ORIGINALNI ČLANAK

Mehanizam dejstva nisko-energetske Er:YAG laserske iradijacije na proliferaciju osteoblasta

Apstrakt

Uvod Nedavno je ustanovljeno da nisko-energetsko Er:YAG lasersko zračenje utiče na povećanu proliferaciju osteoblasta. Međutim, mehanizam nastanka ovog biološkog efekta je i dalje nejasan. Cilj ovog rada je da istraži mehanizam, koji je odgovoran za proliferaciju i diferencijaciju osteoblasta.

Materijal i metode MC3T3-E1 osteoblasti mišije kalvarije su zračeni Er:YAG laserom pri ukupnoj energiji od 2.6 mJ/cm², a nakon zračenja, istraživana je uloga mitogenom-aktivirane protein kinaze (MAPK) na povećanu proliferaciju.

Rezultati Nisko-energetska Er:YAG laserska iradijacija je izazvala fosforilaciju MAPK/ERK (ekstracelularnim signalima regulisane kinaze), a specifični MAPK/ERK inhibitor U0126 je izazvao inhibiciju laserom povećane proliferacije.

Zaključak Rezultati ovog istraživanja su pokazali da nisko-energetsko Er:YAG lasersko zračenje uzrokuje povećanu proliferaciju osteoblasta aktiviranjem MAPK/ERK. Rezultati ukazuju na mogućnost efikasne primjene Er:YAG laserske terapije u cilju brže produkcije koštanog tkiva i njegovoj regeneraciji, te se mogu primjenjivati u parodontologiji i u implantologiji.

(Scr Med 2010;41:97-9)

Verica Pavlič

Korespondencija

Verica Pavlič, DDS, PhD
78000 Banja Luka, Republika Srpska
Bosna i Hercegovina
Tel: +387 (0)66 769-844
E-mail: dr.vericapavlic@gmail.com

Cljučne reči

Er:YAG iradijacija, osteoblasti,
MAPK, 'Western blott'

Rad je prihvaćen
29. augusta, 2010.

Erbium - itrijum aluminijum garnet (Er:YAG) laser emituje infracrvenu svjetlost talasne dužine 2940 nm. Svjetlost frekvencije Er:YAG lasera se posebno dobro apsorbuje od strane molekula vode i hidroksiapatita, što omogućava primjenu ove vrste lasera pri ablaciji tvrdih i mekih zubnih tkiva uz minimalna neželjena toplotna oštećenja. Do sada je objavljen niz radova o primjeni Er:YAG lasera za uklanjanje zubnog kamenca, uklanjanje parodontoloških bakterija, te efikasno uklanjanje tvrdih i mekih tkiva, kao i potencijalnu rutinsku primjenu nisko-energetske laserske iradijacije.¹⁻³

Nisko-energetska laserska iradijacija dovodi do pozitivnog stimulisanja tkiva i ćelija. Do sada je objavljeno više istraživanja koja objašnjavaju pozitivan efekt nisko-energetske laserske iradijacije na osteoblastima. Ozawa i saradnici⁴ su pokazali pojačanu proliferaciju i diferencijaciju osteoblasta korištenjem nisko-energetskog diodnog lasera: Ga-Al-As (830 nm, 500 mW). Do sličnih rezultata su došli i Stein i Arisu sa saradnicima,^{5,6} koristeći nisko-energetsku He-Ne (632 nm, 10mW) i Nd:YAG lasersku iradijaciju na SaOS-2 osteoblastima. Nedavno je objavljeno da nisko-energetsko Er:YAG lasersko zračenje dovodi do pojačane proliferacije MC3T3-E1 osteoblasta.⁷ Cilj ovog rada je da se pokuša

objasniti ćelijski mehanizam koji je odgovoran za proliferaciju i diferencijaciju osteoblasta.

Materijal i metode

Kultivisano je 50 000 osteoblasta mišije kalvarije (MC3T3-E1 osteoblasti) u alfa minimalnom esencijalnom mediumu (α-MEM; Sigma, St. Louis, MO) obogaćen sa 10% fetalnog govedeg seruma (FBS; Bioserum, Melbourne, Australia). Osteoblasti su 24 sata nakon kultivisanja tretirani sa 0.5% FBS α-MEM (serumom osiromašenim mediumom), narednih 24 sata do laserskog zračenja. Iradijacija je izvedena korištenjem Er:YAG lasera (Hoya Photonics, Fremont, CA), talasne dužine 2940 nm, sa rasponom energije od 30-350 mJ/puls, i maksimalnom frekvencijom od 50 Hz, sa pojedinačnim pulsem trajanja 200 μs. Iradijacija je izvedena na udaljenosti od 15 cm, pri energiji od 30 mJ (ukupna energija: 2.6 mJ/cm²), frekvenciji od 30 Hz, bez prisustva medijuma. Medijum je odstranjen prije početka iradijacije, a nakon zračenja je zamijenjen novim. Kontrolni osteoblasti su tretirani posve jednako, samo bez Er:YAG laserske iradijacije.

Osteoblasti su tretirani dodavanjem specifičnih inhibitora MAP kinaze 30 min prije iradijacije - U0126 za MAPK/ERK

(ekstracelularnim signalima regulisane kinaze), SP600125 za SAPK/JNK (c-Jun N-terminalne kinaze) i SB203580 za p38 MAPK inhibiciju (MAPK inhibitor set, BIAffin, Njemačka). 24 sata nakon iradijacije, ćelijska proliferacija je mjerena WST-8 testom (Cell counting kit-8, Dojindo, Japan). Suština testa je bio-konverzija interćelijske dehidrogenaze iz tetrazolijuma u formazan, čije vrijednosti direktno odgovaraju broju aktivnih ćelija. Apsorpcija uzoraka je mjerena pri talasnoj dužini od 450 nm. Daljnja analiza je bila mjerenje MAPK fosforilacije 'Western blott' metodom u vremenskim intervalima od 0, 5, 15, 30 i 60 minuta nakon nisko-energetске Er:YAG laserske iradijacije.

Statistička analiza vršena je pomoću ANOVA - testa homogenosti promjenljivih za poređenje grupa, i Tukey testa kao post-hoc testa za poređenje unutar svake grupe. Statistički značajna razlika je $p < 0.05$.

Rezultati

Pri tretiranju osteoblasta sa specifičnim MAPK inhibitorima, inhibicija je uočena samo pri dodavanju MAPK/ERK inhibitora - U0126, dok je pri tretiranju sa SAPK/JNK i p38 MAPK inhibitorima, SB203580 i SP600125, osteoblastna proliferacija bila bez razlike u odnosu na kontrolnu grupu, koja nije tretirana sa inhibitorima (Slika 1). 'Western blott' analiza je potvrdila ove rezultate, jasnom MAPK/ERK fosforilacijom 5 min nakon iradijacije, u poređenju sa kontrolnom grupom. Nivo fosforilacije postepeno opada 15 i 30 min nakon iradijacije, da bi posve iščezao 60 min nakon iradijacije. Fosforilacija SAPK/JNK ili p38 MAPK nije uopšte detektovana (Slika 1).

Diskusija

Dobijeni rezultati ukazuju da nisko-energetsko Er:YAG lasersko zračenje izaziva povećanu proliferaciju osteoblasta putem aktiviranja MAPK/ERK. Neki od ranije sugerisanih mehanizama su da nisko-energetska laserska iradijacija aktivira kalcijumske kanale, rezultujući u povećanju intraćelijskog kalcijuma, i sljedstvenoj proliferaciji.⁸ Moguće je i aktiviranje ROS-a (reactive oxygen species) i ATP/cikličnog AMP-a, koji dalje uzrokuju signalnu kaskadu, odgovornu za povećanu proliferaciju.⁹ Povećani ATP i sinteza proteina uzrokuju i porast faktora rasta i citokina, koji eventualno dovode do porasta proliferacije.¹⁰ Neki autori¹¹, pak navode i tijesnu povezanost povećane proliferacije i homeostatskih parametara: pH, ćelijskog redoks potencijala, i oslobađanje redoks-senzitivnih faktora, kao NF- κ B. Moguća je, međutim i pretpostavka da je porast proliferacije, upravo rezultat više gore navedenih mehanizama koje djeluju u isto vrijeme, i sinergistički.

Prethodne studije su ukazivale na jaku povezanost MAPK, pogotovo MAPK/ERK sa povećanom ćelijskom proliferacijom.¹² Studija Shefer i Miyate^{13,14} na temu efekta nisko-energetске laserske iradijacije na MAPK, pokazala je da upotreba He-Ne (632.8 nm) i diodnog (Ga-Al-As, 810 nm) lasera povećava aktivnost ćelija, uzrokujući povećanu proliferaciju, specifično aktivirajući MAPK/ERK, bez efekta na SAPK/JNK ili p38 MAPK. Rezultati našeg istraživanja su, također, u saglasnosti sa navedenim nalazima, i oni pokazuju da nisko-energetsko Er:YAG lasersko zračenje na osteoblastima stimuliše njihovu proliferaciju isključivo aktivirajući MAPK/ERK. Uz to, inače stresom-aktivirani

Slika 1. Efekti nisko-energetskog Er:YAG laserskog zračenja na MAPK [Effects of low-level Er:YAG laser irradiation on MAPK]. a - Efekti inhibicije MAPK korištenjem specifičnih inhibitora prije iradijacije Er:YAG laserom. Pri iradijaciji od 30 Hz, 30 mJ/puls i 60 sekundi, bez prisustva medijuma, laserom-povećana osteoblastna proliferacija je inhibirana nakon tretmana sa U0. * $p < 0.05$ u poređenju sa kontrolnom grupom; U0 - U0126 (specifični inhibitor MAPK/ERK), SB - SB203580 (specifični inhibitor p38 MAPK), SP - SP600125 (specifični inhibitor SAPK/JNK). b - Fosforilacija MAPK metodom 'Western blott'. MAPK/ERK fosforilacija je uočljiva 5 min nakon iradijacije, u poređenju sa kontrolnom grupom. U isto vrijeme, fosforilacija SAPK/JNK i p38 MAPK nije detektovana ni u jednom vremenskom intervalu. K0- kontrola bez iradijacije, L5- laser 5 min nakon iradijacije, L15- laser 15 min nakon iradijacije, L30- laser 30 min nakon iradijacije, L60- laser 60 min nakon iradijacije, K5- kontrola 5 min nakon iradijacije, K15- kontrola 15 min nakon iradijacije, K30- kontrola 30 min nakon iradijacije, K60- kontrola 60 min nakon iradijacije.

SAPK/JNK i p38 MAPK, nisu stimulisani nisko-energetskim Er:YAG laserskim zračenjem. To potvrđuje da ćelije, u ovom slučaju osteoblasti, ne doživljavaju Er:YAG lasersku iradijaciju kao stres.

Naše istraživanje ima i neka ograničenja, koja se očituju u korištenju samo jednog seta iradijacijskih parametara Er:YAG lasera i ograničenog broja uzoraka ćelija (n=3). Dodatna *in vitro* i *in vivo* ispitivanja mogu potpunije objasniti mehanizme djelovanja nisko-energetske Er:YAG laserske terapije na povećanu produkciju koštanog tkiva.

Reference

1. Aoki A, Sasaki KM, Watanabe H, Ishikawa I. Lasers in non-surgical periodontal therapy. *Periodontol 2000* 2004;36:59-97.
2. Ishikawa I, Aoki A, Takasaki AA. Potential application of erbium:YAG laser in periodontics. *J Periodontal Res* 2004;39:275-85.
3. Aoki A, Mizutani K, Takasaki AA, Ishi S, Aleksic V, Izumi Y. Removal of melanin hyperpigmentation by Er:YAG laser using chisel tip. *J Japan Soc Laser Dent* 2009;20:23. (in Japanese)
4. Ozawa Y, Shimizu N, Kariya G, Abiko Y. Low-energy laser irradiation stimulates bone nodule formation at early stages of cell culture in rat calvarial cells. *Bone* 1998;22:347-54.
5. Stein A, Benayahu D, Maltz L, Oron U. Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. *Photomed Laser Surg* 2005;23:161-6.
6. Arisu HD, Türköz E, Bala O. Effects of Nd:YAG laser irradiation on osteoblast cell cultures. *Lasers Med Sci* 2006;21:175-80.
7. Aleksic V, Aoki A, Iwasaki K, Takasaki AA, Chen YW, Abiko Y, Ishikawa I, Izumi Y. Low-level Er:YAG laser irradiation enhances osteoblast proliferation through activation of MAPK/ERK. *Lasers Med Sci* 2010;25:559-69.
8. Lubart R, Friedmann H, Sinykov M, Cohen N, Breitbart H. Changes in calcium transport in mammalian sperm mitochondria and plasma membranes caused by 780 nm irradiation. *Lasers Surg Med* 1997;21:439-99.
9. Lavi R, Shainberg A, friedmann H, Shneyvays V, Rickover O, Eichler M, Kaplan D, Lubart R. Low energy visible light induces reactive oxygen species generation and stimulates an increase of intracellular calcium concentration in cardiac cells. *J Biol Chem* 2003;278:40917-22.
10. Hawkins D, Abrahamse H. Effect of multiple exposures of low-level laser therapy on the cellular responses of wounded human skin fibroblasts. *Photomed Laser Surg* 2006;24:705-14.
11. Lubart R, Breitbart H. Biostimulative effects of low energy lasers and their implications for medicine. *Drug Dev Res* 2000;50:471-5.
12. Robinson MJ, Cobb MH. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9:180-6.
13. Shefer G, Oron U, Irintchev A, Wernig A, Halevy O. Skeletal muscle cell activation by low-energy laser irradiation: a role of MAPK/ERK pathway. *J Cell Physiol* 2001;187:73-80.
14. Miyata H, Genma T, Ohshima M, Yamaguchi Y, Hayashi M, Takeichi O, Ogiso B, Otsuka K. Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated protein kinase activation of cultured human dental pulp cells by low-power gallium-aluminium-arsenic laser irradiation. *Int Endod J* 2006;39:238-44.

Mechanism of Low-level Er:YAG Laser Irradiation Involved in Osteoblast Proliferation

Abstract

Background It has been reported that MC3T3-E1 osteoblast proliferation was enhanced following low-level Er:YAG laser irradiation (low-level laser therapy-LLLT, photo-bio-modulation). However, the reason for enhanced osteoblast proliferation following low-level Er:YAG laser irradiation remained unclear. Therefore, the aim of this study was to investigate the potential mechanisms underlying photo-bio-modulatory effect of the Er:YAG laser on osteoblasts.

Materials and Methods MC3T3-E1, mouse derived osteoblasts were irradiated at specific fluence of 2.6 mJ/cm² and, the role of mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways in laser-enhanced cell proliferation was examined.

Results Low-level Er:YAG laser irradiation induced the phosphorylation of extracellular signal-regulated protein kinase (MAPK/ERK), and MAPK/ERK inhibitor U0126 significantly inhibited laser-enhanced cell proliferation.

Conclusion These results obtained that low-level Er:YAG laser irradiation increases osteoblast proliferation mainly by activation of MAPK/ERK, suggesting that the Er:YAG laser may be efficient in promoting bone healing following periodontal and peri-implant therapy.