştir. Hücre kültürü çalışmaları, ilk kez, hücre metabolizmasının organizmanın ölümünden sonra da bir süre daha devam ettiğinin gözlenmesiyle ortaya çıkmıştır ^{125,126,127}.

Hücre ve doku kültürü üretmek için kullanılan vasatlarda, hücresel metabolizma faaliyetlerinin devamı ve hücrelerin çoğalması bazı belli maddelerin varlığı ile sağlanabilir. Hücre bu maddeleri diğer moleküllerden kendisi sentezleyemez ve bu gerekli maddeleri, ortama ilave edilen vasatlar sağlar. Bu vasatlar doğal ve sentetik materyallerin çeşitli kombinasyonlarını kapsar. Hücre üretme vasatları, organlardan hücrenin ayrılmasından sonra doku tabakası meydana gelene kadar hücrelerin üretilmesi için kullanılır. Hücre üretme vasatları genel olarak serumla birlikte hücrelerin çabuk üremelerini sağlayan diğer maddeleri kapsarlar. Hücreleri in vitro çoğaltabilmek için en iyi ortam, in vivo ortamlarına en yakın ortamdır. İn vitro hücre büyümesinde temel ihtiyaçlar 1950'lerde tespit edilmiştir. Hücreler günümüzde rutin olarak kültüre edilmektedir. Vasat, enerji kaynağı olarak glukoz, bunun yanında esansiyel aminoasitler, vitamin ve mineraller içerir. Tamponlama kısmen fosfat tuzları ile en fazla da $\text{NaHCO}_3/\text{CO}_2$ sistemi ile bağlanır.

Bu sisteme ilaveten veya bunun yerine kullanılabilen Hepes gibi uygun birkaç sentetik tampon vardır. İnkübatör, hücreler için gerekli 37°C nin devamı için ısı kontrolünü de sağlar. Ozmotik şartlar, vasata NaCl ilave edilerek sağlanır ^{125,126,127}.

BIYOLOJİK AKTİVİTENİN ÖLÇÜMÜ:

Hücre popülasyonunun canlılığı birkaç şekilde ölçülebilir: En kolay yöntem boya alma ölçümüdür. Hücreler trypan blue ile muamele edilir, daha sonra bir hemositometrede mikroskop altında incelenir. Mekanik olarak tahrip olmuş veya metabolik olarak inaktif hücreler mavi görünür ¹²⁵.

Hücrenin metabolik bütünlüğünden çok proliferatif kapasitelerini saptamayı amaçlayan çalışma yapılıyorsa daha başka deneysel yöntemler kullanılmalıdır. Hücre kültürlerinin büyümesi veya "plating efficiency" (plating randımanı) proliferatif kapasitelerin ölçümünde kullanılabilir.

Hücreler çoğalıp mevcut yüzeyi doldurduklarında replikasyon durur ve hücreler istirahat fazına girerler. Eğer böyle hücreler yeniden süspanse edilir (örneğin tripsinizasyon ile) ve dilüe edilir ise, hücreler yeniden büyümeye başlar ve bir günlük yavaşlama periyodunu takiben, yaklaşık 24 saatlik bir sürede hücre sayısı iki katına çıkar. Bu süre hücre kültürlerinin yaşına, vasattaki serumun miktarına ve donörün genotipine bağlıdır.

Plating randımanı deneyleri, büyüme eğrilerinden çok proliferasyon gücünü ölçer. Az sayıda hücre direkt olarak hücre kültür plaklarına ekilir ve iki haftalık bir inkübasyondan sonra koloniler sayılır. Bir hücre dizisinin plating randımanı belirli büyüklükte koloniler (ekseri 50 hücre veya daha fazlası) veren hücrelerin yüzdesi şeklinde saptanır ¹²⁵.

HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE KONTAMİNASYON

Bakteri, küf veya mantar ile kontamine olan kültürler uygun olmadığından, biyokimyasal çalışmalar için laboratuarlarda kullanılmaz. Mikoplazma ile enfekte kültürler morfolojik olarak anormal görülmez, mikroorganizma veya onun hücreler üzerindeki etkisi çalışmalarda dikkati çekmeyebilir. Mikoplazma ve konakçı hücreler nükleik asit metabolizması açısından önemli farklılıklar gösterir.

Kültürler, kültür hücreleri için kullanılan materyal veya çalışan kişideki mikroorganizmalar ile kontamine olabilir. Mikroorganizmaların varlığı bazen kaba kontrole belirgin olarak görülürken, her zaman durum böyle değildir. Kontaminasyonu yansıtan ayrıntılı protokoller mevcuttur ve hücre kültürlerine başlanırken bunlardan yararlanılması gerekmektedir^{125,126,127}.

HÜCRE KÜLTÜRÜ TEKNİKLERİ

Hücre Kültürü: spontan migrasyon, mekanik veya enzimatik parçalama ile bir dokudan ayrılmış olan hücrelerin üretilmesidir. Hücre kültüründe başlıca üç tanımdan bahsedebiliriz:

- 1- organ kültürleri
- 2- doku eksplant kültürleri
- 3- hücre kültürleri

Organ kültürü organların belli sürelerde vücut dışında canlı kalmalarının sağlanmasıdır.

Doku eksplant kültürleri ise doku parçacıklarının canlılıklarının in vitro koşullarda yürütülmesinin sağlanmasıdır.

Hücre kültürünün tarihçesi 1800'lü yıllara kadar uzanır. İlk olarak 1866 yılında in vitro doku kültürü çalışılmış amfibi kan hücrelerinin 35 gün canlı kalabilmesi sağlanmıştır. Ardından Roux tavuk embriyosu sinir plaklarının birkaç gün canlı kalabilmesini sağlamıştır. 1898'de Ljunggren insan derisini in vitro koşullarda bir-iki gün yaşatabilmiştir. 1913 yılında Jolly in vitro koşullarda hücre canlılığı ve bölünmesiyle ilgili birtakım çalışmalar yapmış ve semenderden elde ettiği lökositleri bir ayın üzerinde canlı tutmayı başarabilmiştir. Bu dönemlerde henüz hücre kültürü vasatlarıyla beraber antibiyotikler kullanılmadığı için, dokuların bu şekilde canlı kalmalarını sağlamak oldukça büyük başarı kabul edilmektedir.

1910-1914 yılları arasında temel hücre, doku ve organ kültürlerinde büyük adımlar atılmıştır. Aseptik koşullarda çalışmalar yapılmış ve gerçek anlamda ilk doku kültürü çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

1926'lı yıllarda çalışmalar hücre üretme vasatları üzerine yoğunlaşmış ve Fisher analitik yöntemlerle hücre kültür vasatlarını hazırlamıştır.

1952'de insan serviks karsinomasından ilk devamlı hücre kültürü (HeLa) elde edilmiştir.

1955-1960 yılları arasında Eagle bugün kullandığımız anlamda temel hücre kültürü vasatlarını hazırlamıştır ki bu hücre kültürü çalışmalarında çok önemli bir adımdır.

1960'lı yıllarda hücre füzyonu çalışmaları ile monoklonal antikor üretimine öncülük edilmiş ve ilk olarak 1961 yılında Barskib ve arkadaşları in vitro koşullarda somatik hücre hibridlerinin elde edilmesini gerçekleştirmişlerdir.

1979 yılında Green ve arkadaşları epidermal hücre kültürleri hazırlamışlardır. 1980'li yıllarda endotelyal hücrelerden kapiller damarların oluşulmasına çalışılmış ve 1989 yılında hücre kültürü teknolojisi, homograft yapımı ve rekonstrüktif

cerrahide kullanılmaya başlanmıştır. 1992'de Rosenfield ve Morgan genetik olarak modifiye edilmiş hücreleri, çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanmaya başlamışlardır ki bu hücre kültürü teknolojisinin kullanıldığı son ve en önemli uygulamalardan biridir.

Son 20 yıldır hücre kültürü yalnızca spesifik araştırmalar için kullanılan bir araç olmaktan çıkmış dünyanın en hızlı gelişen endüstri alanlarından biri olan biyoteknolojinin temel taşlarından birisi haline gelmiştir. Yalnızca akademik araştırmalarda değil fertilizasyon, yapay organ, medikal ve toksikolojik çalışmalarda hayvanların yerini alması yolunda yeni uygulamalar geliştirilmiştir ^{125,126,127}.

HÜCRE KÜLTÜRLERİNİN KULLANIM ALANLARI

Günümüzde hücre kültürlerinin çok yaygın kullanım alanları vardır. Hemen her alanda bu tür çalışmalara rastlamak mümkündür. Bunları şu şekilde özetleyebiliriz:

- 1- viral aşı üretimi ve viral teşhis amaçlı
- 2- monoklonal antikorlar ile antikor üretimi
- 3- interferon üretimi
- 4- enzim üretimi
- 5- insekt aşı üretimi
- 6- interleokin üretimi
- 7- hormon üretimi (insülin)
- 8- büyüme faktörlerinin üretimi

Hücre kültürlerinin yeni kullanım alanlarını ise şöyle sıralayabiliriz:

1- Somatik gen tedavisi

2- Tümör aşıları

3- Canlı hücrelerin greft amaçlı kullanılması

Eritrositlerin organizma dışında transfüzyon amacıyla kullanılması

Kanser tedavisinde kemik iliğinin kullanılması

Parkinson hastalığının tedavisinde beyin hücrelerinin kullanılması

Organizma dışında hücre modifikasyonu

4- Kompleks üç boyutlu dokular

Yapay deri

Yapay kıkırdak

Yapay karaciğer

Yapay pankreas

HÜCRE KÜLTÜRLERİNİN AVANTAJ VE DEZAVANTAJLARI

Avantajları:

1- Hücre kültürü ortamında fizikokimyasal çevre ve buna bağlı olarak fizyolojik koşullar daha iyi kontrol edilebilir. Sıcaklık, pH, ozmotik basınç, oksijen ve karbondioksit kısmi basınçları gibi fizikokimyasal koşullar hücre kültüründe daha kolay sağlanırken, canlı vücudunda sabit bir çevreyi oluşturarak birtakım testleri yapmak daha zordur.

2- Örneğin homojenitesinin kontrolü sağlanabilir. Doku örnekleri çoğunlukla heterojendir. Ancak, bir-iki pasaj sonra kültüre edilmiş hücreler, homojen hale gelirler. Hücrelerin homojenitesi, elde edilen ürünlerin homojenitesi açısından son derece önemlidir. Bunun sağlanmasının bir diğer yolu da kuşkusuz çalışan kişilerin homojenitesi ve çalışmaların aynı koşullarda yapılmasıdır.

3- Hücre kültürleri ekonomiktir. İn vivo sistemlerde test için canlı organizmaya verilen maddelerin bir kısmı çeşitli yollarla dışarıya atılacak, bir kısmı da organizmanın bağışıklık sistemi tarafından ortadan kaldırılacaktır. Bu koşullarda canlı bir organizmada verilen maddenin ancak %10'una bir cevap alınabilirken, hücre kültürlerinde bu oran %90'lara kadar çıkabilmektedir.

4- Hücre kültürlerinin bir diğer avantajı da ürün eldesinde endüstriyel amaçlı olarak kullanılabilmesidir. Son yıllarda geliştirilen teknikler ile bu daha kolay hale gelmiştir.

Dezavantajları:

1- Primer kültür ile başladığımızda birbirini izleyen pasajlarda hücreler farklılaşır ve bir miktar ölüm her zaman gerçekleşir. Yani hücre kültürlerinde zamana bağlı bir kararsızlık söz konusudur.

2- Hücre kültürlerinde hijyenite çok önemli olduğu için primer kültürlerin elde edildiği doku ve bunların bulunduğu koşullar hücre kültürlerini etkiler.

3- Deneyim çok önemli bir faktördür. İn vitro çalışmalarda sterilite, kültürlerin hazırlanması ve mikroskopik inceleme bir uzmanlığı gerektirir.

4- Hücre kültürleri in vivo yöntemlere kıyasla daha ekonomik olmasına karşın kullanılan hücre üretme vasatları ve diğer malzemeler son derece

pahalıdır. Buna rağmen elde edilen ürünün saf olması son derece önemli bir avantajdır. Ancak son yıllarda bu teknolojinin gelişmesi, kullanılan malzemelerin geliştirilmesine ve giderek daha da ucuzlamasına olanak tanımaktadır.

Bu tez çalışmasında hücre kültürü yöntemlerinden faydalanılarak, kök kanal tedavilerinde çeşitli amaçlarla kullanılan Nd:YAG lazerlerin farklı frekans ve güçlerde uygulanmasının osteoblast benzeri devamlı hücre hattı Saos-2 üzerinde meydana getireceği değişiklikler ve etkilerin incelenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM:

Çalışmanın hücre kültürü ve MTT değerlendirmesi bölümleri Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı ŞAP Enstitüsü Hücre Kültürü Bankası'nda, biyokimyasal değerlendirmeler, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Araştırma Biyokimya Anabilim Dalı'nda, ALP ve kalsiyum boyamalarının görüntülenmesi ise Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Oral Patoloji Bilim Dalı'nda gerçekleştirildi.

HÜCRE KÜLTÜRÜNÜN HAZIRLANMASI:

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 vasatı olarak %10 Fetal sığır serumu (Biochrom, Germany) %1 antibiyotik-antimikotik karışım içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) Ham's F12 (Sigma, USA) kullanıldı. Hücreler dondurulmuş halde kuru buz içerisinde transfer edilen ampuller olarak temin edildi. Bu ampuller kuru buz içerisinde çıkartılarak 36°C lik su banyosu içinde çözüldükten sonra 5 dakika boyunca 800 devir/dakika'da santrifüj edildi. Ampullerin üzerindeki süpernatant kısımlar atıldıktan sonra ampulün tabanına çökelen hücreler 1 ml taze vasatla birkaç kez pipetlenerek, 25 cm²'lik hücre kültür kabına 5ml taze vasatla yerleştirildi. Hücre kültür kabının kapağı 1 diş gevşetilerek 37°C'de %5 CO₂'li etüvde inkübe edildi. Hücreler hücre kültür kabının tabanını yaklaşık 72 saat sonra tamamen kaplayıp tek tabaka oluşturdıklarında, hücre kültür kabının içindeki vasat dökülerek atıldı ve hücre kültür kabının içine 5ml versen-tripsin ilave edildi. Hücre kültür kabı birkaç kez aşağı yukarı hareket ettirildikten sonra, versen-tripsin hücrelerin tutunduğu yüzeyin tersinden dökülerek uzaklaştırıldı. Daha sonra hücre kültür kabına 5ml daha versen-tripsin ilave edildi ve aynı işlem tekrarlandı. Hücre kültür kabının içinde, yaklaşık 0.5 ml kadar versen-tripsin bırakıldı. Kalan bu tripsinle hücre kültür kabı 37°C'lik etüvde hücreler tamamen tutundukları yüzeyden

kalkıncaya kadar bekletildi. Hücrelerin yüzeyden kalktığı makroskobik (hücre kültür kabının tabanından akmaya başladıkları) ve mikroskobik olarak (hücreler yuvarlaklaşıp yüzeyde hareket etmeye başladıkları) gözlemlendikten sonra bu hücreler pipetlenerek 5'er ml taze vasatla 25 cm²'lik 3 ayrı hücre kültür kabına taksim edilip, bu şekilde subkültüre edildi. Hücreler faz-kontrast doku mikroskobunda incelenip, hücre kültür kaplarının kapakları 1 diğ gevşetilerek 37°C %5'lik CO₂ li etüve yerleştirildi.

Hücre sayımı için hücreler tripsinize edilip toplandıktan ve taze vasatla dilüe edildikten sonra; hücre kültür kabından 0.9 ml'lik bir örnek alındı ve 0.1ml tripan mavisiyle iyice karıştırılıp hemositometreye yerleştirildi. Daha sonra hemositometre ışık mikroskobunda incelenip hücre sayımı yapıldı.

Bu şekilde hücre kültürleri subkültüre edilip çoğaltıldıktan ve hücre sayıları belirlendikten sonra, istenilen hücre yoğunluğunda dilüsyon elde etmek için toplanmış hücrelerin içerisine ne kadar daha taze vasat konulması gerektiği hesap edildi.

Hücrelerin Dondurulması:

Bu safhalar arasında herhangi bir kontaminasyon durumunda stokta hücre bulunması ve yapılan deneyler arasında geçecek sürelerde hücre yaşlanmasını önlemek amacıyla subkültüre edilen hücrelerden bir kısmı dondurularak sıvı nitrojen kaplarının içerisinde saklandı. Hücrelerin dondurulması sırasında yapılan işlemler:

Hücrelerin yüzeyi %100 kapladığı bir adet 25 cm² hücre kültür kabı içerisindeki vasat dökülüp hücreler versen-tripsin solusyonu ile muamele edilip yüzeyden ayrıldıktan sonra 800 devir/dakika'da 5 dakika santrifüj edildi ve 3ml dondurma solusyonu (%90 serum+ %10 DMSO (Dimetil sülfoksit) ile 3 ampul içerisine taksim edidi (1ml x3). DMSO hücrelerin çabuk donmasını ve çabuk çözülmesini sağladığından, donma sırasında hücre içerisinde kristaller oluşmasına ve bunun hücreye zarar vermesine engel olması için kullanıldı.

Hücreler en azından 3 subkültür yapıldıktan sonra analizlere başlandı.

LAZER UYGULAMASI:

Hücre kültür örneklerine 13 farklı güç ayarında Nd:YAG lazer uygulandı. Bu çalışmada Gazi Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Diş Hastalıkları ve Tedavisi Anabilim Dalı'nda bulunan 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. 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 4 'de verilmiştir. Lazer her güç ayarı için 10 saniye boyunca aktive edildi. Uygulama bittikten sonra fiber optik kablonun ucundaki karbonize artıklar steril bir gazlı bez yardımıyla uzaklaştırıldı ya da fiber optik kablonun ucu kesilerek uzaklaştırıldı.

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				

Tablo 4: Çalışmada kullanılan lazer güç ayarları

Hücreler MTT analizleri, ALP ve osteokalsin ölçümleri ve histokimyasal boyamalar için hücre kültür plaklarına yerleştirildikten sonra lazer uygulaması gerçekleştirildi.

MORFOLOJİK İNCELEME:

Morfolojik inceleme 24 gözlü plaklarda yapıldı. Hücreler, hücre yoğunluğu 3×10^4 hücre/ml olacak şekilde dilüe edildi. Her göze 2 ml hücre süspansiyonu kondu. Çalışmada her inkübasyon dönemi ve lazer uygulaması için 15 göz olmak üzere, toplam 45 göz hazırlandı. Hücre kültür plakları 7, 14 ve 21 günlük inkübasyon dönemleri boyunca

37°C'de ve %5 CO₂ 'li etüvde bekletildi. Gözler, gözlem periodlarına kadar faz kontrast doku mikroskopunda gün aşırı incelendi.

İnkübasyonun 7, 14 ve 21. günlerinde faz kontrast doku mikroskopuyla çeşitli büyütmelemlerde yapılan incelemeler New Image görüntüleme programıyla fotoğraflandı.

MTT ANALİZLERİ:

Hücreler yukarıda anlatılan şekilde pasajlanıp hücre sayıları 2×10^4 hücre/ml olacak şekilde seyreltildikten sonra 96 gözlü hücre kültür plaklarına her gözde 100 µl olacak şekilde taksim edildi. Daha sonra değişik değerlendirme periodları ve lazer uygulamaları için her birinde 8 adet göz olan 45 gruba ayrıldı.

Değerlendirmenin yapılacağı gün, o güne ait 15 grup alınıp içlerindeki vasat boşaltıldı ve yerine 100µl/göz taze vasat ilave edildi. Daha sonra 12,5 µl/göz MTT solusyonu (Cat. No:5655, Sigma, USA) ilave edilip karanlık ortamda 37°C'de %5'lik CO₂'li etüvde 4 saat bekletildi. Faz-kontrast doku mikroskopunda renkli formazan kristallerinin oluşumu izlendikten sonra bu gözlerdeki karışım döküldü ve 100 µl/göz DMSO ve 12,5 µl/göz Glycin tampon çözeltisi (pH:10.30) ilave edilip oluşan bu formazan kristallerinin çözünmesi sağlandı. Daha sonra bu gözlerdeki renk yoğunluğu optik okuyucuda 570 nm'de okundu ve her grup için kullanılan 8 gözün ortalaması alındı. Her grup için değişim yüzdesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

Değişim yüzdesi= [(deney gözlerinin absorbans ortalaması- kontrol gözlerinin absorbans ortalaması) / (kontrol gözlerinin absorbans ortalaması)]x 100

ALKALEN FOSFATAZ VE OSTEOKALSİNİN BİYOKİMYASAL DEĞERLENDİRİLMESİ

Bu çalışmaya 24 gözlü 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 değerlendirmesi 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.

Inkübasyon 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 Gülhane Askeri Tıp Akademisi Araştırma Biyokimya Dalı'nda vasatlarıyla birlikte ultrasonik parçalayıcı ile yarım saat muamele edilerek parçalandı. Serum ALP ölçümleri AMP (amino-2 methyle-2 propanol) tampon ile p-nitro phenylphosphate kullanılan bioMerieux ALP kit (BIOMERIEUX SA, France) ile Technicon Dax-48 analizöründe (Bayer Diagnostica, GERMANY) yapıldı.

Serum osteokalcin ölçümü immunokemiluminesans teknikle IMMULITE 1 (DPC Diagnostic Product Corporation LA,CA,USA) analizöründe original kiti ile yapıldı.

ALKALEN FOSFATAZ İÇİN HİSTOKİMYASAL BOYAMA YÖNTEMİ:

Boyanın hazırlanması: 2mg/ml Na- α -naftil fosfat (Cat.No. N7000,Sigma, USA) ve 2mg/ ml Fast blue RR tuzu (Cat. No. 44680, Fluka,) distile suyla otomatik karıştırıcıda karıştırıldı. Daha sonra solusyonun pH'sı tris tamponu damlatılarak 10'a eşitlendi. Bu işlem için pH metre kullanıldı.

Hücre süspansiyonunun yoğunluğu 4×10^4 hücre/ml olacak şekilde ayarlandı. Daha sonra 35 mm² 'lik doku kültür kabı içerisine 2 ml bu hücre süspansiyonundan kondu. Her lazer uygulaması ve her inkübasyon periodu için 1 doku kültür kabı olacak şekilde toplam 45 doku kültür kabı hazırlandı. 24 saat sonra doku kültür kaplarındaki hücrelerin tutunmaları faz-kontrast doku mikroskopunda incelendikten sonra doku kültür kaplarına belirlenen güçlerde lazer uygulandı ve 37°C'de %5'lik CO₂'li etüvde 7, 14 ve 21 gün süreyle bekletildi. Inkübasyon periodunun sonunda o perioda ait toplam 15 doku kültür kabı alınarak içlerindeki vasat döküldü. Her doku kültür kabına 2 ml 0.14 mol/l sodyum katodilat tamponunda hazırlanmış %1,5'luk gluteraldehit ilave edildi ve 10 dakika bekletilerek yüzeydeki hücrelerin fikse edilmesi sağlandı. Daha sonra petrilerdeki gluteraldehit dökülerek doku kültür kapları distile suyla yıkanarak gluteraldehit uzaklaştırıldı. Fikse edilen doku kültür kaplarına 2ml hazırlanmış olan ALP boyası ilave edilerek karanlık ortamda 1 saat bekletildi. 1 saatin sonunda doku kültür kaplarındaki boya döküldü ve doku kültür kapları distile suyla yıkanarak reaksiyon sonlandırıldı ve doku kültür kapları kurumaya bırakıldı. Daha sonra ışık mikroskopunda x10 ve x20 büyütmeyle mikroskoba bağlı dijital fotoğraf makinesi kullanılarak fotoğraflandı.

KALSIYUM İÇİN HISTOKİMYASAL BOYAMA YÖNTEMİ:

Boyanın Hazırlanması: NH₄OH (Cat. No. A-6899, Sigma, USA) distile su ile seyreltilerek %0.028'lik NH₄OH solusyonu elde edildi. Distile su ile S alizarin sodyum sülfanat otomatik karıştırıcıda karıştırılarak %1'lik S alizarin sodyum sülfanat solusyonu elde edildi. Daha sonra %0.028'lik NH₄OH damlatılarak %1'lik S alizarin sodyum sülfanat solusyonunun pH'sı 6.4'e eşitlendi. Bu işlem için pH metre kullanıldı.

Hücre süspansiyonunun yoğunluğu 4×10^4 hücre/ml olacak şekilde ayarlandı. Daha sonra 35 mm² 'lik doku kültür kabı içerisine 2 ml bu hücre süspansiyonundan kondu. Her lazer uygulaması ve her inkübasyon periodu için 1 doku kültür kabı olacak şekilde toplam 45 doku kültür kabı hazırlandı. 24 saat sonra doku kültür

kaplarındaki hücrelerin tutunmaları faz-kontrast doku mikroskopunda incelendikten sonra doku kültür kaplarına belirlenen güçlerde lazer uygulandı ve 37°C'de %5'lik CO₂'li etüvde 7, 14 ve 21 gün süreyle bekletildi. İnkübasyon periodunun sonunda o perioda ait toplam 15 doku kültür kabı alınarak içlerindeki vasat döküldü.

Doku kültür kapları ALP boyaması için kullanılan yöntemle fikse edilip distile suyla yıkanıp kurutulduktan sonra, doku kültür kaplarının içine hazırlanan kalsiyum boyasından 2'şer ml ilave edilip 2 dakika bekletildi. Reaksiyon doku kültür kaplarının asit etanol (etanol içerisinde %0.01 HCl) ve distile suyla yıkanmasıyla sonlandırıldı. Doku kültür kapları kurumaya bırakıldı. Daha sonra ışık mikroskopunda x10 ve x20 büyütmeyle mikroskoba bağlı dijital fotoğraf makinesinde fotoğraflandı.

İSTATİSTİKSEL ANALİZ:

MTT abzorbars ortalamaları, ALP ve osteokalsin aktivitesi ortalamaları Varyans analiziyle, çoklu karşılaştırmalar Tukey testi kullanılarak p=0.05 seviyesinde değerlendirildi¹²⁸.

BULGULAR:**MORFOLOJİK İNCELEME:**

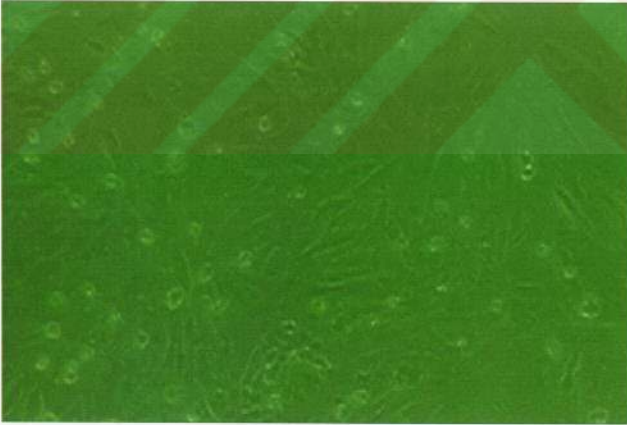
Tüm gözlerdeki hücreler inkübasyon periodunun 3. gününden itibaren hücre kültür plaklarının tabanına tutunarak bir monolayer oluşturmaya başladı. 7. günün sonunda bütün deney ve kontrol gözlerinde hücreler hücre kültür plağının tabanına tutunmuş olarak gözlemlendi ancak özellikle yüksek güç ayarı uygulanan Grup 7, Grup 10, Grup 11, Grup 12 ve Grup 13'e ait gözlerde tabanın tamamının kaplanmadığı ve bazı boşlukların olduğu gözlemlendi.

14. günün sonunda özellikle Grup 1 deney gözlerinde, kontrol gözlerinde ve He-Ne lazerin uygulandığı Grup 14 gözlerindeki hücrelerde kontak inhibisyon sonucunda dökülmeler olduğu gözlemlendi. Yüksek güç ayarı uygulanan gruplarda, kontak inhibisyona bağlı hücre dökülmeleri daha az gözlemlendi.

21 günlük inkübasyon periodunun sonunda tüm gruplara ait gözlerde hücre dökülmeleri başladığı gözlemlendi. 21 günlük period sonunda hücre sitoplazmalarında granüler yapılar oluşmaya başladığı, hücre membranlarındaki bozulmalara bağlı olarak hücrelerin şişerek yuvarlaklaştığı ve orijinal iç şeklindeki yapılarında bozulmalar meydana geldiği izlendi. Yine bu periodda, osteoblastların orijinal morfolojilerinde sitoplazmanın ortasında yer alan hücre çekirdeklerinin hücrenin bir tarafına doğru itilmiş olduğu gözlemlendi. 21 günlük gözlem dönemi sonunda da hücre yoğunluğu, Grup1, Grup 14 ve Grup 15 (kontrol)'de lazer uygulanan diğer gruplara oranla daha fazla bulundu.



Resim 1: Hücreler neredeyse tamamen tabanı kaplamış olarak izleniyor (7. Gün, Grup 14)



Resim 2: Bazı boşluklar izlense de hücreler tabanı kaplamış olarak izleniyor(7. Gün,Grup 1)



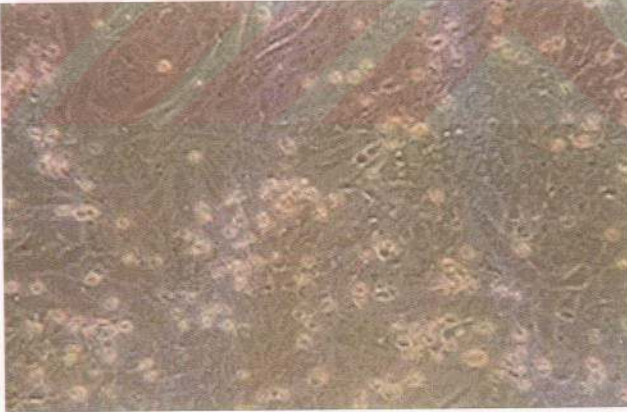
Resim 3: Hücreler tabanın tamamını kaplamış olarak izleniyor (7. Gün,Kontrol)



Resim 4: Hücreler henüz tabanı kaplamamış, tutunan hücreler normal osteoblast fenotipi gösteriyor (7. Gün, Grup 13)



Resim 5: Altteki tabakanın tabanın tamamını kapladığı ve kontak inhibisyonlar yüzünden hücrede dökülmeler başladığı izleniyor (14. Gün, Grup 1)



Resim 6: Daha az hücre dökülmesi olmasına karşın, tabanda hiç boşluk olmadığı izleniyor (14. Gün, Grup 14)



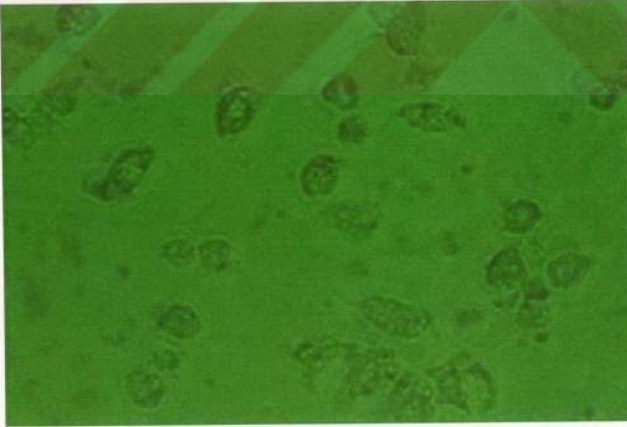
Resim 7: Tabanda hala boşluklar var, ancak özellikle hücrelerin yoğun olduğu bölgelerde dökülmeler izleniyor. (14. Gün, Kontrol)



Resim 8: Hücre proliferasyonu kontrol gözlerine oranla çok daha düşük (14. Gün, Grup 13)



Resim 9: Alttta hala normal hücreler olmasına karşın hücrelerin yuvarlaklaşmaya başladıkları izleniyor (21. Gün, Grup1)



Resim 10: Hücrelerdeki yaşlanmaya bağlı olarak stoplazmalarının koyulaştığı ve hücrelerin yuvarlaklaşarak nükleuslarının kaybolduğu izleniyor(21. Gün, Grup 13)



Resim 11: Hücre yoğunluğunun fazla olduğu ve hücrelerin yaşlanmaya başladığı izleniyor (21. Gün, Kontrol)



Resim 12: Altteki tabakada hala normal morfolojide hücreler olmasına karşın, hücrelerin çoğunda yuvarlaklaşmalar ve nükleusların bir tarafa doğru itildiği izleniyor (21. Gün, Grup 14)

MTT DEĞERLENDİRMELERİ:

Saos-2 insan osteoblast benzeri hücre kültürleri üzerinde yapılan çalışmada, deney ve kontrol gözlerinin abzorban ortalamaları değerlerinin inkübasyon periodunun 7. gününde en yüksek değerlerinde olduğunu ve bu değerlerin 14. günde azalmaya başladığını ve 21. günde bu değerlerin en düşük düzeye ulaştığı gözlemlendi.

Her üç gözlem periodunda da Grup 1 ve Grup 14 gözlerinin abzorban ortalaması, kontrol gözlerinin abzorban ortalamalarından daha yüksek, lazer uygulanan diğer grupların abzorban ortalamaları ise kontrol gözlerinin abzorban ortalamalarından daha düşük bulundu.

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

Bütün gruplar için kaydedilen gözlem periodlarının kaydedilen değerleri çoklu grup olarak alınıp, Tukey testi $p=0.05$ seviyesinde uygulandığında bütün periodlar arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$) (Tablo 5).

	7	14	21
7	-	-	-
14	$P<0.05$	-	-
21	$P<0.05$	$P<0.05$	-

Tablo 5: Gözlem periodlarının çoklu karşılaştırılmasında anlamlılık tablosu.

Gruplarda kullanılan atım enerji değerleri (mj) karşılaştırıldığında Grup 1 ve Grup 14 (He-Ne), Grup 1 ve Grup 15 (Kontrol) arasındaki fark anlamlı değildir ($p>0.05$). Aynı şekilde 60 mj atım enerjisi uygulanan gruplar ve Grup 15 arasındaki fark da anlamlı değildir ($p>0.05$). Bunun dışındaki grupların abzorbanans ortalama değerleri arasındaki farklar anlamlıdır ($p<0.05$) (Tablo 6).

	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	$p>0.05$	$P>0.05$	$P<0.05$	$P<0.05$	$P<0.05$	-

Tablo 6: Atım enerjileri (mj) değerleri karşılaştırılırken yapılan anamlılık tablosu.

Bütün gruplar için atım oranlarının kaydedilen, çoklu grup olarak alınıp, Tukey testi uygulandığında 10 pps atım oranı ve kontrol grubu arasındaki fark, 15 pps atım oranı ve 30 pps atım oranı arasındaki fark ve 20 pps atım oranı ve 30 pps atım oranı arasındaki fark anlamlı değildir ($p>0.05$). Bunun dışındaki atım oranları karşılaştırıldığında fark anlamlı çıkmaktadır ($p<0.05$) (Tablo 7).

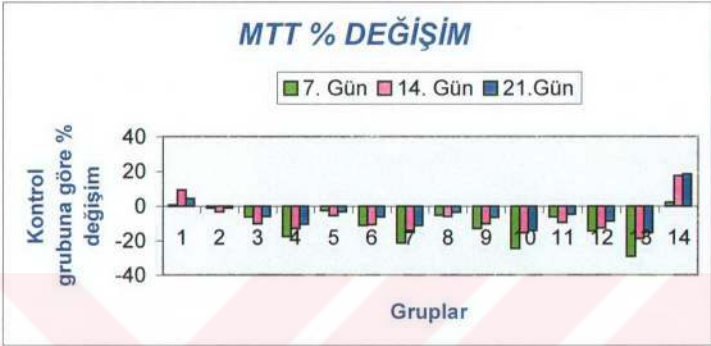
	10	15	20	30	HeNe	Kontrol
10	-	-	-	-	-	-
15	P<0.05	-	-	-	-	-
20	P<0.05	p>0.05	-	-	-	-
30	P<0.05	P>0.05	P>0.05	-	-	-
HeNe	P<0.05	P<0.05	P<0.05	P<0.05	-	-
Kontrol	P>0.05	P<0.05	P<0.05	P<0.05	P<0.05	-

Tablo 7: Atım oranları(pps) karşılaştırıldığında yapılan anlamlılık tablosu.

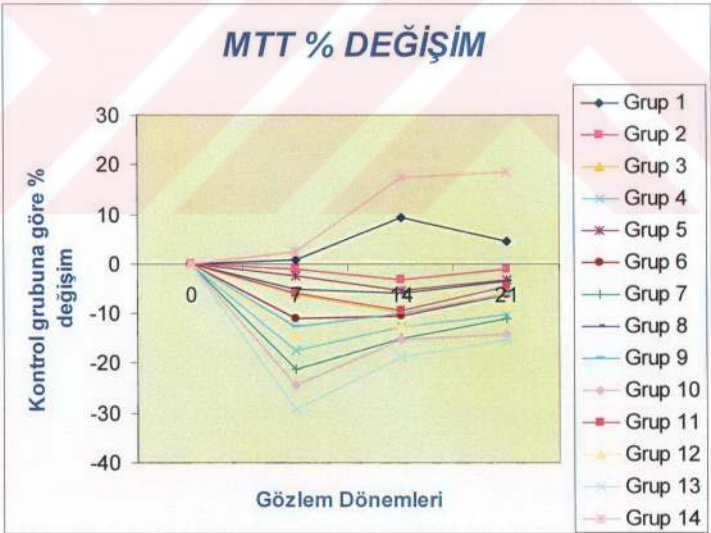
MTT ölçümlerinin kontrol grubuna göre değişim yüzdesinin hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılmıştır:

Değişim yüzdesi=[(deney gözlerinin abzorbars ortalaması – kontrol gözlerinin abzorbars ortalaması) / (kontrol gözlerinin abzorbars ortalaması)] x 100

Bu formüle göre MTT abzorbanans değişim yüzdeleri karşılaştırıldığında ortaya çıkan grafikler aşağıdaki gibidir (Grafik 1, 2);

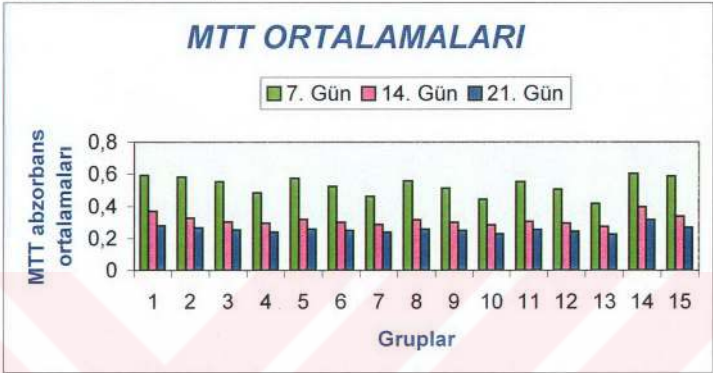


Grafik 1: MTT değişim yüzdelerinin gruplara göre karşılaştırılması

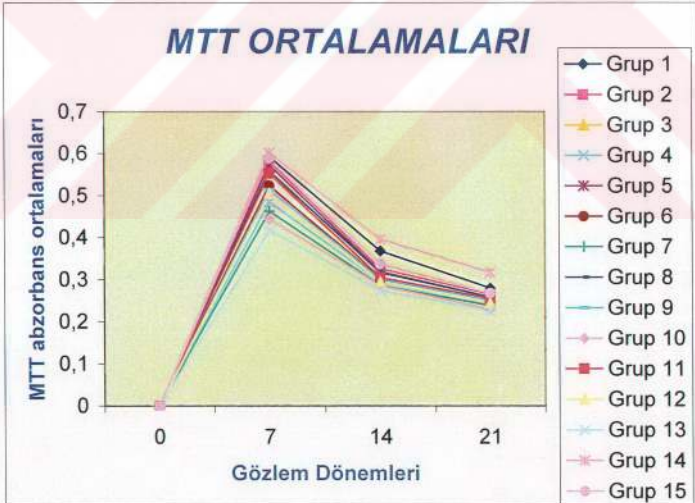


Grafik 2: MTT değişim yüzdelerinin gözlem dönemlerine göre karşılaştırılması

MTT abzorbanans ortalamaları karşılaştırıldığında ortaya çıkan grafikler aşağıdaki gibidir (Grafik 3,4):



Grafik 3: MTT abzorbanans ortalamalarının gruplara göre karşılaştırılması



Grafik 4: MTT abzorbanans ortalamalarının gözlem dönemlerine göre karşılaştırılması

ALP ÖLÇÜMLERİ:

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

ALP için yapılan varyans analizi sonuçlarına göre değerlendirme periodları karşılaştırıldığında fark anlamlı ($p<0.05$), atım enerjisi (mj) miktarları karşılaştırıldığında fark anlamlı ($p<0.05$), atım oranları (pps) karşılaştırıldığında fark anlamlı ($p<0.05$), değerlendirme periodu ve atım enerjisi (mj) arasındaki etkileşim 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 8).

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

Tablo 8: Gözlem periodları karşılaştırılmasında yapılan anlamlılık tablosu.

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 9).

	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	$p>0.05$	$P<0.05$	$P<0.05$	$P<0.05$	$P<0.05$	-

Tablo 9: Atım enerjileri (mJ) değerleri karşılaştırıldığında ortaya çıkan anlamlılık tablosu.

ALP ortalamalarına göre atım oranları karşılaştırıldığında yalnızca 15 ve 20 pps atım oranları arasındaki farkın anlamlı olmadığı ($p>0.05$), diğer atım oranları arasındaki farkın ise anlamlı olduğu gözlenmiştir ($p<0.05$) (Tablo 10).

	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	-

Tablo 10: Atım oranları(pps) karşılaştırıldığında ortaya çıkan anlamlılık tablosu.

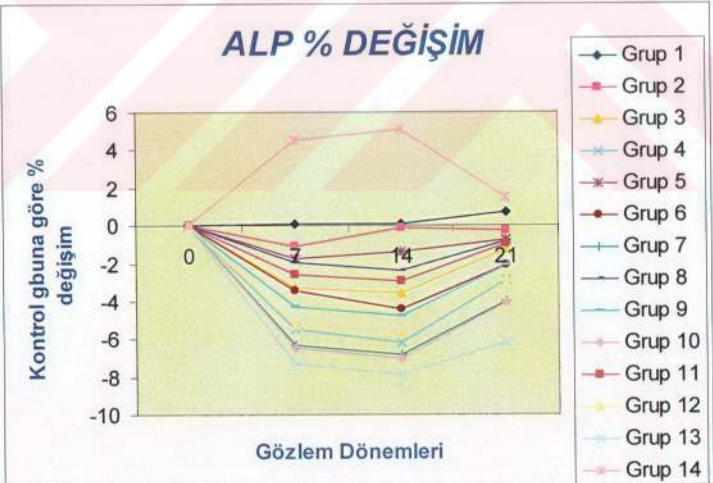
ALP ölçümlerinin kontrol grubuna göre değişim yüzdesinin hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılmıştır:

Değişim yüzdesi=[(deney gözlerinin ortalaması – kontrol gözlerinin ortalaması) / (kontrol gözlerinin ortalaması)] x 100

Bu formüle göre değişim yüzdeleri karşılaştırıldığında ortaya çıkan grafikler aşağıdaki gibidir (Grafik 5, 6):

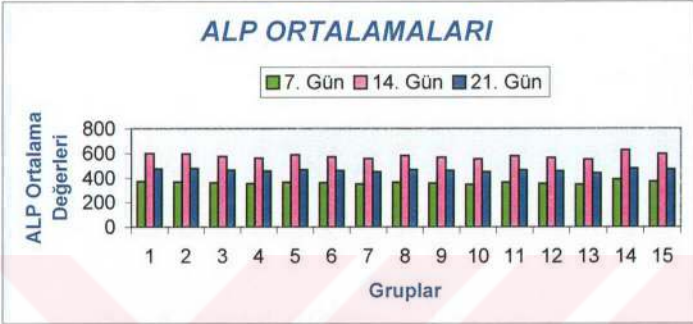


Grafik 5: ALP aktivitesi değişim yüzdeleri gruplara göre karşılaştırılması

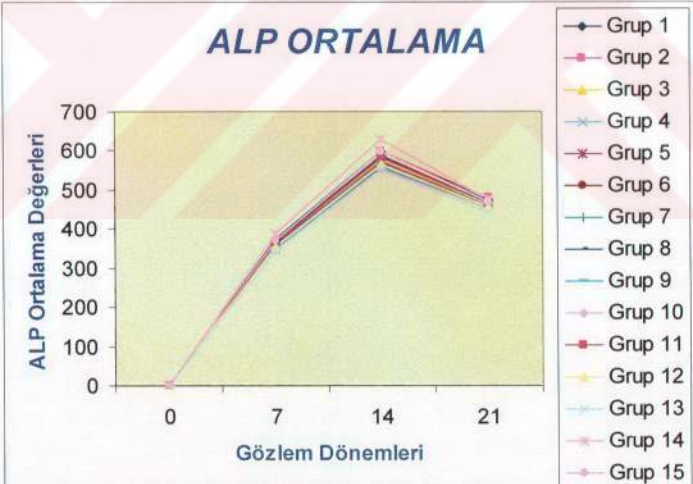


Grafik 6: ALP aktivitesi değişim yüzdeleri gözlem dönemlerine göre karşılaştırılması

ALP aktivitesi ortalamaları karşılaştırıldığında ortaya çıkan grafikler aşağıdaki gibidir (Grafik 7, 8):



Grafik 7: ALP aktivitesi ortalama değerlerinin gruplara göre karşılaştırılması



Grafik 8: ALP aktivitesi ortalama değerlerinin gözlem dönemlerine göre karşılaştırılması

OSTEOKALSİN ÖLÇÜMLERİ:

Osteokalsin ölçümleri yapılırken önce hücreler vasatlarıyla birlikte ultrasonik parçalayıcı ile yarım saat muamele edilerek parçalandı ve parçalanmış hücrelerin serum osteokalsin miktarları ölçüldü.

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 karşılaştırılamamıştır. Atım enerji (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.

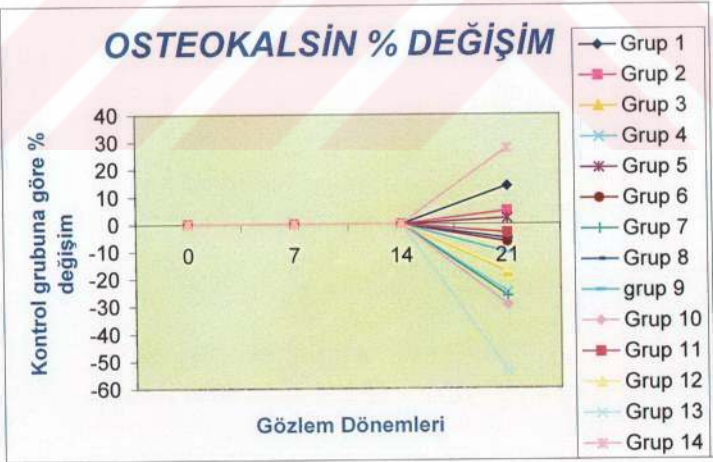
OSC ölçümlerinin kontrol grubuna göre değişim yüzdesinin hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılmıştır:

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

Bu formüle göre osteokalsin değişim yüzdeleri karşılaştırıldığında ortaya çıkan grafikler aşağıdaki gibidir (Grafik 9, 10):



Grafik 9: Osteokalsin değişim yüzdelерinin gruplara göre karşılaştırılması



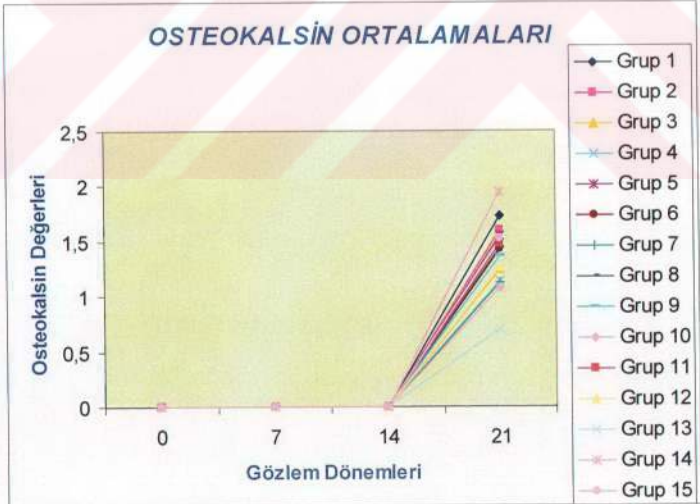
Grafik 10: Osteokalsin değişim yüzdelерinin gözlem dönemlerine göre karşılaştırılması

Osteokalsin ortalamaları karşılaştırıldığında ortaya çıkan grafikler

aşağıdaki gibidir (Grafik 11,12):



Grafik 11: Osteokalsin ortalamalarının gruplara göre karşılaştırılması



Grafik 12: Osteokalsin ortalamalarının gözlem dönemlerine göre karşılaştırılması

HISTOKİMYASAL DEĞERLENDİRMELER:

ALP BOYAMASI:

ALP boyamaları sonucunda fikse edilen hücrelerde hücre sitoplazmalarında ALP pozitif hücrelerde karverengi-siyah boyamalar oluştuğunu gözlemledik.

ALP aktivitesi bulgularını destekleyecek şekilde histokimyasal boyamalarda bütün gruplarda ALP gözlenmiş olmasına karşın özellikle 14 günlük period sonundaki boyamalarda ALP yoğunluğunun artmış olduğunu gözlemledik.

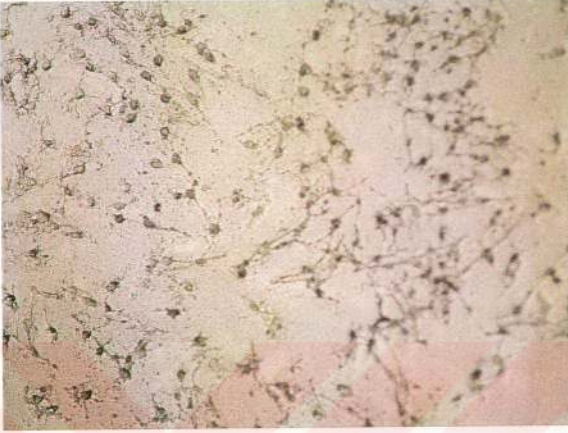
Gruplar arasında bir karşılaştırma yapıldığıdaysa HeNe lazer uygulanan Grup 14'teki, en düşük lazer güç seviyeleri olan 20 mJ, 10 pps ve 10 saniye uygulanan Grup1, ve kontrol gözlerinde yoğunlukların daha fazla olduğunu gözlemledik. Aynı şekilde yüksek güçlerde özellikle 60 mJ, 10 pps ve 10 saniye güç ayarlarının üzerinde ALP boyamalarının yoğunluğunun azaldığını gözlemledik.



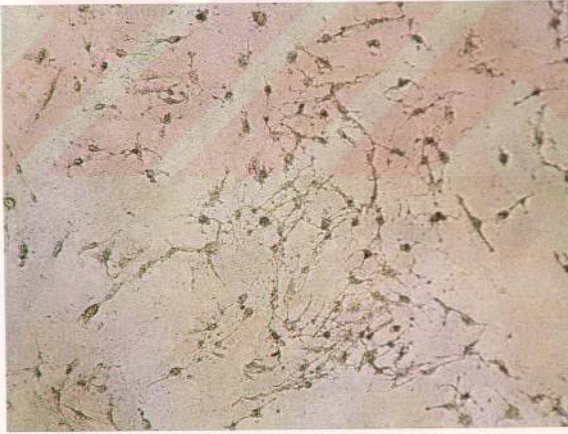
Resim 13: 7. gün ALP boyaması Grup 15'e (kontrol) ait bir örnek.



Resim 14: 7. gün ALP boyaması Grup 13'e ait bir örnek.



Resim 15: 14. gün ALP boyaması Grup 14'e ait bir örnek



Rsim 16:14. gün ALP boyaması Grup 13'e ait bir örnek



Resim 17: 21. gün ALP boyaması Grup 14'e ait bir örnek



Resim 18: 21. gün ALP boyaması grup 13'e ait bir örnek

KALSIYUM BOYAMALARI:

Kalsiyum boyamalarında fikse edilen hücrelerde, hücre sitoplazmaları içerisinde bulunan kalsiyum depoları kırmızı-kahverengi renkte izlendi. Bu depoların gözlemlenmeleri de gözlem periodunun ikinci evresi olan 14. günde yoğunluk göstermektedir. Gözlem periodunun üçüncü evresi olan 21. günde bu yoğunlukların arttığını gözlemledik.

ALP boyamalarında olduğu gibi gruplar arası bir karşılaştırma yapıldığında kontrol grubu, HeNe lazer uygulanan grup ve düşük güç seviyelerinde lazer uygulanan (20mj, 10 pps ve 60 mj, 10 pps)gruplarda boyama yoğunlukları diğer gruplara oranla daha fazladır.



Resim 19: 7. gün kalsiyum boyaması kontrol grubuna (Grup 15) ait bir örnek



Resim 20: 7. gün kalsiyum boyaması 13. gruba ait bir örnek



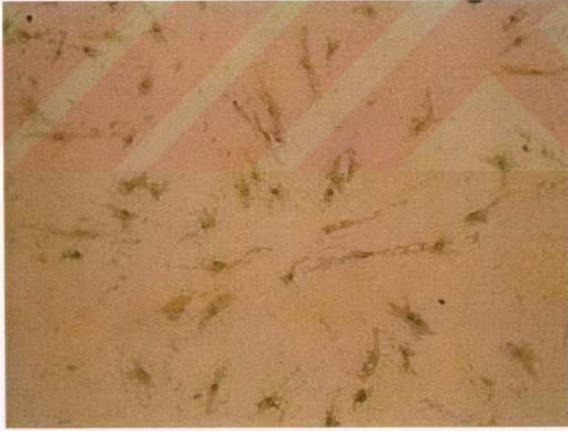
Resim 21: 14. gün kalsiyum boyaması kontrol grubuna ait bir örnek



Resim 22: 14. gün kalsiyum boyaması 13. gruba ait bir örnek



Resim 23: 21. gün kalsiyum boyaması kontrol grubuna ait bir örnek



Resim 24: 21. gün kalsiyum boyaması Grup 13' e ait bir örnek

TARTIŞMA:

Lazer teknolojisi, günümüzde diş hekimliği alanında sıklıkla kullanılır hale gelmiştir. Lazer uygulamalarının kök kanal tedavilerinde konvansiyonel yöntemlerle birlikte kullanılmasının pek çok fayda sağlayabileceği birçok araştırmacı tarafından kabul edilmektedir. Bu amaçla, kök kanalları içerisine rahatlıkla girebilen ince fiber optik iletim sistemleriyle özellikle Nd:YAG lazerler tercih edilmektedir.

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

Değişik tipteki lazerlerin kök kanal sistemleri üzerindeki etkileriyle ilgili pek çok araştırma yapılmış olmasına karşın, bu lazerlerin hücresel düzeyde meydana getirdiği morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerle ilgili çok az bilgi mevcuttur. Bu etkilerin in vivo yerine, hücre kültürleri kullanılarak in vitro olarak değerlendirilmesi standart deney işlemlerinin gerçekleştirilebilmesi, kısa sürede sonuç alınabilmesi, deney maliyetlerinin daha düşük olması ve sayısal değerler elde edilebilmesi gibi avantajlar sağlamaktadır

129,130,131

Hayvan deneyleri diş hekimliğinde kullanılan pek çok maddeye karşı biyolojik cevabın belirlenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak güvenilir ve belirgin sonuçlar elde edilebilmesi için çok sayıda hayvan kullanılması gerekmektedir. Bunun yanında bu tür in vivo modellerde elde edilen sonuçların yorumlanması güçtür, çünkü vücutta bu sonuçları etkileyebilecek pek çok değişken ortaya çıkabilmektedir. Bu değişkenlerin standart şartlar altında kontrol edilebilmesi imkansızdır. Bunun yanında hücre kültür sistemleriyle standart bir deney ortamının sağlanması yalnızca denenen materyale veya yönteme hücrenin verdiği cevabın ölçülebilmesi avantajını sağlamaktadır

132

Temelde hücre ve doku kültürü için üç yöntem mevcuttur. Eğer bir doku eksplantı kontrolsüz şekilde üremeye bırakılırsa bu yöntem 'doku kültürü' denir. Pek çok doku tipi içeren doku eksplantındaki bir parçanın kontrolsüz proliferasyonuna 'organ kültürü' denmektedir. Eğer yalnızca bir tip hücrenin proliferasyonuna izin verebilecek bir düzenek sağlanıyorsa buna 'hücre kültürü' denmektedir. Organ kültür sistemleri in vivo koşullara en yakın olmasına karşın, bu sistemin kompleks olması sebebiyle biyoyumluluk çalışmalarında pek tercih edilmemektedir. Bu nedenle çalışmamızda organ kültürü yerine hücre kültür yöntemlerini kullanmayı tercih ettik.

Dental materyallerin çalışılmasında bugüne kadar pek çok hücre tipi kullanılmıştır. Biyomateryaller çalışılırken seçilen hücre zincirinin özellikleri ve devamlı hücre hattı mı yoksa primer hücreyle mi çalışmanın daha anlamlı sonuçlar vereceği hala tartışılmaktadır. Primer osteoblast hücreleri kıkırdak, kemik iliği, kemik gibi pek çok farklı dokudan elde edilebilmektedir. İnsan osteoblastları, fare kemik hücreleri, civciv embriyonik hücreleri, fetal sığır osteoblastları diploid kromozoma sahiptir ve primer osteoblast hücreleri olarak kabul edilir. Çok yavaş üreme gösterirler. Bu hücreler belirli bir yaşam süresine sahiptirler. Primer insan hücre kültür sistemleri her zaman çoğaltılabilir sonuçlar vermemektedir. Bu, her izolasyondan elde edilen hücrelerin fenotipik belirteçlerinde farklılıklar olmasına ve zamanla kültürün osteoblastik fenotipindeki kayba bağlıdır.

Diğer taraftan devamlı hücre hatları, aneuploid kromozoma sahiptir, hızlı ürer ve doğru olarak pasajlandıklarında çok uzun süreler yaşatılabilirler. Elde edilmesi primer olanlara göre daha kolaydır. Çok uzun bir dönem boyunca bile fenotipik özelliklerinde bir kayıp söz konusu değildir. Yani devamlı hücre hatları ile çalışmak primer hücre kültürlerine göre daha hızlı sonuç verir.

Bazı araştırmacılar diploid hücrelerin aneuploid hücrelere göre farklı sonuçlar verdiğini bildirmiş olmalarına karşın buna dair kesin kanıtlar yoktur. Deney

sonuçlarının ortaya çıkmasında, deney metodu çok önemli rol oynamaktadır. Bu nedenle çalışmaların sonuçları arasında herhangi bir karşılaştırma yapılacağında çalışmalar arasındaki metod farkı mutlaka göz önünde bulundurulmalıdır.

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 kullanılabilecek devamlı hücre hatlarının kullanılmasıyla daha kolaydır ¹³³.

Kemik dokuyla ilgili yapılan in vitro araştırmaların, özellikle biyouyumluluk araştırmalarının pek çoğunda insan kaynaklı olmayan primer hücre kültürleri kullanılmaktadır. Ancak farklı bir türe ait doku veya hücre kültürü kullanıldığında osteoblastik hücrelerin karakterizasyonunda ve bu hücreye ait özel belirteçlerin tanımlanmasında bazı farklılıklar ortaya çıkmaktadır. İnsan kaynaklı primer kemik hücrelerinin üretilmeleri ve uzun dönemli araştırmaların bu hücreler üzerinde gerçekleştirilmeleri pek mümkün olmadığından, bu tür araştırmalarda insan kaynaklı primer hücreler yerine devamlı hücre hatlarının kullanılması önerilmektedir ¹³⁴.

Carvalho ve arkadaşları¹³⁵, ortodontik nedenlerle uygulanan mekanik kuvvetin kemik üzerindeki etkilerini değerlendirmek için yaptıkları araştırmalarında transforme osteosarkom hücre hattı (TE-85) kullanmışlar ve bu osteoblastların kemik remodelinginin formatif ve rezorbtif fazını taklit edebildiğini ve bu nedenle kolaylıkla üretilen ve osteoblastik fenotip gösteren homojen bir hücre modelinin kullanılmasının uygun olduğunu bildirmişlerdir.

Ree ve arkadaşları¹³⁶'nın yaptıkları çalışmada fare kalvariasından elde edilmiş primer osteoblast hücreleri ve osteoblast benzeri devamlı hücre hattı MC3T3-E1 poli(metil metakrilat)/silica hibrid içeren kalsiyum tuzlarına tabi tutulmuş, hücrelerin proliferasyonu ve diferansiyasyonu, SEM, MTT ve ALP aktivitelerinin

ölçümleriyle değerlendirilmiştir. Bu çalışmada her iki hücreden de benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Zhang ve arkadaşları¹³⁷ implant materyalleri üzerine TGF- β_1 uygulamasının insan osteoblastlarının in vitro mineralizasyonu üzerine olan etkilerini inceledikleri çalışmalarında hücre kültür modeli olarak primer insan osteoblastı ve insan osteoblast benzeri devamlı hücre hattı Saos-2'yi kullanmışlar ve çalışmalarının sonucunda iki hücre kültürü arasında fark gözlenmediğini bildirmişlerdir.

Abdullah ve arkadaşları¹³⁸ restoratif materyal olan geliştirilmiş Portland çimentosunun iki farklı şeklinin biyouyumluluklarını değerlendirdikleri çalışmalarında Saos-2 insan osteoblast benzeri devamlı hücre hattını kullanmışlardır. Portland çimentosunun farklı bir çeşidi olan MTA'nin biyouyumluluğunun değerlendirildiği diğer çalışmalarda MG-63 devamlı hücre hattı kullanılmasına karşın çalışmalarında Saos-2 kullanmalarının nedenini MG-63 hücrelerinin Saos-2 hücreleri ile kıyaslandığında olgun osteoblastların karakterlerine daha az sahip olmalarına bağlamışlardır.

Ahmad ve arkadaşları¹³⁹ da implant materyalleri üzerinde insan osteoblast benzeri hücrelerin mineralizasyonunu inceledikleri 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.

Saos-2 hücreleri insan osteosarkoma devamlı hücre hattıdır. Bu hücreler kemik belirteçlerini yüksek seviyelerde göstermeleri nedeniyle insan osteoblastlarına çok benzemektedir. Hücreler in vivo olarak implante edildiklerinde kemik oluşturabilmekte ve uzun dönem kültürlerde in vitro olarak mineralize matriks oluşturabilmektedirler.

Biz de çalışmamızda ATCC'den temin edilen Saos-2 insan osteosarkom devamlı hücre hattını kullandık ve çalışmanın sonucunda bu hücrelerin osteoblastik

kemik belirteçleri olan ALP ve Osteokalsin üretimlerinin olduğunu, bunun hücrenin fenotipik özelliklerini yansıttığını gözlemledik. Bunun yanında hücrelerde, kültür ortamı içerisinde matriks mineralizasyonu da gerek kontrol gözlerinde gerekse deney gözlerinde farklı zamanlarda da olsa gözlemledik.

Çalışmamızda hücresel artış ve canlılık, Mossman¹⁴⁰ın tanımladığı MTT metoduyla değerlendirilmiştir. MTT değerlendirmesi hücre artışı, canlılığı ve sitotoksitesinin ölçülmesi için kantitatif kolorometrik bir değerlendirmedir. Değerlendirme sarı tetrazolyum tuzunun MTT [3-(4,5 dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difenil tetrazolyum bromid] halkasının mor renkli formazan kristallerine dönüşmesine dayanmaktadır. Reaksiyon mitokondrial süksinil dehidrogenaz tarafından katalize edilmektedir. MTT yöntemi sonucunda meydana gelen renkli formazan halkası yalnızca aktif mitokondriada meydana geldiğinden bu reaksiyon yalnızca canlı hücrelerde oluşmaktadır¹⁴¹. Kültürdeki metabolik olarak aktif hücrelerin sayısı ile direk bağlantılı olarak boyanın konsantrasyonu ve abzorbans değerleri değişmektedir. Büyük sayılardaki hücre kültürlerinde canlı hücre oranının belirlenmesinde hızlı, güvenilir ve kolay bir yöntemdir. MTT değerlendirmeleri büyüme döngüsünün herhangi bir aşamasındaki canlı hücre yoğunluğu hakkında fikir verir. Bu yöntemin avantajları kolay, hızlı olması ve güvenilir sonuçlar vermesidir. Tetrazolyum tuzu MTT'nin, hücresel enzimlerle azalması ilaç ve biyomateyallerin sitotoksitesilerinin değerlendirilmesinde¹⁴², hücre canlılığı ve çoğalmasının ölçümünde sıklıkla kullanılmaktadır^{141,143,144}.

Hücresel artış ve canlılığın ölçülmesi amacıyla bugüne kadar hücre sayımı, ³H-timidin gibi yöntemler kullanılmıştır. Bölünen hücrelerde ³H-timidin ve MTT değerlendirmeleri benzer sonuçlar vermektedir. Ayrıca bu yöntemde ³H-timidin yönteminde olduğu gibi oldukça pahalı olan radyoizotoplara gerek yoktur¹⁴⁰.

Hücre sayımı yönteminde hücrelerin tripsinize edilerek hücre kültür plaklarından kaldırılması gerekmektedir. Bizim daha önce yaptığımız ve kompozit

rezinlerin fibroblastlar üzerindeki sitotoksisiteilerini değerlendirdiğimiz bir ön çalışmada, MTT metodu ve hücre sayımını karşılaştırdık. Özellikle 96 gözlü hücre kültür plaklarında tripsinizasyondan sonra, hücrelerin gözlerden tam olarak toplanamadığını, hücreler toplandıktan sonra bile faz kontrast mikroskopta yapılan incelemede gözlerde canlı hücrelerin kaldığını gözlemledik.

Zhu ve arkadařları¹⁴⁵ insan osteoblastlarının kök ucu dolgu materyallerine tutunmalarını inceledikleri çalışmalarında insan osteoblast benzeri devamlı hücre hattı Saos-2'yi kullanmışlar. Bu çalışmada osteoblastların MTA, kompozit rezin , IRM ve amalgama tutunmasını SEM ile incelemişlerdir. Hücresel tutunma ve yayılmanın hücresel fonksiyonun başlangıç fazı olduğunu bildirmişlerdir.

Bizim çalışmamızın sonuçlarına göre hücreler hücre kültür plaklarının tabanına yaklaşık 3. günde tutunmaya başladı. Morfolojik incelemelerde hücrelerin 7. günde kültür plaklarının tabanını kapladığı daha sonraki inceleme periodlarında hücrelerde dökülmelerin oluşmaya başladığı izlendi. 14. günde yapılan faz kontrast doku mikroskobu incelemelerinde hücrelerde dökülmelerin oluşmaya başladığı ve 21. günde bu dökülmelerin arttığı izlendi. Aynı şekilde, MTT abzorbars değerleri tüm gözlerde en yüksek değerlerine 7. günde ulaşmış daha sonra bu abzorbars değerlerinde bir düşüş meydana gelmiştir. Bu bulgular faz kontrast mikroskop kullanılarak yapılan morfolojik incelemelerin bulgularıyla uyumludur. Saos-2 osteoblast benzeri devamlı hücre hattı tabana tutunarak büyüyen hücreler olduğundan hücrelerdeki bu dökülmeler kontak inhibisyon ve hücresel yaşlanmaya bağlı olarak hücre canlılığının azaldığını göstermektedir.

Osteoblastik diferansiyasyon belirteci olarak kullanılan iki tipik parametre, spesifik alkalen fosfataz aktivitesi ve osteokalsin üretimidir. Genelde, matriksi mineralize olmayan fibroblast gibi hücrelere göre, osteoblastlar yüksek alkalen fosfataz seviyeleri gösterirler. Bu hücreler enzim yönünden zengin enzim kesecikleri oluştururlar. Alkalen

fosfataz rölatif olarak erken bir diferansiyasyon belirtecidir. Yaklaşık aynı dönemde, hücreler osteokalsin mRNA üretmeye başlarlar ve bu protein, kemiğin mineral fazına bağlanır^{146,147,148}.

ALP kemik metabolizmasıyla ve osteoblast diferansiyasyonuyla bağlantılı olduğu bilinen bir enzimdir. ALP aktivitesi, osteoblast diferansiyasyonu ve osteojenik özelliğin belirlenmesinde en sık kullanılan parametredir¹⁴⁹.

Genelde osteokalsin üretiminin hücre diferansiyasyonundan sonra meydana geldiği ve bunu mineralizasyonun takip ettiği düşünülmektedir.

Biz de çalışmamızda hücresel karakterizasyonu belirlemek için ALP ve osteokalsin ölçümlerini değerlendirdik.

Hücresel diferansiyasyonun osteoblastik yolda ilerlemesi, kemikle bağlantılı matriks proteinleri ve enzim aktiviteleriyle açıklanabilir. Kollejen Tip I en erken ortaya çıkan matriks proteini olmasına rağmen kemiğe özgün değildir. Alkalen fosfataz, bütün dünyada genel olarak kabul edilmiş kemik matriks enzimidir ve başlamış osteogenezin analizi için sıklıkla kullanılmaktadır¹⁵⁰.

Osteokalsin kemik matriks proteinidir ve diferansiye osteoblastların biyokimyasal belirteci olarak kullanılmaktadır¹⁵⁰. Osteoblastik ve fibroblastik fenotipler osteokalsin üretebilmeleri ve in vitro olarak mineralize olabilmeleriyle birbirlerinden ayrılırlar. Osteoblastlar hücre kültürü ortamında osteokalsin üretebilir ve mineralize olabilirler¹⁵¹.

Osteokalsin karboksi glutamik asit içeren protein olarak bilinmektedir, kemiğin nonkollejen proteinidir. Osteokalsin kemik metabolizması ve döngüsü için biyokimyasal bir belirteçtir ve kemikteki metabolik hastalıkların belirlenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. Osteokalsin ekspresyonu, büyüyen kemiklerde en yüksek seviyesindedir ve bunun mineralizasyonda geliştirici bir rolü olduğu d ř n lmektedir¹⁵².

ALP erken dönemde belirlenebilir bir kemik belirtecidir ve kemik mineralizasyonunda önemli rol oynamaktadır. Osteokalsin, mineralize olmuş olgun matrikste daha geç dönemde ortaya çıkmakta ve kemiğin yeniden yapılanmasında rol oynadığı düşünülmektedir¹³⁷.

Osteokalsin kemik oluşumu için gerekli bir belirteçtir. Osteokalsin kemiğin total nonkollejen proteinlerinin %20'sini oluşturmaktadır ve kemiğe özgü bir proteindir. Üç karboksi glutamik asit içermektedir ve bu konfigürasyon hidroksiapatit oluşumu için gereklidir. Bunun kemik oluşumu ve osteoblast fonksiyonu olan mineral olgunlaşması için sinyal olduğu kabul edilmektedir¹³⁸.

Osteokalsin varlığı, kemik döngüsünün başlatılması için sinyal olabilir. Osteokalsin, matur ve tamamen oluşmuş mineralize matrikste bulunur. In vivo ve in vitro osteokalsin kemiğin diğer belirteçlerine göre daha geç dönemlerde meydana gelmektedir ve kemiğin yeniden yapılanmasında rol oynar¹³⁹.

Li ve arkadaşları¹⁴¹ ultrason uygulamalarının kemik oluşumu ve rezorpsiyonu üzerine etkilerini inceledikleri çalışmalarında erken osteoblast belirteci olarak ALP aktivitesini incelemişlerdir.

Koh ve arkadaşları¹⁵³ insan osteoblastları üzerinde MTA'nın etkilerini inceledikleri çalışmalarında MG63 osteoblastlarını kullanmışlar, bu hücreleri MTA üzerine yerleştirdikten sonra osteokalsin üretimi ve ALP aktivitesini değerlendirmişlerdir. Osteokalsin üretimi, MTA kullanıldığında 3.8 ± 0.87 ng/mL'den 19.7 ± 2.8 ng/mL'ye çıkmıştır. Karşılaştırma grubu olan PMA (polimetilmetakrilat) ile osteokalsin ölçülememiştir.

Aparicio ve arkadaşları¹⁵⁴ da iki hastadan elde ettikleri primer insan osteoblast hücreleri üzerinde yaptıkları çalışmalarında hücre diferansiyasyonunu belirlemek için ALP aktivitesini ölçmüşlerdir.

Scotchford ve arkadaşları¹⁵⁵ kollejen-PVA(polivinil alkol) biyoyapay polimerlere osteoblastların verdiği cevabı inceledikleri çalışmalarında hücre kültürü olarak femoral kemikten çıkartılan trabeküler kemik fragmanlarından elde edilen primer hücre kültürü kullanmışlardır. Bu hücrelerin fenotipik karakterlerini belirlemek için ALP aktiviteleri ve osteokalsin üretimlerini incelemişlerdir.

Oliva ve arkadaşları¹³⁴ cam iyonomer simanların biyoyumluluğunu inceledikleri çalışmalarında primer insan osteoblast hücrelerini kullanmış ve osteokalsin seviyelerini radioimmunoassay yöntemiyle incelemişlerdir. Osteoblast fenotipinin belirlenmesinde alkalin fosfataz aktivitesi ve non kollejen protein olan osteokalsin seviyesinin incelenmesi gerektiğini vurgulamışlardır. Osteokalsinin, majör non-kollejen kemik proteini olduğunu ve osteoblasta özgü bilinen tek polipeptit olduğunu belirtmişlerdir.

Kurachi ve arkadaşları¹⁵⁶ osteoblastik hücreler üzerinde titanyum yüzeylerin etkilerini inceledikleri in vitro çalışmalarında, MC3T3-E1 osteoblast devamlı hücre kültürü kullanmış ve fenotipik belirteç enzim olarak ALP aktivitesini ölçmüşlerdir.

Dalby ve arkadaşları¹⁵⁷ hidroksi apatit –poly(metilmetakrilat) siman yüzeyine osteoblast hücrelerinin tutunmasını inceledikleri çalışmalarında, hücre fenotipini ALP seviyesi ölçümleriyle incelemişlerdir. Bu çalışmanın sonucunda hücre proliferasyonu ile bağlantılı olarak ALP seviyesinde artış olduğu tespit edilmiştir. 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 arkadaşları¹⁵⁸ yaptıkları çalışmada, kollejen, ALP ve osteokalsin mRNA'nın mineralize nodül formasyonundan önce gözlemlendiğini ancak osteokalsinin kemik dokunun başlangıç oluşumunda gözlenmediğini bildirmişlerdir.

Snyder ve arkadaşları¹⁵⁹ kök perforasyonlarında kullanılan materyallerin osteoblastik hücrelerdeki etkilerini inceledikleri çalışmalarında devamlı hücre kültürü ROS 17/2.8'i kullanmışlardır. Bu çalışmada non-kollejen protein olan osteopontin ve osteokalsinin mRNA seviyeleri incelenmiştir. Test edilen materyallerden yalnızca Cavit-G'nin osteokalsin mRNA seviyesini belirgin olarak arttırdığı ve bu maddenin pozitif osteoblastik etkisi olduğunu belirtmişlerdir. Osteokalsinin, hücrenin osteoblastik fenotipini gösteren geç belirteçi olduğunu bildirmişlerdir.

Morais ve arkadaşları¹⁴⁴ çalışmalarında tavşan kemiklerinden elde edilmiş primer osteoblast hücre kültürü kullanmışlardır. Bu çalışmada 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. Mineral depolarının oluşumu, en yüksek ALP aktivitesini takip edecek şekilde 3. haftada meydana gelmiştir. Bu çalışmada osteoblast diferansiyasyonunu belirginleştirmek için askorbik asit, β -gliserofosfat ve dekzametazon kullanmışlar. Bizim yaptığımız çalışmada bu maddeler kullanılmamakla beraber, aldığımız sonuçlar benzerdir. Osteojenik hücre sistemleri üzerinde yapılan çalışmalar, osteoprogenitor hücrelerin, preosteoblastlara, olgun osteoblastlara ve daha sonra osteosit hücrelerine diferansiye olduğu yönündeki bilgileri desteklemektedir. ALP aktivitesi, hücreler osteoblastlara dönüştüğünde mevcuttur ve kemik hücre popülasyonunda spesifik ALP aktivitesi arttığında hücrelerin daha diferansiye bir konuma geçtiği genel olarak kabul edilmektedir. ALP matriks mineralizasyonunun başlatılmasında kritik bir rol oynamaktadır ve bundan sonra enzim seviyesi düşmektedir. Sonuçlarımız bu bulgularla da aynı doğrultudadır.

Ohbayashi ve arkadaşları¹⁴⁹ insan diş pulpası fibroblastları 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 diferansiye ettiği bildirilmiştir. Bizim çalışmamızın sonuçlarına göre de ALP aktivitesi 14. günde, osteokalsin aktivitesi ise 21. günde en yüksek seviyesine ulaşmıştır. Bu bulgular Morais ve arkadaşlarının¹⁴⁴ ve Ohbayashi ve arkadaşlarının¹⁴⁹ bulgularıyla uyumludur.

Biz de çalışmamızda ALP için en yüksek değerleri 14. günde yani MTT ile elde edilen bulgulara göre proliferasyon fazından, yani 7 günlük peroddan sonraki gözlem döneminde tespit ettik. Bu bulgu, osteoblast diferansiyasyonu ve karakterizasyonuna uygundur. Yani hücreler proliferasyon fazını tamamladıklarında diferansiye olmaya başlamışlardır. Osteokalsin ise 7 ve 14 günlük dönemlerde ölçüm değerlerinin en alt sınırı olan 0.01 ng/ml değerlerinin altında kaldı. Ancak 21. günde, hücrelerde osteokalsin tespit edilebildi. Bu bulgu osteokalsinin kemik oluşumunun geç belirteçlerinden olduğu yönündeki tespitlerle uyumludur. Bunun yanında ALP ve osteokalsin değerleri MTT metoduyla elde edilen değerlerle uyumludur. Yani canlılığın daha fazla olduğu gözlerdeki ALP ve osteokalsin miktarları da daha fazladır.

Bu bulgulara göre, lazer uygulamasını takip eden ilk 7 günlük dönemde hücrelerde sayıca bir artış meydana geldi. Bu dönemde hücrelerde ALP aktivitesi de mevcuttu. Ancak inkübasyon periodunun 14. gününde bu ALP aktivitesi en yüksek seviyesine çıktı, hücresel artış ve canlılık değerlerinde ise bir miktar düşüş izlendi. 7 ve 14. günlerde hücrelerde osteokalsin miktarları ölçülemedi. Inkübasyon periodunun 21. gününde hücrelerin çoğalma ve canlılıkları en düşük seviyedeysen, ALP aktivitesi de düşmeye başladı. Osteokalsin miktarları ise tespit edilebilen miktarlara yükseldi. Bu osteokalsinin, osteoblast hücrelerinin geç belirteci olduğu yönündeki bilgilerle uyumlu bir sonuçtur ve osteokalsinin ALP aktivitesinin artışını takip ettiği söylenebilir. Daha uzun

inkübasyon dönemlerinde hücrelerdeki osteokalsin miktarının artış gösterip göstermeyeceğine dair çalışmalar yapılmalıdır.

Çeşitli lazer sistemlerinin hücre kültürleri üzerindeki etkilerini inceleyen çalışmalar mevcuttur.

Düşük güçteki lazer tedavisi (LLLT) pek çok klinik uygulamada popülerite kazanmaya başlamıştır. Düşük enerjili lazer ışığının yara iyileşmesini hızlandırdığı ve enflamasyonu azaltıcı etkisi olduğu bildirilmektedir. Ancak düşük seviyedeki lazer radyasyonu ortaya çıkan biyokimyasal reaksiyonlar tam olarak açıklanamamaktadır.

Klinik uygulamalarda ya da hayvan deneylerinde doku yenilenmesiyle ilgili operatif değişkenlerin ölçülmesinin güçlüğü, lazer biyolojisi hakkında temel hücresel araştırmaları zorunlu kılmaktadır. Düşük güçteki lazer enerjisinin DNA sentezini arttırdığı, kollejen ve prokollejen miktarını arttırdığı, proliferasyon oranında artışa neden olduğu bildirilmiştir. Lazer-hücre etkileşiminin tam mekanizması kesin olarak bilinmemektedir. Hücresel etkilerin lazer ışınının moleküler emilimiyle oluştuğu düşünülmektedir. Ancak hücreler üzerindeki lazer etkilerinin dalga boyu ve doza bağımlı olduğu genel olarak kabul edilmektedir.

Kreisler ve arkadaşları¹⁶⁰ 809 nm diyod lazer kullandıkları çalışmalarında fiber optik kabloyu oral fibroblast hücre kültürleri üzerine 9 mm mesafeden uygulamışlardır. Bu çalışmanın sonuçlarında elde edilen bulgular, 809 nm düşük güçteki lazer ışığının insan gingival fibroblastlarının proliferasyonu üzerinde aktive edici etkisi olduğunu göstermektedir.

Kreisler ve arkadaşları¹⁶¹ yaptıkları diğer bir araştırmada, 809 nm diode lazer kullanmış ve fiber optik kabloyu hücre kültürlerine 0.5 mm mesafeden uygulamışlardır. Çalışmalarının sonuçlarına göre, yüksek ayarlardaki lazer uygulamalarının, hücre sayılarında azalmaya neden olduğunu bildirmişlerdir.

Chen ve arkadaşları¹⁶², Nd:YAG lazerin periodontal yenilenme üzerindeki etkilerini kültüre edilmiş insan gingival fibroblastları üzerinde değerlendirmişlerdir. Bu araştırmacılar lazeri 10 saniye süreyle, 100 ila 150 mj ve 10 ila 30 pps değerlerinde uygulamışlardır. Lazer, hücre kültürüne kontaklı veya 2mm uzaklıktan uygulanmıştır. Hücrelerde oluşan sitomorfolojik değişiklikler SEM ile hücrelerin canlılık oranlarındaki değişiklikler MTT metodu kullanılarak incelenmiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre 2mm uzaklıktan 150 mj, 20 pps ve 10 saniye lazer uygulamasının hücre kültürünün canlılığını belirgin oranda azaltmadığını gözlemlemişlerdir. Güç ayarları 150 mj, 30 pps ve 10 saniye olarak belirlendiğinde SEM fotoğraflarında hücrelerin vakuolize olduğunu, organik moleküllerin tamamen harab olduğunu bildirmişlerdir. SEM incelemeleri hücre hasarının derecesinin lazer çıkış gücüne bağlı olarak değiştiğini göstermektedir. Bu çalışmada hücre kültür gözlerinde oluşan ısı miktarları ölçülmemiş olmasına karşın bu bulgunun ısı artışıyla paralel olduğu düşünülmektedir. Ayrıca bu çalışmada lazer uygulanmasından sonra hücrelerde meydana gelen hasarın geriye dönüşümlü olup olmadığı incelenmemiş, hücreler lazer uygulamasından hemen sonra incelemeye tabi tutulmuştur. Biz çalışmamızda lazer uygulamasından sonra hücreleri 7, 14 ve 21 günlük gözlem dönemlerinde inceledik. Bu dönemlerde ve bu dönemler arasında faz kontrast mikroskopta gün aşırı yaptığımız morfolojik incelemelerde hücrelerde belirgin bir dejenerasyon izlemedik. 14 günlük gözlem döneminden sonra meydana gelen hücresel dökülmeler, osteoblast hücrelerinin tabana tutunarak büyüyen hücreler olmasından kaynaklı kontak inhibisyon nedeniyle meydana geldi. Bu bulgu hücresel artışın daha az olduğu gözlerde, daha az hücre dökülmesi olmasıyla desteklenmektedir. 21. günde hücrede meydana gelen değişiklikler ise hücrenin yaşlanmasıyla ilgilidir.

Gutknecht ve arkadaşları¹⁶³ Nd:YAG lazerin tek tabaka hücre kültürleri üzerindeki etkilerini inceledikleri çalışmalarında 30 ila 120 mj atım enerjisinde, 20 ila 100 Hz atım oranında, 1,5 ila 3.0 W güç çıkışıyla 10 ila 60 sn süreyle 200 µm çaplı fiber optik kabloyla Nd:YAG lazer uygulamışlardır. Çalışmalarının sonuçlarına göre termal hasar

alanı hasar olmayan alandan kolaylıkla ayırt edilebilmekteydi. Bazı güç ayarlarında kısa süreli uygulamalarda termal hasar gözlenmezken, süre arttırıldığında termal hasar oluştuğunu bildirmişlerdir. Termal hasar olan ve olmayan bölge arasındaki sınırın çok keskin olması sonucunda, Nd:YAG lazerin mikrometre seviyelerinde çalışılmasına imkan vereceğini bildirmişlerdir. 100 mJ atım enerjisi, 20 Hz atım oranı, 2.0 W çıkış gücü, 30 saniye lazer uygulaması yalnızca DNA metabolizması ve hücre bölünme oranlarında bir inhibisyon meydana getirdiğinden ancak sitomorfolojide dejeneratif bir değişiklik oluşturmadığından sınır ayar olarak kabul edilmiştir. Bu ayarda bile hücrelerin ancak %70'i boyanmış ve hücresel aktiviteleri büyük oranda azalmıştır. Bu bulgu, lazer ışınının hücrenin morfolojik görüntüsünde bir değişiklik meydana getirmeden hücre içi aktiviteleri etkilediği sonucunu meydana çıkarmaktadır. Sınır ayarlara dahil olmayan ayarlar daha farklı değişiklikler meydana getirmektedir. Vital ve piknotik hücreler arasındaki sınır, 30 mJ, 80 Hz, 2.4 W, 30 sn lazer uygulamasından sonra daha keskindir. Bu ayar 4 mm çaplı daha keskin sınırlı bir lazer inhibisyon alanı meydana getirmektedir. 120 mJ, 20 Hz, 2.4W, 40 sn ayarları tek tabaka hücre kültürlerinde tamamen nekroza neden olmaktadır.

Bu sonuçlar güç ayarlarına bağlı olarak meydana gelen ısı artışı kaynaklı olabilir. Biz hücrelerimizde, morfolojik incelemeler sonucunda çok büyük dejeneratif değişiklikler tespit etmedik. Ancak lazer güç seviyeleri arttırıldıkça gerek hücre canlılığı ve proliferasyonunda, gerekse 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.

Falwaczny ve arkadaşları¹⁶⁴ Nd:YAG lazerin kök kanalı içerisindeki antibakteriyel etkilerini inceledikleri çalışmalarında, kök kanallarındaki bakteriyel azalma yanında kök kanalları içerisinde oluşan ısı artışını da değerlendirmişlerdir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre 100 mJ, 20 pps, ve 20 sn uygulama sonrasında ortalama 24.3 °C(±3.9)

ve 200 mj, 20 pps, 20sn uygulamayla 61.8 °C(±4.2) ısı artışı oluşmuştur. Aynı çalışmada 100 mj, 20 pps, 10 sn uygulandığında ısı artışı 11.3°C olarak bildirilmiştir.

Bahcall ve arkadaşları¹⁰³ 1992 yılında köpek dişleri üzerinde yaptıkları bir çalışmada 120 mj, 25 pps, 30 sn (3.0 W) Nd:YAG lazer uygulamasının periapikal alanda ankiloz ve semental lizise neden olduğunu göstermişlerdir. Bunun zıttı olarak Ramsköld ve arkadaşları¹⁶⁵ çekilmiş dişler üzerinde yaptıkları bir araştırmada 60 mj, 50 pps, 15 saniye (3.0 W) Nd:YAG lazer uygulamasının kök yüzeyinde yalnızca 6.1 °C'lik bir ısı artışına sebep olduğunu bildirmişler ve bunun Khan¹⁶⁶ ve arkadaşlarının bildirdiği gibi periodontal ligaman için güvenli olduğunu bulmuşlardır.

Lan¹⁶⁷ kök kanalı içerisinde Nd:YAG lazer uygulaması sırasında kök yüzeyinde oluşan ısı artışını değerlendirdikleri çalışmalarında, 60, 80, 100, 150 ve 200 mj atım enerjisi ile 20, 25 ve 30 pps atım oranlarının kombinasyonlarını kullanmışlardır. Çalışmalarının sonuçlarına göre 20 pps atım oranında 60, 80 ve 100 mj'de ısı artışı 10°C'yi geçmemektedir. 25 pps atım oranında 150, 200 ve bazı 100 mj gruplarında ısı artışı 10°C'yi geçmektedir. 30 pps atım oranında 60 mj ve bazı 80 mj örneklerinin dışındaki bütün örneklerde ısı artışı 10°C'yi geçmektedir. Bu çalışmada kullanılan ısı uç 37°C'lik su banyosundan, yapışkan mumla izole edildiğinden elde edilen sonuçlar, in vivo koşullarda kök yüzeyinde meydana gelebilecek ısıdan daha fazladır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre Nd:YAG lazer kök kanalında 100 mj, 20 pps ve 15 saniyeden daha düşük güç ayarlarında uygulandığında kök yüzeyinde oluşan ısı 10°C'yi geçmemektedir. Lazer uygulama süresini düşürmek, ısı oluşumunu azaltmak için bir diğer yöntem olarak ileri sürülmüştür.

Eriksson ve Albertsson¹⁰², kemik hasarı için kritik ısı derecesinin 47°C yani normal vücut ısısından yalnızca 10°C fazla olduğunu bildirmişlerdir.

Bizim çalışmamızın sonuçlarına göre en yüksek MTT, ALP ve osteokalsin seviyeleri HeNe lazer uygulamasıyla elde edilmiştir. Bunun yanında 20mj, 10 pps, 10

saniye lazer uygulamasının (Grup1) MTT, ALP ve osteokalsin seviyeleri HeNe lazerden daha az ancak kontrol grubundan daha yüksektir. Bu düşük güçlerde lazer uygulamasının hücresel proliferasyonu ve hücre içi aktiviteleri arttırdığı yönündeki bulgularla uyumludur. Bu güç seviyeleri dışındaki ayarlar hücresel canlılık ve aktivitede bir azalma meydana getirmektedir.

7. günde yapılan MTT değerlendirmelerinin sonuçlarına göre hücre sayısı ve canlılığı artmış olmasına karşın ALP boyama yoğunluklarının 7. günde az olması ve daha sonra 14. günde artması ALP aktivitesi sonuçlarıyla uyumludur ve hücrenin proliferasyonunu takip edecek şekilde diferansiyasyonun 14. gün civarında meydana geldiğini göstermektedir. Gruplar arasında bir karşılaştırma yapıldığıdaysa HeNe lazer uygulanan Grup 14'teki, en düşük lazer güç seviyeleri olan 20 mJ, 10 pps ve 10 saniye uygulanan Grup1, ve kontrol gözlerinde yoğunlukların daha fazla olduğunu gözlemledik. Daha yüksek güç seviyelerinde ise ALP boyamalarının yoğunluğu azalmaktadır. Bu bulgular lazer uygulamalarının belli güç seviyelerini aştığında hücrenin proliferasyonunda yada canlılığında bir düşüşle birlikte karakterizasyonunda da değişiklikler meydana geldiğini göstermektedir.

Kalsiyum depolarının gözlemlenmeleri de gözlem periodunun ikinci evresi olan 14. günde yoğunluk göstermektedir. Bu bize ALP aktivitesinin artışının hücre içi mineralizasyonu başlattığını göstermektedir. Mineralizasyon ALP aktivitesinin artışıyla başlamakta ve giderek artmaktadır.

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 MTT abzorban ortalamaları ve ALP ortalamaları her üç gözlem periodu için karşılaştırıldığında en yüksek MTT abzorban ortalamaları ve ALP aktivitesi Grup 8'de yani 60 mJ, 20 pps lazer uygulandığında ortaya çıkmaktadır. Bu bulgu, lazerin atım enerjisinin artırılmasının aynı

enerji çıkışlarında atım oranının artırılmasına göre hücrelere negatif etkisinin daha fazla olduğunu göstermektedir.

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

Aynı şekilde ortalamalara göre bir değerlendirme yapıldığında cihazın çıkış gücü arttırıldıkça MTT abzorban ortalamaları ve ALP seviyeleri düşmektedir. Bu her üç gözlem perodu 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 uyguladık. Dik olarak uygulamamızın nedeni bütün gözlemlere lazer ışınının aynı şekilde ve eşit uygulanmasını sağlamaktır. Daha önce yaptığımız ön çalışmalarda fiber optik kablo temasta ya da 2mm'den daha az mesafede uygulandığında kültür plaklarında çok fazla ısınma, karbonizasyon ve erimeler meydana geldi. Bunun sebebi hücre kültür plaklarının polisterenden imal edilmiş olmasıdır. Bunun yanında Nd:YAG lazer endodontik amaçlarla kök kanalı içerisine uygulandığında kullanılma şekli, fiber optik kablonun 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, MTT abzorban, 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 karşılaştırılamamasına 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 görülebilecek cevapların daha düşük olacağıdır. Lazer uygulamasının hücresel 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.

SONUÇLAR:

Çalışmamızın bulgularına göre Nd:YAG lazerin ve Nd:YAG lazerin rehber ışını olarak kullanılan He-Ne lazerin insan osteoblast benzeri hücre kültürlerine uygulanması sonucunda;

- He-Ne lazer uygulaması ve 20 mj, 10 Hz, 10 saniye Nd:YAG lazer uygulaması, kontrol grubuna göre, insan osteoblast benzeri hücre kültürlerinde hücresel artış ve canlılığı aktive etmektedir.
- He-Ne lazer uygulaması ve 20 mj, 10Hz, 10 saniye Nd:YAG lazer uygulaması, kontrol grubuna göre insan osteoblast benzeri hücre kültürlerinde ALP ve osteokalsin sentezlerini arttırmaktadır.
- Nd:YAG lazerin 20 mj, 10 Hz ayarlarından daha yüksek ayarlarda kullanılması kontrol grubuna göre insan osteoblast benzeri hücre kültürlerinde hücresel artış ve canlılık ve aktiviteleri üzerinde olumsuz etki oluşturmaktadır.
- Nd:YAG lazerin atım enerjisinin artırılması atım oranının artırılmasına göre osteoblast benzeri hücreler üzerinde daha fazla olumsuz etkiye neden olmaktadır.
- Cihazın çıkış gücü artırıldıkça hücresel artış ve canlılık ve hücresel 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.

Nd:YAG lazer uygulamalarının hücresel düzeyde meydana getirdiği bu bulgular diş hekiminin periapikal bölgedeki osteoblast hücrelerinde meydana gelebilecek etkileri anlaması yönünden faydalıdır. Unutulmaması gereken nokta in vivo olarak

görülebilecek cevapların, in vitro olarak elde edilen bu bulgulardan daha düşük olacağıdır. İn vivo şartlarda oluşabilecek gerçek değişikliklerin incelenmesi için hayvan çalışmaları ve klinik deneyler yapılması gerekmektedir.



ÖZET

Lazerler cerrahi, periodontoloji, ortodonti, endodonti ve konservatif tedavi gibi dişhekimliğinin pek çok dalında yaklaşık 30 yıldır kullanılmaktadır. Nd:YAG lazerler ince fiber optik iletim sistemleriyle kök kanal tedavilerinde konvansiyonel tedavi yöntemlerine ek olarak, kök kanal sterilizasyonu, debrislerin uzaklaştırılması ve smear tabakanın eliminasyonu gibi işlemler için tercih edilmektedir.

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.

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 artış ve canlılık MTT metoduyla, hücresel aktivite ise ALP ve osteokalsin ölçümleriyle değerlendirildi. Ayrıca hücresel mineralizasyonu değerlendirmek için ALP ve kalsiyum boyamaları yapıldı.

Çalışmanın bulgularına göre MTT abzorbans ortalamaları karşılaştırıldığında yalnız 20 mJ, 10 Hz, 10 saniye (Grup 1) ve He-Ne lazer (Grup 14) uygulanan gruplar ile kontrol grubu (Grup 15) arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$). Diğer gruplar arasındaki fark anlamlı bulundu ($p<0.05$).

ALP aktiviteleri karşılaştırıldığında ise 20 mJ, 10 Hz, 10 saniye (Grup 1) ve kontrol grubu (Grup 15) arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$). Diğer gruplar arasındaki fark anlamlı bulundu ($p<0.05$).

MTT abzorbars ortalamları ve ALP ve osteokalsin ortalama değerlerine göre bir değerlendirme yapıldığında lazerin atım enerjisi ve enerji çıkışının arttırılmasının osteoblast hücre kültürleri üzerinde negatif bir etki oluşturduğu görüldü.

Sonuç olarak; eğer atım enerji miktarı ve enerji çıkışı amaçlanan tedavi için yeterliyse en düşük ayarları seçmek doğru yöntem olacaktır.



SUMMARY

Dental lasers had been used in dentistry in a wide range of application including surgery, periodontology, endodontics, operative dentistry and orthodontics for more than 30 years. Their fiber optic delivery system of 320 μm made Nd:YAG lasers preferable at root canal sterilization, removing of debris and elimination of Smear layer in addition to other conventional endodontic uses.

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.

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, cell viability and proliferation was evaluated with MTT method and cellular activity was assessed with ALP and osteocalcin measurements. Cellular mineralisation evaluated with ALP and calcium stainings.

The results of this study showed that, when the average MTT values were compared, there was no statistically difference between 20mj, 10 Hz, 10 seconds (Group 1), He-Ne (Group 14) and control group (Group 15) ($p>0.05$). The differences between all other groups were significant ($p<0.05$).

When ALP activities were compared, there was no statistically difference between 20mj, 10 Hz, 10 seconds (Group 1) and control group (Group 15). The difference between all other groups were also significant ($p<0.05$).

When average MTT absorbance values, ALP and osteocalcin activities were compared, increase in the pulse energy and power output had a negative effect on human osteoblast like cell cultures.

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.



KAYNAKLAR :

1. AYDIN, M.: Endodontik immünoloji. Endodonti. ALAÇAM T. Bölüm 14, Sayfa 385-429, Barış Yayınları, Ankara(2000)
2. SEPİCİ, V. : Kemik remodelingi. Aktüel Tıp Dergisi, 5: 312-316 (1996)
3. CALVO, M.S., EYRE, D.R., GUNDBERG, C.M.: Molecular basis and clinical application of biological markers of bone turnover. Endocr. Rev., 17: 333-368 (1996)
4. BRONNER, F.: Calcium and osteoporosis. Am. J. Clin. Nutr., 60: 831-836 (1994)
5. AKAY, M.T.: Genel Histoloji. Palme Yayıncılık, Ankara (2001)
6. ERKOÇAK, A.: Genel Histoloji. Bölüm 5: Bağ ve Destek Dokuları. Okan Yayıncılık Ltd. Şti., İstanbul (1983)
7. CURRIE, A. W.: Basic histology and Cytology. Longman Group UK Limited, Singapore (1988)
8. FAWCETT, D.W.: A Textbook of Histology. Chapter 8: Bone, Page: 199-238. WB Saunders Company, Canada (1986)
9. ITANI, O., TSANG, R.G.: Chapter 28: Bone Disease in "Clinical Chemistry: Theory, Analysis, Correlation" (KAPLAN, A.L., PESCE, A. J. Ed.) Mosby-Year Book Inc., St. Louis (1996)
10. ALAÇAM, T.: Endodonti. Bölüm 3: Pulpa ve periapikal dokuların biyolojisi Say: 17-44, Barış Yayınları, Ankara (2000)

11. BETTICA, P., MORO, L., ROBINS, S.P., TAYLOR, A.K., TALBOT, J., SINGER, F.R., BAYLINK, D.J.: Bone-resorption markers galactosyl hydroxylysine, pyridinium crosslinks and hydroxyproline compared. Clin. Chem. 38: 2313-2318 (1992)
12. DELMAS, P.D., GARNERO, P.: Utility of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis. Osteoporosis 55: 1075- 1088 (1996)
13. DELMAS, P.D.: Biochemical markers of bone turnover I: Theoretical considerations and clinical use in osteoporosis. Am. J. Med. 95: 11 - 16 (1993)
14. DELMAS, P.D.: Biochemical markers of bone turnover. Acta. Orthop. Scand. 66: 176-182 (1995)
15. ROBEY, P.G., BOSKEY, A.L.: The biochemistry of bone, Osteoporosis. Chapter 4, Page: 95- 183 Acad Press Inc. (1996)
16. McKAY, G.C., MACNAIR, R., MACDONALD, C., GRANT, M.H.: Interactions of orthopaedic metals with an immortalized rat osteoblast cell line. Biomaterials 17: 1339-1344 (1996)
17. FARLEY, J.R., WERGEDAL, J.E., HALL, S.E., HERRING, S., TARBAUX, N.M.: 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)
18. ROBEY, P.G.: Biochemistry of bone, Osteoporosis : Etiology, diagnosis, and management . Page:41-66 (RIGGS, L., MELTON, L. J. Eds.) Mayo Foundation, Lippincott-Raven Publ., Philadelphia (1995).

19. DOULL, I., FREEZER, N., HOLGATE, S.: Osteocalcin, growth and inhaled corticosteroids: a prospective study. Arch. Disease in Childhood 74: 497-501 (1996)
20. COLUZZI, D.J.: An overview of laser wavelengths used in dentistry. Dent. Clin. of North Am. 44(4): 753-765 (2000)
21. MISSERENDINO, L.J.: The History and Development of Laser Dentistry in "Lasers in Dentistry" (MISSERENDINO LJ, PICK RM ed.) Page 17-25 Quintessence Publishing Co, Inc., Chicago (1995)
22. HARRIS, D.M., PICK, R.M.: Laser Physics in "Lasers in Dentistry" (MISSERENDINO, L.J., PICK, R.M. ed.) Page: 27-38 Quintessence Publishing Co. Inc., Chicago (1995)
23. BAXTER, G.D., DIAMANTOPOULOS, C.: Therapeutic Lasers: Theory and Practice Chapter2:Laser Physics Page: 23-47 Churchill Livingstone Inc. (1994)
24. MIDDA, M., RENTON-HARPER, P.: Lasers in Dentistry. Br. Dent. J .11:343-346 (1991)
25. CERNAVIN, I., PUGATCHEW, A., BOER, N., TYAS, M.J.: Laser application in dentistry: A review of the literature. Aust. Dent. J. 39: 28-32 (1994)
26. YÜCEL, E., DELİLBAŞI, E., GÜNHAN, Ö.: Soft lazerlerin yara iyileşmesi üzerine etkisinin histopatolojik olarak incelenmesi. H.Ü. Dişhek. Fak. Derg. 12: 24-29 (1988)
27. MYERS, M.L.: The effect of laser irradiation on oral tissues. J. Prosthet. Dent. 66: 395-397 (1991)

28. PICK, R.M.: Using lasers in clinical dental practice. JADA 124: 37-47 (1993)
29. NEIBURGER, E.J., MISERENDINO, L.: Laser reflectance : Hazard in dental operatory. Oral. Surg. 66: 659-661 (1988)
30. DEDERICH, D.N.: Laser/Tissue interaction: What happens to laser light when it strikes tissue? JADA 124: 58-61 (1993)
31. KUTSCH, V.K.: Lasers in dentistry: Comparing wavelengths. JADA 124: 49-54 (1993)
32. MISERENDINO, L.J., LEVY, G., MISERENDINO, C.A.: Laser Interaction with biologic tissues in "Lasers in Dentistry". (MISERENDINO, L.J., PICK R.M. ed.) Chapter 3:Page: 39-55. Quintessence Publishing Co. Inc., Chicago (1995)
33. MELCER, J., CHAUMETTE, F., MELCER, F., DEJARDIN, J.: Treatment of dental decay by CO₂ laser beam: preliminary results. Laser Surg. Med. 4:311-321 (1984)
34. MELCER, J., CHAUMETTE, F., MELCER, F.: Dental pulp exposed to the laser beam. Laser Surg. Med. 7:347-352 (1987)
35. YAMAMOTO, H., Ooya, K.: Potential of yttrium aluminium garnet laser on caries prevention. J. Oral Pathol. 3:7-15 (1974)
36. YAMAMOTO, H., Ooya, K., MATSUDA, K., OKABE, H.: YAG laser effects for acid resistance on tooth enamel (abstract 7). J. Dent. Res. 53:1093 (1974)
37. YAMAMOTO, H., SATO, K.: Prevention of dental caries by acousto-optically Q-switched Nd:YAG laser irradiation. J. Dent. Res. 59:137. (1980)

38. GOLDSTEIN, A., WHITE, J.M., PICK, R.M.: Clinical Applications of the Nd:YAG Laser in "Lasers in Dentistry". (MISSENERENDINO, L.J., PICK R.M. ed.) Chapter 14: Page: 199-216. Quintessence Publishing Co. Inc., Chicago (1995)
39. MIDDIA, M., RENTON-HARPER, P.: Lasers in dentistry. Br. Dent. J. 168: 343-346(1991)
40. PICK, R.M.: Using lasers in clinical dental practice. JADA 124: 37-47 (1993)
41. WIGDOR, H., ABT, E., ASHRAFI, S., WALSH, J.T.: The effect of lasers on dental hard tissues. JADA 124: 65-70 (1993)
42. WIGDOR, H.A., WALSH, J.T., FEATHERSTONE, J.D.B., VISURI, S.R., FRIED, D., WALDVOGEL, J.L.: Lasers in dentistry. Laser Surg. and Med. 16: 103-133 (1995)
43. OLGART, L., GAZELIUS, B., LINDH-STROMBERG, U.: Laser Doppler Flowmetry in assessing vitality in luxated permanent teeth. Int. End. J. 21: 300-306 (1988)
44. WILDER-SMITH, P.: A new method for the non-invasive measurement of pulpal blood flow. Int. End. J. 21: 307-312 (1988)
45. WATSON, A.D.M., PITT FORD, T.R, MCDONALD F.: Blood flow changes in the dental pulp during limited exercise measured by laser Doppler flowmetry. Int. End. J. 25: 82-87 (1992)
46. VONGSAVAN, N., MATTHEWS, B.: Experiments in pigs on the sources of laser Doppler blood-flow signals recorded from teeth. Arch. Oral Biol. 41: 97-103 (1996)

47. HARTMANN, A., AZERAD, J., BOUCHER, Y.: Environmental effects on laser Doppler pulpal blood flow measurements in man. *Arch. Oral Biol.* 41: 333-339 (1996)
48. ODOR, T.M., PITT FORD, T.R., MCDONALD, F.: Effect of wavelength and bandwidth on the clinical reliability of laser Doppler recordings. *Endod. Dent. Traumatol.* 12: 9-15 (1996)
49. KIMURA, Y., WILDER-SMITH, P., MATSUMOTO, K.: Lasers in Endodontics: a review. *Int. End. J.* 33: 173-188 (2000)
50. RENTON-HARPER, P., MIDDA, M.: Nd:YAG laser treatment of dentinal hypersensitivity. *Br. Dent. J.* 172: 13-16 (1992)
51. ROCHKIND, S., NISSAN, M., BARR-NEA, L., RAZON, N., SHWARTZ, M., BARTAL, A.: Response of peripheral nerve to He-Ne laser: experimental studies. *Laser Surg. Med.* 7: 441-443 (1987)
52. MEZAWA, S., IWATA, K., NAITO, K., KAMOGAWA, H.: The possible analgesic effect of soft-laser irradiation on heat nociceptors in the cat tongue. *Arch. Oral Biol.* 33: 693-694(1988)
53. WHITTERS, C.J., HALL, A., CREANOR, S.L.: A clinical study of pulsed Nd:YAG laser induced pulpal analgesia. *J. Dent.* 23: 145-150 (1995)
54. BONIN, P., BOIVIN, R., POULARD, J.: Dentinal permeability of the dog canine after exposure of a cervical cavity to the beam of a CO₂ laser. *J. Endodon.* 17:116-118 (1991)
55. FAYAD, M.I., CARTER, J.M., LIEBOW, C.: Transient effects of low-energy CO₂ laser irradiation on dentinal impedance: implications for treatment of hypersensitive teeth. *J. Endodon.* 22: 526-531 (1996)

56. LIU, H-C., LIN, C-P., LAN, W-H.: Sealing depth of Nd:YAG laser on human dentinal tubules. J. Endodon. 23:691-693 (1997)
57. WHITE, J., GOODIS, H., KUDLER, J.: Laser threshold in pulp exposure: a rat animal model. Proceedings of the International Society for Optical Engineering 2394: 160-169 (1995)
58. MELCER, J., CHAUMETTE, M.T., MELCER, F.: Preliminary report on the effect of the CO₂ laser beam on the dental pulp of the Macaca Mulatta primate and the beagle dog. J. Endodon. 11: 1-5 (1985)
59. MATSUMOTO, K.: Lasers in Endodontics. Dental Clinics of North America 44: 889-906 (2000)
60. MELCER, J., CHAUMETTE, M.T., MELCER, F.: Dental pulp exposed to the CO₂ laser beam. Laser Surg. Med. 7: 347-352 (1987)
61. MORITZ, A., SCHOOP, U., GOHARKHAY, K., SPERR, W.: The CO₂ laser as an aid in direct pulp capping. J. Endodon. 24: 248-251 (1998)
62. SHOJI, S., NAKAMURA, M., HORIUCHI, H.: Histopathological changes in dental pulps irradiated by CO₂ laser : a preliminary report on laser pulpotomy. J. Endodon. 11: 379-384 (1985)
63. JUKIC, S., ANIC, I., KOBA, K., NAJZAR-FLEGER, D., MATSUMOTO, K.: The effects of pulpotomy using CO₂ and Nd:YAG lasers on dental pulp tissue. Int. End. J. 30: 175-180 (1997)
64. WILDER-SMITH, P., PEAVY, G.M., NIELSEN, D., ARRASTIA-JITOSHO, A.M.: CO₂ laser treatment of pulpal exposures in dogs. Laser. Surg. Med. 21: 432-437 (1997)

65. DANG, J., WILDER-SMITH, P., PEAVY, G.M.: Clinical preconditions and treatment modality: effects on pulp surgery outcome. *Laser Surg. Med.* 22: 25-29 (1998)
66. FOGEL, H.M., PASHLEY, D.H.: Dentin permeability: effects of endodontic procedure on root slabs. *J. Endodon.* 16: 442-445 (1990)
67. ANIC, I., TACHIBANA, H., MATSUMOTO, K., QI, P.: Permeability, morphologic and temperature changes of canal dentine walls induced by Nd:YAG, CO₂ and argon lasers. *Int. End. J.* 29:13-22 (1996)
68. KHAN, M.A., KHAN, M.F.R., KHAN, M.W., WAKABAYASHI, H., MATSUMOTO, K.: Effect of laser treatment on the root canal of human teeth. *Endod. Dent. Traumatol.* 13: 139-145 (1997)
69. ÖNAL, B., ERTL, T., SIEBERT, G., MULLER, G.: Preliminary report on the application of pulsed CO₂ laser radiation on root canals with AgCl fibers: a scanning and transmission electron microscopic study. *J. Endodon.* 19: 272-276 (1993)
70. DEDERICH, D.N., ZAKARIASEN, K.L., TULIP, J.: Scanning electron microscopic analysis of canal wall dentin following neodymium-yttrium-aluminum-garnet laser irradiation. *J. Endodon.* 10:428-431 (1984)
71. LEVY, G.: Cleaning and shaping the root canal with a Nd:YAG laser beam: a comparative study. *J. Endodon.* 18:123-127 (1992)
72. MISERENDINO, L.J., LEVY, G.C., RIZOIU, I.M.: Effects of Nd:YAG laser on the permeability of root canal wall dentin. *J. Endodon.* 21: 83-87 (1995)

73. SAUNDERS, W.P., WHITTERS, C.J., STRANG, R., MOSELEY, H., PAYNE, A.P., MCGADEY, J.: The effect of an Nd:YAG pulsed laser on the cleaning of the root canal and the formation of a fused apical plug. *Int. End. J.* 28: 213-220 (1995)
74. Koba, K., Kimura, Y., MATSUMOTO, K., TAKEUCHI, T., IKARUGI, T., SHIMIZU, T.: A histopathological study of the morphological changes at the apical seat and in the periarical region after irradiation with a pulsed Nd:YAG laser. *Int. End. J.* 31: 415-420 (1998)
75. Koba, K., Kimura, Y., MATSUMOTO, K., TAKEUCHI, T., IKARUGI, T., SHIMIZU, T.: A histopathological study of the effects of pulsed Nd:YAG laser irradiation on infected root canals in dogs. *J. Endodon.* 25:151-154 (1999)
76. ZHANG, C., MATSUMOTO, K., KIMURA, Y., HARASHIMA, T., ZHOU, H.: Effects of pulsed Nd:YAG laser irradiation on root canal wall dentin with different laser initiators. *J. Endodon.* 24:352-355 (1998)
77. MOSHONOV, J., SION, A., KASIRER, J., ROTSTEIN, I., STABHOLZ, A.: Efficacy of argon laser irradiation in removing intracanal debris. *Oral Surg., Oral Med., Oral Pathol.* 79: 221-225 (1995)
78. TAKEDA, F.H., HARASHIMA, T., KIMURA, Y., MATSUMOTO, K.: Efficacy of Er:YAG laser irradiation in removing debris and smear layer on root canal walls. *J. Endodon.* 24: 548-551 (1998)
79. TAKEDA, F.H., HARASHIMA, T., KIMURA, Y., MATSOMOTO, K.: A comparative study of the removal of smear layer by three endodontic irrigants and two types of laser. *Int. End. J.* 32: 32-39 (1999)

80. TEWFIK, H.M., PASHLEY, D.H., HORNER, J.A., SHARAWY, M.M.:
Structural and functional changes in root dentin following exposure to
KTP/532 laser. *J. Endodon.* 19: 492-497 (1993)

81. MACHIDA, T., WILDER-SMITH, P., ARRASTIA, A.M., LIAW, L-H.L., BERNIS,
M.W.: Root canal preperation using the second harmonic KTP:YAG laser: a
thermographic and scanning electron microscopic study. *J. Endodon.* 21:88-
91 (1995)

82. ARRASTIA-JITOSHO, A.M.A., LIAW, L-H.L., LEE, W., WILDER-SMITH, P.:
Effects of a 532 nm Q-switched nanosecond pulsed laser on dentin. *J.*
Endodon. 24: 427-431 (1998)

83. STABHOLZ, A., NEEV, J., LIAW, L-H.L., STABHOLZ, A., K.HAYAT, A.,
TORABINEJAD, M.: Sealing of human dentinal tubules by XeCL 308-nm
excimer laser. *J. Endodon.* 19: 267-271 (1993)

84. STABHOLZ, A., ROTSTEIN, I., NEEV, J., MOSHONOV, J., STABHOLZ, A.:
Efficacy of XeCl 308-nm excimer laser in reducing dye penetration through
coronal dentinal tubules. *J. Endodon.* 21: 266-268 (1995)

85. STABHOLZ, A., NEEV, J., LIAW, L-H.L., STABHOLZ, A., KHAYAT, A.,
TORABINEJAD, M.: Effect of ArF-193 nm excimer laser on human dentinaql
tubules. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 75: 90-94 (1993)

86. ARIMA, M., MATSUMOTO, K.: Effects of ArF: eximer laser irradiation on
human enamel and dentin. *Laser Surg. Med.* 13: 97-105 (1993)

87. WILDER-SMITH, P., LIN, S., NGUYEN, A.: Morphological effects of ArF
excimer laser irradiation on enamel and dentin. *Laser Surg. and Med.* 20:
142-148 (1997)

88. STEVENS, B.H., TROWBIDGE, H.O., HARRISON, G., SILVERTON, S.F.:
Dentin ablation by Ho:YAG laser: correlation of energy versus volume using
stereophotogrammetry. J. Endodon. 20: 246-249 (1994)
89. BLUM, J-Y., ABADIE, M.J.M.: An evaluation of the bactericidal effect of the
Nd:YAP laser. J. Endodon. 23:583-585 (1997)
90. ROONEY, J., MIDDA, M., LEEMING, J.: A laboratory investigation of the
bactericidal effect of Nd:YAG laser. Br. Dent.I J. 176: 61-64 (1994)
91. FEGAN, S.E., STEIMAN, H.R.: Comparative evaluation of the antibacterial
effects of intracanal Nd:YAG laser irradiation: an in vitro study. J. Endodon.
21: 415-417 (1995)
92. RAMSKOLD, L.O., FONG, C.D., STROMBERG, T.: Thermal effects and
antibacterial properties of energy levels required to sterilize stained root
canals with an Nd:YAG laser. J. Endodon. 23:96-100 (1997)
93. STABHOLZ, A., KETTERING, J., NEEV, J., TORABINEJAD, M.: Effects of
the XeCl excimer laser on Streptococcus Mutans. J. Endodon. 19: 232-235
(1993)
94. MORITZ, A., GUTKNECHT, N., GOHARKHAY, K., SCHOOP, U.,
WERNISCH, J., SPERR, W.: In vitro irradiation of infected root canals with a
diode laser: results of microbiologic infrared spectrometric and stain
penetration examinations. Quintessence Int. 28:205-209 (1997)
95. HARDEE, M.W., MISERENDINO, L.J., KOS, W., WALIA, H.: Evaluation of
the antibacterial effects of intracanal Nd:YAG laser irradiation. J. Endodon.
20: 377-380 (1994)

96. MCKINLEY, I.B., LUDLOW, M.O.: Hazards of laser smoke during endodontic therapy. *J. Endodon.* 20: 558-559 (1994)
97. POTTS, T.V., PETROU, A.: Laser photopolymerisation of dental materials with potential endodontic applications. *J. Endodon.* 16: 265-268 (1990)
98. POTTS, T.V., PETROU, A.: Argon laser initiated resin photopolymerisation for the filling of root canals in human teeth. *Laser Surg. Med.* 11: 257-262 (1991)
99. ANIC, I., MATSUMOTO, K.: Comparison of the sealing ability of laser-softened, laterally condensed and low-temperature thermoplasticised gutta-percha. *J. Endodon.* 21: 464-9 (1995)
100. ANIC, I., MATSUMOTO, K.: Dentinal heat transmission induced by a laser softened gutta-percha obturation technique. *J. Endodon.* 21: 470-474 (1995)
101. ANIC, I., SHIRASUKA, T., MATSUMOTO, K.: Scanning electron microscopic evaluation of two compaction techniques using a composite resin as a root canal filling material. *J. Endodon.* 21: 594-598 (1995)
102. ERICKSSON, A.R., ALBREKTSSON, T.: Temperature threshold levels for heat induced bone tissue injury: a vital microscopic study in the rabbit. *J. Prosthet. Dent.* 50: 101-107 (1983)
103. BAHCALL, J., HOWARD, P., MISERENDINO, L., WALIA, H.: Preliminary investigation of the histological effects of laser endodontic treatment on the periradicular tissues in dogs. *J. Endodon.* 18:47-51 (1992)

104. KIMURA, Y., WILDER-SMITH, P., ARRASTIA-JITOSHO, A.M.A., LIAW, L.-H.L., MATSUMOTO, K., BERNS, M.W.: Effects of nanosecond pulsed Nd:YAG laser irradiation on dentin resistance to artificial caries-like lesions. *Laser Surg. Med.* 20: 15-21 (1997)
105. COHEN, B.I., DEUTSCH, A.S., MUSIKANT, B.L.: Effect of power settings on temperature change at the root surface when using a holmium YAG laser in enlarging the root canal. *J. Endodon.* 22: 596-599 (1996)
106. KOBAYASHI, K., KIMURA, Y., MATSUMOTO, K.: Post operative symptoms and healing after endodontic treatment of infected teeth using pulsed Nd:YAG laser. *Endod. Dent. Traumatol.* 15: 68-72 (1999)
107. MISERENDINO, L.J.: The laser apicoectomy: endodontic application of the CO₂ laser for periapical surgery. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 66: 615-619 (1988)
108. READ, R.P., BAUMGARTNER, J.C., CLARK, S.M.: Effects of a carbon dioxide laser on human root dentin. *J. Endodon.* 21: 4-8 (1995)
109. FRIEDMAN, S., ROTSTEIN, I., KOLEN, L., TROPE, M.: Dye leakage in retrofilled dog teeth and its correlation with radiographic healing. *J. Endodon.* 17: 392-395 (1991)
110. FRIEDMAN, S., ROTSTEIN, I., BAB, I.: Tissue response following CO₂ laser application in apical surgery: light microscopic assessment in dogs. *Laser Surg. Med.* 12: 104-111 (1992)

111. STABHOLZ, A., KHAYAT, A., WEEKS, D.A., NEEV, J., TORABINEJAD, M.: Scanning electron microscopic study of the apical dentin surfaces lased with Nd:YAG laser following apicoectomy and retrofill. *Int. End. J.* 25: 288-291 (1992)
112. STABHOLZ, A., KHAYAT, A., RAVANSHAD, S.H., MCCARTY, D.W., NEEV, J., TORABINEJAD, M.: Effects of Nd:YAG laser on apical seal of teeth after apicoectomy and retrofill. *J. Endod.* 18: 371-375 (1992)
113. WONG, W.S., ROSENBERG, P.A., BOYLAN, R.J., SCHULMAN, A.: A comparison of the apical seals achieved using retrograde amalgam fillings and the Nd:YAG laser. *J. Endodon.* 20: 595-597 (1994)
114. MAILLET, W.A., TORNECK, C.D., FRIEDMAN, S.: Connective tissue responses to root surfaces resected with Nd:YAG laser or burs. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 82: 681-690 (1996)
115. PAGHEDIWALA, A.F.: Root resection of endodontically treated teeth by erbium:YAG laser radiation. *J. Endodon.* 18:257-262 (1993)
116. KOMORI, T., YOKOYAMA, K., TAKATO, T., MATSUMOTO, K.: Clinical application of the erbium:YAG laser for apicoectomy. *J. Endodon.* 23:748-750 (1997)
117. ROCCA, J.P., JASMIN, J.R., DUPREZ, J.P.: Removal of calcified attached denticle with a pulsed dye laser. A case report. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 77: 281-284 (1994)
118. ARAKAWA, S., COBB, C.M., RAPLEY, J.W., KILLOY, W.J., SPENCER, P.: Treatment of root fracture by CO₂ and Nd:YAG lasers. *J. Endodon.* 22: 662-667 (1996)

119. ADRIAN, J.C., GROSS, A.: A new method of sterilization: the carbon dioxide laser. J. Oral Pathol. 8: 60-61 (1979)
120. HOOKS, T.W., ADRIAN, J.C., GROSS, A., BERNIER, W.E.: Use of the carbon dioxide laser in sterilization of endodontic reamers. Oral Surg. 49: 263-265 (1980)
121. ABT, E.: Biostimulation and Photodynamic Theory in "Lasers in Dentistry" (MISSERENDINO, L.J., PICK, R.M. ed.) Chapter 17: Page: 247-257. Quintessence publishing Co. Inc., Chicago (1995)
122. WIGDOR, H., MISSERENDINO, L.J.: Regulations, standards, and Education for Lasers in Dentistry in "Lasers in Dentistry" (MISSERENDINO, L.J., PICK, R.M. ed.) Chapter 7: Page: 103-111. Quintessence publishing Co. Inc., Chicago (1995)
123. MISSERENDINO, L.J., PICK, R.M., BLANKENAU R.J.: Laser Safety in Dental Practice in "Lasers in Dentistry" (MISSERENDINO, L.J., PICK, R.M. ed.) Chapter 6: Page: 85-101. Quintessence publishing Co. Inc., Chicago (1995)
124. MORGAN, S.J., DARLING, D.C.: Animal Cell Culture. BIOS scientific Publishers Limited, Oxford (1993)
125. FRESHNEY, R.I.: Animal Cell Culture: a practical approach. IRL Press Limited, Oxford (1986)
126. SHARP, J.A.: An Introduction to Animal Tissue Culture. The Camelot Press Ltd., Southampton (1977)
127. DAVIS, J.M.: Basic Cell Culture. A Practical Approach. Oxford University Press, New York (1996)

128. ÜNSAL A.: Varyans Analizi (Tek Faktör- İki Faktör). Doçentlik Tezi. Gazi Üniversitesi, İktisadi İdari Bilimler Fakültesi, Ekonometri Bölümü, Ankara (1993)
129. TYAS, M.J., BROWNE, R.M.: Biological testing of dental restorative materials. J Oral Rehabil 4: 275 (1977)
130. BROWNE, M., TYAS, M.J.: Biological testing of dental restorative materials in vitro-a review. J. Oral Rehabil. 6:365 (1979)
131. MERYON, S.D., BROWNE, R.M.: Evaluation of cytotoxicity of four dental materials in vitro assessed by cell viability and enzyme cytochemistry. J. Oral Rehabil. 10: 363-372 (1983)
132. TOMAS, H., CARVALHO, G.S., FERNANDES, M.H., FREIRE, A.P., ABRANTES, L.M.: The use of rat, rabbit or human bone marrow derived cells for cytocompatibility evaluation of metallic elements. J. Mater. Sci. Mater. Med. 8: 233-238 (1997)
133. SPANGBERG, L.S.W.: The study of biological properties of endodontic biomaterials in Experimental Endodontics. (SPANGBERG, L.S.W., ed.) Page: 173-210 CRC Press, Boca Raton, Florida.(1990)
134. OLIVA, A., DELLA RAGIONE, F., SALERNO, A., RICCIO, V., TARTORO, G., COZZOLINO, A., D'AMATO, S., PONTINI, G., ZAPPÀ, V.: Biocompatibility studies on glass ionomer cements by primary cultures of human osteoblasts. Biomaterials. 17: 1351-1356 (1996)

135. CARVALHO, R.S., SCOTT J.E., YEN, E.H.: The effect of mechanical stimulation on the distribution of $\beta 1$ integrin and expression of $\beta 1$ integrin mRNA in TE-85 human osteosarcoma cells. Arch. Oral Biol. 40: 257-264 (1995)
136. 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)
137. ZHANG, H., AHMAD, M., GRONOWICZ, G.: Effects of transforming growth-factor-beta 1 (TGF- $\beta 1$) on in vitro mineralization of human osteoblasts on implant materials. Biomaterials 24: 2013-2020 (2003)
138. ABDULLAH, D., PITT FORD, T.R., PAPPAIOANNOU, S., NICHOLSON, J., MCDONALD, F.: An evaluation of accelerated Portland Cement as a restorative material. Biomaterials 23: 4001-4010 (2002)
139. AHMAD, M., MCCARTHY, M.B., GRONOWICZ, G.: An in vitro model for mineralization of human osteoblast-like cells on implant materials. Biomaterials 20: 211-220 (1999)
140. MOSSMAN, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immun. Meth. 65:55-63 (1983)
141. LI, J.K., CHANG, W.H., LIN C.H., RUAAN, R.C., LIU, H.C., SUN, J.S.: Cytokine release from osteoblasts in response to ultrasound stimulation. Biomaterials 24: 2379-85 (2003)

142. HUANG, F.M., TAI, K.W., CHOU, M.Y., CHANG, Y.C.: Cytotoxicity of resin-, zinc oxide-eugenol-, and calcium hydroxide-based root canal sealers on human periodontal ligament cells and permanent V79 cells. *Int. End. J.* 35: 153-158 (2002)
143. LEWIS, C.W., SMITH, J.E., ANDERSON, J.G., FRESHNEY, R.I.: Increased cytotoxicity of food-borne mycotoxins toward human cell lines in vitro via enhanced cytochrome p450 expression using the MTT bioassay. *Mycopathologica* 148; 97-102 (1999)
144. MORAIS, S., SOUSA, J.P., FERNANDES, M.H., CARVALHO, G.S. In vitro biomineralization by osteoblast-like cells I. Retardation of tissue mineralization by metal salts. *Biomaterials* 19: 13-21 (1998)
145. ZHU, Q., HAGLUND, R., SAFAVI, K.E., SPANGBERG, L.S.W.: Adhesion of human osteoblasts on root end filling materials. *J. Endodon.* 26:404-406 (2000)
146. OWEN, T.A., ARANOW, M., SHALHOUB, V., BARONE, L.M., WILMING, L., TASSINARI, M.S.: Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated the bone extracellular matrix. *J. Cell. Physiol.* 143; 420-430 (1990)
147. KOLANCI, 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)

148. SCHWARTZ, Z., LOHMANN, C.H., OEFINGER, J., BONEWALD, L.F., DEAN, D.D., BOYAN, B.D.: Implant surface characteristics modulate differentiation behavior of cells in osteoblastic lineage. *Adv. Dent. Res.* 13: 38-48(1999)
149. OHBAYASHI, E., MATSUSHIMA, K., HOSOYA, S., AGABEYKO, Y., YAMAZAKI, M.: Stimulatory effect of laser irradiation on calcified nodule formation in human dental pulp fibroblasts. *J. Endodon.* 25 : 30-33 (1999)
150. COOPER, L.F., HARIS, C.T., BRUDER, S.P., KOWALSKI, R., KADIYALA, S.: Incipient analysis of mesenchymal stem-cell-derived osteogenesis. *J. Dent. Res.* 80:314-320 (2001)
151. MURPHY, M.G., MAILHOT, J., BORKE, J., WATAHA, J., SHARAWY, M., SMITH, A.: The effects of rh BMP-2 on human osteosarcoma cells and human gingival fibroblasts in vitro. *J. Oral Implant.* 27: 16-24 (2001)
152. ROY, M.E., NISHIMOTO, S.K., RHO, J.Y., BHATTACHARYA, S.K., PHARR, G.M.: The distribution of osteocalcin, degree of mineralization, and mechanical properties along the length of *Cyprinus carpio* ribbone. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 12: 699-702 (2001)
153. KOH, E.T., TORABINEJAD, M., PITT FORD, T.R., BRADY, K., MCDONALD, F.: Mineral trioxide aggregate stimulates a biological response in human osteoblasts. *J. Biomed. Mater. Res.* 37:432-439 (1997)
154. APARICIO, C., GIL, F.J., PLANELL, J.A.: Human osteoblast proliferation and differentiation on grit blasted and bioactive titanium for dental applications. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 13; 1105-1111(2002)

155. SCOTCH, C.A., CASCONI, M.G., 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)
156. 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)
157. DALBY, M.J., DI SILVIO, L., HARPER, E.J., BONFIELD, W.: Initial interaction of osteoblasts with the surface of a hydroxyapatite-poly(8-methylmethacrylate) cement. *Biomaterials* 22: 1739-1747 (2001)
158. YAO, K.L., 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: 231-40 (1994)
159. SNYDER, W.R., HOOVER, J., KHOURY, R., FARACH-CARSON, M.C.: Effect of agents used in perforation repair on osteoblastic cells. *J. Endodon.* 23 :158-161(1997)
160. KREISLER, M., CHRISTOFFERS, A.B., 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)
161. 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)

162. CHEN, Y.J., JENG, J.H., LEE, B.S., CHANG, H.F., CHEN, K.C., LAN, W.H.: Effects of Nd:YAG laser irradiation on cultured human gingival fibroblasts. *Laser Surg. Med.* 27: 471-478 (2000)
163. GUTKNECHT, H., KANEHL, S., MORITZ, A., MITTERMAYER, C., LAMPERT, F.: Effects of Nd:YAG laser irradiation on monolayer cell cultures. *Laser Surg. Med.* 22: 30-36 (1998)
164. FALWACZYN, M., MEHL, A., JORDAN, C., HICKEL, R.: Antibacterial effects of pulsed Nd:YAG laser radiation at different energy settings in root canals. *J. Endodon.* 28: 24-29 (2002)
165. RAMSKÖLD, L.O., FONG, C.D., STRÖMBERG, T.: Thermal effects and antibacterial properties of energy levels required to sterilize stained root canals with a Nd:YAG laser. *J. Endodon.* 23: 96-100 (1997)
166. KHAN, M.A., KHAN, M.F., KHAN, M.W., WAKABAYASHI, H., MATSUMOTO, K.: Effect of laser treatment on the root canal of human teeth. *Endod. Dent. Traumatol.* 13: 139-45 (1997)
167. LAN, W.-H.: Temperature elevation on the root surface during Nd:YAG laser irradiation in the root canal. *J. Endodon.* 25: 155-156 (1999)

ÖZGEÇMİŞ

22 Kasım 1973 tarihinde Ankara'da doğdum. İlkokulu Nuh Eskiyan İlkokulu, orta ve lise öğrenimimi Yükseliş Koleji'nde tamamladım. 1991 yılında girdiğim Ankara Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi'nden 1996 yılında mezun oldum. 1997 yılında Gazi Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Diş Hastalıkları ve Tedavisi Anabilim Dalı'nda doktora eğitimime başladım. Evliyim. Yabancı dilim İngilizce'dir.



TEŞEKKÜR:

Doktora eğitimimde büyük katkıları olan, engin bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım saygıdeğer hocam Prof. Dr. Emin TÜRKÖZ'e,

İhtiyaç duyduğumda yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Güliz GÖRGÜL'e,

Çalışmalarım sırasında özellikle lazer fiziği konusunda bilgilerine başvurduğum Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fizik Bölümü Başkanı Prof. Dr. Hüseyin KORU'ya,

Bilgi, tecrübe ve manevi desteğiyle her zaman yanımda olan çok sevgili hocam Prof. Dr. Oya BALA'ya,

Köy İşleri Bakanlığı ŞAP Enstitüsü Hücre Kültürü Laboratuvarı olanaklarının kullanılmasında yardımlarını esirgemeyen ŞAP Enstitüsü Müdürlüğü'ne ve bu tezin deneylerinde büyük emeği olan ŞAP Enstitüsü Hücre Kültürü Laboratuvarı Şefi Dr. Nilay ÜNSAL'a, bitmez tükenmez enerjisiyle bana her zaman moral veren ve çalışmalarımda çok büyük katkısı olan Biyolog Şükran YILMAZ'a,

Bu tezin biyokimyasal analizlerinin yapılmasındaki katkılarından dolayı Gülhane Askeri Tıp Akademisi Araştırma Biyokimya Bilim Dalı Başkanı Doç. Dr. Namık Kemal BİNGÖL'e ve öğretim görevlisi Doç. Dr. Muhittin SERDAR'a,

Histokimyasal boyamaların fotoğraflanmasındaki katkılarından dolayı Gazi Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Oral Patoloji Bilim Dalı araştırma görevlileri ve Bölüm Başkanı Prof. Dr. Tülin OYGÜR'e,

Bu tezin istatistiksel verilerinin değerlendirilmesi ve yorumlanmasında yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Aydın ÜNSAL'a

Bugüne gelmemde manevi ve maddi desteğini esirgemeyen, her zaman yanımda olan sevgili anne ve babama, sabrından dolayı sevgili eşime ve tezimin son aşamalarında yanımda olan biricik oğluma sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.