T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAMİDİYE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DÜŞÜK SEVİYELİ LAZER VE DÜŞÜK YOĞUNLUKTA KESİKLİ ULTRASON UYGULAMALARININ OSTEOBLAST-OSTEOKLAST ORTAK HÜCRE KÜLTÜRÜ SİSTEMİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN *IN VITRO* OLARAK İNCELENMESİ

DİLEK TEKİN

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. ŞENİZ KARAÇAY

ORTODONTİ ANA BİLİM DALI
ORTODONTİ DOKTORA PROGRAMI

DOKTORA TEZİ
ARALIK/2022

İTHAF

“Varlığını her daim yanımda hissettiğim rahmetli anneme ithaf ediyorum.”

TEŞEKKÜR

Tezimin oluşumunda ve sürdürülmesinde her türlü bilimsel ve manevi katkıyı sağlamış olan, doktora eğitimim süresince değerli destek ve birikimlerini esirgemeyen danışmanım ve sevgili hocam Prof. Dr. Şeniz KARAÇAY'a,

Tezimin planlama ve işleyiş aşamasındaki katkıları nedeni ile tez izleme komitesi üyeleri Prof. Dr. Günseli GÜVEN POLAT ve Doç. Dr. Ersin YILDIRIM'a,

Tezimin laboratuvar çalışmalarını birlikte yürüttüğümüz, rehberliği ve tecrübesi ile bana yol gösteren değerli eş danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Gamze YEŞİLAY'a,

Doktora eğitimim boyunca çalışmalarımın her aşamasında katkılarını esirgemeyen, her konuda bana destek olan değerli hocalarım Doç. Dr. Ersin YILDIRIM ve Dr. Öğr. Üyesi Derya DURSUN'a,

Tez çalışmamın istatistik aşamasındaki katkılarından dolayı Doç. Dr. Cesur SAMANCI'ya, laboratuvar aşamasındaki ve tez sürecindeki yardımlarından dolayı Dr. Esra ERKAN'a,

Birlikte çalışmaktan büyük keyif aldığım ve varlıklarını her zaman yanımda hissettiğim, doktora eğitim sürecimi keyifli bir aile ve arkadaşlık ortamına çeviren çok sevdiğim doktora öğrencisi arkadaşlarıma, eğitim kliniğimizin tüm ihtiyaçlarını gideren, ne istesek bir şekilde arayıp bulan, her gün gülen yüzüyle bizleri motive eden Necmi ARICI'ya,

Bana arkadaşlıktan çok kardeşlik yapan, desteğini her zaman yanımda hissettiğim çok sevgili arkadaşım Dr. Melike YEŞİLDAL'a,

Diş hekimliği serüvenine birlikte başladığımız, farklı kulvarlarda yol alsak da her zaman yan yana yürüdüğümüz canım arkadaşım Dr. Sema ÖZGEN YILDIRIM'a,

Her zaman bana destek olan canım ağabeyim Ali TEKİN'e ve sevgili aileme,

Bu projeye verdiği maddi destekten dolayı Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne,

Tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Bu araştırma Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2020/095 numaralı Bilimsel Araştırma Projesi ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

İTHAF iv
TEŞEKKÜR v
İÇİNDEKİLER vi
TABLOLAR LİSTESİ x
ŞEKİLLER LİSTESİ xv
SİMGELER VE KISALTMALAR xvi
ÖZET xix
ABSTRACT xxi
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 2
2.1. DÜŞÜK SEVİYELİ LAZER 2
2.1.1. Lazerin Tarihçesi 2
2.1.2. Lazerin Fiziği 3
2.1.2.1. Optik temelleri 4
2.1.2.2. Lazer ışını 5
2.1.3. Lazer-Doku Etkileşimleri 6
2.1.4. Lazer Parametreleri 9
2.1.4.1. Dalga boyu 9
2.1.4.2. Işınım 9
2.1.4.3. Akıcılık 9
2.1.4.4. Atım süresi (Atım genişliği) 9
2.1.4.5. Atım tekrarlama oranı 10
2.1.5. Diş Hekimliğinde Lazer Uygulamaları 10
2.1.5.1. Diş hekimliğinde kullanılan lazer cihazları 10
2.1.6. Düşük Seviyeli Lazer Tedavisi (DSLT) 12
2.1.6.1. Düşük seviyeli lazer tedavisinin hücresel etki mekanizması 12
2.1.6.2. Ortodontide düşük seviyeli lazer tedavisinin uygulama alanları 14
2.2. DÜŞÜK YOĞUNLUKLU KESİKLİ ULTRASON 21
2.2.1. Ultrasonun Tanımı ve Tarihçesi 21
2.2.2. Ultrasonun Fiziği 22
2.2.3. Ultrason Dalgasının Yayılımı 24
2.2.3.1. Frekans 24
2.2.3.2. Yayılma hızı 24
2.2.3.3. Dalga boyu 25

2.2.3.4. Periyot 25
2.2.3.5. Basınç 25
2.2.3.6. Mod 26
2.2.3.7. Dalga gücü 26
2.2.4. Düşük Yoğunluklu Kesikli Ultrason (DYKU) 27
2.2.4.1. Ortodontide düşük yoğunluklu kesikli ultrason uygulama alanları 27
2.3. KEMİĞİN YAPISI VE YENİDEN ŞEKİLLENMESİ 32
2.3.1. Kemik Dokusu 32
2.3.2. Alveolar Kemiğin Yeniden Şekillenmesi 32
2.3.3. Ortodontik Diş Hareketinde Rol Alan Hücre Tipleri 33
2.4. LAZER VE ULTRASON TEDAVİLERİNİN KEMİK HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİSİ 35
2.4.1. Lazer Tedavisinin Kemik Hücreleri Üzerine Etkisi 35
2.4.2. Ultrason Tedavisinin Kemik Hücreleri Üzerine Etkisi 37
3. GEREÇ VE YÖNTEM 39
3.1. GEREÇ 39
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Materyaller 39
3.2. YÖNTEM 43
3.2.1. Deney Grupları 43
3.2.1.1. Kontrol grupları 43
3.2.1.2. Ultrason grupları 43
3.2.1.3. Lazer grupları 44
3.2.1.4. Kombinasyon Grupları 44
3.2.2. Hücre Kültürünün Oluşturulması 45
3.2.3. Deney Düzeneğinin Hazırlanması 46
3.2.4. Lazer ve Ultrason Uygulamaları 47
3.2.4.2. DYKU uygulamaları 47
3.2.4.1. DSLT uygulamaları 49
3.2.4.3. Kombine uygulamalar 50
3.2.5. Hücresel Canlılık Analizleri 51
3.2.6. Hücre Apoptozunun Belirlenmesi 51
3.2.7. Morfolojik Farklılaşma Analizleri 52
3.2.7.1. Boyama için gerekli olan solüsyonların hazırlanması 52
3.2.7.2. Aktin boyama protokolü 52
3.2.8. Tartrat Rezistan Asit Fosfataz (TRAP) ve Alkalen Fosfataz (ALP) Aktivitesinin Belirlenmesi 53
3.2.8.1. Reaktiflerin hazırlanması 53
3.2.8.2. TRAP ve ALP protokolünün ana hatları 53

3.2.8.3. TRAP ve ALP protokolleri 53
3.2.9. Hücre Kültüründe Protein Miktar Tayini 54
3.2.10. İstatistiksel Analiz 55
4. BULGULAR 56
4.1. HÜCRELERİN CANLILIK DÜZEYLERİNE AİT BULGULAR 56
4.1.1. Kontrol Gruplarının Hücresel Canlılık Düzeylerine Ait Bulgular 56
4.1.2. Ultrason Gruplarının Hücresel Canlılık Düzeylerine Ait Bulgular 57
4.1.3. Lazer Gruplarının Hücresel Canlılık Düzeylerine Ait Bulgular 58
4.1.4. Kombinasyon Gruplarının Hücresel Canlılık Düzeylerine Ait Bulgular 59
4.1.5. Kontrol Grubu ile Ultrason, Lazer ve Kombinasyon Gruplarının Hücresel Canlılık Düzeylerinin Karşılaştırılması 62
4.1.6. Lazer Grupları ile Ultrason Gruplarının Hücresel Canlılık Düzeyinin Karşılaştırılması 66
4.1.7. Kombinasyon Grupları ile Lazer Gruplarının Hücresel Canlılık Düzeyinin Karşılaştırılması 68
4.1.8. Kombinasyon Grupları ile Ultrason Gruplarının Hücresel Canlılık Düzeyinin Karşılaştırılması 70
4.1.9. Kombinasyon-I ve Kombinasyon-II Gruplarının Hücresel Canlılık Düzeyinin Karşılaştırılması 72
4.2. HÜCRELERİN TRAP AKTİVİTELERİNE AİT BULGULAR 73
4.2.1. Kontrol Gruplarının TRAP Aktivitelerine Ait Bulgular 73
4.2.2. Ultrason Gruplarının TRAP Aktivitelerine Ait Bulgular 74
4.2.3. Lazer Gruplarının TRAP Aktivitelerine Ait Bulgular 75
4.2.4. Kombinasyon Gruplarının TRAP Aktivitelerine Ait Bulgular 76
4.2.5. Kontrol Grubu ile Ultrason, Lazer ve Kombinasyon Gruplarının TRAP Aktivitelerinin Karşılaştırılması 78
4.2.6. Lazer Grupları ile Ultrason Gruplarının TRAP Aktivitelerinin Karşılaştırılması 82
4.2.7. Kombinasyon Grupları ile Lazer Gruplarının TRAP Aktivitelerinin Karşılaştırılması 84
4.2.8. Kombinasyon Grupları ile Ultrason Gruplarının TRAP Aktivitelerinin Karşılaştırılması 86
4.2.9. Kombinasyon-I ve Kombinasyon-II Gruplarının TRAP Aktivitelerinin Karşılaştırılması 87
4.3. HÜCRELERİN ALP AKTİVİTELERİNE AİT BULGULAR 89
4.3.1. Kontrol Gruplarının ALP Aktivitelerine Ait Bulgular 89
4.3.2. Ultrason Gruplarının ALP Aktivitelerine Ait Bulgular 90
4.3.3. Lazer Gruplarının ALP Aktivitelerine Ait Bulgular 91
4.3.4. Kombinasyon Gruplarının ALP Aktivitelerine Ait Bulgular 92

4.3.5. Kontrol Grubu ile Ultrason, Lazer ve Kombinasyon Gruplarının ALP Aktivitelerinin Karşılaştırılması 94
4.3.6. Lazer Grupları ile Ultrason Gruplarının ALP Aktivitelerinin Karşılaştırılması 98
4.3.7. Kombinasyon Grupları ile Lazer Gruplarının ALP Aktivitelerinin Karşılaştırılması 100
4.3.8. Kombinasyon Grupları ile Ultrason Gruplarının ALP Aktivitelerinin Karşılaştırılması 102
4.3.9. Kombinasyon-I ve Kombinasyon-II Gruplarının ALP Aktivitelerinin Karşılaştırılması 103
4.4. HÜCRELERİN CANLILIK, TRAP VE ALP ANALİZLERİNE AİT GRAFİKLER 105
4.5. HÜCRELERİN MORFOLOJİK GÖRÜNÜMLERİNE AİT BULGULAR 107
4.3.1. Aktin Boyama Görüntüleri 107
4.3.2. Hücrelerin Apoptoz Görüntüleri 110
5. TARTIŞMA 113
5.1. AMAÇ, GEREÇ VE YÖNTEMİN TARTIŞILMASI 113
5.2. BULGULARIN TARTIŞILMASI 118
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 135
KAYNAKLAR 137
EKLER 147

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1: Sıcaklık artışına bağlı olarak hedef dokuda meydana gelen değişiklikler 8

Tablo 2.2: Ultrason cihazının farklı çalışma modları 26

Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan lazer ve ultrason cihazları 39

Tablo 3.2: Çalışmada kullanılan hücreler 40

Tablo 3.3: Çalışmada kullanılan sarf malzemeleri 40

Tablo 3.4: Çalışmada kullanılan deneysel metotlar 44

Tablo 3.5: DYKU uygulamalarında kullanılan parametreler 48

Tablo 3.6: DSLT uygulamalarında kullanılan parametreler 50

Tablo 4.1: Kontrol gruplarının tüm günlerdeki hücresel canlılık ortalamaları 56

Tablo 4.2: 7. ve 11. günlerde hücresel canlılık ortalamalarının kontrol grupları arası karşılaştırılması 56

Tablo 4.3: Kontrol gruplarının hücresel canlılık ortalamalarının günler arası karşılaştırılması 57

Tablo 4.4: Ultrason gruplarının tüm günlerdeki hücresel canlılık ortalamaları 57

Tablo 4.5: 7. günde hücresel canlılık ortalamalarının ultrason grupları arası karşılaştırılması 57

Tablo 4.6: Ultrason gruplarının hücresel canlılık ortalamalarının günler arası karşılaştırılması 58

Tablo 4.7: Lazer gruplarının tüm günlerdeki hücresel canlılık ortalamaları 58

Tablo 4.8: Lazer gruplarının hücresel canlılık ortalamalarının günler arası karşılaştırılması 59

Tablo 4.9: Kombinasyon-I gruplarının tüm günlerdeki hücresel canlılık ortalamaları 59

Tablo 4.10: 7. ve 11. günlerde hücresel canlılık ortalamalarının kombinasyon-I grupları arası karşılaştırılması 60

Tablo 4.11: Kombinasyon-I gruplarının hücresel canlılık ortalamalarının günler arası karşılaştırılması 60

Tablo 4.12: Kombinasyon-II gruplarının tüm günlerdeki hücresel canlılık ortalamaları ... 61

Tablo 4.13: 7. günde hücresel canlılık ortalamalarının kombinasyon-II grupları arası karşılaştırılması ... 61

Tablo 4.14: Kombinasyon-II gruplarının hücresel canlılık ortalamalarının günler arası karşılaştırılması ... 61

Tablo 4.15: Ultrason gruplarının hücresel canlılık düzeyinin OB+PBMC grubu ile karşılaştırılması ... 62

Tablo 4.16: Lazer gruplarının hücresel canlılık düzeyinin OB+PBMC grubu ile karşılaştırılması ... 63

Tablo 4.17: Kombinasyon-I gruplarının hücresel canlılık düzeyinin OB+PBMC grubu ile karşılaştırılması ... 64

Tablo 4.18: Kombinasyon-II gruplarının hücresel canlılık düzeyinin OB+PBMC grubu ile karşılaştırılması ... 65

Tablo 4.19: Ultrason gruplarının hücresel canlılık düzeyinin L1 grubu ile karşılaştırılması ... 66

Tablo 4.20: Ultrason gruplarının hücresel canlılık düzeyinin L2 grubu ile karşılaştırılması ... 67

Tablo 4.21: Kombinasyon-I grupları ile L1 grubunun hücresel canlılık düzeyinin karşılaştırılması ... 68

Tablo 4.22: Kombinasyon-II grupları ile L2 grubunun hücresel canlılık düzeyinin karşılaştırılması ... 69

Tablo 4.23: Kombinasyon gruplarının canlılık yüzdelerinin ultrason grupları ile karşılaştırılması ... 70

Tablo 4.24: Kombinasyon-I grupları ile Kombinasyon-II gruplarının karşılaştırılması ... 72

Tablo 4.25: Kontrol gruplarının tüm günlerde gösterdiği TRAP aktiviteleri ... 73

Tablo 4.26: 1., 7. ve 11. günlerde TRAP aktivitesinin kontrol grupları arası karşılaştırılması ... 73

Tablo 4.27: Kontrol gruplarının TRAP aktivitelerinin günler arası karşılaştırılması ... 73

Tablo 4.28: Ultrason gruplarının tüm günlerde gösterdiği TRAP aktiviteleri ... 74

Tablo 4.29: 11. günde TRAP aktivitesinin ultrason grupları arası karşılaştırılması..... 74

Tablo 4.30: Ultrason gruplarının TRAP aktivitelerinin günler arası karşılaştırılması..... 75

Tablo 4.31: Lazer gruplarının tüm günlerde gösterdiği TRAP aktiviteleri 75

Tablo 4.32: Lazer gruplarının TRAP aktivitelerinin günler arası karşılaştırılması 75

Tablo 4.33: Kombinasyon-I gruplarının tüm günlerde gösterdiği TRAP aktiviteleri 76

Tablo 4.34: 7. ve 11. günlerde TRAP aktivitesinin Kombinasyon-I grupları arası karşılaştırılması..... 76

Tablo 4.35: Kombinasyon-I gruplarının TRAP aktivitelerinin günler arası karşılaştırılması 77

Tablo 4.36: Kombinasyon-II gruplarının tüm günlerde gösterdiği TRAP aktiviteleri 77

Tablo 4.37: 1., 7. ve 11. günlerde TRAP aktivitesinin Kombinasyon-II grupları arası karşılaştırılması..... 77

Tablo 4.38: Kombinasyon-II gruplarının TRAP aktivitelerinin günler arası karşılaştırılması..... 78

Tablo 4.39: Ultrason gruplarının TRAP aktivitelerinin OB+PBMC grubuyla karşılaştırılması..... 79

Tablo 4.40: Lazer gruplarının TRAP aktivitelerinin OB+PBMC grubuyla karşılaştırılması 80

Tablo 4.41: Kombinasyon-I gruplarının TRAP aktivitelerinin OB+PBMC grubuyla karşılaştırılması..... 80

Tablo 4.42: Kombinasyon-II gruplarının TRAP aktivitelerinin OB+PBMC grubuyla karşılaştırılması..... 81

Tablo 4.43: Ultrason gruplarının TRAP aktivitelerinin L1 grubu ile karşılaştırılması..... 82

Tablo 4.44: Ultrason gruplarının TRAP aktivitelerinin L2 grubu ile karşılaştırılması..... 83

Tablo 4.45: Kombinasyon-I gruplarının TRAP aktivitelerinin L1 grubu ile karşılaştırılması 84

Tablo 4.46: Kombinasyon-II gruplarının TRAP aktivitelerinin L2 grubu ile karşılaştırılması..... 85

Tablo 4.47: Kombinasyon gruplarının TRAP aktivitelerinin ultrason grupları ile karşılaştırılması 86

Tablo 4.48: Kombinasyon-I ve Kombinasyon-II gruplarının TRAP aktivitelerinin karşılaştırılması 88

Tablo 4.49: Kontrol gruplarının tüm günlerde gösterdiği ALP aktiviteleri 89

Tablo 4.50: 1., 7. ve 11. günlerde ALP aktivitesinin kontrol grupları arası karşılaştırılması 89

Tablo 4.51: Kontrol gruplarının ALP aktivitelerinin günler arası karşılaştırılması 89

Tablo 4.52: Ultrason gruplarının tüm günlerde gösterdiği ALP aktiviteleri 90

Tablo 4.53: 11. günde ALP aktivitesinin ultrason grupları arası karşılaştırılması 90

Tablo 4.54: Ultrason gruplarının ALP aktivitelerinin günler arası karşılaştırılması 91

Tablo 4.55: Lazer gruplarının tüm günlerde gösterdiği ALP aktiviteleri 91

Tablo 4.56: Lazer gruplarının ALP aktivitelerinin günler arası karşılaştırılması 92

Tablo 4.57: Kombinasyon-I gruplarının tüm günlerde gösterdiği ALP aktiviteleri 92

Tablo 4.58: 7. ve 11. günlerde ALP aktivitesinin Kombinasyon-I grupları arası karşılaştırılması 92

Tablo 4.59: Kombinasyon-I gruplarının ALP aktivitelerinin günler arası karşılaştırılması 93

Tablo 4.60: Kombinasyon-II gruplarının tüm günlerde gösterdiği ALP aktiviteleri 93

Tablo 4.61: 1., 7. ve 11. günlerde ALP aktivitelerinin kombinasyon-II grupları arası karşılaştırılması 94

Tablo 4.62: Kombinasyon-II gruplarının ALP aktivitelerinin günler arası karşılaştırılması 94

Tablo 4.63: Ultrason gruplarının ALP aktivitelerinin OB+PBMC grubuyla karşılaştırılması 95

Tablo 4.64: Lazer gruplarının ALP aktivitelerinin OB+PBMC grubuyla karşılaştırılması 96

Tablo 4.65: Kombinasyon-I gruplarının ALP aktivitelerinin OB+PBMC grubuyla karşılaştırılması 96

Tablo 4.66: Kombinasyon-II gruplarının ALP aktivitelerinin OB+PBMC grubuyla karşılaştırılması 97

Tablo 4.67: Ultrason gruplarının ALP aktivitelerinin L1 grubu ile karşılaştırılması 98

Tablo 4.68: Ultrason gruplarının ALP aktivitelerinin L2 grubu ile karşılaştırılması 99

Tablo 4.69: Kombinasyon-I gruplarının ALP aktivitelerinin L1 grubu ile karşılaştırılması 100

Tablo 4.70: Kombinasyon-II gruplarının ALP aktivitelerinin L2 grubu ile karşılaştırılması 101

Tablo 4.71: Kombinasyon gruplarının ALP aktivitelerinin ultrason grupları ile karşılaştırılması 102

Tablo 4.72: Kombinasyon-I ve Kombinasyon-II gruplarının ALP aktivitelerinin karşılaştırılması 104

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: Lazer teorisinin genel şeması 3

Şekil 2.2: Elektromanyetik sinüs dalgası 4

Şekil 2.3: Elektromanyetik radyasyon spektrumu 4

Şekil 2.4: Lazer bileşenleri 5

Şekil 2.5: Lazer-doku etikeşimleri 6

Şekil 2.6: Ultrason frekansı ile işitilebilir ses dalgalarının karşılaştırılması 22

Şekil 2.7: Farklı materyal yoğunluklarında görülen akustik empedans 23

Şekil 2.8: Ultrasonun farklı ortamlarda yayılma hızı 25

Şekil 2.9: Ses yayılımı 25

Şekil 3.1: Çalışmada kullanılan lazer ve ultrason cihazları 40

Şekil 3.2: Deney ve kontrol grupları 43

Şekil 3.3: Uygulamalar için hazırlanan deney düzeneği 47

Şekil 3.4: Laminer kabin içinde hücre kültürlerine DYKU uygulaması 49

Şekil 3.5: TRAP ve ALP protokolünün ana hatları 53

Şekil 4.1: 1., 7. ve 11. günler resazurin testi sonuçları 105

Şekil 4.2: 1., 7. ve 11. günler TRAP enzim aktivitesi sonuçları 105

Şekil 4.3: 1., 7. ve 11. günler ALP enzim aktivitesi sonuçları 106

Şekil 4.4: 1. günde kontrol ve deney gruplarına ait aktin boyama görüntüleri 107

Şekil 4.5: 7. günde kontrol ve deney gruplarına ait aktin boyama görüntüleri 108

Şekil 4.6: 11. günde kontrol ve deney gruplarına ait aktin boyama görüntüleri 109

Şekil 4.7: Hücrelerin 1. gün apoptoz sürecine ait görüntüler 110

Şekil 4.8: Hücrelerin 7. gün apoptoz sürecine ait görüntüler 111

Şekil 4.9: Hücrelerin 11. gün apoptoz sürecine ait görüntüler 112

SİMGELER VE KISALTMALAR

ALP : Alkalen Fosfotaz

ATP : Adenozin Trifosfat

BMP-2 : Kemik Morfogenetik Proteini

CO_2 : Karbon Dioksit

COX-2 : Siklooksijenaz-2

CSF : Koloni Uyarıcı Faktör

DO : Distraksiyon Osteogenezi

DOS : Dişeti Oluğu Sıvısı

DSLT : Düşük Seviyeli Lazer Tedavisi

DYKU : Düşük Yoğunluklu Kesikli Ultrason

Er:YAG : Erbiyum: Yitriyum, Alüminyum ve Garnet

F : Frekans

FBM : Fotobiyomodülasyon

FGF : Fibroblast Büyüme Faktörü

He-Ne : Helyum-Neon

GaAlAs : Galyum Alüminyum Arsenid

GAÖ : Görsel Analog Ölçeği

IGF : İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü

IL-1β : İnterlökin 1-Beta

InGaAs : İndiyum Galyum Arsenid

J : Joule

kHZ : Kilohertz

KP : Kronik Periodontitis

KTP : Potasyum Titanil Fosfat

MHZ : Megahertz

Mikro-BT : Mikro Bilgisayarlı Tomografi

MMP : Matriks Metalloproteinaz

Nd:YAG : Neodmiyum: Yitriyum, Alüminyum ve Garnet

NF-κB : Nükleer Faktör Kappa B

NO : Nitrik Oksit

ns : Nanosaniye

OB : Osteoblast

OC : Osteoklast

ODH : Ortodontik Diş Hareketi

OPG : Osteoprotegerin

OOİİİKR : Ortodontik Olarak İndüklenmiş İnflamatuar Kök Rezorpsiyonu

P : Basınç

PDGF : Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü

PDL : Periodontal Ligament

PTH : Periosttan Türetilen Hücre

RME : Hızlı Maksiller Ekspansiyon

ROT : Reaktif Oksijen Türü

SCO : Sitokrom C Oksidaz

SEM : Taramalı Elektron Mikroskobu

SP : Substans P

SS : Paslanmaz Çelik

T : Periyot

TGF-β : Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta

Ti : Titanyum

TNF : Tümör Nekroz Faktörü

USG : Ultrasonografi

V : Yayılım Hızı

W : Watt

µm : Mikrometre

µs : Mikrosaniye

λ : Dalga Boyu

3B : 3 Boyutlu

DÜŞÜK SEVİYELİ LAZER VE DÜŞÜK YOĞUNLUKTA KESİKLİ ULTRASON UYGULAMALARININ OSTEOBLAST-OSTEOKLAST ORTAK HÜCRE KÜLTÜRÜ SİSTEMİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN *IN VITRO* OLARAK İNCELENMESİ

ÖZET

Amaç: Çalışmamızda *in vitro* ortamda düşük seviyeli lazer (DSLT) ve düşük yoğunlukta kesikli ultrason (DYKU) ile bu iki yöntemin kombinasyon uygulamalarının osteoblast-osteoklast (OB-OC) ortak hücre kültürü sistemi üzerindeki etkilerini değerlendirmeyi, ortodontik açıdan DSLT ve DYKU'nun etkin çalışma dozlarını belirlemeyi ve her iki yöntemin birlikte uygulanmasının sinerjik etki oluşturup oluşturmadığını tespit etmeyi amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda 3 kontrol, 14 deney grubu olmak üzere toplam 17 grup yer aldı. 2 grupta 976 nm dalga boyuna sahip lazer cihazıyla 4 ve 8 J/cm^2 enerji düzeyinde 10 ve 20 sn.'lik DSLT uygulamaları, 4 grupta 1, 3, 5 ve 10 dk. süre ile 25 mW/cm^2 güç yoğunluğunda DYKU uygulamaları ve 8 grupta DSLT+DYKU kombinasyon uygulamaları gerçekleştirildi. 1., 7. ve 11. günlerde OC farklılaşması TRAP, OB farklılaşması ALP boyaması ile, hücresel canlılık ve proliferasyon apoptoz kiti ve resazurin redüksiyon yöntemi ile, morfolojik farklılaşma aktin boyama ile değerlendirildi.

Bulgular: DSLT gruplarının canlılık ve proliferasyon oranı DYKU ve kombinasyon gruplarından anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). 7. günde K6 grubunun ALP aktivitesi ve 11. günde U4 grubunun ALP aktivitesi tüm gruplardan anlamlı derecede yüksektir ($p<0,05$). 7. günde en yüksek TRAP aktivitesi K8 grubunda ve en düşük TRAP aktivitesi K2 grubunda, 11. günde en yüksek TRAP aktivitesi K8 grubunda ve en düşük TRAP aktivitesi K4 grubunda izlenmiştir ($p<0,05$).

Sonuç: DSLT, DYKU ve kombinasyon uygulamaları OB-OC ortak hücre kültüründe canlılık ve proliferasyonu aktive etmektedir. Kombinasyon uygulamaları esnasında farklı dozların seçimiyle TRAP aktivitesinde artış/azalış ve ALP aktivitesinde artış indüklenerek; ortodontide diş hareketini ve RME iyileşme dönemini hızlandırmaya, minividaların stabilizasyonunu desteklemeye, ortodontik diş hareketi kaynaklı kök rezorpsiyonunu engellemeye katkı sağlanabilir.

Anahtar Kelimeler: Düşük Seviyeli Lazer Tedavisi, Düşük Yoğunluklu Kesikli Ultrason, Osteoblast, Osteoklast, TRAP

IN VITRO EVALUATION OF THE EFFECTS OF LOW LEVEL LASER THERAPY AND LOW INTENSITY PULSED ULTRASOUND APPLICATIONS ON OSTEOBLAST-OSTEOCLAST CO-CULTURE CELL SYSTEM

ABSTRACT

Aim: To evaluate the effects of low-level laser therapy (LLLT), low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) and combined applications of the methods *in vitrually* on the osteoblast-osteoclast (OB-OC) co-culture system, and to determine the effective working parameters of LLLT and LIPUS in terms of orthodontics.

Materials and Methods: A total of 17 groups, 3 control and 14 experimental, were included in our study. LLLT applications with energy density of 4 and 8 J/cm^2 were carried out using a laser device at a wavelenght of 976 nm. LIPUS applications with a power density of 25 mW/cm^2 were performed for 1, 3, 5 and 10 minutes, and combination of LLLT+LIPUS applications were performed in 8 groups. On days 1, 7 and 11, OB ve OC differentiations were evaluated by TRAP and ALP staining, cellular viability and proliferation was evaluated by apoptosis kit and resazurin reduction method, and morphological differentiation was evaluated by actin staining.

Results: The viability and proliferation rates of the LLLT groups were significantly higher than the LIPUS and combination groups ($p<0.05$). ALP activity of K6 group on the 7th day and ALP activity of U4 group on the 11th day were significantly higher than all groups ($p<0.05$). The highest TRAP activity was observed in K8 group and the lowest TRAP activity was observed in K2 group on the 7th day, and the highest TRAP activity was observed in K8 group and the lowest TRAP activity was observed in K4 group on the 11th day ($p<0.05$).

Conclusion: LLLT, LIPUS and combination applications activate viability and proliferation in OB-OC co-culture cell system. During combination applications, with the selection of different doses, an increase/decrease in TRAP activity and an increase in ALP activity can be achieved. In orthodontics, it can contribute to accelerate tooth movement and RME healing period, support the stabilization of miniscrews, and prevent root resorption caused by orthodontic tooth movement.

Keywords: Low Intensity Pulsed Ultrasound, Low Level Laser Therapy, Osteoblast, Osteoclast, TRAP

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Son zamanlarda tıp ve diş hekimliğinde, DSLT ve DYKU'nun doku rejenerasyonunu stimüle etme, enflamasyonu azaltma ve ağrıyı hafifletme gibi özelliklerinden sıklıkla yararlanılmaya başlanılmıştır. Ortodontik açıdan ele alındığında, DSLT ve DYKU'nun ortodontik hareket nedeniyle oluşan ağrıyı ve kök rezorbsiyonunu azaltmak, hızlı maksiller ekspansiyon sonrası kemik rejenerasyonunu stimüle etmek ve ortodontik diş hareketini hızlandırarak tedavi süresini kısaltmak gibi çok sayıda olumlu etkisi önceki çalışmalarda bildirilmiş olmasına rağmen, biyokimyasal etki mekanizmalarının altında yatan nedenlerin tam olarak anlaşılamaması ve uygun doz seçimi için çok sayıda parametre arasından seçim yapmanın karmaşıklığı, DSLT ve DYKU uygulamalarıyla ilgili bir dizi soru işaretini de beraberinde getirmiştir.

Literatür araştırması yaptığımızda DSLT ve DYKU ile gerçekleştirilen deneysel çalışmaların birbiriyle tartışmalı sonuçlar verdiğini; DSLT için enerji düzeyi, dalga boyu, güç ve uygulama süresi/sıklığı, DYKU için frekans, yoğunluk, görev döngüsü ve uygulama süresi/sıklığı konusunda birbirinden farklı parametreler kullanıldığını tespit ettik. Literatürde DSLT ve DYKU ile ilgili birçok çalışma mevcut olmasına rağmen, bu iki uygulamanın etkilerini karşılaştıran ve kombine etkilerini araştıran çalışma sayısı oldukça kısıtlıdır. Bizim çalışmamız ise DSLT ve DYKU'nun kombine etkilerini *in vitro* olarak araştıran ilk çalışmadır. Bunun yanı sıra literatürde DSLT ve DYKU'nun kemik hücreleri üzerindeki etkileri sıklıkla osteoblastik veya osteoklastik hücrelerden elde edilen tek tip hücre kültürü üzerinde incelenmiştir. Bizim çalışmamız ise, DSLT ve DYKU'nun, kemik remodelinginin oldukça iyi taklit eden osteoblast-osteoklast ortak hücre kültür sistemi üzerinde hem tek başına hem de kombine etkilerinin karşılaştırmalı olarak incelendiği tek çalışmadır.

Çalışmamızda *in vitro* DSLT ve DYKU uygulamalarının farklı enerji düzeyleri ve uygulama sürelerindeki etkilerini birbiriyle kıyaslayarak ortodontik açıdan avantaj ve dezavantajlarını ortaya koyabilmeyi, her iki yöntemin birlikte kullanılmasının daha etkin olup olmadığını tespit etmeyi ve böylece DSLT ve DYKU uygulamalarının ortodonti pratiğinde yer almasını yaygınlaştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. DÜŞÜK SEVİYELİ LAZER

Lazer (LASER) "**L**ight **A**mplification by **S**timulated **E**mission of **R**adiation" kelimelerinin akronimi olup, "Radyasyonun Uyarılmış Emisyonu ile Işığın Güçlendirilmesi" anlamına gelir ve aynı yönde hareket eden, tam olarak aynı frekansı, enerjiyi ve fazı paylaşan fotonlar yaratarak ışık enerjisi üretme mekanizmasını ifade eder (1,2).

2.1.1. Lazerin Tarihçesi

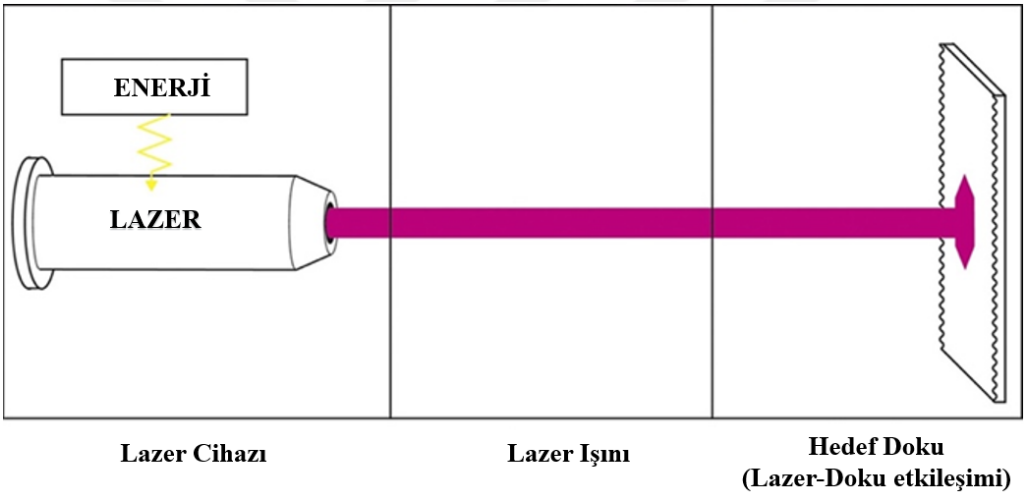
Lazerin teorik temelleri ilk olarak Einstein tarafından 1917'de tanımlandı (3). Einstein, Rutherford'un 1911'de yayınlanan atomu açıklayan çalışmasından ve Niels Bohr'un 1913'te yayınlanan 'uyarılmış maddelerden parçacık salınımı teorisi'nden yola çıkarak 'ışınım enerjisinin uyarılması teorisi'ni oluşturdu (4). Daha sonra 1950'lerde Townes, Gennadiyevich ve Mikhailovich bu kuramı geliştirdiler. Ayrıca kuantum fiziğindeki temel çalışmaları nedeniyle 1964'te topluca Nobel Fizik Ödülü'ne layık görüldüler (5). Bu temel teoriler 1960 yılında California'daki Hughes Corporation Araştırma Laboratuvarları'nda Theodore M. Maiman tarafından yakut lazerin teknik gelişimini sağladı (4). Gordon Gould, "uyarılmış radyasyon emisyonu ile ışık amplifikasyonu" kelimelerinden türetilen lazer kısaltmasını icat ederek bu terimin patentini aldı (6).

1961'de retina fotokoagülasyonunda lazerlerin kullanımı ile lazer teknolojisinin ilk biyolojik uygulaması gerçekleştirilerek sonuçları Science dergisinde yayınlandı (7). 1964 yılında karbon dioksit lazerler tanıtıldı ve bunu 1964-1973 yılları arasında Goldman'ın, argon ve neodimyum lazerler üzerine çalışmaları takip etti. 1996 yılında ise erbiyum lazerler keşfedildi (6). Lazerin son derece hedefli, terapötik bir modalite olarak büyük umut vaat ettiği çok erken fark edilmesine rağmen, bakım standardı haline gelerek daha geniş uygulama alanlarında yer alması, maliyet, bulunabilirlik ve eğitim gibi sebeplerle bir şekilde sınırlandırıldı (8).

Günümüzde yumuşak doku ve derinin vasküler ve pigmente lezyonlarının tedavisinde, cerrahi insizyon, koterizasyon ve kriyoterapi gibi klasik yöntemler ile kıyaslandığında, dokuda daha az tahribat yaratan modalitelerin ön plana çıktığı görülür. Lazer, yoğun darbeli ışık (intense pulsed light, IPL) ve ışık yayan diyot (light emitting diode, LED) gibi ışık enerjisi cihazları, bu yeni terapötik seçeneklerin önemli bir bölümünü temsil eder. Bu cihazlar hastaların konfor, hızlı iyileşme ve estetik gibi beklentilerine oldukça iyi cevap vermeleri nedeniyle tercih edilir (8).

2.1.2. Lazerin Fiziği

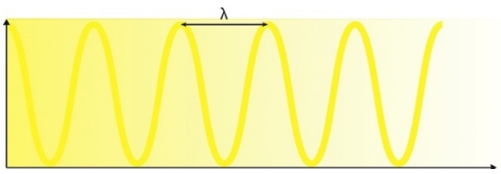
En basit haliyle tanımlanacak olursa; lazer cihazları (Şekil 2.1) istenen etkiyi oluşturmak için hedef doku ile etkileşime giren ışık demeti şeklinde bir enerji yaratır.



Şekil 2.1: Lazer teorisinin genel şeması (8)

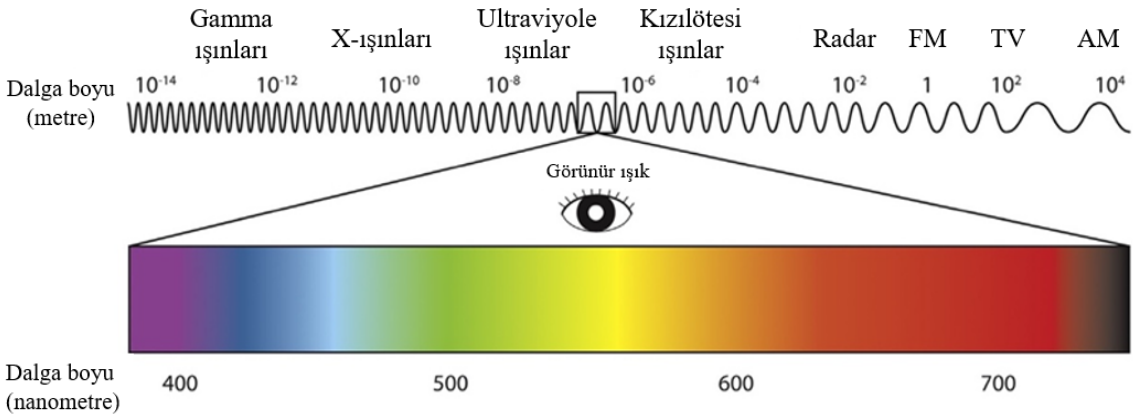
Einstein'ın kuantum radyasyon hipotezi teorisine dayanan lazer enerjisinin yayılmasının temeli, elektronların genellikle atom çekirdeğine yakın düşük enerjili bir yörüngede olması ve bu elektronların eksternal enerjiyi emerek daha yüksek bir enerji durumuna geçebilmesi üzerine kuruludur. Atomdan uzaklaştıkça daha kararsız hale gelen elektron, yeniden kararlı bir hale ulaşmak için orijinal temel durumuna geri dönerken, fotonların veya ışığın kendiliğinden emisyonu ile elektromanyetik enerjiyi serbest bırakır. Lazer ışını içindeki enerji, atomdan foton emisyonunu başlatmak için elektriksel, kimyasal veya optik bir kaynak kullanılarak üretilir (9,10).

2.1.2.1. Optik temelleri: Işık ve diğer elektromanyetik enerji formları, fotonlar (ışık kuantumu) olarak bilinen temel parçacıklardan oluşur. Fotonlar boşlukta ışık hızında (300 000 km/sn) hareket eder ve sinüzoidal dalga paterninde sürekli hareket halindedir. Dalga boyu (Şekil 2.2), elektromanyetik sinüs dalgasının art arda 2 tepesi arasındaki mesafedir ve çok kısa gama ışınları ile çok uzun AM (genlik modülasyonu) radyo dalgaları arasında değişir (8).



Şekil 2.2: Elektromanyetik sinüs dalgası (8)

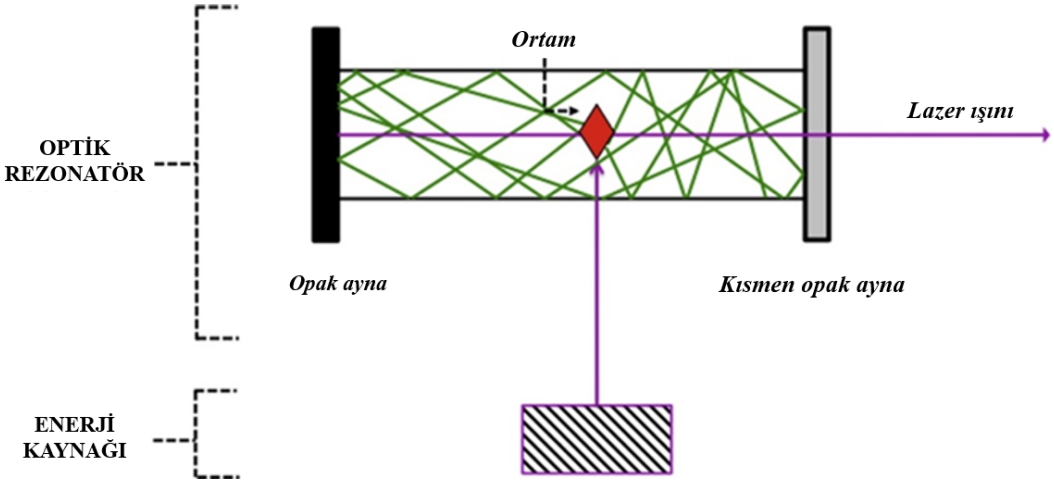
Görünür ışık, insan gözü tarafından görülebilen, 390 nm (mor) ile 700 nm (kırmızı) dalga boyları arasında, nispeten küçük elektromanyetik radyasyon spektrumundadır (Şekil 2.3). Klinik olarak kullanılan lazerlerin çoğu, elektromanyetik spektrumun görünür ışık bölümünün yanı sıra daha uzun dalga boyuna sahip kızılötesi bölümünde de yer almaktadır.



Şekil 2.3: Elektromanyetik radyasyon spektrumu (9)

Tüm lazer cihazları temel olarak bir enerji kaynağı ve bir optik rezonatörden (Şekil 2.4) oluşur. Enerji kaynağı, başlangıçta elektronları uyarılmış bir duruma taşıyarak fotonların oluşturulmasını sağlar. Bu enerji kaynağı, lambalar, elektrik akımı

ve hatta diğer lazerlerden oluşabilir. Optik rezonatör, biri tamamen opak ve diğeri kısmen opak (dolayısıyla kısmen iletken) olan 2 tane aynası bulunan bir tüp içine alınmış bir ortamdan oluşur (11). Ortam; katı, sıvı, sıvı-kristal veya gaz formunda olabilir. Sıvı-kristal ortam, katı ve sıvı arasında geçiş yapan atomik bir organizasyona sahiptir. Lazerin dalga boyunu ve tanımlamasını belirleyen ise yakut, argon gazı, erbiyum, yitriyum, alüminyum ve garnet gibi farklı ortamlardır (8).



Şekil 2.4: Lazer bileşenleri (9)

Enerji kaynağı ortamdaki elektronları uyarılmış duruma getirir ve dinlenme durumuna geri döndüklerinde, belirli bir dalga boyundaki fotonlar tüp içinde her yöne yayılır. Halihazırda uyarılmış durumda olan bir elektron uygun enerjiye sahip başka bir fotonla karşılaşırsa, ek fotonu emmeden aynı dalga boyunda bir foton yayar ve böylece fotonların daha fazla yayılmasına yol açan bir "zincirleme reaksiyon" oluşturur. Kusursuzca paralel yönde hareket eden fotonların bir kısmı, optik rezonatörün kısmen iletici aynasından çıkarak "lazer ışını" şeklini alacaktır (8).

2.1.2.2. Lazer ışını: Ortaya çıkan ışındaki ışık "tek renkli, tutarlı ve paralel" olmasıyla lazeri standart bir akkor ışıktan ayırarak ona benzersiz özellikler kazandırır. Lazer ışının özellikleri (8):

- *Monokromatik:* Lazer ışınları, çeşitli dalga boylarında fotonlar yayan bir el fenerinin aksine, hepsi aynı dalga boyuna sahip fotonlardan oluştuğu için monokromatiktir.

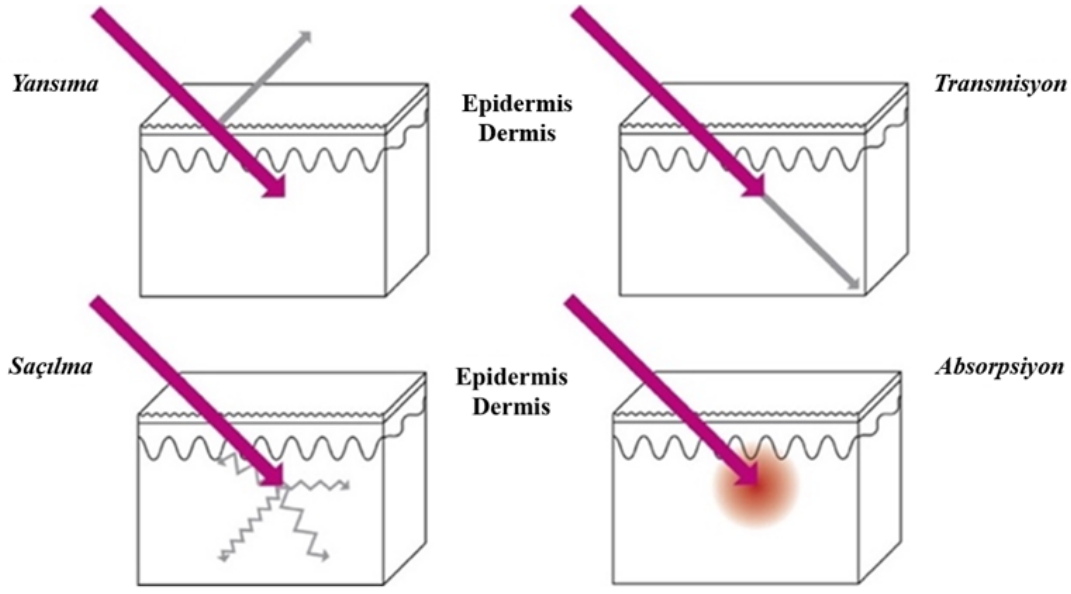
• *Koherent:* Lazer ışını içindeki fotonlar tutarlıdır, çünkü dalgalar hem uzay hem de zaman açısından aynı fazdadır.

• *Paralel*: Lazer ışınları, tüm fotonlar birbirine paralel olacak şekilde hizalanır. Bu durum, lazer ışınlarının minimum bozulma ile son derece uzun mesafeler kat edebilmesinin bir sonucudur. Dolayısıyla lazer ışını yüksek bir enerji yoğunluğuna sahiptir. Lazer cihazı tarafından üretilen mutlak enerji miktarı sürecin verimsizliğinden dolayı oldukça düşüktür ve giriş enerjisinin yalnızca %0,1'i gerçekte lazer ışınına dönüştürülür. Bununla birlikte, ışın çarpıştırıldığında enerji çok yoğun bir şekilde küçük bir hacme paketlenir.

Lazeri güçlü bir teknoloji yapan şey, enerjiyi (ör: elektrik, ışık) tek dalga boyundaki fotonlara ve paralelleştirilmiş, tutarlı ve yüksek enerjili bir ışına dönüştürme yeteneğidir.

2.1.3. Lazer-Doku Etkileşimleri

Lazer dokuyla temas ettiğinde, Şekil 2.5'de gösterildiği gibi bir dizi farklı ve birbirini dışlamayan etkileşimler gerçekleşir. Bunlar; absorpsiyon, yansıma, saçılma ve transmisyondur (12).



Şekil 2.5: Lazer-doku etikeşimleri (8)

• *Absoprsiyon*: Fotonlar kromofor olarak bilinen belirli bir moleküler hedefe çarptığında, enerjinin ısıya dönüştürülmesi olarak tanımlanabilecek "soğurma" gerçekleşir ve böylece lazerin temel etkisi oluşur (12).

• *Yansıma*: Işık dokuya eğik bir açıyla çarptığında, ışığın bir kısmı o yüzeyden yansır ve farklı bir yöne yönlendirilir; buna yansıma denir. Işık cilde tam olarak dik olduğunda bile, *stratum corneum*'un yansıtıcı özelliğinden dolayı ışığın yaklaşık %5'i yansıtılır. Lazerin yansıması, her zaman uygun güvenlik gözlüklerinin takılmasının zorunlu olmasının nedenlerinden biridir (8).

• *Saçılma*: Dokudan geçen ışık, küçük parçacıklarla etkileşime girmesi nedeniyle yine de sapabilir. Bu özellik saçılma olarak bilinir ve daha kısa dalga boylarında meydana gelme olasılığı daha yüksektir. Saçılma, dokudan geçerken ışığın uzaysal dağılımında bir artışa yol açar, böylece ışın odağında bir değişikliğe ve buna bağlı olarak daha geniş doku alanlarının ışınlanmasına yol açar (8).

• *Transmisyon*: Emilmeyen ışık, hedef yapının veya dokunun ötesindeki daha derin dokuya iletilecektir. Genel olarak, daha büyük dalga boylarına sahip ve daha büyük bir spottan çıkan ışık dokulara daha derinden iletilir (8).

Fotonun enerjisinin kromofora transferi, çeşitli lazer-doku etkileşimlerine yol açar:

- Kimyasal (fotokimyasal)
- Mekanik (fotoakustik veya fotodistruptif)
- Termal (fototermal, ortaya çıkan ısı ile komşu hücrelere, dokulara ve yapılara doğrudan zarar verir)

Kesin bir biyolojik etki ancak ışık dokunun belirli bir bileşeni tarafından yüksek oranda emildiğinde olur. Bu reaksiyonu doğru bir şekilde tahmin etmek zor görünse de aslında lazer ışınını gerçekten emen cildin sadece üç ana bileşeni vardır: melanin, hemoglobin ve intraselüler/ekstraselüler su. Mevcut teknolojik cihazlar, cildin bu bileşenlerinden biri tarafından tam olarak absorbe edilebilen, doğru renk veya dalga boyunda ışık üretecek şekilde tasarlanmıştır. Böylece çevredeki normal dokuda oluşabilecek ikincil yaralanma minimal düzeyde olur (13). İlk olarak Anderson ve Parrish (14) tarafından tanımlanan ve lazer ışını ile mikrodamarların

termal hasara uğramadan nasıl etkili ve güvenli bir şekilde tedavi edilebildiğini ortaya koyan seçici fototermoliz teorisi, fototermal lazerlerin klinik uygulamalarının arkasındaki ilkeleri açıklar ve aşağıdaki ana noktaları içerir:

1. Seçilen lazer ışığının dalga boyu selektif ve hedef dokuya uygun olmalıdır (Ör: Kılcal damarların tedavisi için 532 nm lazer).

2. Hedef dokuya uygulama yapılırken çevre dokulara zarar verilmemelidir. Lazer ışınının atım genişliği veya süresi, tedavi edilen dokuların termal gevşeme zamanı içinde yer almalıdır. Termal gevşeme zamanı, ortaya çıkan ısının üçte ikisinin çevre dokulara aktarılması için geçen zaman birimidir.

Atım genişliği, akıcılık ve spot boyutu parametrelerinin değiştirilmesinin, Tablo 2.1'de gösterildiği gibi ablasyondan, inflamatuar yanıtla sonuçlanan hafif termal yaralanmaya kadar uzanan çeşitli etkileri olacaktır. Elde edilen etki, hedef ve çevre dokuların sıcaklığındaki artışa bağlıdır (15).

Tablo 2.1: Sıcaklık artışına bağlı olarak hedef dokuda meydana gelen değişiklikler

DOKU SICAKLIĞI	GÖZLENEN ETKİ
37-50°C	Hipertermi
60-70°C	Koagülasyon, protein denatürasyonu
70-80°C	Kaynama
100-150°C	Vaporizasyon, ablasyon
>200°C	Karbonizasyon

Terapötik lazer türü seçerken uygun dalga boyuna ek olarak birden fazla değişken göz önünde bulundurulmalıdır. Sonucu optimize eden ek lazer parametreleri (8):

- Akı veya güç yoğunluğu (Joule/cm^2)
- Atım genişliği veya süresi (Q-switch, pico, long-pulsed vb.)
- İletim şekli (sürekli, kesikli vb.)
- Spot boyutu

2.1.4. Lazer Parametreleri

Biyolojik bir hedefte uygun dalga boyu, atım süresi ve enerji akışı seçimi ile termal etkiler oluşturulabilir (16).

2.1.4.1. Dalga boyu: Işığın doku üzerindeki etkisi dalga boyuna bağlıdır. İnsan gözüyle görülemeyen UV bölgesindeki ışığın (10-400 nm), eritem, hiperpigmentasyon ve deri kanserine neden olduğu bilinmektedir. Görünür spektrumdaki ışık enerjisi (380-700 nm) çoğunlukla zararsızdır, ancak kolaylıkla emilebilir olduğundan cilde yüksek yoğunlukta iletildiğinde termal hasara neden olabilir. Spektrumun yakın-kızılötesi bölgesindeki ışık (780-3000 nm) ise insan gözüyle görülememekle birlikte cilt ve retina hasarına neden olur (17).

2.1.4.2. Işınım: W/cm^2 cinsinden ölçülen ışınım, lazer ışınının yoğunluğudur (güç yoğunluğu) ve spot boyutunun yarıçapının karesiyle ters orantılıdır.

Işınım = lazer gücü/lazer ışını çapraz kesit alanı (πr^2)

Örneğin, ışın çapı 0,4 cm olan 50 W çıkışlı bir lazer için ışınım 400 W/cm^2'dir. Işını 0,2 cm çapa odaklayarak ve 50 W çıkış sağlayarak, ışınım 1600 W/cm^2'ye yükseltilebilir. Belirli bir dalga boyu için lazer ışını çapı (spot boyutu) ne kadar büyükse, penetrasyon o kadar derindir. Buna ek olarak, saçılma ve enerji kaybı da aynı oranda az olur (13).

2.1.4.3. Akıcılık: Işınım ve maruz kalma süresinin ürünü olan akı, birim alan başına iletilen Joule cinsinden enerjidir.

Enerji (Joule) = Güç (Watt) x Zaman (saniye)

$$\text{Akı } (J/cm^2) = \frac{\text{Lazer güç çıkışı (W) x maruz kalma süresi (saniye)}}{\text{Lazer ışını çapraz kesit alanı } (cm^2)}$$

Akı, tek bir atım için birim alan başına düşen enerjiyi tanımlar. Sabit bir ışın çapı ve atım süresi için, lazerin gücü veya maruz kalma süresi değiştirilerek akıcılık değiştirilebilir. Q-anahtarlı lazerlerde kısa atımlar kullanıldığında, daha uzun atımlarla kıyaslandığında akıcılık daha az olmasına rağmen, her atımda çok yüksek güç sağlanır (18).

2.1.4.4. Atım süresi (Atım genişliği): Atım genişliği, lazer çıkış gücünün sürekli olarak maksimum değerinin yarısının üzerinde kaldığı süredir. Bir sürekli dalga

ışık kaynağının modüle edilmesiyle atım süresi değiştirilebilir. Atımlı lazer sistemleri, atım süresi 40 ms ila 450 ms arasında değişen pulsed dye lazer gibi uzun atım süreli veya Q-anahtarlı lazerler gibi çok kısa atım süreli (5-100 ns) olabilir. Atım süresi hedefin termal gevşeme süresine eşit veya daha kısaysa, istenmeyen ısının bitişik dokuya difüzyonu azalır (14).

2.1.4.5. Atım tekrarlama oranı: Atım tekrarlama hızı veya atım tekrarlama frekansı, saniyede yayılan atım sayısı (Hz) olarak tanımlanır. Termal etkiler doku tipine ve doku içinde meydana gelen sıcaklık artışına bağlıdır. Isı iletimi, ısının bitişik doku yapılarına aktarıldığı mekanizmadır. Sonraki lazer atımı çevre dokulara yeterli termal difüzyon oluşmadan önce gelirse, dokuda belirgin bir sıcaklık artışı ve termal hasar meydana gelebilir. Termal etkiye sahip olmayan, her biri 100 ps'den daha az atım süreli ultra kısa lazer atımları bile, yaklaşık 10-20 Hz'den daha yüksek tekrarlama oranlarında uygulandığında dokuda ölçülebilir bir sıcaklık artışına neden olabilir (14).

2.1.5. Diş Hekimliğinde Lazer Uygulamaları

Her geçen gün artan teknolojik gelişmeler hastaların dental tedavi deneyimleme biçimlerini de değiştirmektedir. Teknoloji, tedavi süresini azaltmaya yardımcı olur ve tedaviyi hasta için daha konforlu hale getirir. Bu teknolojik gelişmelerden birisi de diş hekimliğinde lazerlerin kullanılmasıdır. Lazer uygulamaları ile hastalar için daha verimli, daha konforlu ve daha öngörülebilir sonuçlar elde edilir. Lazer teknolojisi restoratif, periodontoloji, endodonti, ortodonti ve oral ve maksillofasiyal cerrahi dahil olmak üzere diş hekimliğinin tüm alanlarında kullanılmaktadır. Lazer hem estetik prosedürler hem de patolojik oluşumların tedavisinde yumuşak ve sert doku uygulamaları için kullanılabilir (9). Diş hekimliğinde; yumuşak doku prosedürleri (gingivektomi/gingivoplasti, tümörlerin ve lezyonların eksizyonu, insizyon/eksizyon biyopsileri, frenektomi, aftöz ülserler, herpetik lezyonlar vb.), artroskopik temporomandibular eklem cerrahisi, çürük teşhisi ve temizlenmesi, kompozitlerin ışınlanması, diş beyazlatma solüsyonlarının aktivasyonu, kök kanal debridmanı ve hazırlığı, osteotomi ve kuron boyu uzatma gibi birçok alanda lazer cihazları kullanılmaktadır (19).

2.1.5.1. Diş hekimliğinde kullanılan lazer cihazları: Kullanım amacına bağlı olarak birçok türde lazer cihazı geliştirilerek diş hekimliğinde yaygın bir uygulama alanına erişilmiştir.

2.1.5.1.a. Helyum-Neon (He-Ne) lazerler: Tıpta ve daha sonra diş hekimliğinde kullanılan en eski lazerlerden biri olan He-Ne lazeri, çekirdeği uyarıldığında 635 nm dalga boyunda ışık yayan helyum ve neon gazının bir karışımıdır. Görünür kırmızı ışık spektrumunda yer alan bu lazer cihazının ışınları, birçok terapötik tedavide kullanılmakla birlikte, görünmeyen lazer dalga boyları için bir hedefleme ışını olarak da kullanılabilmektedir (20).

2.1.5.2.b. Potasyum titanil fosfat (KTP), argon ve karbon dioksit (CO_2) lazerler: Ağız yumuşak doku cerrahisinde ve diş beyazlatmada kullanılan bir başka lazer türü, çekirdeğinin 532 nm'de görünür bir yeşil ışık yayan bir potasyum (K) titanil (T) fosfat (P) kristali olduğu KTP lazerdir. Mavi argon lazerler (488 nm) genellikle kompozit dolgu malzemesini sertleştirmek için kullanılır. Diş hekimliğinde kullanılan diğer lazerler, görünür spektrumun dışında, kızılötesi aralığında ışık yayar. Geliştirilen en eski türlerinden biri, bir gaz karışımı olan (çoğunlukla CO_2) ve 10600 nm dalga boyunda ışık yayan CO_2 lazer, yumuşak dokuyu kesmek için ağız cerrahisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Her lazer adını genellikle çekirdek filamentinden almaktadır. Bu durum her lazeri benzersiz kılmakla birlikte, optimal hedef dokunun ve dokunun lazer ışını maruziyetine tepkisinin belirlenmesine yardımcı olur (20).

2.1.5.2.c. Diyot lazerler: 800-980 nm aralığında dalga boyuna sahip, yarı iletken özellikteki diyot lazerler; galyum, arsenid, alüminyum, indiyum gibi elementlerin farklı kombinasyonları aracılığıyla elektrik enerjisini ışık enerjisine dönüştürürler. Diş hekimliğinde daha çok estetik amaçlı olarak dişetinin yeniden şekillendirilmesi, iltihaplı ve hipertrofik dokunun eksizyonu ve frenektomi gibi yumuşak doku uygulamalarında kullanılır (21).

2.1.5.2.d. Erbiyum: Yitriyum, Alüminyum ve Garnet (Er:YAG) lazerler: 2940 nm dalga boyuna sahip, suda çok iyi absorbe olabilen Er:YAG lazerler, Er iyonlarıyla güçlendirilmiş YAG ana kristalinden oluşur. Diş hekimliği uygulamalarında genellikle 5-10 W gücüne sahip olan türleri kullanılır. Suda çok iyi absorbe olan, kollajen ve hidroksiapatit kristallerine iyi affinite gösteren Er:YAG lazerler, bu özelliklerinden dolayı diş hekimliğinde kavite preperasyonu ve çürüğün temizlenmesi aşamalarında kullanılır. Hidroksiapatit kristallerinde bulunan su, lazer enerjisini absorbe ederek vaporizasyona uğrar ve meydana gelen hacimsel genişleme nedeniyle çevredeki materyal patlayarak uzaklaşır. Er:YAG lazerin suda iyi absorbe olabilme özelliği, aynı

zamanda uygulama esnasında çevre dokulardaki termal hasarın azalmasına neden olduğundan, dokuda yalnızca minimal bir dejenerasyon görülür (22).

2.1.5.2.e. Neodmiyum: Yitriyum, Alüminyum ve Garnet (Nd:YAG) lazerler: 1064 nm dalga boyuna sahip Nd:YAG lazer ışını, elektromanyetik spektrumun non-iyonize, kızıl ötesi bölümünde yer alır. Diş hekimliğinde daha çok dentin tübüllerini tıkamak suretiyle hipersensitivite tedavisinde, bleaching uygulamalarında, selektif diş taşı temizliğinde ve kanalın dezenfeksiyonu ile pulpotomi/pulpektomi aşamalarında endodontik amaçla kullanılmaktadır (23).

2.1.6. Düşük Seviyeli Lazer Tedavisi

Düşük seviyeli lazer (ışık) tedavisi, fotobiyomodülasyona (FBM) dayalı birçok tedavi türünü ifade eden genel bir isimlendirmedir. FBM, atomlar veya moleküller ile fotonların etkileşimi sonucu organizmada biyolojik değişikliklere neden olan bir süreçtir.

En yaygın DSLT prosedürleri, daha iyi bir iyileşmeyle sonuçlanan hücresel süreçleri hızlandırmak için düşük seviyeli veya düşük güçlü lazerlerin kullanılmasıyla gerçekleştirilir. Hemen hemen tüm DSLT uygulamaları, ısı oluşturmayan bir enerji yoğunluğunda (0,1-100 J/cm^2), 1–1000 mW çıkış gücüyle, kırmızı veya yakın kızılötesi ışıkla (600–1100 nm) gerçekleştirilir. Işık, dokulardan geçerek hedef dokuya ulaştığından DSLT prosedürleri non-invazivdir. Ayrıca fotosentezde olduğu gibi fotokimyasal reaksiyonlarla ilgili olduğundan non-termaldir. Bu özellikleri DSLT'nin geniş bir klinik uygulama alanına sahip olmasını sağlar (24).

Literatürde terapötik amaçlı FBM'yi tanımlamak için; düşük seviyeli lazer tedavisi, düşük seviyeli ışık tedavisi, düşük yoğunluklu lazer tedavisi, düşük reaktif lazer tedavisi, soğuk lazer, termal olmayan lazer ve yumuşak lazer gibi birçok farklı isimlendirme yer alır. Termal etkileri nedeniyle biyolojik dokuları kesebilen, ablasyon ve koagülasyon yapabilen cerrahi lazer prosedürlerine kıyasla DSLT'de kullanılan enerji yoğunluğu oldukça azdır. Bu nedenle DSLT uygulamaları esnasında makroskopik doku sıcaklığında artış görülmez (24).

2.1.6.1. Düşük seviyeli lazer tedavisinin hücresel etki mekanizması: DSLT'nin doku iyileşmesi üzerindeki olumlu etkilerinin keşfedilmesiyle birlikte hücresel düzeydeki etki mekanizmasını araştırmaya yönelik birçok çalışma yapılmıştır.

Fibroblastlar, doku hasarını takiben iyileşmede rol oynayan ve en sık çalışılan hücre türüdür. Kreisler ve ark. (25) fibroblast hücrelerine 809 nm dalga boyuna sahip galyum alüminyum arsenid (GaAIAs) diyot lazer cihazı ile 1,96-7,84 J/cm^2 güç yoğunluğunda, 1-3 kez ışınlama yapmışlar ve DSLT uygulanmasından sonra 72 saate kadar hücre proliferasyonunda anlamlı bir artış bulmuşlardır. Schartinger ve ark. (26) 660 nm dalga boyuna sahip lazer cihazı ile, 350 mW güç yoğunluğunda, günde 15 dk. DSLT uygulanmasının fibroblastların hücre proliferasyon seviyesinde anlamlı bir artışa yol açtığını bildirmişlerdir. Bu tür çalışmalar, araştırmacıları DSLT'nin hücresel düzeyde oluşturduğu cevabın altında yatan mekanizmaları keşfetmeye itmiştir.

Laboratuvar bulguları, ana fotoalıcı ve fotosinyal dönüştürücü olarak Sitokrom C Oksidazın (SCO), DSLT'nin etki bölgesi olduğu teorisini desteklemektedir (27). SCO, kırmızı ile kızılötesi dalga boyları arasında (600–1.070 nm) emiciliğe sahip dört redoks aktif metal merkezine sahiptir. Mitokondriyal solunum zincirinin terminal enzimi olan SCO, moleküler oksijene elektron transfer edilmesine aracı olarak adenozin trifosfat (ATP) üretimini destekler (28). Buna karşın, Sommer (29) alternatif bir teori üreterek, mitokondriyal ATP sentezindeki artışa aracılık edenin arayüzey su katmanları viskozitesindeki azalma olduğunu öne sürmüştür. Görüldüğü üzere, mitokondriyal değişikliklerden sorumlu DSLT'nin neden olduğu değişikliklerin altında yatan mekanizma hala tam olarak çözülememiştir. Bununla birlikte, bu mitokondriyal değişiklikler, transkripsiyonel değişiklikleri ve nükleer faktör-κB (NF-κB) üretimini indüklemek için reaktif oksijen türlerinin (ROT) salınımını artırabilir (30). NF-κB, hücre çoğalması ve göçüyle birlikte anti-apoptotik ve hayatta kalma yanlısı proteinleri indükler (31).

Reaktif oksijen türleri, nükleik asit ve protein sentezinde, hücreler arası sinyal iletiminde, hücre döngüsü ilerlemesinin düzenlenmesinde ve enzim aktivasyonunda önemli rol oynayan kimyasal olarak aktif moleküllerdir. DSLT oksijen metabolizmasını desteklediğinden, aynı zamanda ROT üretimini de arttırır. Buna karşılık ROT, çeşitli uyarıcı ve koruyucu genlerin düzenlenmesine yol açan transkripsiyon faktörlerini aktive eder. Bu genler büyük olasılıkla hücresel proliferasyon, migrasyon ve hepsinin düşük seviyeli ışıkla uyarıldığı gösterilmiş olan sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin üretimi ile ilgilidir (28). Tüm bunlara ek olarak, yapılan bir başka çalışmada, DSLT'den sonra

mitokondriyal nitrik oksitin (NO) azaldığı ve bunun da ATP üretimini arttırarak hücresel çoğalmayı desteklediği bildirilmiştir (32).

2.1.6.2. Ortodontide düşük seviyeli lazer tedavisinin uygulama alanları: Düşük seviyeli lazer tedavisi analjezik, antienflamatuar, biyostimülasyon ve biyomodülasyon etkileri nedeniyle tıp ve diş hekimliğinde giderek daha fazla kullanılmaktadır (33). Ortodontideki yaygın kullanım alanları; ortodontik hareket nedeniyle oluşan ağrıyı azaltmak, hızlı maksiller ekspansiyon (RME) sonrası kemik rejenerasyonunu hızlandırmak, ortodontik diş hareketini hızlandırmak, ortodontik olarak indüklenmiş kök rezorbsiyonunu azaltmak, distraksiyon osteogenezinde (DO) kemik rejenerasyon sürecini hızlandırmak ve sabit ortodontik apareylerin neden olduğu oral ülserleri tedavi etmek olarak bildirilmiştir.

2.1.6.2.a. Ortodontik ağrının kontrolü: Ortodontik tedavi sırasında ağrıyla karşılaşılması olağandır ve bu durum bazı hastaların tedaviyi erken bırakmalarına dahi sebep olabilir. Ortodontik diş hareketi için gereken kuvvetlerin ağrı veya rahatsızlık hissi yaratması, diş hareketinin ancak bir enflamasyon sonucu gerçekleşebilmesiyle ve bu enflamasyon sırasında ağrıdan sorumlu olan çeşitli biyokimyasal medyatörlerin salınımıyla doğrudan ilgilidir. DSLT, ortodontik tedavi esnasında karşılaşılan ağrının kontrol edilmesinde farmakolojik ajanlara alternatif olarak sunulmuş yöntemlerden birisidir. Sakurai ve ark. (34) yaptıkları bir çalışmada DSLT'nin Siklooksijenaz-2'yi (COX-2) inhibe ederek prostaglandin E2 seviyesini azalttığı ve kan akımını arttırdığı, bunun sonucunda ise antienflamatuar yanıt oluşturduğunu bildirmişlerdir.

Nobrega ve ark. (35) 30 deney, 30 kontrol grubu olmak üzere toplam 60 hasta üzerinde gerçekleştirdikleri bir çalışmada, seperatör yerleştirilmesinden hemen sonra deney grubuna 830 nm dalga boyunda GaAlAs diyot lazer cihazı ile, kök apeks bölgesine 2 J/cm² dozunda tek spot ve kök ekseni boyunca 1 J/cm²'lik üç spot DSLT, kontrol grubuna ise aynı bölgede benzer prosedürlerle plasebo ışık uygulamışlardır. Deney grubundaki hastaların tüm ölçümlerinde ortalama ağrı skorları daha düşükken, tam ağrı yokluğu (skor =0) deney grubunda anlamlı seviyede daha yüksek bulunmuş ve 830 nm'lik bir ışınlamanın sabit ortodontik apareylerin yol açtığı ağrı hissini etkili bir şekilde kontrol ettiği sonucuna varılmıştır.

Qamruddin ve ark. (36) ortodontik tedavi amacıyla birinci premolar diş çekimi planlanmış, Sınıf 2 divizyon 1 malokluzyona sahip 20 hastanın dahil edildiği bir

çalışmada; distalizasyon sırasında kanin dişlerinin köklerine GaAlAs diyot lazer cihazı ile 5 bukkal-5 palatinal olmak üzere toplamda 10 noktadan her noktaya 3'er sn., 940 nm dalga boyunda, 7,5 J/cm^2 enerji düzeyinde ve sürekli modda DSLT uygulamışlardır. 3 haftada 1 kez olacak şekilde 9 hafta sürdürülen DSLT uygulamalarının bir sonucu olarak deney grubunda yer alan hastaların ağrı düzeyinde plasebo grubuna göre anlamlı seviyede bir düşüş gözlenmiştir. Bu sonuçlar Almallah ve ark. (37) tarafından yapılan ve tek doz lazer uygulaması sonrası ağrı düzeyinde %12 oranında bir azalma olduğunu bildiren çalışmanın sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir. Bununla birlikte literatürde; kanin retraksiyonu esnasında GaAlAs lazer cihazı ile, 810 nm dalga boyunda, 200 mW güçte, 21,4 J/cm^2 enerji düzeyinde DSLT uygulanmasının ağrı düzeyi açısından etkilerinin değerlendirildiği, ancak plasebo grubuyla aralarında anlamlı bir farklılığın gözlenmediği klinik çalışmalar da mevcuttur (38).

Kaya ve ark. (39), elastomerik separatör yerleştirilmesinin ardından dişeti oluğu sıvısının (DOS) interlökin 1-beta (IL-1β) ve substans P (SP) seviyelerine göre ibuprofen ve DSLT'nin etkinliklerini karşılaştırdıkları bir çalışmada; maksiller birinci molar dişlerin bantlanması için separatöre ihtiyaç duyan toplam 60 hastayı, "ibuprofen, lazer ve kontrol" gruplarına rastgele atayarak, ibuprofen ve kontrol gruplarına separatörden 1 saat önce sırasıyla 400 mg ibuprofen ve plasebo laktoz tabletleri kullandırırken, lazer grubuna separatörden hemen sonra tek bir doz DSLT uygulamışlardır. DOS örnekleri separatör yerleşiminden hemen sonra (0. gün) ve 1., 3. ve 7. günlerde toplanmış, ağrı yoğunluğu ise 1., 3. ve 7. günlerin 0., 2. ve 6. saatlerinde Görsel Analog Ölçeği (GAÖ) kullanılarak değerlendirilmiştir. Gruplar arası sonuçlar değerlendirildiğinde; IL-1β seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmezken, sadece ibuprofen grubunun SP seviyelerinde, 0. ve 1. günlerde anlamlı bir düşüş görülmüştür. GAÖ skorlarına göre ise ibuprofen grubu ağrı kontrolü açısından daha başarılı bulunmuştur.

2.1.6.2.b. Hızlı maksiller ekspansiyon sonrası kemik rejenerasyonunun hızlandırılması: DSLT'nin RME sonrası median suturda kemik rejenerasyonuna etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada, sutura 810 nm dalga boyuna sahip diyot lazer cihazı ile sürekli modda, 13 J/cm^2 enerji yoğunluğunda, her seans 15 sn. sürecek şekilde toplam 5 seans ışınlama yapılmıştır. Çalışmanın sonuçları median suturdaki kemik yoğunluğu açısından incelendiğinde, kontrol grubunda 3 ayda elde edilen stabilitenin lazer grubunda 1,5 ay sonra elde edilebildiği görülmüş ve RME sonrası DSLT

uygulanmasının retansiyon süresi ile stabilite açısından olumlu etkileri kaydedilmiştir (40).

Ratlarda DSLT'nin ekspansiyon üzerine etkilerini inceleyen bir başka çalışmada, 20 deney hayvanı araştırma ve kontrol olmak üzere rastgele 2 gruba ayrılarak araştırma grubuna dalga boyu 618 nm ve çıkış gücü 20 mW/cm^2 olan bir lazer cihazı ile her gün 20 dk. olacak şekilde 10 gün boyunca lazer uygulanmış, kontrol grubundaki hayvanlara ise plasebo ışınlama yapılmıştır. DSLT uygulamaları sonucunda, sutur bölgesinde kemik oluşumu, yeni kemik oluşumu miktarı, OB sayısı, OC sayısı ve damar sayısı histomorfometrik olarak değerlendirilmiş ve araştırılan parametrelerin tümü için araştırma grubunda kontrol grubuna kıyasla daha yüksek değerler izlenmiştir. DSLT'nin genişleme ve retansiyon dönemlerinin erken safhasında, ortopedik olarak genişletilmiş interpremaksiller suturda kemik oluşumunu uyarabileceği sonucuna varılmıştır (41).

Ferreira ve ark. (42) DSLT'nin RME sonrası midpalatal suturda kemik rejenerasyonu üzerine etkilerini incelemek için yaptıkları bir çalışmada, hasta popülasyonunu 10 deney ve 4 kontrol olmak üzere 2 gruba ayırmışlardır. Deney grubuna RME sonrası GaAlAs lazer cihazı ile 780 nm dalga boyunda, 70 mW güçte, 0,04 cm^2'lik bir spotta 12 seans DSLT uygulanmıştır. Midpalatal sutur kemik rejenerasyonu açısından 4 ay arayla tomografiyle değerlendirilmiş ve kontrol grubuyla karşılaştırıldığında deney grubunda kemiğin optik yoğunluğunun daha fazla olduğu görülmüştür. Çalışmanın bulgularına göre, DSLT'nin kemik onarım sürecini hızlandırarak, RME sonrası midpalatal suturun rejenarasyonu üzerinde olumlu bir etkiye sahip olduğu kaydedilmiştir.

2.1.6.2.c. Ortodontik diş hareketinin hızlandırılması: Fiziksel bir uyaran/kuvvet tarafından indüklenen diş hareketi, alveolar kemik, periodontal ligament, diş eti, vasküler ve nöral ağların fizyolojik ve patolojik reaksiyonlarını içeren bir dizi fenomenden oluşur. Yapılan sınırlı sayıda çalışmaya göre, DSLT'nin etkilerinin doza bağlı olduğu ve lazer cihazının "dalga boyu, çıkış gücü, frekansı, ışınlama dozu, prob boyutunun tipi" gibi parametreleri ile hedef dokunun "emilim katsayısı, yoğunluk, derinlik, kalınlık" gibi fiziksel özelliklerinin tüm bu biyolojik süreçleri stimüle veya inhibe edebileceği düşünülmektedir (43).

Zheng ve ark. (44) DSLT'nin ortodontik diş hareketi üzerine etkisini ve bunun DOS'taki IL-1β, NF-κB ligandının reseptör aktivatörü (RANKL) ve osteoprotegerin (OPG) seviyeleriyle korelasyonunu gözlemlemek amacıyla yapmış oldukları bir klinik çalışmada; ortodontik tedavi amacıyla 1. premolar diş çekimi planlanmış 12 hastayı random olarak 2 gruba ayırmışlardır. Deney grubuna diş çekimi sonrası kanin retraksiyon kuvvetini takip eden 0., 7., 14. ve 21. günlerde 810 nm dalga boyu, 100 mW güç çıkışı ve 6,29 J/cm^2 enerji yoğunluğunda, 4 noktadan 40'ar sn. DSLT uygulamışlardır. 28 gün boyunca kümülatif diş hareketi, lazer grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak daha yüksek bulunurken, lazer grubunun DOS örneklerinde OPG seviyelerinde önemli düşüşler ve IL-1β ile RANKL seviyelerinde anlamlı artışlar izlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre DSLT'nin periodonsiyumdaki biyostimülatör etkileri nedeniyle diş hareketini hızlandırdığı sonucuna varılmıştır.

Genc ve ark. (45) DSLT'nin ortodontik diş hareketinin hızı ve DOS'taki NO seviyeleri üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla yapmış oldukları bir çalışmada, maksiller 1. premolar dişleri çekilerek kanin distalizasyonu gerçekleştirilecek olan 20 hastayı 10 deney, 10 kontrol olmak üzere 2 gruba ayırmış ve deney grubuna 0., 3., 7., 14., 21. ve 28. günlerde GaAlAs diyot lazer uygulamışlardır. Deney grubunu sağ maksiller lateral dişlerin oluşturduğu, sol maksiller lateral dişlerin ise kontrol olarak ele alındığı çalışmada, deney grubundaki dişlere 20 mW güç yoğunluğu, 0,71 J/cm^2 enerji seviyesinde 5 bukkal-5 palatinal olmak üzere toplam 10 doz lazer uygulaması yapılmıştır. Yukarıda belirtilen günlerde DOS örnekleri alınan deney ve kontrol gruplarının NO seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmediği ve DSLT'nin ortodontik diş hareketini önemli ölçüde hızlandırdığı bildirilmiştir.

Alveolar kemik iyileşmesinde DSLT'nin etkisini gözlemlemek için yapılan bir rat çalışmasında, 60 deney hayvanı deney ve kontrol olmak üzere 2 gruba ayrılmış ve deney grubunda yer alan hayvanların sol üst birinci molar dişleri çekilerek çekim bölgesine 830 nm dalga boyuna sahip GaAIAs lazer cihazı ile 30 mW güç yoğunluğunda, 54 J/cm^2 enerji düzeyinde art arda 3 doz (toplamda 216 J/cm^2) ışınlama yapılmıştır. Çalışmanın sonucunda DSLT'nin, olgun kollajen lif demetleri ve erken yeni kemik oluşumunu stimüle ederek kemik iyileşmesini hızlandırdığı görülmüştür. Histomorfometrik analiz, kontrol grubuna kıyasla lazer uygulanan alveol kemiğin OB

ve OC aktivitesinde ve süngerimsi kemik alan yüzdesinde istatiksel olarak anlamlı bir artış olduğunu ortaya koymuştur. Bu sonuç DSLT'nin GaAlAs diyot lazer cihazı ile uygulanmasının, alveolar bölgede kemik iyileşmesini ve mineralizasyonu arttırdığına işaret eder (46).

Maksillofasiyal bölgede DSLT uygulamalarının kemik onarımı üzerine etkilerini inceleyen bir derlemede; seçilen 15 çalışmadan 6'sında kemik onarımının hızlandığı bildirilmiştir (primer sonuçlar). Diğer 9 çalışmada ise DSLT uygulandıktan sonra maksillofasiyal bölgede antienflamatuar, analjezik ve iyileşme hızlandırıcı etkiler ve ağız sağlığıyla ilişkili yaşam kalitesi dahil olmak üzere iyileşmeyle ilgili ikincil parametreler (ikincil sonuçlar) değerlendirilmiş ve DSLT'nin herhangi bir olumsuz veya yan etkisinin bulunmadığı bildirilmiştir. Ancak yine de DSLT uygulama protokollerinin standardize edilmesi gerektiğine vurgu yapılmıştır (47).

2.1.6.2.d. Ortodontik olarak indüklenmiş inflamatuar kök rezorpsiyonunun (OOİİKR) azaltılması: Ortodontik diş hareketi esnasında DSLT uygulanan ve uygulanmayan hastaların kuvvet uygulanan dişlerinin kök yüzeylerini eksternal kök rezorpsiyonu açısından karşılaştırmayı amaçlayan bir çalışmada, deney grubuna indiyum-galyum-arsenid (InGaAs) lazer cihazı ile 980 nm dalga boyunda, 100 mW'luk enerji düzeyinde, 0., 3., 7., 11., 15. ve 28. günlerde ışınlama yapılarak 28. gün sonunda sonuçlar değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonucunda deney grubunda yer alan dişlerde kontrol grubuna kıyasla %32,78 daha az sayıda rezorpsiyon krateri ve %39,49 daha az oranda rezorpsiyon krater hacmi oluştuğunun görülmesi, DSLT'nin ortodontik diş hareketi sırasında eksternal kök rezorpsiyonunu azalttığının bir göstergesi olarak kabul edilmiştir (48).

Öztürk ve ark. (49) tek dalga boyu FBM ve kümülatif artan dalga boyu FBM'nin OOİİKR üzerindeki onarıcı ve inhibitör etkilerini değerlendirmek amacıyla yaptıkları çalışmada; 33 Wistar albino ratını, tedavi edilmeyen grup (negatif kontrol), sadece relaps grubu (pozitif kontrol), sadece retansiyon grubu (pozitif kontrol-2), tek dalga FBM grubu (650 nm, 100 mW/cm^2) ve kümülatif dalga FBM grubu (532-650-940 nm, 100 mW/cm^2) olmak üzere 5 gruba ayırarak 10 gün süreyle ratlarda deneysel ortodontik diş hareketini indüklemişler ve eş zamanlı olarak retantif ve terapötik yaklaşımlarda bulunmuşlardır. Pozitif kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında FBM uygulamaları ile rezorpsiyon laküna hacmi, rezorpsiyon laküna sayısı ve rezorpsiyon laküna yüzdesinin

azaldığı görülürken, FBM gruplarının RANKL ve COX-2 ekspresyon seviyelerinde de anlamlı ölçüde düşüş gözlenmiştir. Buna karşın OPG ekspresyon seviyelerinde ve OPG/RANKL oranlarında anlamlı bir değişiklik bulunmamıştır. Farklı dalga boylarının etkilerinin birbirine benzer olduğunu ortaya koyan bu çalışma, FBM uygulamalarının, RANKL ve COX-2 ekspresyon seviyelerini modüle ederek OOİİKR üzerinde belirgin inhibitör ve onarıcı etkiler gösterdiğini bildirmiştir.

Fotobiyomodülasyonun OOİİKR onarımı üzerine etkilerini değerlendirmek amacıyla 20 rat üzerinde yapılan bir çalışmada, deney hayvanları 4 gruba ayrılarak 40 adet sağ ve sol üst birinci molar dişler değerlendirilmiştir: DSLT grubunda yer alan hayvanlar 810 nm dalga boyuna sahip GaAlAs diyot lazer cihazı ile spot başına 1,5 J enerji, 100 mW güç yoğunluğu, 15 sn. süre, 75 J/cm^2 enerji yoğunluğu ile 7 gün boyunca 48 saatte bir ışınlanmıştır. Histomorfometrik ve immünohistokimya analizleri, negatif kontrol grubuna kıyasla tüm gruplarda kök rezorpsiyon alanının arttığını gösterirken, geleneksel tedavide distal kökün basınç tarafında DSLT'ye kıyasla daha fazla kök rezorpsiyon lakünaları izlenmiştir. DSLT grubunda basınç tarafında OPG daha yüksek bulunurken, gerilim tarafında RANKL ekspresyonunun daha düşük olduğu gözlenmiş ve DSLT'nin, basınç alanındaki OPG ekpresyonunu artırarak ve kök yüzeyindeki klastik hücrelerin sayısını azaltarak kök rezorpsiyonunun ilerlemesini potansiyel olarak yavaşlatabileceği sonucuna varılmıştır (50).

2.1.6.2.e. Distraksiyon osteogenezinde kemik rejenerasyon sürecinin hızlandırılması: Eksternal distraktörlerle desteklenen unilateral mandibular osteotomide DSLT uygulamalarının histopatolojik etkilerini araştırmak amacıyla 20 adet Yeni Zelanda tavşanının dahil edildiği bir çalışmada, eksternal distraktörler unilateral mandibuler korpus osteotomisini takiben hayvanların sağ mandibulasına yerleştirilerek aktive edilmiştir. Deney grubundaki hayvanlara transkutanöz olarak 6 farklı noktadan 820 nm dalga boyuna sahip GaAIAs lazer cihazı ile 150 mW/cm^2 güç, 36 J/cm^2 enerji yoğunluğunda 40'ar sn. DSLT uygulanmış; osteoblastik aktivite ve trabeküler kemik oluşumu, kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Böylece DO'nun aktivasyon döneminde DSLT uygulamalarının, intramembranöz iyileşmeyi indükleyerek DO'nun erken evrelerinde kemik onarımını uyaracağı sonucuna varılmıştır (51).

Distraksiyon osteogenezi sırasında lazer biyostimülasyonuna kemiğin verdiği cevabı değerlendirmek için 30 melez köpek üzerinde yapılan bir çalışmada; mandibular 2. ve 3. premolarlar arasına yerleştirilen distraktörler aktive edilerek deney grubuna 970 nm dalga boyuna sahip diyot lazer cihazı ile 2 W güç ve 840 J total enerji düzeyinde ışınlama yapılmıştır. Histopatolojik kesitler incelendiğinde, benzer prosedürler uygulanan ancak ışınlama yapılmayan kontrol grubuna kıyasla deney grubunda; artış gösteren OB proliferasyonu, farklılaşması, intramembranöz ossifikasyon hızı ve neoanjiyogenez yoluyla lazerin yeni kemik üzerinde biyouyarıcı etkilere yol açtığı görülmüştür. Histomorfometrik olarak ise kemik trabeküler toplam alanı ve rejenerasyonunun lazer gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermesi, DSLT'nin oluşan yeni kemiğin kalitesi ve miktarı üzerinde belirgin bir etkiye sahip olduğunun, kemik rejenerasyonunun erken stabilitesine yol açtığının ve tedavi süresini kısalttığının işaretidir (52).

2.1.6.2.f. Yara iyileşmesinin desteklenmesi: Lazer uygulamalarının hücre proliferasyonu ve yara iyileşmesi üzerindeki biyostimülatör etkileri birçok çalışmada rapor edilmiştir. Bununla birlikte, bu mekanizmanın moleküler temeli hakkında çok az şey bilinmektedir. Ratlar üzerinde yapılan bir çalışmanın bulguları, DSLT'nin IL-1β ve interferon-γ üretimi üzerindeki inhibitör etkisinin ve dönüştürücü büyüme faktörü (TGF-β) ile trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) üzerindeki stimulatör etkisinin yara iyileşmesi sürecindeki rejeneratif ve antienflammatuar yanıttan sorumlu olabileceğini düşündürmektedir (53).

Maloklüzyondan muzdarip kronik periodontitisli (KP) hastalarda kombine ortodontik/rejeneratif tedavi ile kemik içi yara iyileşmesinin desteklenmesinde 940nm düşük seviyeli diyot lazer biyostimülasyonunun etkinliğini değerlendirmek amacıyla yapılan bir çalışmada, en az 2 kemik içi defekte sahip ve ortodontik tedavi ihtiyacı bulunan 15 KP'li yetişkin hasta çalışmaya dahil edilerek toplam 30 defekt üzerinde tedavi gerçekleştirilmiştir. DSLT uygulanan ve uygulanmayan kombine ortodontik rejeneratif tedavi gören hastaların sert ve yumuşak doku ölçümleri (sondalama derinliği, klinik ataşman seviyesi ve kemik yoğunluğu) değerlendirildiğinde, lazer grubunda sondalama derinliğinin azalması açısından kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülemezken, klinik ataşman seviyesi kazanımı ve kemik yoğunluğu

açısından lazer grubu kontrol grubundan daha başarılı bulunarak klinik ve radyografik parametrelerinde iyileşmeler gözlendiği bildirilmiştir (54).

Ortodontik diş çekimi sonrası kriyoterapi ve DSLT uygulamalarının ağrı ve iyileşme üzerine etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada, ortodontik tedavi amacıyla premolar dişlerinin çekimi planlanan 62 hastanın bilateral ekstraksiyon bölgeleri biri deney (DSLT veya kriyoterapi) diğeri kontrol olacak şekilde 2 gruba ayrılmıştır. Hastaların ağrı düzeyleri 7 gün boyunca GAÖ ile değerlendirilirken, yara iyileşme düzeyleri 4., 7. ve 14. günlerde modifiye yara iyileşme skalası kullanılarak değerlendirilmiştir. Ağrı skorları açısından sonuçlar değerlendirildiğinde tüm günlerde kriyoterapiye kıyasla DSLT daha başarılı bulunmuştur. Yara iyileşme düzeyi açısından sonuçlar değerlendirildiğinde ise kriyoterapiye kıyasla DSLT'nin 7. ve 14. günlerde istatisiksel olarak anlamlı bir farklılık gösterdiği ve yara iyileşme sürecini desteklediği bildirilmiştir (55).

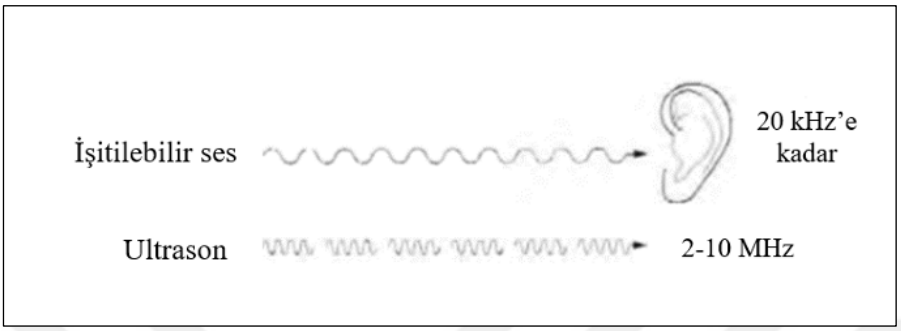
In vitro çalışmalar, hayvan deneyleri ve randomize kontrollü klinik çalışmalardan elde edilen birçok olumlu bulgu raporuna rağmen, DSLT'nin biyokimyasal etki mekanizmalarının altında yatan nedenler tam olarak anlaşılamadığı için DSLT uygulamaları hala tartışmalıdır. Bununla birlikte dalga boyu, akıcılık, güç yoğunluğu, titreşim yapısı ve uygulama süresi gibi çok sayıda parametre arasından seçim yapmanın karmaşıklığı, DSLT ile ilgili yapılan birçok olumlu çalışmanın yanı sıra bir dizi olumsuz sonucun da yayınlanmasına yol açmıştır.

2.2. DÜŞÜK YOĞUNLUKLU KESİKLİ ULTRASON

2.2.1. Ultrasonun Tanımı ve Tarihçesi

Ultrason, insan kulağının ayırt edebildiği üst sınır olan 20 kHz üzeri seslerin genel adıdır. Diagnostik ultrasonografi (USG) ya da diğer adıyla sonografi elde edebilmek amacıyla klinik olarak uygulanan 2-10 MHz aralığındaki ses dalgaları (Şekil 2.6), biyolojik dokulara iletilerek çeşitli metabolik aktiviteleri harekete geçirir (56). Saniyede ortalama 1000 kez tekrarlanan ve titreşim süresi yaklaşık 1 μs olan ses dalgaları dokulardan farklı hızlarda geçerek, her dokuda "yansıtma, saçılma" gibi farklı cevaplara neden olmaktadır (57). X-ışınlı görüntüleme yöntemlerinde imaj, dokudan geçen ışınlar tarafından oluşturulurken; ultrasonografik görüntülemede imaj, yansıyan

ses dalgaları tarafından meydana getirilir. Dokuların akustik geçirgenliğine bağlı olarak USG ile özel görüntülerinin elde edilebilmesinin yanı sıra, patolojik değişimleri de aynı şekilde bu yöntemle izlenebilmektedir (56).



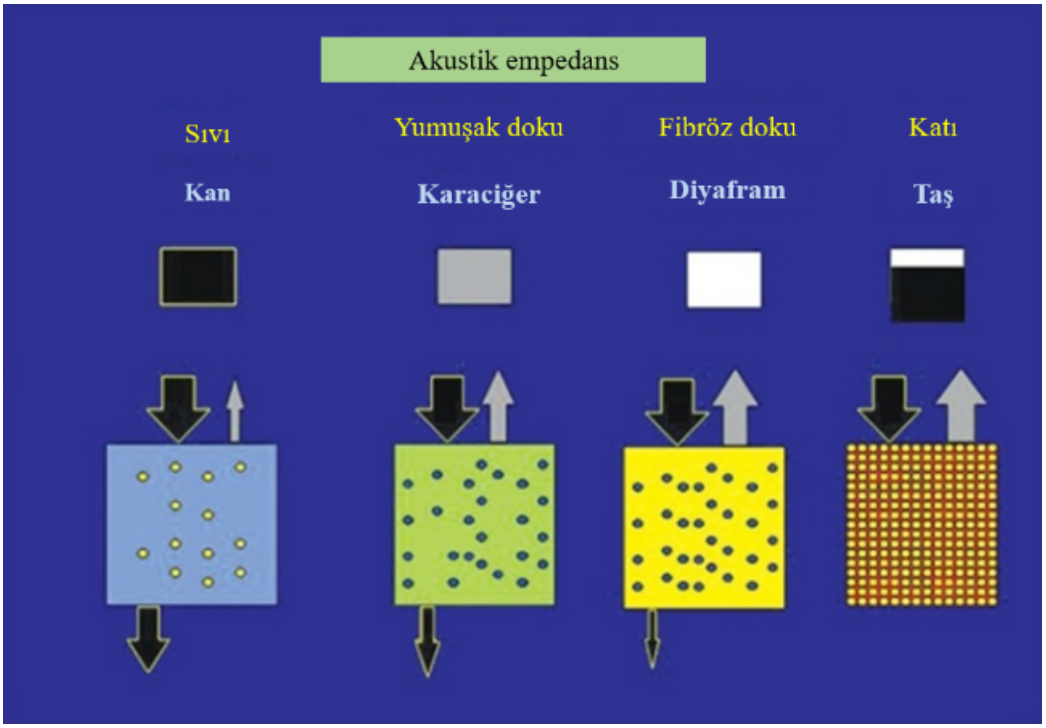
Şekil 2.6: Ultrason frekansı ile işitilebilir ses dalgalarının karşılaştırılması (57)

Ultrasonun temel prensip ve uygulamalarının ilk kez 1880 yılında Curie kardeşler tarafından keşfedilmesinin ardından, 1937 yılında Avustralyalı Theodore Dussik tıbbi ultrason görüntülemesini tanımlayan ilk kişi olmuştur (58). II. Dünya Savaşı'ndan sonra modern ultrason teknolojisinin gelişmeye başlamasıyla 1963 yılında Baum ve ark. (59) ilk defa diş hekimliğinde tanısal USG bulgularını rapor etmişlerdir. 1971 yılında USG'nin anne karnında gelişmekte olan bebeğin incelenmesinde kullanılması tüm dünyada gebelik takiplerinde bir devrim yaratmıştır. Kolay tekrarlanabilir, ucuz, non-invaziv ve ağrısız bir yöntem olmasının yanı sıra radyasyon içermemesi sebebiyle ultrason, tıbbın birçok alanında tanı ve tedavi amacıyla yaygın olarak tercih edilen bir yöntem olmuştur.

2.2.2. Ultrasonun Fiziği

Ultrason bir dalga olduğu için, tıpkı bir elektromanyetik dalga veya radyasyon gibi enerji iletir. Bununla birlikte, elektromanyetik dalganın aksine, ses içinde hareket edebileceği bir ortama ihtiyaç duyması nedeniyle boşlukta yayılamaz. Ultrasonik dalgalar üreten ve dokudan yansıyan ekoları karşılayan tıbbi ultrason cihazları genel olarak, kesitin anatomik yerine göre 2 boyutlu siyah-beyaz görüntü veren parlaklık modunda (B modu) kullanılmaktadır. Her biri 1 mm'den küçük olan bu ince kesitler sagital, koronal, transversal veya oblik olabilir. Ses dalgaları, ultrason transdüserinin

elektrik sinyallerini mekanik titreşimlere ve mekanik titreşimleri elektrik sinyallerine dönüştüren piezoelektrik kristallerinden yayılır (60). Vücut dokularından geçerken cihazın ekranında bir görüntü oluşturarak dönüştürücüye geri yansıtılan ultrason dalgaları, içinden geçtiği materyalin yoğunluğuna göre değişen ve "akustik empedans" (Şekil 2.7) olarak tanımlanan bir dirençle karşılaşır (61).



Şekil 2.7: Farklı materyal yoğunluklarında görülen akustik empedans

Materyal ne kadar solid olursa parçacık yapıları da o kadar yoğun olacağından, sonografik dalgaların geri yansıma miktarı materyalin soliditesiyle artar. Buna karşın sıvı, solid materyalden daha çok ses dalgası ilettiği için sonografik dalgaların geri yansıma miktarı azalır ve ekojenik siyah bir görüntü üretilir. Taşlar ve kemiklerin sıvıya göre ses dalgasını geri yansıtma miktarının fazla olması; beyaz ve parlak görüntülerin üretilmesine yol açar. Hava ise arkasındaki yapıları görselleştirmeyi zorlaştıran güçlü bir ultrason ışını reflektörüdür (62,63).

Emisyonu sürekli veya kesintili olabilen ultrason dalgalarının ultrason transdüserlerinden yayılma şeklini kontrol etmenin farklı yöntemleri vardır. Ultrason

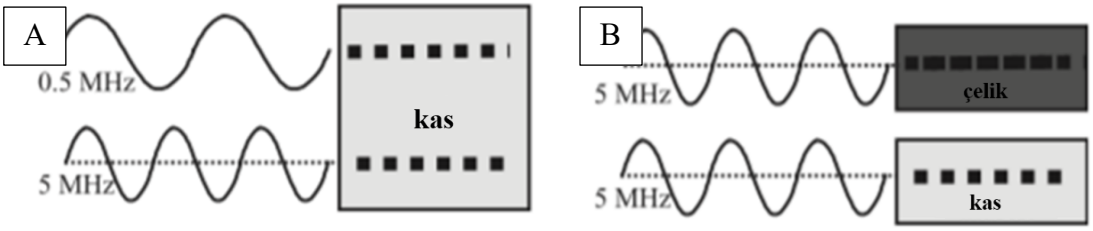
dalgalarının kesintili emisyonu B modunda görüntüler oluştururken, sürekli emisyon Doppler modunu oluşturur. Belirli bir zaman içinde bir çizgiyi görüntülemeye ise hareketli mod (M modu) denir (62). Görüntülerin penetrasyonu ve çözünürlüğü, ultrason dalgalarının frekansını değiştirerek kontrol edilebilir. Yüksek frekanslı transdüserler kullanıldığında çözünürlük artıp penetrasyon derinliği azalırken, düşük frekanslı transdüserler kullanıldığında bunun tam tersi bir sonuç alınır. Bu nedenle obez hastalar ve derinlerde yer alan dokular için düşük frekanslı probların, yüzeysel yapılar içinse yüksek frekanslı probların kullanılması yerinde olacaktır (64).

2.2.3. Ultrason Dalgasının Yayılımı

Ultason, doku boyunca boylamsal bir dalga olarak hareket eden ve alternatif kompresyona (yüksek basınç) ve rarefaksiyona (düşük basınç) neden olan bir tür mekanik ses enerjisidir. Ses yayılımı, karakteristik basınç (P), frekans (f), dalga boyu (λ), periyot (T) ve yayılım hızı (V) ile sinüzoidal bir dalga formu kullanılarak tanımlanabilir (65).

2.2.3.1. Frekans: Bir saniyede meydana gelen döngü sayısı veya basınç değişiklikleri ultrason dalgasının frekansı olarak adlandırılır. Birimi hertz veya saniyedeki devir sayısı olan frekans, sesin içinde bulunduğu ortam tarafından değil, yalnızca ses kaynağı tarafından belirlenir. Klinik amaçlar için kullanılan tipik ultrason frekansları 2-10 MHz aralığındadır (66). En sık kullanılan tedavi frekanslarının 1 ve 3 MHz olduğu dikkate alındığında, uygulama yapılacak dokunun derinliğinin frekans seçiminde etkili olduğu göz önünde bulundurulmalıdır. 3 MHz frekanstaki ultrason dokularda daha hızlı emildiğinden yüzeysel lezyonların tedavisinde, 1 MHz frekanstaki ultrason dokularda daha yavaş emildiğinden derinlerde yer alan lezyonların tedavisinde kullanılır. Hedef doku cilt yüzeyinin 2 cm içindeyse 3 MHz frekansla yapılan tedaviler etkili olurken, daha derin dokulara yönelik tedaviler 1 MHz ultrason ile başarılı bir şekilde gerçekleştirilebilir (67).

2.2.3.2. Yayılma hızı: Yayılma hızı, sesin bir ortamdan geçebildiği hızdır ve yumuşak doku için tipik olarak 1540 m/sn. olarak kabul edilir. Hız, yalnızca ortam özellikleriyle (Şekil 2.8), özellikle yoğunluk ve sertlikle belirlenir.



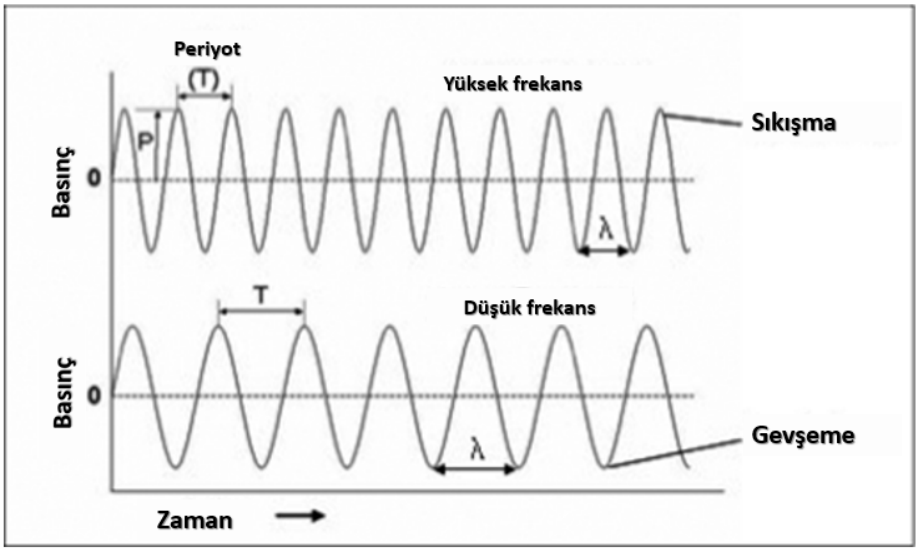
Şekil 2.8: Ultrasonun farklı ortamlarda yayılma hızı

Not: **A)** Belirli bir otamda aynı hızda hareket eden farklı frekanslara sahip akustik dalgalar **B)** Farklı ortamlarda eşit olmayan hızlarda hareket eden akustik dalgalar (66)

2.2.3.3. Dalga boyu: Frekans ile ters orantılı olan dalga boyu "sesin bir döngüde kat ettiği mesafe" olarak tanımlanabilir. Frekans yükseldikçe dalga boyu kısalarak daha yüzeysel dokulara penetre olur, ancak dalga boyu uzadıkça penetrasyon derinliği de artacaktır (66). Frekans, hız ve dalga boyu birbiriyle ilişkilidir ve matematiksel olarak "V=F.λ" şeklinde ifade edilir.

2.2.3.4. Periyot: Bir tam dalganın oluşması için geçen süreye periyot denir. Frekans ile ters orantılı olan periyotun birimi saniyedir. Frekans ile periyot arasındaki ilişki T=1/F olarak özetlenebilir (65).

2.2.3.5. Basınç: Genlik olarak da bilinen basınç (Şekil 2.9), periyodik bir harekette bir dalganın tepesinden çukuruna kadar olan düşey uzaklığın yarısını temsil eder (65).



Şekil 2.9: Ses yayılımı (65)

2.2.3.6. Mod: Ultrasonun termal etkisinin istenip istenmemesine göre sürekli veya kesikli olmak üzere 2 modu bulunmaktadır. Sürekli modda tedavi boyunca ses enerjisi sabit kalmaktadır, kesikli modda ise enerjinin iletilmediği sessiz dönemler vardır. Tablo 2.2'de farklı çalışma modlarında yer alan DYKU atım oranları ve görev döngüleri listelenmiştir (67).

Tablo 2.2: Ultrason cihazının farklı çalışma modları

MOD	ATIM ORANI	GÖREV DÖNGÜSÜ
Sürekli	1:1	100%
Kesikli	1:2	50%
	1:3	33%
	1:4	25%
	1:5	20%
	1:10	10%

2.2.3.7. Dalga gücü: Bir dalganın gücünü tanımlayan üç parametre vardır: genlik, güç ve yoğunluk. *Genlik*; dalganın boyutudur ve dalganın ortalama ve maksimum değerleri arasındaki fark grafiksel olarak tanımlanır. *Güç*; birim zamanda üretilen enerjidir (Joule/saniye) ve Watt olarak ifade edilir. Örneğin daha parlak görüntüler oluşturmak için cihazın çıkış gücü değiştirilebilir (68). Dönüştürücünün piezoelektrik kristallerine giden voltajının artırılması titreşim kuvvetinin artmasına yol açarak vücuda daha güçlü ses dalgalarının iletilmesine neden olur (69). *Yoğunluk*; bir ses demetinin enine kesitindeki enerji konsantrasyonunu temsil eder ve matematiksel olarak gücün ses dalgasının enine kesit alanına bölünmesiyle tanımlanır (68).

Optikte, tek bir frekansın ışık radyasyonu saf bir renge karşılık gelir; aynı şekilde, mükemmel sinüzoidal bir akustik dalga saf bir tona karşılık gelir. Birçok monokromatik ışık kaynağı mevcut olmasına rağmen, akustik kaynaklar için aynı şey geçerli değildir. Gerçek bir kaynaktan yayılan ses, farklı frekans, genlik ve sürelerdeki birçok titreşimin üst üste gelmesinden kaynaklanır. Bu nedenle sesi nicel olarak tanımlamak son derece karmaşık bir iştir ve farklı fiziksel niceliklerin sonlu zaman, uzay veya frekans aralıklarında ortalamasını alarak yaklaşık bir yolla çözülebilir (70).

2.2.4. Düşük Yoğunluklu Kesikli Ultrason

Tıp alanında ultrason, dalga biçimine göre (sürekli ve kesikli) veya uygulama amacına göre (tanısal, operatif ve terapötik) sınıflandırılır. DYKU içinden geçtiği dokuda mikromekanik gerilim üreten ve biyokimyasal olaylara yol açan akustik bir dalga şekline sahiptir (56). Terapötik ultrason tiplerinden biri olan DYKU; 1,5 MHz frekansa, 1 kHz'de tekrarlanan 200 μs'lik bir atım genişliğine, 30 mW/cm^2'lik uzaysal ve 20 dk./gün'lük zamansal ortalama yoğunluğa sahip tıbbi bir teknolojidir. Kemik kırıklarının tedavisi için non-invaziv ve güvenli bir terapötik teknik olan DYKU'nun; dişeti hücreleri, periodontal ligament hücreleri, sementoblastik hücreler, odontoblast benzeri hücreler, kondrositler, kemik hücreleri, kas hücreleri, mezenkimal kök hücreler ve sinovyal membran hücreleri dahil olmak üzere çok çeşitli hücre tiplerini uyardığı bildirilmiştir (71-79).

Ultrasonik dalgaların canlı dokularda mekanik uyaran ürettiği ve doku iyileşmesini teşvik eden biyokimyasal olaylara neden olduğu kabul edilmiştir. DYKU ile uyarılan doku onarımında yer alan biyolojik mekanizmalar yeterince ortaya çıkarılamamış olmakla birlikte, DYKU'nun neden olduğu biyofiziksel etkilerin büyük olasılıkla mekanik stres ve/veya sıvı mikroakışından kaynaklandığı bilinmektedir (80).

1964 yılında Shiro (81) tarafından yapılan bir çalışma ile, ultrasonun kemikte yarattığı termal etkilerin en aza indirgenebilmesi için, ultrasonun yoğunluğunun azaltılması ve kesikli (pulsed) şekilde uygulanması gündeme gelmiştir. Diş hekimliğinde ise terapötik ultrasonun; periodontal hastalıklar, yara iyileşmesi, tükürük bezi hastalıkları, tempromandibular eklem rahatsızlıkları, dentin ve pulpanın rejenerasyonu, DO sonrası iyileşme, dental implant sonrası osseointegrasyon ve doku mühendisliği alanlarında kullanıldığı bilinmektedir.

2.2.4.1. Ortodontide düşük yoğunluklu kesikli ultrason uygulama alanları: Ortodontide DYKU'nun yaygın kullanım alanları; OOİİKR'nin iyileştirilmesi, ortodontik diş hareketinin hızlandırılması, mini vida uygulamalarında stabilizasyon sağlanması, DO sonrası iyileşme, sabit ortodontik tedavi sürecinde gingival sağlığın kontrolü ve ortodontik tedavide ağrının hafifletilmesi olarak sıralanabilir.

2.2.4.1.a. Ortodontik olarak indüklenmiş inflamatuar kök rezorbsiyonunun azaltılması: Kök rezorpsiyonu ortodontik diş hareketinin istenmeyen yan etkilerinden birisidir. Hücre kültürü deneylerinde DYKU uyulamalarının osteoklastik yanıtı eş

zamanlı olarak azalttığı görülmüştür. İletilen ultrasonografik titreşimler lokal mikroçevre stresini değiştirebilir ve hücresel düzeyde biyolojik reaksiyonlara neden olabilir. Canlı dokularda bariz bir termal reaksiyon oluşturan terapötik ultrason, antienflamatuar etkileri, uyarıcı büyüme faktörünü ve kemik protein ekspresyonunu artırarak iyileşme sürecini hızlandırır (82). DYKU'nun OOİİKR'nin iyileşme sürecine etkisini araştıran bir çalışmada, ortodontik tedavi öncesi premolarların çekiminin gerektiği 12 hastanın çenesinin bir tarafına DYKU uygulanırken, diğer taraf kontrol grubu olarak tasarlanmıştır. 4 hafta sonra, tüm hastaların deneysel premolarları çıkarılarak 6 hastanın premolarları taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile diğer 6 hastanın premolarları ise histolojik olarak incelenmiştir. SEM çalışması, DYKU'ya maruz kalan premolarlarda rezorpsiyon alanlarında ve rezorpsiyon laküna sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğunu gösterirken, histolojik incelemede rezorbe olmuş kök yüzeyinin hipersementozla iyileştiği görülmüştür. Bu çalışmanın sonuçları, insanlarda kök rezorpsiyonunu azaltmak için non-invaziv bir yöntem olarak DYKU'nun uygulanabileceğini göstermektedir (83).

Dahhas ve ark. (84) DYKU'nun ortodontik diş hareketi ve OOİİKR üzerine etkilerini araştırdıkları, 48 adet ovaryektomili ve osteoporotik Wistar ratı üzerinde gerçekleştirdikleri çalışma sonucunda; ovaryektominin OOİİKR'yi artırdığı, DYKU'nun ise ovaryektomiden bağımsız olarak kök hacim kaybını azalttığı ve diş hareketini normalleştirdiğini belirleyerek postmenopozal osteoporozu olan kadınlarda bu tür uygulamaların faydalı olabileceğini bildirmişlerdir.

2.2.4.1.b. Ortodontik diş hareketinin hızlandırılması: Ratlar üzerinde yapılan bir çalışmada, DYKU'nun kemik morfogenetik proteini (BMP-2) ve RANKL ekspresyonunu önemli ölçüde arttırarak alveolar kemik remodelingini geliştirdiği ve ortodontik diş hareketini artırdığı saptanmış, DYKU'nun ortodontik diş hareketini hızlandırmak için yeni bir destekleyici terapi olabileceği ve bu sayede daha hızlı ortodontik diş hareketi sağlanabileceği bildirilmiştir (85).

Alshihah ve ark. (86) DYKU'nun ortodontik kuvvet uygulaması esnasında dentoalveolar sistem üzerine etkilerini araştırmak için 6 normal, 6 diyabetik ve 6 insülin tedavili diyabetik olan toplam 18 rat üzerinde yapmış oldukları bir çalışmada, her gruptaki ratları rastgele 2 gruba ayırarak bir gruba günde 10 dk. DYKU uygulamış ve diğer grubu kontrol olarak bırakmışlardır. Tüm çalışma grupları için DYKU tedavisi,

gerilim tarafında predentin ile sement kalınlığını önemli ölçüde artırmış ve kemik remodelingini iyileştirmişken, basınç tarafında odontoblast, sub-odontoblast ve PDL hücre sayılarını ve kemik rezorpsiyon lakünalarını artırarak ortodontik tedavi sürecinin hızlandırılmasında etkili bulunmuştur.

Şeffaf plakla ortodontik tedavi gören hastalarda DYKU uygulaması ile genel tedavi süresinde bir azalma olup olmadığını belirlemek amacıyla 34 hastaya evde günlük 20 dk., 1,5 MHz frekans, 200µs atım süresi, 1 kHz atım tekrarlama hızı ve 30mW/cm^2 yoğunlukta DYKU uygulaması yaptırılmıştır. Tedavi süresinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı ölçüde azaldığı ve DYKU grubunda tedavi süresinin ortalama %49 oranda azalma gösterdiği bildirilmiştir (87).

2.2.4.1.c. Mini vida uygulamalarında stabilizasyon sağlanması: Titanyum (Ti) ve paslanmaz çelik (SS) mini vidaların implantasyonundan sonra DYKU uygulamasının kemik oluşumu üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla yapılan bir çalışmada, ratların kaval kemiğine mini vidalar yerleştirildikten sonra 1,5 MHz frekans, 30 mW/cm^2 yoğunluk, 1:4 görev döngüsünde günlük 20 dk. DYKU uygulaması yapılmıştır. Mini vidaların etrafındaki kemik morfolojisi, SEM ve 3 boyutlu mikro-bilgisayarlı tomografi (mikro-BT) ile değerlendirildiğinde, mini vida yerleştirilmesinin ardından 3. günden 14. güne kadar mini vida-kemik entegrasyonunun kademeli olarak arttığı görülmüştür. DYKU uygulamasının, Ti ve SS mini vidaların implantasyonundan sonra kortikal kemik yoğunluğunu, kalınlığını ve oluşum hızını arttırdığı bildirilmiştir. Bununla birlikte 3. günde OB öncüsü hücrelerde alkalen fosfataz (ALP) artışına neden olduğu tespit edilen terapötik ultrason uygulamalarının ortodontik mini vidaların stabilizasyonuna katkı sağlayabileceği bildirilmiştir (88).

Miura ve ark. (89) DYKU'nun ortodontik mini vidaların stabilitesi üzerindeki etkilerini değerlendirmek için 7 rat üzerinde yaptıkları bir çalışmada, ratların sağ ve sol tibialarına 1,4 mm çapında, 4 mm uzunluğunda 14 adet mini vida yerleştirmiş ve bu bölgelerde sağ tibiayı uyarmak için DYKU kullanılırken sol tibiayı kontrol grubu olarak bırakmışlardır. Kemik-mini vida arayüzünü değerlendirmek için SEM görüntüleri ve mini vidaların stabilitesini değerlendirmek için bir mobilite test cihazı kullanmışlardır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında DYKU ile tedavi edilen grupta anlamlı ölçüde daha düşük mobilite gözlenirken, histomorfometrik değerlendirme kemik-mini vida entegrasyonunun DYKU ile tedavi edilen grupta kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde

daha iyi olduğu bildirilmiştir. DYKU'nun büyümekte olan ratlarda kemik-mini vida temasını arttırmayı ve mini vidaların hareketliliğini azaltmayı başardığı rapor edilmiştir.

2.2.4.1.d. Distraksiyon osteogenezi sonrası iyileşme: Yapılan bir çalışmada, tavşanlarda mandibulanın sağ tarafına DO ve günlük 20 dk.lık 1,5 MHz frekans, 30 mW/cm^2 yoğunlukta DYKU uygulanarak distraksiyon boşluğundaki yeni kemik oluşumu radyografi, mikro-BT taraması, mikro sertlik testi ve histolojik incelemeyle değerlendirilmiştir. Distraksiyondan sonraki 0. hafta ve 2. haftada tedavi gruplarının daha yüksek radyoopasite ve mikro sertlik gösterdiği ve bu gruplarda histolojik incelemede daha fazla kemik oluşumu saptandığı bildirilmiştir (90).

DYKU'nun mandibular distraksiyonda osteogenezi stimüle edip etmediğinin araştırıldığı bir çalışmada, 9 hastaya dikey mandibular distraksiyon uygulanarak distraksiyonun ilk gününden itibaren 1,5 MHz frekans, 200 μs atım süresi, 30 mW/cm^2 yoğunluk, 1:4 görev döngüsü, 20 dk./gün DYKU veya plasebo ışınlama yapılmıştır. Çalışmanın sonucunda DO sonrası distraksiyon boşluğunda woven kemik izlenebiliyor olmasına rağmen gruplar arasında belirgin bir fark bulunamadığı kaydedilmiştir. Ultrasonografik değerlendirme ile distraksiyon boşluğu içindeki osteogenez 4-20 hafta aralığında takip edilmiş ve ultrason ile plasebo grupları arasında anlamlı farklılık bulunamadığından ultrason tedavisinin DO sonrası kemik oluşumunu uyarmadığı bildirilmiştir (91).

2.2.4.1.e. Mandibular kondiller büyümenin hızlandırılması: Genç erişkin ratlarda 1,5 MHz frekans, 200 μs süre, 1 KHz tekrarlama oranı, 30 mW/cm^2 yoğunluk ile 4 hafta DYKU uygulamasını takiben mandibuladaki potansiyel büyüme değişikliklerin değerlendildiği bir çalışmada 19 rat; 10 deney ve 9 kontrol olacak şekilde gruplara ayrılmıştır. Deney grubundaki hayvanların kondilleri, arka arkaya 28 gün boyunca her gün 20 dk. olmak üzere iki taraflı olarak DYKU ile tedavi edilmiştir. Morfolojik değerlendirmeler, DYKU grubunda özellikle ana kondiler büyüme yönünde istatistiksel olarak anlamlı olmayan hafif bir artış olduğunu gösterirken; 3 boyutlu (3B) değerlendirme ile DYKU uygulama sahasında gelişmiş bir periost kemik apozisyonu tespit edilmiştir. Mikroyapısal analiz, DYKU'nun hem kondrogenezi hem de osteogenezi uyardığını ve genç yetişkin ratlarda endokondral kemik oluşumunu arttırdığını ortaya koymuştur. Ayrıca, DYKU'nun subkondral süngerimsi kemiğin osteojenik hücreleri üzerindeki etkisi dikkate değer bulunarak, terapötik ultrasonun genç

yetişkin ratların mandibular kondil büyüme potansiyelini artırabiliceği sonucuna varılmıştır (92).

Düşük yoğunluklu kesikli ultrason uygulamasının günlük 20'den 40 dk.ya çıkarılmasının, özellikle fonksiyonel bir aparey ile kombine edildiğinde, büyüyen ratlarda mandibular kondiler büyümeyi artıracağı hipotezini test etmek için tasarlanan ve ratlar üzerinde yapılan bir çalışmada, 20 dk. DYKU grubunda, kondiler proses uzunluğu haricindeki ölçülen değerlerin çoğunda anlamlı artışlar gözlendiği bildirilmiştir. Buna karşın 40 dk. DYKU grubunda en az olumlu sonuçların elde edildiği, 20 dk.lık DYKU uygulamasının, 40 dk.lık uygulamaya kıyasla, proliferatif ve hipertrofik hücre sayıları ile genişliklerinde ve trabeküler kemiğin gelişmiş mikro mimarisinde artışlara neden olduğu kaydedilmiştir (93).

2.2.4.1.f. Ortodontik tedavide ağrının kontrolü: Qamruddin ve ark. (94) 3 haftalık aralıklarla DYKU uygulamasının ortodontik diş hareketi ve buna bağlı ağrı üzerindeki biyostimülatör etkilerini değerlendirmek için yapmış oldukları bir çalışmada; ortodontik tedavi için premolarlarına çekim endikasyonu koyulmuş Sınıf 2 malokluzyona sahip 22 adet hastayı 2 gruba ayırarak, deney grubuna diş çekimlerini takiben kanin retraksiyonu sırasında 3 haftada 1 kez olmak üzere toplam 3 doz, 20'şer dk.lık, 1,1 MHz frekans ve 30 mW/cm^2 yoğunlukta ekstraoral DYKU uygulamışlardır. Deney ve plasebo grupları arasında kanin dişinin hareket hızında ve ağrı düzeylerinde anlamlı bir fark olmadığı bildirilmiştir. Buna göre, DYKU'nun 3 haftalık aralıklarla tek doz uygulanması, diş hareketini uyarmada ve buna bağlı tedavi ağrısını azaltmada etkisiz bulunmuştur.

Tehranchi ve ark. (95) mandibular ortognatik cerrahi ile tedavi edilen 9 hastaya operasyon sonrası 3 hafta boyunca günde 20 dk. sağ veya sol tarafa 30 mW/cm^2 yoğunluk, 1 MHz frekans, 1 kHz atım tekrarlama oranı, 200 μs atım süresi ve 1:4 görev döngüsünde DYKU uygulamış ve diğer yarım çeneyi kontrol grubu olarak kullanmışlardır. Çalışmanın sonucunda mandibulanın kenar ve medullasındaki kemik yoğunluğu kontrol grubuna kıyasla deney grubunda istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha yüksek bulunurken, ameliyattan sonraki 3 hafta boyunca yaşanan ağrıdaki azalmanın deney grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı ölçüde farklı olduğu bildirilmiştir. Böylece DYKU'nun ortognatik cerrahi sonrası kemik remodellingini arttırmada ve ağrıya azaltmada etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

2.3. KEMİĞİN YAPISI VE YENİDEN ŞEKİLLENMESİ

2.3.1. Kemik Dokusu

Vücudu koruyan ve destekleyen iskelet sisteminin önemli bir kısmını oluşturan kemik, organik ve inorganik komponentleri olan, özelleşmiş, dinamik bir bağ dokusudur. %60'ı inorganik madde, %8-10'u su ve geri kalanı organik maddeden meydana gelen kemik dokusunun inorganik fazını, kalsiyum hidroksiapatit ve kalsiyum fosfat kristalleri oluşturur. Organik faz ise büyük oranda tip I kollajen, çeşitli kollajen olmayan proteinler ve kemik hücrelerinden oluşur. Kemiğin organik fazı, dokunun yapısını, mekanik ve biyokimyasal özelliklerini derinden etkileyen birçok süreçte yer alır. Büyüme faktörleri, sitokinler ve ekstraselüler matriks proteinleri (osteonektin, osteopontin, kemik sialoproteini, osteokalsin, proteoglikanlar vb.) kemiğin genel hacminin küçük bir kısmını oluşturmasına rağmen biyolojik işlevine büyük katkılar sağlar. Kemik minerali saf hidroksiapatit değildir. Küçük, plaka şeklindeki apatit kristalleri fosfat grupları yerine karbonat; kalsiyum iyonları yerine potasyum, magnezyum, stronsiyum ve sodyum; hidroksil grupları yerine klorür ve florür içerir. Apatitin kristal yapısının bozulması, mineral homeostazı ve kemik adaptasyonu için kritik öneme sahip olan çözünürlük gibi belirli özelliklerin değişmesine sebep olur (96).

2.3.2. Alveolar Kemiğin Yeniden Şekillenmesi

Ortodontik diş hareketi (ODH) sırasında alveolar kemiğin yeniden şekillenmesi (remodelling), osteoklastlar tarafından kemik rezorpsiyonunu ve osteoblastlar tarafından yeni kemik oluşumunu koordine eden oldukça düzenli bir süreçtir. ODH'de yer alan mekanizmalar, sıkıştırma tarafında mekanosensitif, steril inflamasyon aracılı osteoklastogenezi ve gerilim tarafında çekme kuvvetinin neden olduğu osteogenezi içerir (97). ODH'de alveolar kemiğin yeniden şekillenmesi, periodontal ligament (PDL) fibroblastları, mezenkimal kök hücreler, inflamatuar hücreler, osteoblastlar, osteositler ve osteoklastlar dahil olmak üzere farklı hücre tiplerinin koordineli hareketini gerektirir.

Genel olarak ODH, sıkıştırma tarafında PDL'nin kademeli bir kompresyonu (4-7 gün), kan akışının durması sonucunda beslenmenin gerçekleşmemesi nedeniyle hücre ölümünün meydana geldiği hyalinizasyon periyodu (7-14 gün) ve dişin hareket etmeye devam etmesi için gerekli olan doğrudan kemik rezorpsiyonu ile karakterize sekonder

dönem olmak üzere üç aşamadan oluşur (98,99). Gerilim tarafında ise PDL gerilir ve kan akışı aktivasyonu ile osteoblastik aktiviteyi, osteoit birikimini ve mineralizasyonu uyarır. Mekanik kuvvet yüklemesinde, diş çevresindeki hücrelerde meydana gelen sıkışma ya da gerginlik sonucunda sonraki biyolojik tepkileri uyaran çoklu sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin salınımı gerçekleşir. ODH'de kemiğin yeniden şekillenmesi için hücrelerin mekanik kuvvetleri ilettiği ve biyolojik tepkiler ürettiği bu süreçlerin gerçekleşmesi gereklidir (100).

Sıkıştırma tarafında, çok çekirdekli osteoklastlar, uygulanan kuvvet yönünde diş hareketinin gerçekleşmesine izin vermek için kemik rezorpsiyonunu başlatır. Ek olarak, basınç uygulamasından sonra tümör nekroz faktörü (TNF), IL-1, prostaglandinler ve IL-6 gibi proinflamatuar sitokinlerin yanı sıra matriks metalloproteinazlar (MMP'ler) kısa sürede üretilerek steril bir inflamatuar yanıt indüklenir (101-103). Hücreler mekanik olarak deforme olduğunda prostaglandinler salgılanır ve PDL hücrelerindeki mekanosensör olan fokal adezyon kinazın bu süreçle ilişkili olduğu bilinmektedir (104). Bu nedenle ODH için hem steril inflamasyon hem de mekanik transdüksiyon önemlidir (105). Sıkıştırma kuvvetlerine maruz kalan hücreler, RANKL'ın yukarı regülasyonu yoluyla osteoklastogenezi indükler (106). Proinflamatuar sitokinler, osteoklastogenezi uyarmak için RANKL ekspresyonunu indükleyerek ODH'de kemik rezorpsiyonuna katkıda bulunur (107). Gerilim tarafında, PDL hücreleri gerilir ve genişleyen PDL aralığıyla birlikte prolifere olur. Bunu takiben yeni kemik oluşur ve sonrasında PDL normal aralığına geri döner (108). PDL ve alveolar kemikteki progenitör hücreler çoğalarak yeni kemik üretmek için osteoblastlara farklılaşır. Gerilim kuvvetleri osteojenik transkripsiyon faktörü Runx2 ile kemik matriks proteinleri osteokalsin ve osteopontini yukarı doğru regüle eder (103). Mekanik yüklemeye yanıt olarak meydana gelen eşzamanlı kemik remodelling süreçlerini temsil eden osteoklastogenez ve osteogenez ODH'nin önemli bileşenleridir.

2.3.3. Ortodontik Diş Hareketinde Rol Alan Hücre Tipleri

Alveolar kemikte ortodontik diş hareketine yanıt veren beş tip hücre tanımlanmıştır: osteoblastlar, osteoklastlar, osteositler, kemik astar hücreleri ve osteoprogenitör hücreler (109).

- **Osteoblastlar** esas olarak kemiği oluşturan, tip 1 kollajen dahil olmak üzere kemiğin ekstraselüler matriksini sentezleyen ve salgılayan mezenkimal hücrelerdir. PDL'deki mezenkimal progenitör hücrelerden osteoblastların gelişimini; BMP'ler, TGF-βI ve II, insülin benzeri büyüme faktörü (IGF-I ve II), PDGF ve fibroblast büyüme faktörü (FGF) gibi birkaç faktörün etkilediği gösterilmiştir (110). Kemik soketini kaplayan OB'lar, ortodontik diş hareketinden kaynaklanan gerilime doğrudan yanıt vermektedir (111).
- **Osteoklastlar** diş hareketi için gerekli olan kemik rezorpsiyonundan sorumlu, hematopoietik kök hücrelerden türetilen çok çekirdekli hücrelerdir. Koloni uyarıcı faktör (CSF), RANKL, OPG ve BMP'ler gibi çözünür faktörler, osteoklast farklılaşmasını düzenler (112-114). Bu faktörler, alveolar kemikte bulunan osteositler ve PDL'de bulunan OB'lar tarafından üretilir (115). Tıpkı RANKL ve reseptörü RANK gibi CSF de osteoklastların farklılaşmasını destekler. OPG, RANKL için bir tuzak reseptör görevi görerek farklılaşmayı engeller, böylece onun RANK'a bağlanmasını inhibe eder (116).
- **Osteositler** esas olarak propriyoseptif ve cevap verici bir işlev gören, kemik matriksiyle çevrili, terminal olarak farklılaşmış OB'lardır (117). Osteositler, kemik yüzeyindeki komşu osteositler ve OB'lar ile uzun sitoplazmik uzantılar aracılığıyla iletişim kurar. Burada iyonların doğrudan değişimi, *neksus* adı verilen bağlantılarla gerçekleşir. Osteositler kemiğin içinde lakuna adı verilen bir boşlukta bulunur ve sitoplazmik süreçleri kanalikül adı verilen küçük kanallar içinde gerçekleşir. Kemiğin mekanosensör hücrelerinden olan osteositler farklı yükleme paternlerine karşı kemiğin geliştirdiği fonksiyonel adaptasyonda çok önemli bir rol oynar (118).
- **Kemik astar hücrelerinin** kemiğin ve kemik sıvılarının korunmasında rol oynayan, terminal olarak farklılaşmış OB'lar olduğu düşünülür. Bu hücreler kemik rezorpsiyonunu ve kemiğin yeniden şekillenmesini başlatan aktivasyon sinyalinin yayılmasında da rol oynamaktadır (119).
- **Osteoprogenitör hücreler**, OB üretmekle görevli kök hücre popülasyonudur ve PDL'nin kan damarlarının yakınında bulunur (120).

Ortodontik diş hareketi, hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimlerinin yanı sıra sistemik hormonların, sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin bir araya gelmesini içeren karmaşık olaylar dizisinin bir sonucu olarak ortaya çıkar. Son araştırmalar, ortodontik diş hareketini düzenleyen anahtar hücreler olarak PDL içindeki alveolleri kaplayan osteositlere ve OB'lara işaret etmektedir.

2.4. LAZER VE ULTRASON TEDAVİLERİNİN KEMİK HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİSİ

2.4.1. Lazer Tedavisinin Kemik Hücreleri Üzerine Etkisi

Mevcut çalışmalar, kırmızı ve yakın kızılötesi ışığın, hücrelerin mitokondrilerindeki fotoalıcılarla etkileşimleri yoluyla tüm yaşam formlarının temel hücresel yollarını etkileyebileceğini göstermektedir.

Agas ve ark. (121) FBM'nin pre-osteoblastlarda *in vitro* moleküler değişiklikleri indükleyebileceği mekanizmaların anlaşılmasını sağlamak amacıyla yaptıkları bir çalışmada, pre-osteoblastları iki ardışık hafta boyunca haftada 1, 3 veya 5 kez, 60 sn. boyunca, sırasıyla 0,75; 0,45 ve 0,20 W/cm^2'lik bir güç ve 45, 27 ve 12 J/cm^2'lik bir enerji yoğunluğunda ışınlayarak incelemişlerdir. Çalışmanın sonucunda "45 J/cm^2, 0,75 W" grubunda istatistiksel açıdan anlamlı farklılıklar izlenmiş ve 980 nm dalga boyundaki lazerin, pre-osteoblastların metabolik programlarını düzenleyerek modüle edebildiği ortaya koyulmuştur.

Shimohira ve ark. (122) yaptıkları bir çalışmada, ratlardan elde ettikleri OB benzeri hücrelerden oluşturulan osteojenik kültürlere, 25 cm mesafeden Er:YAG lazer ile 2,94 μm dalga boyu ve 3,1 ile 8,2 J/cm^2 enerji yoğunluğunda DSLT uygulamışlar ve lazer ışınlaması sonrasında yüzey sıcaklığı ve laktat dehidrogenaz ktivitelerinde önemli bir artış olmadığını gözlemlemişlerdir. Özellikle 3,1 J/cm^2'de Er:YAG lazer ışınlamasının, osteojenik hücrelerde kemik oluşumu ile ilgili genlerin ekspresyonu üzerinde önemli bir hücre hasarı oluşturmadan pozitif etki gösterdiği bildirilmiştir.

Bouroni ve ark. (123) OB, fibroblast ve OB+fibroblasttan elde edilen ortak hücre kültürleri üzerinde yapmış oldukları çalışmada, 810 nm dalga boyuna sahip diyot lazer cihazı ile 500 mW güç ve 15 J/cm^2 yoğunluğunda hücre kültürlerine DSLT uygulamış ve hücreleri 24, 48 ve 72 saat sonra proliferasyon, canlılık ve 7 gün sonra

farklılaşma açısından kollajen tip 1a ve ALP ekspresyonlarını analiz ederek değerlendirmişlerdir. Çalışmanın bulgularına göre; 810 nm diyot lazerin, tüm deney gruplarında hücre çoğalmasını ve canlılığını olumlu yönde etkilediği ve ışınlamadan 7 gün sonra kollajen tip 1a gen ekspresyonunun artmasına sebep olarak her iki hücre kültüründe de ekstraselüler matriks oluşum sinyalini indüklediği sonucuna varılmıştır.

Düşük seviyeli lazer tedavisinin pre-osteoblast hücrelerinin proliferasyonu ve apoptozu üzerine etkilerini mikro-RNA düzeyinde araştırmayı amaçlayan bir çalışmada; deney grubunda yer alan hücreler 12 saat aralıklarla 90'ar sn.lik, 3 doz, 808 nm dalga boyu ve 3,75 J/cm^2 enerji yoğunluğunda GaAlAs lazer ışığına maruz bırakılmıştır. Çalışmanın sonunda DSLT'nin, proliferasyonu fonksiyonel olarak inhibe eden ve apoptozu teşvik eden gen ekspresyonlarını önemli ölçüde azalttığı ve kaspaz-3 seviyesini yukarı doğru regüle ederek hücrelerin proliferasyon ve apoptoz mekanizmalarında önemli değişikliklere yol açtığı bildirilmiştir (124).

Düşük seviyeli lazer tedavisinin kemik iyileşmesi üzerine olumlu etkileri birçok çalışmada bildirilmiş olmasına rağmen iyi tanımlanmış tedavi parametreleri hala eksiktir. İnsan OB benzeri hücrelerini *in vitro* yara iyileştirme deneyine tabi tutarak yapılan bir çalışmada, 915 nm GaAlAs diyot lazer ile sırasıyla 0, 48, 96 ve 144 sn. boyunca 0, 5, 10 ve 15 J/cm^2 ile DSLT uygulanarak hücre canlılığı, DNA içeriği, gen ekspresyonu ve kemikle ilgili proteinlerin salınımı 24, 48 ve 72 sa. sonra değerlendirilmiş ve lazer fotobiyomodülasyonunun, esas olarak OB'lar tarafından hücre göçü ve kollajen birikiminin uyarılması yoluyla yara iyileşmesini desteklediği sonucuna varılmıştır (125).

Tsuka ve ark. (126) lazer ışınımının hücreler üzerindeki etkilerini gerçek zamanlı olarak değerlendirmek amacıyla yaptıkları bir çalışmada, Nd:YAG lazer ışınlamasının insan OB'larının göçü üzerindeki etkilerini incelemişler ve hücre göçünün DSLT ile hızlandığını ve ATP üretiminde önemli bir artışa sebep olduğunu bildirmişlerdir. Böylece, Nd:YAG lazer ışınlamasının gelişmiş OB hücre göçü nedeniyle kemik dokularının yenilenmesine katkıda bulunabileceği ortaya koyulmuştur.

Hızlı maksiller ekspansiyon sonrası DSLT ile tedavi sonucunda midpalatal suturdan toplanan hücrelerin osteoblastik aktivitesini araştırmak amacıyla da Silva ve ark. (127) tarafından yapılan bir çalışmada 30 rat kullanılmış ve deney hayvanları "sadece RME yapılan" ve "RME+DSLT uygulanan" olmak üzere 2 eşit gruba

ayrılmıştır. Ratların RME'den 24 sa., 48 sa. ve 7 gün sonra midpalatal suturlarından toplanan osteoblastik hücreleri eksplante edilerek hücre kültürleri oluşturulmuştur. RME+DSLT uygulanan midpalatal suturdan elde edilen hücre kültürlerinde proliferatif aşamadaki hücresel ikiye katlanma sürelerinin (3-7 gün) azaldığı görülmüştür. Bu sürenin azalması kültür içindeki hücrelerin büyümesindeki artışı gösteren olumlu bir veridir. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonuyla yapılan analizlere göre; RME'den sonra DSLT uygulanan grupta yer alan hücrelerin, kontrol hücrelerinden daha yüksek ALP, Runx2, osteokalsin, tip I kollajen ve kemik sialoprotein mRNA seviyelerine sahip olduğu bildirilmiştir. RME+DSLT grubunda DSLT'nin; ALP aktivitesi, mineralizasyon ve kemik belirteçlerinin gen ekspresyonu üzerine etkileri 48 sa. sonra daha anlamlı bir düzeyde gözlenmiştir. Bu sonuçlar, RME'den sonra uygulanan DSLT'nin midpalatal suturdan elde edilen hücrelerde osteoblastik fenotipin proliferasyonunu ve ekspresyonunu artırabildiğini göstermektedir.

2.4.2. Ultrason Tedavisinin Kemik Hücreleri Üzerine Etkisi

Murin periosteumundan türetilen hücrelerde (PTH) DYKU'nun osteojenik farklılaşma üzerine etkisini ve altında yatan mekanizmayı araştırmak amacıyla yapılan bir çalışmada PTH'lere, 3 MHz frekans, 30 mW/cm^2 yoğunluk ve 1 kHz atım tekrarlama hızı ile 21 gün boyunca 20 dk./gün DYKU uygulanarak DYKU'nun hücre proliferasyonu ve canlılığı üzerindeki etkileri incelenmiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre ultrason stimülasyonunun PTH'lerin proliferasyonunu önemli ölçüde etkilemediği, ancak 7. günde ALP aktivitesini önemli ölçüde arttırdığı ve 21. günde mineralize nodüllerin oluşumunu belirgin şekilde desteklediği bildirilmiştir (128).

Terapötik ultrasonun OC hücre kültürlerinin rezorpsiyon aktivitesi üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla yapılan bir çalışmada, 1 kHz tekrarlama oranı, 30 mW/cm^2 yoğunluk ve 1.5 MHz atımlar ile günde 10 ve 20 dk. olmak üzere 1 hafta boyunca deney gruplarına DYKU uygulanmıştır. Çalışmanın sonuçlarına göre, düzenli bir şekilde DYKU uygulanmasının OC'lerin rezorptif aktivitesini arttırdığı, ayrıca ultrason uygulaması daha uzun sürdüğünde (20 dk.) rezorpsiyonun en yüksek seviyede olduğu bildirilmiştir (129).

Meng ve ark. (130) DYKU'nun OC formasyonunu ve aktivitesini etkileme mekanizmasını araştırmak amacıyla yaptıkları bir çalışmada, monosit/makrofaj prekürsörlerinden elde edilen OC hücrelerine 1,5 MHz frekans, 1 kHz tekrarlama hızı,

200 μs atım süresi ve 30 mW/cm^2 güç yoğunluğunda günde 20 dk. DYKU uygulamışlardır. Çalışmanın sonuçlarına göre DYKU'nun ekstraselüler reseptör kinazla ilgili sinyal yolağının inhibisyonu aracılığıyla OC oluşumu üzerinde inhibitor bir etki gösterdiği, ancak olgun OC fonksiyonu üzerinde anlamlı bir etkisinin bulunmadığı bildirilmiştir.

Coskun ve ark. (131) OB ve fibroblast hücreleri üzerinde DYKU ve DSLT'nin etkilerini araştırmak amacıyla yapmış oldukları bir çalışmada, hücre kültürlerini %10-50 atım oranı ile 1 ve 3 MHz frekansta, 1, 3 ve 5 dk. boyunca sürekli modda DYKU ve 4, 8 ve 16 J enerji düzeyi ile 50, 100, 200, 300, 400 ve 500 mW güç yoğunluğunda DSLT ile ışınlayarak analiz etmişlerdir. Elde edilen verilere göre, her iki hücre tipi için %10 atım ve 3 MHz frekans ile 1 dk. uygulanan DYKU tedavisi ve 4, 8, 16 J modaliteleri için 100 mW üzerindeki DSLT tedavisinin büyümeye katkıda bulunarak kemik onarımına ve doku iyileşme sürecine yardımcı olabileceği bildirilmiştir.

Terapötik ultrasonun kemik iliğinden türetilen kök hücrelerin farklılaşmasını önemli ölçüde hızlandırdığı bilinmektedir. DYKU'nun kök hücrelerin farklılaşması ve osteojenik aktivitesi üzerindeki etkisini araştıran bir çalışmada, hücreler kültürlendikten sonra iki gruba ayrılarak deney grubuna 20 dk. boyunca günde bir kez 1,5 MHz frekans, 200 μs atım süresi, 1 kHz atım tekrar hızı ve 30 mW/cm^2 güç yoğunluğunda DYKU uygulanmıştır. Deney grubunda kontrol grubuna kıyasla ALP aktivitesi (7. günde %113,4 ve 14. günde %130,1), OB'la ilişkili genlerin ekspresyonu ve hücrelerin mineralizasyonu (21. günde %135,2) önemli ölçüde daha yüksek bulunurken, hücre proliferasyonunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir farklılık izlenmemiştir (132).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma için Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Hamidiye Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır (Tarih: 26.06.2020, Sayı: 46418926-050.03.04) (EK-1). Çalışmamızın laboratuvar aşaması Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi, Validebağ Araştırma Parkında yapılmıştır.

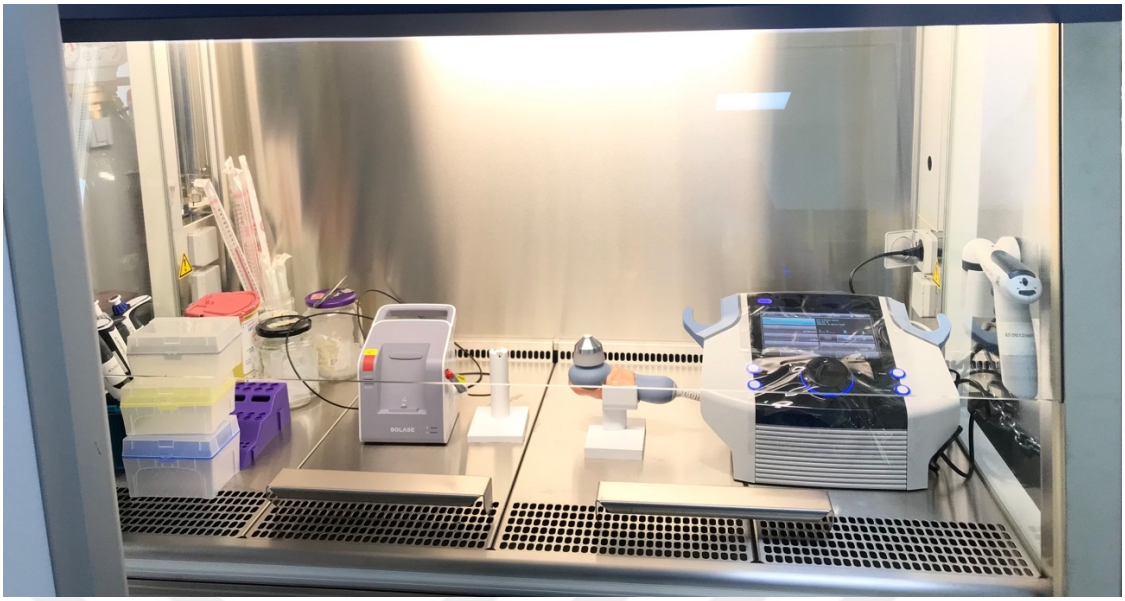
3.1. GEREÇ

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Materyaller

Çalışmamızda ışınlama prosedürleri sırasında kullanılan cihazlar Tablo 3.1 ve Şekil 3.1'de, OB ve OC hücrelerinin besiyeri hazırlama, pasajlama, ekim, sayım ve analiz aşamaları sırasında kullanılan materyaller Tablo 3.2 ve Tablo 3.3'de sunulmuştur.

Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan lazer ve ultrason cihazları

Materyal	Ticari Adı	Firma ve Üretim Yeri
Dental Lazer Cihazı	Solase-976	Lazon Medical Laser Co., LTD, Liaoning, Çin Halk Cumhuriyeti
Terapötik Ultrason Cihazı, Cihaz Ek Başlığı	4710 Premium, Ultrasound Applicator-1 cm^2	BTL Industries Ltd., Hertfordshire, İngiltere



Şekil 3.1: Çalışmada kullanılan lazer ve ultrason cihazları

Tablo 3.2: Çalışmada kullanılan hücreler

Hücre Türü	Ticari Adı	Firma ve Üretim Yeri
İnsan osteoblast hücresi (OB)	hFOB 1.19 CRL-11372™	ATCC, Rockville, MD, ABD
Primer insan kemik iliği mononükleer hücresi (PBMC)	BMMC PCS-800-013™	ATCC, Rockville, MD, ABD

Tablo 3.3: Çalışmada kullanılan sarf malzemeleri

Materyal	Ticari Adı	Firma ve Üretim Yeri
MEM Alpha Solüsyonu	MEM Alpha Modification, w/o L-Glutamine, w/o Nucleosides, D832	Diagnovum, Tilburg, Hollanda
Dulbecco Modifiye Eagle Solüsyonu	DMEM/Ham's F-12, with L-Glutamine, D813	Diagnovum, Tilburg, Hollanda

Tablo 3.3 (devam)

Materyal	Ticari Adı	Firma ve Üretim Yeri
Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi	Dulbecco's PBS (1x), w/o Ca & Mg, w/o Phenol Red, D402	Diagnovum, Tilburg, Hollanda
Makrofaj Koloni Stimülan Faktör	Recombinant Human M-CSF (carrier-free), 574802	BioLegend, San Diego, ABD
Nükleer Faktör-kappa B Ligandının Reseptör Aktivatörü	Recombinant Human TRANCE (RANKL) (carrier-free), 591102	BioLegend, San Diego, ABD
Fetal Sığır Serumu	Heat-inactivated fetal bovine serum, D154	Diagnovum, Tilburg, Hollanda
Dondurucu Solüsyon	Freezing Medium Cryo-SFM, Serum-free medium for cryopreservation, TM026	Abmgood, Richmond, Kanada
Antibiyotik	Geneticin™ Selective Antibiotic (G418 Sulfate), Gibco, 10131027	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, ABD
Tripsin Enzimi Solüsyonu	Trypsin-EDTA (0.25 %) in HBSS (1x), with phenol red, D705	Diagnovum, Tilburg, Hollanda
Hücre Canlılık Kiti	Resazurin Solution 100ml, AR002	R&D Systems, Minneapolis, ABD
Apoptoz Kiti	Annexin V-PE / 7-AAD Apoptosis Detection Kit, E-CK-A216	Elabscience, Houston, Texas, ABD
Tartarat Rezistan Asit Fosfataz ve Alkalen Fosfataz Kiti	TRACP and ALP Assay Kit, MK301	Takara Bio, Kusatsu, Shiga, Japonya

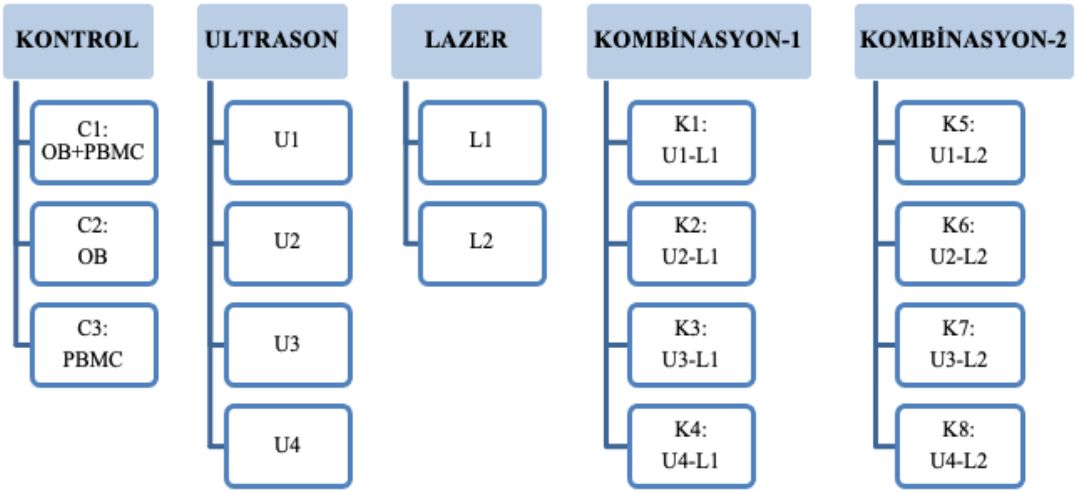
Tablo 3.3 (devam)

Materyal	Ticari Adı	Firma ve Üretim Yeri
Boyama Solüsyonu	DAPI (hydrochloride), 14285	Cayman Chemicals, Ann Arbor, Michigan, ABD
Boyama Solüsyonu	Phalloidin FITC Reagent, Ab235137	Abcam, Cambridge, Birleşik Krallık
Sürfaktan Madde	Triton X100, 648466	Merck-Millipore, Burlington, Massachusetts, ABD
Boyama Solüsyonu	DiO Perchlorate, 27876	Cayman Chemicals, Ann Arbor, Michigan, ABD
Boyama Solüsyonu	Dil Perchlorate, 22102	AAT Bioquest, Sunnyvale, CA, ABD
Floresan Montaj Solüsyonu	Anti-Fade Fluorescence Mounting Medium, Ab104135	Abcam, Cambridge, Birleşik Krallık
Formaldehit	Formaldehit 37 % Chem Pure, ZS.100200.1000	Zag Kimya, İstanbul, Türkiye
İzopropil Alkol	İzopropil Alkol 99 % Chem Pure (2-PROPANOL), ZS.100280.1000	Zag Kimya, İstanbul, Türkiye
Tripan Mavisi Solüsyonu	Trypan blue solution, 0.4%, T8154	Merck SA, Darmstadt, Almanya
Hemositometre	Hemocytometer-Neubauer, B560	Abmgood, Richmond, Kanada
Ultrason Jeli	Ultrasound SWT Gel	BTL Industries Ltd., Hertfordshire, İngiltere

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Deney Grupları

Bu çalışma, Şekil 3.2'de gösterildiği gibi 3 kontrol, 4 DYKU, 2 DSLT ve 8 kombine (DYKU+DSLT) olmak üzere toplam 17 gruptan oluşmaktadır. Her grup için deney 3 kez tekrarlanmıştır.



Şekil 3.2: Deney ve kontrol grupları

3.2.1.1. Kontrol grupları: Çalışmada kontrol grubu olarak OB, primer insan kemik iliği mononükleer hücreleri (PBMC) ve OB+PBMC hücrelerinin kombinasyonundan oluşan ortak hücre kültürü (*co-culture*) sistemi yer almıştır. Bu kontrol grupları için çalışmada kullanılan adlar aşağıdaki gibidir:

- C1: OB+PBMC
- C2: OB
- C3: PBMC

3.2.1.2. Ultrason grupları: Çalışmada DYKU uygulamaları OB-OC ortak hücre kültürü sistemleri üzerinde gerçekleştirilmiştir. Bu deney grupları için kullanılan adlar ve ışınlama protokolleri aşağıdaki gibidir:

- U1: 0,2 W güç, %12,5 görev döngüsü, 3 MHz frekans, 1 dk.

- U2: 0,2 W güç, %12,5 görev döngüsü, 3 MHz frekans, 3 dk.
- U3: 0,2 W güç, %12,5 görev döngüsü, 3 MHz frekans, 5 dk.
- U4: 0,2 W güç, %12,5 görev döngüsü, 3 MHz frekans, 10 dk.

3.2.1.3. Lazer grupları: Çalışmada DSLT uygulamaları OB-OC ortak hücre kültürü sistemleri üzerinde gerçekleştirilmiştir. Bu deney grupları için kullanılan adlar ve ışınlama protokolleri aşağıdaki gibidir:

- L1: 976 nm, 0,4 Watt, 10 sn., 4 J/cm^2
- L2: 976 nm, 0,4 Watt, 20 sn., 8 J/cm^2

3.2.1.4. Kombinasyon Grupları: Çalışmada DYKU+DSLT uygulamaları OB-OC ortak hücre kültürü sistemleri üzerinde gerçekleştirilmiştir. Bu deney gruplarında U1, U2, U3, U4 ve L1, L2 gruplarında yer alan ışınlama protokollerinin kombinasyonları kullanılmıştır. Grup adları K1, K2, K3, K4, K5, K6, K7, K8 olarak tasarlanmıştır. K1 grubu: U1-L1, K2 grubu: U2-L1, K3 grubu: U3-L1, K4 grubu: U4-L1; K5 grubu: U1-L2, K6 grubu: U2-L2, K7 grubu: U3-L2, K8 grubu: U4-L2 gruplarının kombinasyonlarından oluşur.

Tüm deney ve kontrol grupları için yapılan analizler, bu analizler için kullanılan yöntemler ve zaman dilimleri Tablo 3.4'de sunulmuştur.

Tablo 3.4: Çalışmada kullanılan deneysel metotlar

Analiz	Uygulama Yöntemi	Zaman
Hücresel canlılık ve proliferasyon	Resazurin redüksiyon yöntemi	1., 7. ve 11. gün
Apoptoz	Anneksin V/PI	1., 7. ve 11. gün
Morfolojik farklılaşma	Aktin Boyama	1., 7. ve 11. gün
TRAP aktivitesi	TRAP kit	1., 7. ve 11. gün
ALP aktivitesi	ACP kit	1., 7. ve 11. gün

3.2.2. Hücre Kültürü

Çalışmamızda kullandığımız OB hücrelerinin (hFOB 1.19 CRL-11372™, ATCC, Rockville, MD, ABD) ekimi için gerekli olan besiyeri üretici firmanın önerileri doğrultusunda, L-Glutamin içeren Dulbecco Modifiye Eagle medyumuna (DMEM/Ham's F-12, with L-Glutamin, ATCC, Rockville, MD, ABD) %10 fetal sığır serumu (FBS, D154, Diagnovum, Tilburg, Hollanda) ve %1 antibiyotik-antimikotik solüsyon (Geneticin™ Selective Antibiotic-G418 Sulfate, Gibco, ThermoFisher, Waltham, MA, ABD) eklenerek oluşturuldu. Oluşturulan besiyeri soğutucunun +4ºC sıcaklıktaki bölmesinde muhafaza edildi.

Çalışmamızda kullandığımız PBMC hücrelerinin (BMMC PCS-800-013™, ATCC, Rockville, MD, ABD) ekimi için gerekli olan besiyeri üretici firmanın önerileri doğrultusunda, MEM Alpha solüsyonuna (MEM Alpha Modification, w/o L-Glutamine, Diagnovum, Tilburg, Hollanda) %10 fetal sığır serumu (FBS, D154, Tilburg, Hollanda), %1 antibiyotik-antimikotik solüsyon (Geneticin™ Selective Antibiotic-G418 Sulfate, Gibco, ThermoFisher, Waltham, MA, ABD), 6.1 µl makrofaj koloni stimülan faktör (Recombinant Human M-CSF (carrier-free), 574802, Bio Legend, San Diego, ABD) eklenerek oluşturuldu. Oluşturulan besiyeri soğutucunun +4ºC sıcaklıktaki bölmesinde muhafaza edildi.

Hazırlanmış olan hücre kültürü besiyerleri soğutucudan çıkartılarak sıcaklığının ortam sıcaklığına eşitlenmesi için bekletildi. Firmadan teslim alındıktan sonra 2 ml'lik vialler içinde sıvı azot tankında saklanan hücreler tanktan çıkartıldı. Kontaminasyona uğramamaları için kapak kısmından dikkatlice tutularak 2 dk. boyunca +37ºC'lik sıvı banyosunda çözünmeleri için bekletildi.

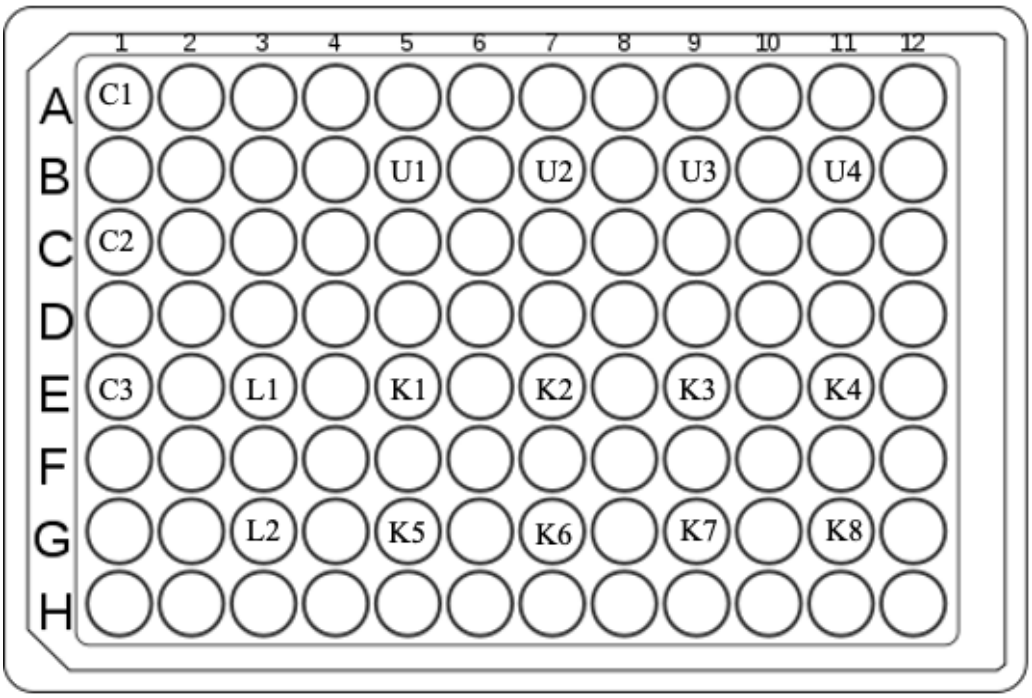
Ortam sıcaklığına erişmiş olan hücre besiyerlerinden 5'er ml alındı ve santrifüj tüplerine konuldu. Laminer akım kabini içersinde, çözünmüş olan 2 ml'lik hücre solüsyonları 5 ml'lik hücre besiyerlerinin üzerine eklendi. Besiyerleri ve hücrelerin karışması için pipetaj yapıldı. Elde edilen yeni karışımlar, 1500 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi. Santrifüjün ardından dibe çöken OB ve PBMC hücrelerinin üzerinden süpernatant kısımlar atıldı. Hücrelerin üzerine yeni besiyerleri eklenerek 25 cm^2'lik hücre flasklarına ekildi. Hücre flaskları %95 atmosferik hava ve %5 CO^2 içeren, 37°C sıcaklıktaki, neme doymuş CO^2 inkübatörüne konuldu. Ortam medyumu her 3-4 günde bir değiştirildi.

Hücrelerin herhangi bir kontaminasyona uğramadan, flask zeminine tutunarak yeterli yoğunluğa ulaşmış olup olmadıkları mikroskop ile günlük olarak gözlemlendi. Yeterli yoğunluğa ulaşan hücreler pasajlama işlemine tabi tutuldu. Laminer akım kabını içersinde flask yüzeyine tutunmuş olan OB ve PBMC hücreleri 0.5'er ml tripsin solüsyonu (Trypsin-EDTA (0.25 %) in HBSS (1x), with phenol red, D705, Diagnovum, Tilburg, Hollanda) aracılığıyla yüzeyden kaldırıldı. Yeniden inkübatöre alınarak flask yüzeyinden ayrılmaları için 5 dk. bekletildi. Flask yüzeyinden ayrılan hücreler 10 ml besiyeriyle beraber 15 ml'lik bir falkona alındı. Bu falkon 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra hücrelerin üzerindeki supernatant uzaklaştırıldı. Falkonun dibine çöken hücrelerin üzerine 1 ml taze besiyeri eklenerek tekrar süspansiyon oluşturuldu. Pipetaj yapılarak besiyerleri ve hücrelerin karıştırılmasının ardından oluşturulan bu çözelti içerisinden 10 µl örnek alınarak hemositometre ile hücre sayımı yapıldı. Sayımdan sonra üzerine besiyeri eklenerek çözelti 10 ml'ye tamamlandı. Hücreler flasklara konuldu ve haftada iki kez benzer prosedürlerle, deney için gerekli olan hücre sayısı elde edilene dek pasajlama işlemine devam edildi. Çalışmamızda kullandığımız hücreler 2-4 pasaj aralığındaydı.

3.2.3. Deney Düzeneğinin Hazırlanması

Osteoblast hücreleri, hücresel canlılık, proliferasyon, apoptoz, morfolojik farklılaşma, TRAP ve ALP testleri için Şekil 3.3'de gösterilen düzende, C3 isimli kuyucuk hariç, işaretli her kuyucukta 200 µl besiyeri içerisinde $1x10^4$ hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu hücre plaklarına ekildi. C3 isimli kuyucuğa ise 200 µl besiyeri içerisinde $1x10^4$ hücre olacak şekilde yalnızca PBMC hücreleri ekildi ve plaklar inkübatöre kaldırıldı.

MEM Alpha solüsyonuna (MEM Alpha Modification, w/o L-Glutamine, Diagnovum, Tilburg, Hollanda) %10 fetal sığır serumu (FBS, D154, Tilburg, Hollanda), %1 antibiyotik-antimikotik solüsyon (Geneticin™ Selective Antibiotic-G418 Sulfate, Gibco, ThermoFisher, Waltham, MA, ABD), son konsantrasyonu 25 ng/ml olcak şekilde makrofaj koloni stimülan faktör (Recombinant Human M-CSF (carrier-free), 574802, Bio Legend, San Diego, ABD) ve RANKL (Recombinant Human TRANCE (RANKL) (carrier-free), 591102, BioLegend, San Diego, ABD) eklenerek ortak hücre kültürü besiyeri oluşturuldu.



Şekil 3.3: Uygulamalar için hazırlanan deney düzeneği

24 saat sonra tüm deney grupları (U1-4, L1-2, K1-8) ve C1 isimli kontrol grupları için kuyucuk başına $5x10^4$ hücre olacak şekilde PBMC hücreleri ekildi ve üzerlerine 100 µl ortak hücre kültürü besiyeri eklendi. C2 ve C3 isimli kuyucuklar sırasıyla OB ve PBMC kontrol grupları olarak tayin edildiğinden herhangi bir ek işleme tabi tutulmadı. Ölçümler 1., 7. ve 11. günlerde olacak şekilde yapıldı. Deneylerin aynı anda bitebilmesi için başlangıç zamanları grupların özelliklerine göre ayarlandı. Aktin boyama ve resazurin redüksiyon testleri aynı deney düzeneğinde uygulandı. Apoptoz/nekroz ve TRAP-ALP analizleri için de benzer şekilde aynı deney düzenekleri kullanıldı. Tüm testler 3'er tekrarlı yapıldı.

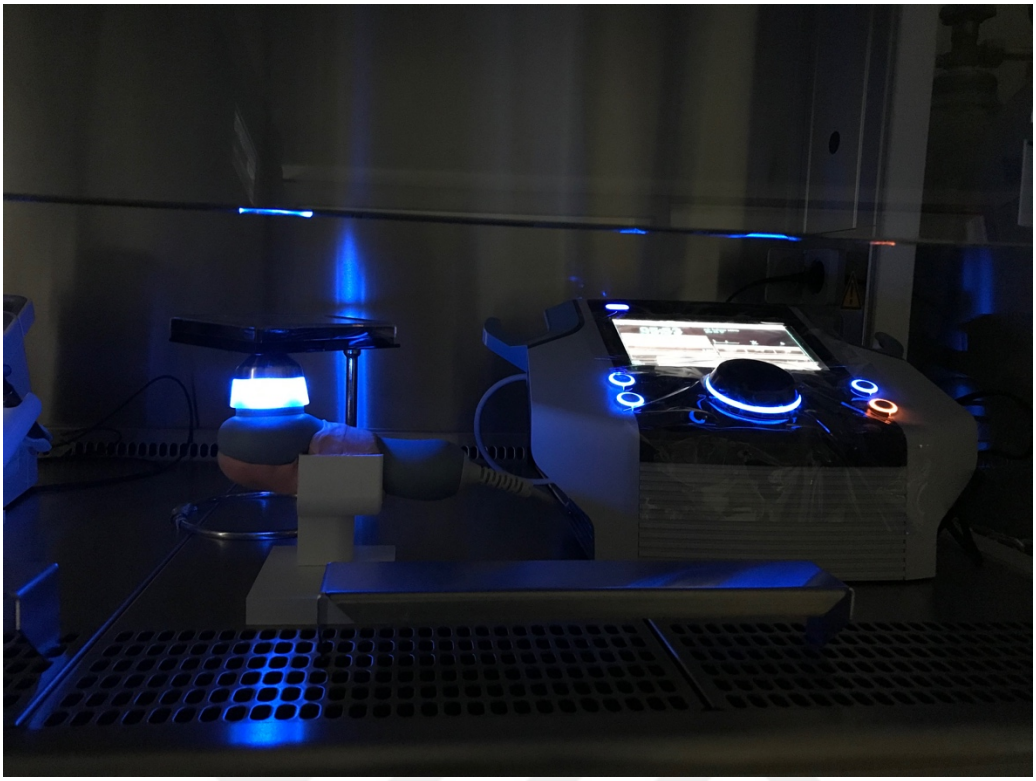
3.2.4. Lazer ve Ultrason Uygulamaları

3.2.4.2. DYKU uygulamaları: DYKU uygulamaları BTL 4710 Premium marka (BTL Industries Ltd., Hertfordshire, İngiltere) terapötik ultrason cihazı ile gerçekleştirildi. Uygulamalarda ultrason cihazının yine aynı markaya ait 1 cm^2'lik küçük uygulama başlığı (Ultrasound Applicator-1 cm^2, BTL Industries Ltd., Hertfordshire, İngiltere) kullanıldı. DYKU uygulamalarını standardize edebilmek için 3 boyutlu yazıcıdan ultrasonun ışınlama başlığını sabit tutacak bir aparey elde edildi. DYKU uygulamaları esnasında ultrasonun havayla temasını kesmek için ultrason jeliyle

birlikte 96 kuyucuklu plakanın alt kısmından uygulama gerçekleştirildi. Uygulamalarda Tablo 3.5'de gösterilen 4 farklı enerji dozu kullanıldı. Ul deney grubu için 25 mW/cm^2 yoğunluk, %12,5 görev döngüsü, 3 MHz frekanstaki DYKU 1 dk. süre ile uygulanarak 1,5 J/cm^2 enerji dozuna ulaşıldı. U2 deney grubu için 25 mW/cm^2 yoğunluk, %12,5 görev döngüsü, 3 MHz frekanstaki DYKU 3 dk. süre ile uygulanarak 4,5 J/cm^2 enerji dozuna ulaşıldı. U3 deney grubu için 25 mW/cm^2 yoğunluk, %12,5 görev döngüsü, 3 MHz frekanstaki DYKU 5 dk. süre ile uygulanarak 7,5 J/cm^2 enerji dozuna ulaşıldı. U4 deney grubu için 25 mW/cm^2 yoğunluk, %12,5 görev döngüsü, 3 MHz frekanstaki DYKU 5 dk. süre ile uygulanarak 15 J/cm^2 enerji dozuna ulaşıldı. Mevcut besiyerinin ışıkla etkileşimini önlemek için ultrason uygulamasından önce ortam PBS ile değiştirildi. Tüm deneyler üç kopya halinde gerçekleştirildi. Hücreler, deney protokollerinin amaçlarına göre analiz için çeşitli zamanlarda toplandı.

Tablo 3.5: DYKU uygulamalarında kullanılan parametreler

	U1 Grubu	**U2 Grubu**	**U3 Grubu**	**U4 Grubu**
Frekans	3 MHz	3 MHz	3 MHz	3 MHz
Atım frekansı	50 Hz	50 Hz	50 Hz	50 Hz
Görev faktörü	%12,5	%12,5	%12,5	%12,5
Çıkış gücü	0,2 W	0,2 W	0,2 W	0,2 W
Güç yoğunluğu (mW/cm^2)	25	25	25	25
Zaman (dk.)	1	3	5	10
Enerji dozu (J/cm^2)	1,5	4,5	7,5	15



Şekil 3.4: Laminer kabin içinde hücre kültürlerine DYKU uygulaması

3.2.4.1. DSLT uygulamaları: DSLT uygulamaları Solase-976 marka (Lazon Medical Laser Co., LTD, Liaoning, Çin Halk Cumhuriyeti) diyot lazer cihazı ile gerçekleştirildi. Uygulamalar esnasında lazer cihazının 1 cm^2'lik uygulama başlığı hücre kültür kabına dik olacak şekilde 10 mm mesafeden tutuldu. Lazer uygulamalarını standardize edebilmek için 3 boyutlu yazıcıdan lazer cihazının ışınlama başlığını sabit tutacak bir aparey elde edildi. Uygulamalarda Tablo 3.6'da gösterilen 2 farklı enerji dozu kullanıldı. L1 deney grubu için 976 nm dalga boyu ve 0,4 Watt güç yoğunluğundaki lazer ışını 10 sn. süre ile uygulanarak 4 J/cm^2 enerji yoğunluğuna ulaşıldı. L2 deney grubu için 976 nm dalga boyu ve 0,4 Watt güç yoğunluğundaki lazer ışını 20 sn. süre ile uygulanarak 8 J/cm^2 enerji yoğunluğuna ulaşıldı. Bu enerji dozları literatür araştırmasına dayalı olarak seçildi. Kontrol hücreleri de ışınlanmış hücrelerle aynı hücre plaklarına ekildiğinden tüm hücrelerin aynı koşullar altında bulunması sağlandı. Mevcut besiyerinin ışıkla etkileşimini önlemek için lazer uygulamasından önce ortam PBS ile değiştirildi. Tüm deneyler üç kopya halinde gerçekleştirildi. Hücreler, deney protokollerinin amaçlarına göre analiz için çeşitli zamanlarda toplandı.

Tablo 3.6: DSLT uygulamalarında kullanılan parametreler

	L1 Grubu	**L2 Grubu**
Dalga boyu (nm)	976	976
Dalga modu	Sürekli	Sürekli
Güç yoğunluğu (mW/cm^2)	400	400
Enerji yoğunluğu (J/cm^2)	4	8
Zaman (sn.)	10	20

3.2.4.3. Kombine uygulamalar: DSLT ve DYKU uygulamalarının kombine edildiği deney gruplarında;

- K1 grubuna sırasıyla U1 ve L1 ışınlama prosedürleri
- K2 grubuna sırasıyla U2 ve L1 ışınlama prosedürleri
- K3 grubuna sırasıyla U3 ve L1 ışınlama prosedürleri
- K4 grubuna sırasıyla U4 ve L1 ışınlama prosedürleri
- K5 grubuna sırasıyla U1 ve L2 ışınlama prosedürleri
- K6 grubuna sırasıyla U2 ve L2 ışınlama prosedürleri
- K7 grubuna sırasıyla U3 ve L2 ışınlama prosedürleri
- K8 grubuna sırasıyla U4 ve L2 ışınlama prosedürleri gerçekleştirildi.

Kombine uygulamaların gerçekleştirildiği OB-OC ortak kültür sisteminin yer aldığı kuyucuklara, plakanın alt tabanından 1 cm^2'lik ultrason uygulama başlığı ile belirtilen dozlarda ışınlamalar yapıldı. DYKU uygulamalarını takiben her gruba göre belirlenmiş olan dozdaki DSLT uygulamaları gerçekleştirildi. Mevcut besiyerinin ışıkla etkileşimini önlemek için lazer ve ultrason uygulamalarından önce ortam PBS ile değiştirildi. Tüm deneyler üç kopya halinde gerçekleştirildi. Hücreler, deney protokollerinin amaçlarına göre analiz için çeşitli zamanlarda toplandı.

3.2.5. Hücresel Canlılık Analizleri

Hücrelerin 1., 7. ve 11. günlerindeki canlılık ve proliferasyon analizlerinde resazurin redüksiyon yöntemi tercih edildi.

Resazurin redüksiyon testi için öncelikle OB-OC ortak hücre kültürü besiyeri ve resazurin boyası soğutucudan çıkartılarak oda sıcaklığına getirildi. Ölçümlerin gerçeği yansıtması için 96 kuyucuklu plaklarda hücrelerin bulunduğu her kuyucuktaki besiyeri kontrol edilerek miktarları birbirine eşitlendi. Kontrol ve deney gruplarının yer aldığı her kuyucuğa 5µl resazurin eklendi. Deney körü (blank) olarak kullanabilmek için boş bir kuyucuğa diğer kuyucuklardaki kadar 100 µl ortak hücre kültürü besiyeri ve 5 µl resazurin eklendi. 96 kuyucuklu plakalar inkübatöre kaldırıldı ve 4 sa. boyunca burada bekletildi. İnkübasyonun sonunda plaklar hücresel canlılık analizleri için 590 nm dalga boyunda Synergy Neo2 Hybrid Multi-Mode Reader (Agilent, Santa Clara, CA, ABD) cihazında okutularak veriler kaydedildi.

3.2.6. Hücre Apoptozunun Belirlenmesi

Hücre apoptozunun belirlenmesi için Annexin V-PE/7-AAD test kiti (Elabscience, Houston, Texas, ABD) tercih edildi.

Anneksin V testi için gerekli olan tampon çözeltisinin hazırlanması esnasında 5ml'lik eppendorf tüp içine;

- 180 µl Annexin binding buffer
- 18 µl Annexin V
- 18 µl Propidium iodide
- 18 µl DAPI boyası
- 1600 µl PBS eklendi.

Apoptoz tayini için 96 kuyucuklu hücre plakları inkübatörden çıkartıldı. Hücrelerin yer aldığı her bir kuyucuk 100 µl PBS ile çok yavaş bir şekilde yıkandı. Hazırlanılan tampon çözeltisinden her kuyucuğa 100'er µl eklendi. Karanlık bir ortamda oda sıcaklığında 20 dk. bekletildi. Son olarak iki kez 100'er µl PBS ile nazikçe yıkama yapılmasının ardından, hücrelerin canlı kalabilmesi için her bir kuyucuğa 100 µl PBS

eklendi. 1., 7. ve 11. günlerde apoptoz deneyleri gerçekleştirildi. Her grup için 3 kez olacak şekilde deneyler tekrarlandı.

3.2.7. Morfolojik Farklılaşma Analizleri

Hücrelerin morfolojik farklılaşma analizleri aktin boyama yöntemiyle yapılarak OB ve OC konfigürasyonları doğrulandı.

3.2.7.1. Boyama için gerekli olan solüsyonların hazırlanması: Formalin çözeltisi: %37'lik formaldehit (Formaldehit 37 % Chem Pure, ZS.100200.1000, Zag Kimya, İstanbul, Türkiye) PBS'de dilüe edilerek %4 konsantrasyonluk bir çözelti elde edidi.

Triton X100 çözeltisi: PBS'de dilüe edilerek %0,1 konsantrasyonluk bir Triton X100 (Triton X100, 648466, Merck-Millipore, Burlington, Massachusetts, ABD) çözeltisi elde edildi.

Falloidin boyası: Falloidin boyası (Phalloidin FITC Reagent, Ab235137, Abcam, Cambridge, Birleşik Krallık) PBS içinde 1:1000 oranında dilüe edilerek gerekli boya karışımı hazırlandı.

DAPI boyası: DAPI boyası (DAPI (hydrochloride), 14285, Abcam, Cambridge, Birleşik Krallık) önce 2 ml su içinde çözülerek 14.3 µmolar konsantrasyona ulaşıldı. Bu çözeltiden alınan 2.1 µl örnek, 100 µl PBS içinde tekrar çözülerek 300 µmolar konsantrasyonda bir karışım elde edildi. Bu karışımın PBS içinde 1:1000 oranında dilüe edilmesiyle DAPI boyası hazırlık süreci tamamlandı.

3.2.7.2. Aktin boyama protokolü: 96 kuyucuklu plaklarda yer alan hücrelerin besiyerleri pipetle çekildi. 300'er µl PBS ile yıkama yapıldı. Kuyucuklara 500'er µl formalin kenar kısmından çok yavaş bir şekilde eklendi ve plaklar 20 dk. oda ısısında bekletilerek hücreler fikse edildi. PBS ile yıkama yapıldı, 3 dk. beklendi ve yıkama işlemi her kuyucuk için toplamda üç kez olacak şekilde tekrar edildi.

Hücrelerin yer aldığı kuyucuklara 500'er µl Triton X100 eklendi hücre membranlarının geçirgen hale gelmesi sağlandı. Plaklar oda ısısında 5 dk. bekletildi ve 3 kez PBS ile yıkama yapıldı.

Herbir kuyucuğa 250 µl falloidin boyası eklerenerek 40 dk. karanlık bir ortamda bekletildi. Daha sonra kuyucuklara DAPI boyası eklenerek 5 dk. daha beklendi ve PBS

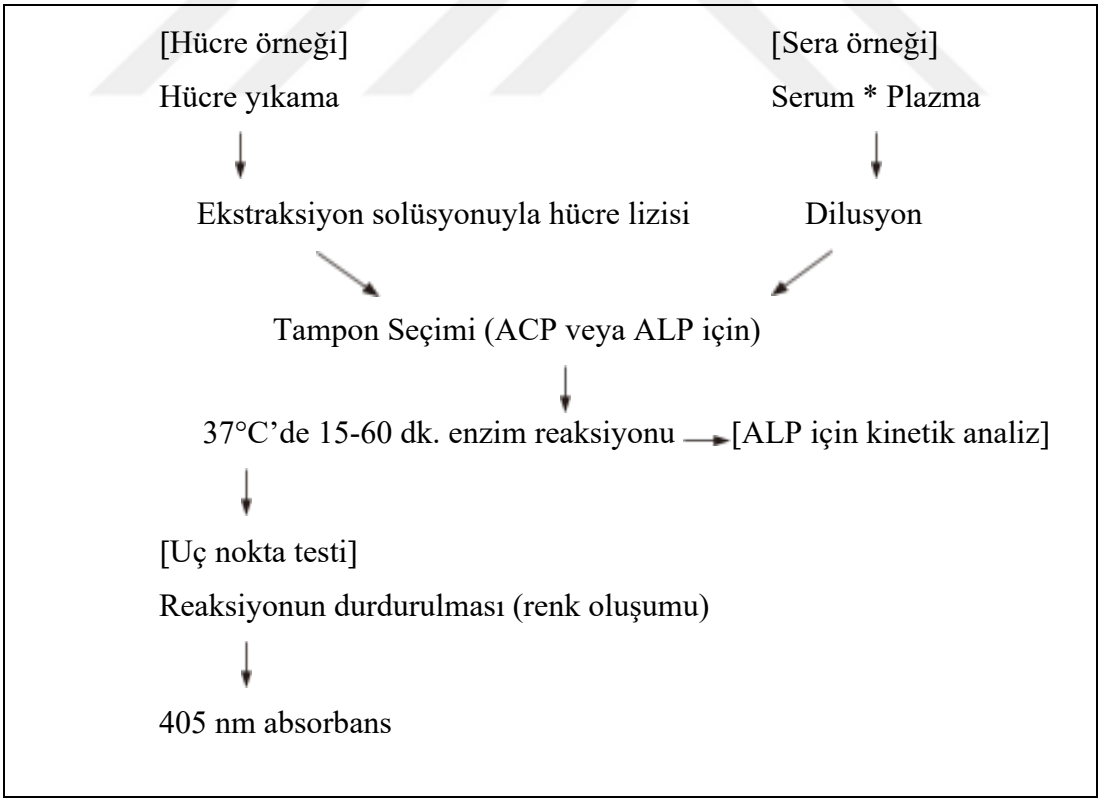
ile 3 kez yıkama yapıldı. 1., 7. ve 11. günler için floresan mikroskobunda görüntüler elde edilerek kaydedildi.

3.2.8. Tartrat Rezistan Asit Fosfataz (TRAP) ve Alkalen Fosfataz (ALP) Aktivitesinin Belirlenmesi

Hücrelerin TRAP ve ALP analizleri için TaKaRa marka test kitleri (TRACP & ALP Assay Kit, Takara Bio Inc., Kusatsu, Shiga, Japonya) kullanıldı.

3.2.8.1. Reaktiflerin hazırlanması: 1 şişe (24 mg) pNPP Substratı 5 ml ACP veya ALP Buffer içinde çözüldü ve bu Substrat Solüsyonu olarak kullanıldı (substrat konsantrasyonu: 12.5 mM). TRAP protokolü için Substrat Solüsyonunun hacminin 1/10'u oranında Sodyum Tartrat Solüsyonu eklendi. Her iki durumda da hazırlanan reaktifler -20°C'de saklandı ve 1 hafta içinde kullanıldı.

3.2.8.2. TRAP ve ALP protokolünün ana hatları: TRAP ve ALP protokollerinin ana hatları Şekil 3.5'de gösterildiği gibidir.



Şekil 3.5: TRAP ve ALP protokolünün ana hatları

3.2.8.3. TRAP ve ALP protokolleri: TRAP ve ALP için uygulanan protokoller aşağıdaki gibidir.

1. 96 kuyucuklu plaklarda yer alan besiyeri süpernatantları pipetlenerek çekildi.
2. Her kuyucuğa 200 µl fizyolojik salin eklendi, bir kez yıkandı, ardından sıvı atıldı. Enzim reaksiyonunu engelleyebileceklerinden yıkama adımlarında fosfat tamponları kullanılmadı.
3. Hafifçe pipetleyerek her kuyucuğa 50 µl Ekstraksiyon Solüsyonu eklendi. Hücre lizisi mikroskopla doğrulandı.
4. Her kuyucuğa ölçüm için 50 µl Substrat Solüsyonu eklendi ve 37°C'de 45 dk. reaksiyona sokuldu. Hücre lizis numunesi ve Substrat Solüsyonunun hacim oranı maksimum 1:1 olacak şekilde belirlendi.
5. Her kuyucuğa 50 µl Stop Solüsyonu (0.5 N NaOH) eklendi ve renk oluşumundan sonra 405 nm'de absorbansı ölçüldü. ACP varlığında Stop Solüsyonu ilavesiyle renk oluşumu başladı.

3.2.9. Hücre Kültüründe Protein Miktar Tayini

Hücre içersinde bulunan total protein miktarlarını ölçmek için kolorimetrik yöntem (The Bio-Rad DC Protein Assay) kullanıldı. Protein tayini protokolleri:

1. Çalışma için gerekli olan her ml reaktif A için 20 µl reaktif S eklenerek reaksiyon karışımı hazırlandı.
2. 0,2 mg/ml ile 1,5 mg/ml protein içeren bir protein standardından 4 dilüsyon hazırlanarak standart bir eğri elde edildi. Sonuçlardan verim alabilmek için standart, numune ile aynı tamponda hazırlandı.
3. 5 µl standart ve örnekler temiz, kuru bir mikrotitre plakasına pipetle yerleştirildi.
4. Her kuyucuğa 25 µl reaktif A eklendi.
5. Her kuyucuğa 200 µl reaktif B eklendi. Plak mikroplak okuyucuya yerleştirildi ve 5 sn. hafifçe karışması sağlandı. Oluşan kabarcıklar temiz, kuru bir pipet ucuyla patlatıldı. Numune kuyularının çapraz kontaminasyonunu önlemek için özen gösterildi.
6. 15 dk. sonra absorbans değerleri 750 nm'de okundu.

3.2.10. İstatistiksel Analiz

Bu çalışmada istatistiksel analizler NCSS (Number Cruncher Statistical System) 2007 Statistical Software (Utah, USA) paket programı ile yapıldı.

Verilerin değerlendirilmesinde tanımlayıcı istatistiksel metotların (ortalama, standart sapma) yanı sıra Shapiro–Wilk normallik testi ile değişkenlerin dağılımına bakıldı. Normal dağılım gösteren değişkenlerin zaman karşılaştırmalarında eşlendirilmiş tek yönlü varyans analizi, alt grup karşılaştırmalarında Newman Keuls çoklu karşılaştırma testi, gruplar arası karşılaştırmalarda tek yönlü varyans analizi, alt grup karşılaştırmalarında Tukey çoklu karşılaştırma testi, ikili grupların karşılaştırılmasında bağımsız t testi kullanıldı. Sonuçlar, anlamlılık $p<0,05$ düzeyinde değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. HÜCRELERİN CANLILIK DÜZEYLERİNE AİT BULGULAR

4.1.1. Kontrol Gruplarının Hücresel Canlılık Düzeylerine Ait Bulgular

Kontrol gruplarının 1., 7. ve 11. günlerdeki hücresel canlılık ortalamaları Tablo 4.1'de, 7. ve 11. günlerde kontrol grupları arası hücresel canlılık ortalamalarının karşılaştırılmasına ait bulgular Tablo 4.2'de, kontrol gruplarının hücresel canlılık ortalamalarının günler arası karşılaştırılmasına ait bulgular Tablo 4.3'de sunulmuştur.

Tablo 4.1: Kontrol gruplarının tüm günlerdeki hücresel canlılık ortalamaları

	1. gün	**7. gün**	**11. gün**	**p**
OB+PBMC	100±12,16	100,29±12,82	100±7,21	0,996
OB	124,86±12,87	76,52±20,21	148,51±12,57	**0,004**
PBMC	100,54±8,27	126,96±14,63	117,82±10,4	0,129
p	0,058	**0,025**	**0,003**	

Tablo 4.2: 7. ve 11. günlerde hücresel canlılık ortalamalarının kontrol grupları arası karşılaştırılması

Tukey Çoklu Karşılaştırma Testi	**7. gün**	**11. gün**
OB+PBMC / OB	0,255	**0,003**
OB+PBMC / PBMC	0,189	0,170
OB / PBMC	**0,021**	**0,025**

OB+PBMC, OB ve PBMC gruplarının 1. gün hücresel canlılık ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmezken (p=0,058), 7. ve 11. gün hücresel canlılık ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmiştir (p=0,025, p=0,003). 7. günde PBMC grubunun OB grubuna kıyasla ve 11. günde OB grubunun OB+PBMC ve PBMC grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek hücresel canlılık ortalamasına sahip olduğu gözlenmiştir (p=0,021, p=0,003, p=0,025) (Tablo 4.1, Tablo 4.2).

Tablo 4.3: Kontrol gruplarının hücresel canlılık ortalamalarının günler arası karşılaştırılması

Newman Keuls Çoklu Karşılaştırma Testi	OB
1. gün / 7. gün	0,065
1. gün / 11. gün	**0,019**
7. gün / 11. gün	**0,018**

OB+PBMC ve PBMC grubunun 1., 7. ve 11. gün hücresel canlılık ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı değişim gözlenmemiştir (p=0,996, p=0,129). OB grubunun 11. gün hücresel canlılık ortalaması 1. gün ve 7. güne kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunurken (p=0,019, p=0,018), 1. ve 7. gün hücresel canlılık ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,065) (Tablo 4.1, Tablo 4.3)

4.1.2. Ultrason Gruplarının Hücresel Canlılık Düzeylerine Ait Bulgular

Ultrason gruplarının 1., 7. ve 11. günlerdeki hücresel canlılık ortalamaları Tablo 4.4'de, tüm günlerde ultrason grupları arası hücresel canlılık ortalamalarının karşılaştırılmasına ait bulgular Tablo 4.5'de, ultrason gruplarının hücresel canlılık ortalamalarının günler arası karşılaştırılması Tablo 4.6'da sunulmuştur.

Tablo 4.4: Ultrason gruplarının tüm günlerdeki hücresel canlılık ortalamaları

	1. gün	7. gün	11. gün	p
U1	91,35±17,24	95,65±17,97	109,41±7,61	0,147
U2	96,76±13,21	107,83±15,95	116,83±6,65	0,086
U3	83,78±11,86	143,48±21,04	121,78±8,46	**0,038**
U4	99,46±10,01	212,17±14,08	109,41±4,12	**0,0001**
p	0,544	**0,0001**	0,156	

Tablo 4.5: 7. günde hücresel canlılık ortalamalarının ultrason grupları arası karşılaştırılması

Tukey Çoklu Karşılaştırma Testi	7. gün
U1 / U2	0,818
U1 / U3	**0,041**
U1 / U4	**0,0001**
U2 / U3	0,142
U2 / U4	**0,0001**
U3 / U4	**0,005**

U1, U2, U3 ve U4 gruplarının 1. ve 11. gün hücresel canlılık ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,544, p=0,156). 7. günde U4 grubunun U1, U2 ve U3 grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek hücresel canlılık ortalamasına (p=0,0001, p=0,0001, p=0,005) ve U3 grubunun U1 grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek hücresel canlılık ortalamasına sahip olduğu bulunmuştur (p=0,041). Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p>0,05) (Tablo 4.4, Tablo 4.5).

Tablo 4.6: Ultrason gruplarının hücresel canlılık ortalamalarının günler arası karşılaştırılması

Newman Keuls Çoklu Karşılaştırma Testi	U3	U4
1. gün / 7. gün	0,07	**0,01**
1. gün / 11. gün	**0,038**	0,341
7. gün / 11. gün	0,330	**0,006**

U1 ve U2 grubunun 1., 7. ve 11. gün hücresel canlılık ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,147, p=0,086). U3 grubunun 11. gün hücresel canlılık ortalamasının 1. güne kıyasla (p=0,038), U4 grubunun 7. gün hücresel canlılık ortalamasının 1. ve 11. güne kıyasla anlamlı şekilde arttığı gözlenmiş (p=0,01, p=0,006), diğer zamanlar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p>0,05) (Tablo 4.4, Tablo 4.6).

4.1.3. Lazer Gruplarının Hücresel Canlılık Düzeylerine Ait Bulgular

Lazer gruplarının 1., 7. ve 11. günlerdeki hücresel canlılık ortalamaları Tablo 4.7'de, lazer gruplarının hücresel canlılık ortalamalarının günler arası karşılaştırılmasına ait bulgular Tablo 4.8'de sunulmuştur.

Tablo 4.7: Lazer gruplarının tüm günlerdeki hücresel canlılık ortalamaları

	1. gün	7. gün	11. gün	p
L1	71,35±3,07	112,17±6,58	299,5±7,21	**0,0001**
L2	75,68±13,9	381,74±10,03	58,91±12,55	**0,0001**
p	0,627	**0,0001**	**0,0001**	

L1 ve L2 gruplarının 1. gün hücresel canlılık ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmezken (p=0,627), 7. günde L2 grubunun hücresel canlılık ortalaması L1 grubuna kıyasla ve 11. günde L1 grubunun hücresel canlılık ortalaması L2 grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,0001) (Tablo 4.7).

Tablo 4.8: Lazer gruplarının hücresel canlılık ortalamalarının günler arası karşılaştırılması

Newman Keuls Çoklu Karşılaştırma Testi	L1	L2
1. gün / 7. gün	**0,002**	**0,002**
1. gün / 11. gün	**0,0001**	0,099
7. gün / 11. gün	**0,0001**	**0,002**

L1 grubunun 11. günde 1. ve 7. güne göre anlamlı derecede en yüksek hücresel canlılık ortalamasına sahip olduğu görülürken (p=0,0001), L2 grubunun 7. günde 1. ve 11. güne göre istatistiksel olarak anlamlı derecede en yüksek hücresel canlılık ortalamasına sahip olduğu görülmüştür (p=0,002) (Tablo 4.7, Tablo 4.8).

4.1.4. Kombinasyon Gruplarının Hücresel Canlılık Düzeylerine Ait Bulgular

Kombinasyon-I gruplarının 1., 7. ve 11. günlerdeki hücresel canlılık ortalamaları Tablo 4.9'da, 7. ve 11. günlerde kombinasyon-I grupları arası hücresel canlılık ortalamalarının karşılaştırılmasına ait bulgular Tablo 4.10'da, kombinasyon-I gruplarının hücresel canlılık ortalamalarının günler arası karşılaştırılmasına ait bulgular Tablo 4.11'de sunulmuştur.

Tablo 4.9: Kombinasyon-I gruplarının tüm günlerdeki hücresel canlılık ortalamaları

	1. gün	7. gün	11. gün	p
K1: U1-L1	75,14±13,29	139,13±17,87	78,22±13,66	**0,018**
K2: U2-L1	78,38±7,38	119,13±12,49	118,81±5,91	**0,024**
K3: U3-L1	84,86±8,58	139,13±21,38	62,87±10,58	**0,008**
K4: U4-L1	79,46±12,52	187,83±25,21	296,04±4,96	**0,0001**
p	0,729	**0,015**	**0,0001**	

Tablo 4.10: 7. ve 11. günlerde hücresel canlılık ortalamalarının kombinasyon-I grupları arası karşılaştırılması

Tukey Çoklu Karşılaştırma Testi	7.Gün	11.Gün
K1 / K2	0,603	**0,003**
K1 / K3	0,999	0,342
K1 / K4	0,069	**0,0001**
K2 / K3	0,603	**0,0001**
K2 / K4	**0,012**	**0,0001**
K3 / K4	0,069	**0,0001**

K1, K2, K3 ve K4 gruplarının 1. gün hücresel canlılık ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmezken (p=0,729), 7. ve 11. gün hücresel canlılık ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmiştir (p=0,015, p=0,0001). 7. günde K4 grubunun K2 grubuna kıyasla (p=0,012), 11. günde K2 grubunun K1 ve K3 grubuna kıyasla (p=0,003, p=0,0001), K4 grubunun K1, K2 ve K3 grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek hücresel canlılık ortalamasına sahip olduğu görülmüştür (p=0,0001) (Tablo 4.9, Tablo 4.10).

Tablo 4.11: Kombinasyon-I gruplarının hücresel canlılık ortalamalarının günler arası karşılaştırılması

Newman Keuls Çoklu Karşılaştırma Testi	K1	K2	K3	K4
1. gün / 7. gün	**0,016**	**0,029**	0,072	**0,022**
1. gün / 11. gün	0,838	**0,024**	0,203	**0,0001**
7. gün / 11. gün	0,077	0,991	**0,012**	**0,019**

Kombinasyon-I gruplarının hücresel canlılık ortalamaları günler arası karşılaştırıldığında 7. günde 1. güne göre K1, K2 ve K4 gruplarının canlılık ortalamalarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış (p=0,016, p=0,029, p=0,022), 11. günde 1. güne göre K2 ve K4 gruplarının canlılık ortalamalarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış (p=0,024, p=0,0001), 11. günde 7. güne göre K3 grubunun canlılık ortalamasında anlamlı derecede düşüş ve K4 grubunun canlılık ortalamasında anlamlı derecede artış saptanmıştır (p=0,012, p=0,019) (Tablo 4.9, Tablo 4.11).

Kombinasyon-II gruplarının 1., 7. ve 11. günlerdeki hücresel canlılık ortalamaları Tablo 4.12'de, 7. günde kombinasyon-II grupları arası hücresel canlılık

ortalamalarının karşılaştırılmasına ait bulgular Tablo 4.13'de, kombinasyon-II gruplarının hücresel canlılık ortalamalarının günler arası karşılaştırılmasına ait bulgular Tablo 4.14'de sunulmuştur.

Tablo 4.12: Kombinasyon-II gruplarının tüm günlerdeki hücresel canlılık ortalamaları

	1. gün	**7. gün**	**11. gün**	**p**
K5: U1-L2	69,19±11,16	116,52±5,1	87,13±6,72	**0,005**
K6: U2-L2	79,46±3,83	86,96±18,9	76,73±11,81	0,774
K7: U3-L2	85,41±11,85	335,65±12,31	85,64±16,1	**0,0001**
K8: U4-L2	94,05±6,45	118,26±20,4	101,98±11,31	0,242
p	0,058	**0,0001**	0,160	

Tablo 4.13: 7. günde hücresel canlılık ortalamalarının kombinasyon-II grupları arası karşılaştırılması

Tukey Çoklu Karşılaştırma Testi	**7. gün**
K5 / K6	0,176
K5 / K7	**0,0001**
K5 / K8	0,999
K6 / K7	**0,0001**
K6 / K8	0,146
K7 / K8	**0,0001**

K5, K6, K7 ve K8 gruplarının 1. ve 11. gün hücresel canlılık ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmezken (p=0,058, p=0,160), 7. gün hücresel canlılık ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmiştir (p=0,0001). 7. günde K7 grubunun K5, K6 ve K8 grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede en yüksek hücresel canlılık ortalamasına sahip olduğu görülmüştür (p=0,0001) (Tablo 4.12, Tablo 4.13)

Tablo 4.14: Kombinasyon-II gruplarının hücresel canlılık ortalamalarının günler arası karşılaştırılması

Newman Keuls Çoklu Karşılaştırma Testi	**K5**	**K7**
1. gün / 7. gün	**0,025**	**0,003**
1. gün / 11. gün	0,173	0,996
7. gün / 11. gün	**0,001**	**0,0001**

K6 ve K8 grubunun 1., 7. ve 11. gün hücresel canlılık ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,774, p=0,242). K5 ve K7 grubunun 7. gün hücresel canlılık ortalamaları 1. güne göre anlamlı düzeyde artış gösterirken (p=0,025, p=0,003), 11. gün hücresel canlılık ortalamaları 7. güne göre anlamlı düzeyde düşüş göstermiştir (p=0,001, p=0,0001) (Tablo 4.12, Tablo 4.14).

4.1.5. Kontrol Grubu ile Ultrason, Lazer ve Kombinasyon Gruplarının Hücresel Canlılık Düzeylerinin Karşılaştırılması

Ultrason gruplarının 1., 7. ve 11. günlerdeki hücresel canlılık düzeyinin kontrol grubu ile karşılaştırılmasına ait bulgular Tablo 4.15'de sunulmuştur.

Tablo 4.15: Ultrason gruplarının hücresel canlılık düzeyinin OB+PBMC grubu ile karşılaştırılması

		OB+PBMC	U	p*
	1. gün	100±12,16	91,35±17,24	0,501
	7. gün	100,29±12,82	95,65±17,97	0,734
U1	**11. gün**	100±7,21	109,41±7,61	0,208
	1. gün	100±12,16	96,76±13,21	0,722
	7. gün	100,29±12,82	107,83±15,95	0,544
U2	**11. gün**	100±7,21	116,83±6,65	**0,041**
	1. gün	100±12,16	83,78±11,86	0,174
	7. gün	100,29±12,82	143,48±21,04	**0,039**
U3	**11. gün**	100±7,21	121,78±8,46	**0,029**
	1. gün	100±12,16	99,46±10,01	0,941
	7. gün	100,29±12,82	212,17±14,08	**0,001**
U4	**11. gün**	100±7,21	109,41±4,12	0,121

*Bağımsız t testi

OB+PBMC ve U1 gruplarının 1., 7. ve 11. gün hücresel canlılık ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,501, p=0,734, p=0,208).

OB+PBMC ve U2 gruplarının 1. ve 7. gün hücresel canlılık ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmezken (p=0,722, p=0,544), 11. günde U2 grubunun OB+PBMC grubuna kıyasla anlamlı düzeyde artmış hücresel canlılık ortalamasına sahip olduğu görülmüştür (p=0,041).

OB+PBMC ve U3 gruplarının 1. gün hücresel canlılık ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmezken (p=0,174), 7. ve 11. günde U3 grubunun OB+PBMC grubuna kıyasla anlamlı düzeyde artmış hücresel canlılık ortalamasına sahip olduğu görülmüştür (p=0,039, p=0,029).

OB+PBMC ve U4 gruplarının 1. ve 11. gün hücresel canlılık ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmezken (p=0,941, p=0,121), 7. günde U4 grubunun OB+PBMC grubuna kıyasla anlamlı düzeyde artmış hücresel canlılık ortalamasına sahip olduğu görülmüştür (p=0,001) (Tablo 4.15).

Lazer gruplarının 1., 7. ve 11. günlerdeki hücresel canlılık düzeyinin kontrol grubu ile karşılaştırılmasına ait bulgular Tablo 4.16'da sunulmuştur.

Tablo 4.16: Lazer gruplarının hücresel canlılık düzeyinin OB+PBMC grubu ile karşılaştırılması

		OB+PBMC	**L**	**p***
	1. gün	100±12,16	71,35±3,07	**0,016**
	7. gün	100,29±12,82	112,17±6,58	0,217
L1	**11. gün**	100±7,21	299,5±7,21	**0,0001**
	1. gün	100±12,16	75,68±13,9	0,082
	7. gün	100,29±12,82	381,74±10,03	**0,0001**
L2	**11. gün**	100±7,21	58,91±12,55	**0,008**

*Bağımsız t testi

OB+PBMC ve L1 gruplarının 7. gün hücresel canlılık ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,217). L1 grubunun 1. gün hücresel canlılık ortalaması OB+PBMC grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunurken (p=0,016), 11. gün hücresel canlılık ortalaması OB+PBMC grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,0001).

OB+PBMC ve L2 gruplarının 1. gün hücresel canlılık ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,082). L2 grubunun 7. gün hücresel canlılık ortalaması OB+PBMC grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunurken (p=0,0001), 11. gün hücresel canlılık ortalaması OB+PBMC grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur (p=0,008).

Kombinasyon gruplarının 1., 7. ve 11. günlerdeki hücresel canlılık düzeyinin kontrol grubu ile karşılaştırılmasına ait bulgular Tablo 4.17 ve Tablo 4.18'de sunulmuştur.

Tablo 4.17: Kombinasyon-I gruplarının hücresel canlılık düzeyinin OB+PBMC grubu ile karşılaştırılması

		OB+PBMC	U-L	p*
K1: U1-L1	**1. gün**	100±12,16	75,14±13,29	0,072
	7. gün	100,29±12,82	139,13±17,87	**0,037**
	11. gün	100±7,21	78,22±13,66	0,071
K2: U2-L1	**1. gün**	100±12,16	78,38±7,38	0,055
	7. gün	100,29±12,82	119,13±12,49	0,147
	11. gün	100±7,21	118,81±5,91	**0,025**
K3: U3-L1	**1. gün**	100±12,16	84,86±8,58	0,149
	7. gün	100,29±12,82	139,13±21,38	0,053
	11. gün	100±7,21	62,87±10,58	**0,009**
K4: U4-L1	**1. gün**	100±12,16	79,46±12,52	0,111
	7. gün	100,29±12,82	187,83±25,21	**0,006**
	11. gün	100±7,21	296,04±4,96	**0,0001**

*Bağımsız t testi

OB+PBMC ve K1 gruplarının 1. ve 11. gün hücresel canlılık ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmezken (p=0,072, p=0,071), K1 grubunun 7. gün hücresel canlılık ortalaması OB+PBMC grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,037).

OB+PBMC ve K2 gruplarının 1. ve 7. gün hücresel canlılık ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmezken (p=0,055, p=0,147), K2 grubunun 11. gün hücresel canlılık ortalaması OB+PBMC grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,025).

OB+PBMC ve K3 gruplarının 1. ve 7. gün hücresel canlılık ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmezken (p=0,149, p=0,053), K3 grubunun 11. gün hücresel canlılık ortalaması OB+PBMC grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur (p=0,009).

OB+PBMC ve K4 gruplarının 1. gün hücresel canlılık ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmezken(p=0,111), K4 grubunun 7. ve 11. gün

hücresel canlılık ortalamaları OB+PBMC grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,006, p=0,0001) (Tablo 4.17).

Tablo 4.18: Kombinasyon-II gruplarının hücresel canlılık düzeyinin OB+PBMC grubu ile karşılaştırılması

		OB+PBMC	K= U-L	p*
	1. gün	100±12,16	69,19±11,16	**0,031**
K5:	**7. gün**	100,29±12,82	116,52±5,1	0,116
U1-L2	**11. gün**	100±7,21	87,13±6,72	0,081
	1. gün	100±12,16	79,46±3,83	**0,047**
K6:	**7. gün**	100,29±12,82	86,96±18,9	0,379
U2-L2	**11. gün**	100±7,21	76,73±11,81	**0,044**
	1. gün	100±12,16	85,41±11,85	0,206
K7:	**7. gün**	100,29±12,82	335,65±12,31	**0,0001**
U3-L2	**11. gün**	100±7,21	85,64±16,1	0,223
	1. gün	100±12,16	94,05±6,45	0,460
K8:	**7. gün**	100,29±12,82	118,26±20,4	0,273
U4-L2	**11. gün**	100±7,21	101,98±11,31	0,842

*Bağımsız t testi

K5 grubunun 1. gün hücresel canlılık ortalaması OB+PBMC grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur (p=0,031). OB+PBMC ve K5 gruplarının 7. ve 11. gün hücresel canlılık ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,116, p=0,081).

K6 grubunun 1. ve 11. gün hücresel canlılık ortalamaları OB+PBMC grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur (p=0,047, p=0,044). OB+PBMC ve K6 gruplarının 7. gün hücresel canlılık ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,379).

OB+PBMC ve K7 gruplarının 1. ve 11. gün hücresel canlılık ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,206, p=0,223). K7 grubunun 7. gün hücresel canlılık ortalaması OB+PBMC grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,0001).

OB+PBMC ve K8 gruplarının 1., 7. ve 11. gün hücresel canlılık ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,460, p=0,273, p=0,842) (Tablo 4.18).

4.1.6. Lazer Grupları ile Ultrason Gruplarının Hücresel Canlılık Düzeyinin Karşılaştırılması

Ultrason gruplarının 1., 7. ve 11. günlerdeki hücresel canlılık düzeyinin lazer grupları ile karşılaştırılmasına ait bulgular Tablo 4.19 ve Tablo 4.20'de sunulmuştur.

Tablo 4.19: Ultrason gruplarının hücresel canlılık düzeyinin L1 grubu ile karşılaştırılması

		L1	U	p*
	1. gün	71,35±3,07	91,35±17,24	0,119
	7. gün	112,17±6,58	95,65±17,97	0,203
U1	**11. gün**	299,5±7,21	109,41±7,61	**0,0001**
	1. gün	71,35±3,07	96,76±13,21	**0,033**
	7. gün	112,17±6,58	107,83±15,95	0,685
U2	**11. gün**	299,5±7,21	116,83±6,65	**0,0001**
	1. gün	71,35±3,07	83,78±11,86	0,145
	7. gün	112,17±6,58	143,48±21,04	0,073
U3	**11. gün**	299,5±7,21	121,78±8,46	**0,0001**
	1. gün	71,35±3,07	99,46±10,01	**0,009**
	7. gün	112,17±6,58	212,17±14,08	**0,0001**
U4	**11. gün**	299,5±7,21	109,41±4,12	**0,0001**

*Bağımsız t testi

U1 ve L1 gruplarının 1. ve 7. gün hücresel canlılık ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,119, p=0,203). L1 grubunun 11. gün hücresel canlılık ortalaması U1 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,0001).

U2 grubunun 1. gün hücresel canlılık ortalaması L1 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,033). U2 ve L1 gruplarının 7. gün hücresel canlılık ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,685). L1 grubunun 11. gün hücresel canlılık ortalaması U2 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,0001).

U3 ve L1 gruplarının 1. ve 7. gün hücresel canlılık ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,145, p=0,073). L1 grubunun 11. gün hücresel canlılık ortalaması U3 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,0001).

U4 grubunun 1. ve 7. gün hücresel canlılık ortalamaları L1 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunurken (p=0,009, p=0,0001), L1 grubunun 11. gün hücresel canlılık ortalaması U4 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,0001) (Tablo 4.19).

Tablo 4.20: Ultrason gruplarının hücresel canlılık düzeyinin L2 grubu ile karşılaştırılması

		L2	U	p*
	1. gün	75,68±13,9	91,35±17,24	0,287
	7. gün	381,74±10,03	95,65±17,97	**0,0001**
U1	**11. gün**	58,91±12,55	109,41±7,61	**0,004**
	1. gün	75,68±13,9	96,76±13,21	0,135
	7. gün	381,74±10,03	107,83±15,95	**0,0001**
U2	**11. gün**	58,91±12,55	116,83±6,65	**0,002**
	1. gün	75,68±13,9	83,78±11,86	0,467
	7. gün	381,74±10,03	143,48±21,04	**0,0001**
U3	**11. gün**	58,91±12,55	121,78±8,46	**0,002**
	1. gün	75,68±13,9	99,46±10,01	0,073
	7. gün	381,74±10,03	212,17±14,08	**0,0001**
U4	**11. gün**	58,91±12,55	109,41±4,12	**0,003**

*Bağımsız t testi

U1 ve L2 gruplarının 1. gün hücresel canlılık ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,287). L2 grubunun 7. gün hücresel canlılık ortalaması U1 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunurken (p=0,0001), U1 grubunun 11. gün hücresel canlılık ortalaması L2 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,004).

U2 ve L2 gruplarının 1. gün hücresel canlılık ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,135). L2 grubunun 7. gün hücresel canlılık ortalaması U2 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunurken (p=0,0001), U2 grubunun 11. gün hücresel canlılık ortalaması L2 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,002).

U3 ve L2 gruplarının 1. gün hücresel canlılık ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,467). L2 grubunun 7. gün hücresel canlılık ortalaması U3 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunurken

(p=0,0001), U3 grubunun 11. gün hücresel canlılık ortalaması L2 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,002).

U4 ve L2 gruplarının 1. gün hücresel canlılık ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,073). L2 grubunun 7. gün hücresel canlılık ortalaması U4 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunurken (p=0,0001), U4 grubunun 11. gün hücresel canlılık ortalaması L2 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,003) (Tablo 4.20).

4.1.7. Kombinasyon Grupları ile Lazer Gruplarının Hücresel Canlılık Düzeyinin Karşılaştırılması

Kombinasyon gruplarının 1., 7. ve 11. günlerdeki hücresel canlılık düzeyinin lazer grupları ile karşılaştırılmasına ait bulgular Tablo 4.21-22'de sunulmuştur.

Tablo 4.21: Kombinasyon-I grupları ile L1 grubunun hücresel canlılık düzeyinin karşılaştırılması

		L1	K: U-L	p*
	1. gün	71,35±3,07	75,14±13,29	0,656
K1:	**7. gün**	112,17±6,58	139,13±17,87	0,070
U1-L1	**11. gün**	299,5±7,21	78,22±13,66	**0,0001**
	1. gün	71,35±3,07	78,38±7,38	0,202
K2:	**7. gün**	112,17±6,58	119,13±12,49	0,478
U2-L1	**11. gün**	299,5±7,21	118,81±5,91	**0,0001**
	1. gün	71,35±3,07	84,86±8,58	0,06
K3:	**7. gün**	112,17±6,58	139,13±21,38	0,105
U3-L1	**11. gün**	299,5±7,21	62,87±10,58	**0,0001**
	1. gün	71,35±3,07	79,46±12,52	0,319
K4:	**7. gün**	112,17±6,58	187,83±25,21	**0,008**
U4-L1	**11. gün**	299,5±7,21	296,04±4,96	0,531

*Bağımsız t testi

K1 ve L1 gruplarının 1. ve 7. gün hücresel canlılık ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,656, p=0,070). K1 grubunun 11. gün hücresel canlılık ortalaması L1 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur (p=0,0001).

K2 ve L1 gruplarının 1. ve 7. gün hücresel canlılık ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,202, p=0,478). K2 grubunun

11. gün hücresel canlılık ortalaması L1 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur (p=0,0001).

K3 ve L1 gruplarının 1. ve 7. gün hücresel canlılık ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,06, p=0,105). K3 grubunun 11. gün hücresel canlılık ortalaması L1 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur (p=0,0001).

K4 ve L1 gruplarının 1. ve 11. gün hücresel canlılık ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,319, p=0,531). K4 grubunun 7. gün hücresel canlılık ortalaması L1 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,008) (Tablo 4.21).

Tablo 4.22: Kombinasyon-II grupları ile L2 grubunun hücresel canlılık düzeyinin karşılaştırılması

		L2	K: U-L	p*
	1. gün	75,68±13,9	69,19±11,16	0,563
K5:	**7. gün**	381,74±10,03	116,52±5,1	**0,0001**
U1-L2	**11. gün**	58,91±12,55	87,13±6,72	**0,027**
	1. gün	75,68±13,9	79,46±3,83	0,673
K6:	**7. gün**	381,74±10,03	86,96±18,9	**0,0001**
U2-L2	**11. gün**	58,91±12,55	76,73±11,81	0,145
	1. gün	75,68±13,9	85,41±11,85	0,401
K7:	**7. gün**	381,74±10,03	335,65±12,31	**0,011**
U3-L2	**11. gün**	58,91±12,55	85,64±16,1	0,087
	1. gün	75,68±13,9	94,05±6,45	0,109
K8:	**7. gün**	381,74±10,03	118,26±20,4	**0,0001**
U4-L2	**11. gün**	58,91±12,55	101,98±11,31	**0,012**

*Bağımsız t testi

K5 ve L2 gruplarının 1. gün hücresel canlılık ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,563). K5 grubunun 7. gün hücresel canlılık ortalaması L2 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunurken (p=0,0001), 11. gün hücresel canlılık ortalaması L2 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,027).

K6 ve L2 gruplarının 1. ve 11. gün hücresel canlılık ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,673, p=0,145). K6 grubunun 7.

gün hücresel canlılık ortalaması L2 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur (p=0,0001).

K7 ve L2 gruplarının 1. ve 11. gün hücresel canlılık ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,401, p=0,087). K7 grubunun 7. gün hücresel canlılık ortalaması L2 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur (p=0,011).

K8 ve L2 gruplarının 1. gün hücresel canlılık ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,109). K8 grubunun 7. gün hücresel canlılık ortalaması L2 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunurken (p=0,0001), 11. gün hücresel canlılık ortalaması L2 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,012) (Tablo 4.22).

4.1.8. Kombinasyon Grupları ile Ultrason Gruplarının Hücresel Canlılık Düzeyinin Karşılaştırılması

Kombinasyon gruplarının 1., 7. ve 11. günlerdeki hücresel canlılık düzeyinin ultrason grupları ile karşılaştırılmasına ait bulgular Tablo 4.23'de sunulmuştur.

Tablo 4.23: Kombinasyon gruplarının canlılık yüzdelerinin ultrason grupları ile karşılaştırılması

	CANLILIK	**U1**	**K: U-L**	**p***
K1: U1-L1	**1. gün**	91,35±17,24	75,14±13,29	0,266
	7. gün	95,65±17,97	139,13±17,87	**0,040**
	11. gün	109,41±7,61	78,22±13,66	**0,027**
K5: U1-L2	**1. gün**	91,35±17,24	69,19±11,16	0,135
	7. gün	95,65±17,97	116,52±5,1	0,129
	11. gün	109,41±7,61	87,13±6,72	**0,019**
	CANLILIK	**U2**	**K: U-L**	**p***
K2: U2-L1	**1. gün**	96,76±13,21	78,38±7,38	0,108
	7. gün	107,83±15,95	119,13±12,49	0,411
	11. gün	116,83±6,65	118,81±5,91	0,719
K6: U2-L2	**1. gün**	96,76±13,21	79,46±3,83	0,100
	7. gün	107,83±15,95	86,96±18,9	0,218
	11. gün	116,83±6,65	76,73±11,81	0,07

Tablo 4.23 (devam)

	CANLILIK	U3	K: U-L	p*
K3: U3-L1	**1. gün**	83,78±11,86	84,86±8,58	0,920
	7. gün	143,48±21,04	139,13±21,38	0,838
	11. gün	121,78±8,46	62,87±10,58	**0,002**
K7: U3-L2	**1. gün**	83,78±11,86	85,41±11,85	0,889
	7. gün	143,48±21,04	335,65±12,31	**0,001**
	11. gün	121,78±8,46	85,64±16,1	**0,026**
	CANLILIK	**U4**	**K: U-L**	**p***
K4: U4-L1	**1. gün**	99,46±10,01	79,46±12,52	0,099
	7. gün	212,17±14,08	187,83±25,21	0,209
	11. gün	109,41±4,12	296,04±4,96	**0,001**
K8: U4-L2	**1. gün**	99,46±10,01	94,05±6,45	0,449
	7. gün	212,17±14,08	118,26±20,4	**0,003**
	11. gün	109,41±4,12	101,98±11,31	0,327

*Bağımsız t testi

1. günde kombinasyon ve ultrason gruplarının hücresel canlılık yüzdeleri arasında istatiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir ($p<0,05$).

7. günde K1 grubunun hücresel canlılık yüzdesi U1 grubunun hücresel canlılık yüzdesinden ($p=0,040$), K7 grubunun hücresel canlılık yüzdesi U3 grubunun hücresel canlılık yüzdesinden ($p=0,001$), U4 grubunun hücresel canlılık yüzdesi K8 grubunun hücresel canlılık yüzdesinden ($p=0,003$) istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunurken, diğer gruplar arasında istatiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir ($p<0,05$).

11. günde U1 grubunun hücresel canlılık yüzdesi K1 ve K5 grubunun hücresel canlılık yüzdesinden ($p=0,027$, $p=0,019$), U3 grubunun hücresel canlılık yüzdesi K3 ve K7 grubunun hücresel canlılık yüzdesinden ($p=0,002$, $p=0,026$), K4 grubunun hücresel canlılık yüzdesi U4 grubunun hücresel canlılık yüzdesinden ($p=0,001$) istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunurken, diğer gruplar arasında istatiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir ($p<0,05$) (Tablo 4.23).

4.1.9. Kombinasyon-I ve Kombinasyon-II Gruplarının Hücresel Canlılık Düzeyinin Karşılaştırılması

Kombinasyon-I gruplarının 1., 7. ve 11. günlerdeki hücresel canlılık düzeyinin kombinasyon-II grupları ile karşılaştırılmasına ait bulgular Tablo 4.24'de sunulmuştur.

Tablo 4.24: Kombinasyon-I grupları ile Kombinasyon-II gruplarının karşılaştırılması

		U-L1	U-L2	p*
	1. gün	75,14±13,29	69,19±11,16	0,585
	7. gün	139,13±17,87	116,52±5,1	0,097
U1-L	**11. gün**	78,22±13,66	87,13±6,72	0,384
	1. gün	78,38±7,38	79,46±3,83	0,833
	7. gün	119,13±12,49	86,96±18,9	0,073
U2-L	**11. gün**	118,81±5,91	76,73±11,81	**0,005**
	1. gün	84,86±8,58	85,41±11,85	0,952
	7. gün	139,13±21,38	335,65±12,31	**0,0001**
U3-L	**11. gün**	62,87±10,58	85,64±16,1	0,133
	1. gün	79,46±12,52	94,05±6,45	0,159
	7. gün	187,83±25,21	118,26±20,4	**0,021**
U4-L	**11. gün**	296,04±4,96	101,98±11,31	**0,0001**

*Bağımsız t testi

K1 ve K5 gruplarının 1., 7. ve 11. gün hücresel canlılık ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,585, p=0,097, p=0,384).

K2 ve K6 gruplarının 1. ve 7. gün hücresel canlılık ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,833, p=0,073). K2 grubunun 11. gün hücresel canlılık ortalaması K6 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,005).

K3 ve K7 gruplarının 1. ve 11. gün hücresel canlılık ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,952, p=0,133). K7 grubunun 7. gün hücresel canlılık ortalaması K3 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,0001).

K4 ve K8 gruplarının 1. gün hücresel canlılık ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,159). K4 grubunun 7. ve 11. gün hücresel canlılık ortalamaları K8 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,021, p=0,0001) (Tablo 4.24).

4.2. HÜCRELERİN TRAP AKTİVİTELERİNE AİT BULGULAR

4.2.1. Kontrol Gruplarının TRAP Aktivitelerine Ait Bulgular

Tüm kontrol gruplarının 1., 7. ve 11. günlerde gösterdiği TRAP aktiviteleri Tablo 4.25'de, gruplar arası TRAP aktivitesi karşılaştırmaları Tablo 4.26'da ve günler arası TRAP aktivitesi karşılaştırmaları Tablo 4.27'de sunulmuştur.

Tablo 4.25: Kontrol gruplarının tüm günlerde gösterdiği TRAP aktiviteleri

	1. gün	7. gün	11. gün	p‡
OB+PBMC	0,0647±0,0062	0,2224±0,0131	0,0565±0,0026	**0,0001**
OB	0,0433±0,0058	0,0516±0,0138	0,0098±0,0029	**0,001**
PBMC	0,0259±0,0064	0,4564±0,0264	0,2397±0,0262	**0,0001**
p†	**0,001**	**0,0001**	**0,0001**	

†Tek Yönlü Varyans Analizi ‡Eşlendirilmiş Tek Yönlü Varyans Analizi

Tablo 4.26: 1., 7. ve 11. günlerde TRAP aktivitesinin kontrol grupları arası karşılaştırılması

Tukey Çoklu Karşılaştırma Testi	1. gün	7. gün	11. gün
OB+PBMC / OB	**0,013**	**0,0001**	**0,022**
OB+PBMC / PBMC	**0,001**	**0,0001**	**0,0001**
OB / PBMC	**0,03**	**0,0001**	**0,0001**

1., 7. ve 11. günlerde TRAP aktiviteleri bakımından OB+PBMC, OB ve PBMC grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmiştir (p=0,001, p=0,0001, p=0,0001). 1. günde OB+PBMC grubunun anlamlı derecede en yüksek TRAP aktivitesine sahip olduğu gözlenirken, 7. ve 11. günlerde PBMC grubunun anlamlı derecede en yüksek TRAP aktivitesine sahip olduğu gözlenmiştir (Tablo 4.25, Tablo 4.26).

Tablo 4.27: Kontrol gruplarının TRAP aktivitelerinin günler arası karşılaştırılması

Newman Keuls Çoklu Karşılaştırma Testi	OB+PBMC	OB	PBMC
1. gün / 7. gün	**0,005**	0,465	**0,002**
1. gün / 11. gün	0,228	**0,022**	**0,008**
7. gün / 11. gün	**0,002**	**0,035**	**0,005**

Tüm kontrol gruplarının TRAP aktivitesi ortalamalarının 1, 7. ve 11. günler arasında anlamlı değişim gösterdiği tespit edilmiştir. 7. günde OB+PBMC ve PBMC gruplarının TRAP aktiviteleri 1. güne göre anlamlı artış göstermiştir (p=0,005, p=0,002). 11. günde tüm kontrol gruplarının TRAP aktivitelerinde 7. güne göre anlamlı düşüş tespit edilmiştir (p<0,05). (Tablo 4.25, Tablo 4.27).

4.2.2. Ultrason Gruplarının TRAP Aktivitelerine Ait Bulgular

Ultrason gruplarının 1., 7. ve 11. günlerde gösterdiği TRAP aktiviteleri Tablo 4.28'de, 11. gün TRAP aktivitesinin gruplar arası karşılaştırılması Tablo 4.29'da ve TRAP aktivitelerinin günler arası karşılaştırılması Tablo 4.30'da sunulmuştur.

Tablo 4.28: Ultrason gruplarının tüm günlerde gösterdiği TRAP aktiviteleri

Gruplar	1. gün	7. gün	11. gün	p‡
U1	0,1119±0,0079	0,2233±0,0245	0,1011±0,0135	**0,003**
U2	0,1069±0,0167	0,2270±0,028	0,0627±0,0077	**0,001**
U3	0,0951±0,0021	0,2171±0,0198	0,0712±0,0078	**0,0001**
U4	0,0878±0,0071	0,2130±0,0153	0,0994±0,0055	**0,0001**
p†	0,062	0,871	**0,002**	

†Tek Yönlü Varyans Analizi ‡Eşlendirilmiş Tek Yönlü Varyans Analizi

Tablo 4.29: 11. günde TRAP aktivitesinin ultrason grupları arası karşılaştırılması

Tukey Çoklu Karşılaştırma Testi	11. gün
U1 / U2	**0,004**
U1 / U3	**0,016**
U1 / U4	0,995
U2 / U3	0,669
U2 / U4	**0,005**
U3 / U4	**0,022**

1. ve 7. günlerde TRAP aktiviteleri bakımından U1, U2, U3 ve U4 grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,062, p=0,871). 11. günde U1 grubunun TRAP aktivitesi U2 ve U3 gruplarına göre (p=0,004, p=0,016), U4 grubunun TRAP aktivitesi U2 ve U3 gruplarına göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,005, p=0,022) (Tablo 4.28, Tablo 4.29).

Tablo 4.30: Ultrason gruplarının TRAP aktivitelerinin günler arası karşılaştırılması

Newman Keuls Çoklu Karşılaştırma Testi	U1	U2	U3	U4
1. gün / 7. gün	**0,018**	**0,031**	**0,009**	**0,01**
1. gün / 11. gün	0,256	0,071	**0,049**	0,206
7. gün / 11. gün	**0,029**	**0,005**	**0,008**	**0,003**

Tüm ultrason gruplarının TRAP aktivitesi 1. güne kıyasla 7. günde istatistiksel olarak anlamlı şekilde artış gösterirken, 7. güne kıyasla 11. günde istatistiksel olarak anlamlı düşüş göstermiştir (Tablo 4.28, 4.30).

4.2.3. Lazer Gruplarının TRAP Aktivitelerine Ait Bulgular

Lazer gruplarının 1., 7. ve 11. günlerde gösterdiği TRAP aktiviteleri Tablo 4.31'de ve TRAP aktivitelerinin günler arası karşılaştırılmasına ait bulgular Tablo 4.32'de sunulmuştur.

Tablo 4.31: Lazer gruplarının tüm günlerde gösterdiği TRAP aktiviteleri

Grup	1. gün	7. gün	11. gün	p‡
L1	0,0940±0,0043	0,2106±0,0101	0,0599±0,0096	**0,0001**
L2	0,0838±0,0041	0,1559±0,0256	0,0759±0,0094	**0,005**
p*	**0,041**	**0,026**	0,108	

*Bağımsız t testi ‡Eşlendirilmiş Tek Yönlü Varyans Analizi

1. ve 7. günlerde L1 grubunun TRAP aktivitesinin L2 grubundan anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir (p=0,041, p=0,026). 11. günde TRAP aktivitesi bakımından L1 ve L2 grupları arasında anlamlı farklılık bulunamamıştır (Tablo 4.31).

Tablo 4.32: Lazer gruplarının TRAP aktivitelerinin günler arası karşılaştırılması

Newman Keuls Çoklu Karşılaştırma Testi	L1	L2
1. gün / 7. gün	**0,005**	0,055
1. gün / 11. gün	**0,008**	0,380
7. gün / 11. gün	**0,005**	**0,016**

L1 grubunun TRAP aktivitesi 1. günden 7. güne doğru anlamlı şekilde artarken, 7. günden 11. güne doğru anlamlı şekilde azalmıştır (p=0,005, p=0,005). L2 grubunun

TRAP aktivitesi 1. gün ve 7. gün arasında anlamlı değişim göstermezken, 7. günden 11. güne doğru anlamlı şekilde azalmıştır (p=0,055, p=0,016) (Tablo 4.32).

4.2.4. Kombinasyon Gruplarının TRAP Aktivitelerine Ait Bulgular

Kombinasyon-I gruplarının 1., 7. ve 11. günlerde gösterdiği TRAP aktiviteleri Tablo 4.33'de, gruplar arası TRAP aktivitesi karşılaştırmaları Tablo 4.34'de ve günler arası TRAP aktivitesi karşılaştırmaları Tablo 4.35'de sunulmuştur.

Tablo 4.33: Kombinasyon-I gruplarının tüm günlerde gösterdiği TRAP aktiviteleri

Grup	1. gün	7. gün	11. gün	p‡
K1: U1-L1	0,0833±0,0075	0,1893±0,0083	0,0930±0,0074	**0,0001**
K2: U2-L1	0,0841±0,0109	0,0315±0,0095	0,0718±0,0099	**0,002**
K3: U3-L1	0,1086±0,0145	0,1363±0,0064	0,0922±0,0071	**0,025**
K4: U4-L1	0,1051±0,0117	0,1840±0,0114	0,0076±0,0014	**0,0001**
p†	0,067	**0,0001**	**0,0001**	

†Tek Yönlü Varyans Analizi ‡Eşlendirilmiş Tek Yönlü Varyans Analizi

Tablo 4.34: 7. ve 11. günlerde TRAP aktivitesinin Kombinasyon-I grupları arası karşılaştırılması

Tukey Çoklu Karşılaştırma Testi	7. gün	11. gün
K1 / K2	**0,0001**	**0,027**
K1 / K3	**0,0001**	0,999
K1 / K4	0,890	**0,0001**
K2 / K3	**0,0001**	**0,033**
K2 / K4	**0,0001**	**0,0001**
K3 / K4	**0,001**	**0,0001**

1. günde K1, K2, K3, K4 gruplarının TRAP aktiviteleri arasında anlamlı farklılık görülmemiştir. 7. günde K1 grubunun TRAP aktivitesi K2 ve K3 grubuna göre anlamlı derecede yüksek (p=0,0001, p=0,0001), K2 grubunun TRAP aktivitesi K3 ve K4 grubuna göre anlamlı derecede düşük (p=0,0001, p=0,0001) ve K3 grubunun TRAP aktivitesi K4 grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur (p=0,001). 11. günde K4 grubunun TRAP aktivitesi K1, K2 ve K3 grubuna göre (p=0,0001), K2 grubunun TRAP aktivitesi K1 ve K3 grubuna göre anlamlı derecede düşüktür (p=0,027, p=0,033) (Tablo 4.33, Tablo 4.34).

Tablo 4.35: Kombinasyon-I gruplarının TRAP aktivitelerinin günler arası karşılaştırılması

Newman Keuls Çoklu Karşılaştırma Testi	U1-L1	U2-L1	U3-L1	U4-L1
1. gün / 7. gün	**0,0001**	**0,02**	0,120	**0,024**
1. gün / 11. gün	**0,04**	0,194	0,315	**0,004**
7. gün / 11. gün	**0,0001**	**0,001**	**0,006**	**0,002**

K1, K2 ve K4 gruplarının TRAP aktivitesi 1. günden 7. güne doğru anlamlı şekilde artmıştır. K1, K2, K3 ve K4 gruplarının TRAP aktiviteleri 7. günden 11. güne doğru anlamlı şekilde azalmıştır (Tablo 4.34, Tablo 4.36).

Kombinasyon-II gruplarının 1., 7. ve 11. günlerde gösterdiği TRAP aktiviteleri Tablo 4.36'da, gruplar arası TRAP aktivitesi karşılaştırmaları Tablo 4.37'de ve günler arası TRAP aktivitesi karşılaştırmaları Tablo 4.38'de sunulmuştur.

Tablo 4.36: Kombinasyon-II gruplarının tüm günlerde gösterdiği TRAP aktiviteleri

Gruplar	1. gün	7. gün	11. gün	p‡
K5: U1-L2	0,0922±0,0083	0,0815±0,0071	0,0883±0,0068	0,399
K6: U2-L2	0,0548±0,0086	0,1154±0,0088	0,0712±0,0024	**0,001**
K7: U3-L2	0,1195±0,0077	0,1685±0,0230	0,0900±0,0071	**0,012**
K8: U4-L2	0,0759±0,0105	0,3052±0,0344	0,1050±0,0053	**0,001**
p†	**0,0001**	**0,0001**	**0,001**	

†Tek Yönlü Varyans Analizi ‡Eşlendirilmiş Tek Yönlü Varyans Analizi

Tablo 4.37: 1., 7. ve 11. günlerde TRAP aktivitesinin Kombinasyon-II grupları arası karşılaştırılması

Tukey Çoklu Karşılaştırma Testi	1. gün	7. gün	11. gün
K5 / K6	**0,004**	0,288	**0,026**
K5 / K7	**0,022**	**0,005**	0,983
K5 / K8	0,185	**0,0001**	**0,03**
K6 / K7	**0,0001**	0,063	**0,016**
K6 / K8	0,073	**0,0001**	**0,0001**
K7 / K8	**0,001**	**0,0001**	**0,049**

1. günde K7 grubunun TRAP aktivitesi K5, K6 ve K8 gruplarından (p=0,022, p=0,0001, p=0,001), K5 grubunun TRAP aktivitesi K6 grubundan (p=0,004) anlamlı

şekilde yüksek bulunmuştur. 1. günde diğer gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmamaktadır (p>0,05).

7. günde K8 grubunun TRAP aktivitesi K5, K6 ve K7 grubundan (p=0,0001), K7 grubunun TRAP aktivitesi K5 grubundan (p=0,005) anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. 7. günde diğer gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmamaktadır (p>0,05).

11. günde K8 grubunun TRAP aktivitesi K5, K6 ve K7 grubundan (p=0,03; p=0,0001, p=0,049), K7 ve K5 grubunun TRAP aktivitesi K6 grubundan (p=0,026, p=0,016) anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (Tablo 4.36, Tablo 4.37).

Tablo 4.38: Kombinasyon-II gruplarının TRAP aktivitelerinin günler arası karşılaştırılması

Newman Keuls Çoklu Karşılaştırma Testi	K6	K7	K8
1. gün / 7. gün	**0,015**	0,097	**0,012**
1. gün / 11. gün	0,105	**0,032**	**0,021**
7. gün / 11. gün	**0,007**	**0,044**	**0,012**

K5 grubunun TRAP aktivitesi 1. günden 11. güne doğru anlamlı değişim göstermemiştir. K6 ve K8 gruplarının TRAP aktivitesi 1. günden 7. güne doğru anlamlı şekilde artmıştır (p=0,015, p=0,012). 7. günden 11. güne doğru K6, K7 ve K8 gruplarının TRAP aktiviteleri anlamlı şekilde azalmıştır (p=0,007, p=0,044, p=0,012) (Tablo 4.36, Tablo 4.38).

4.2.5. Kontrol Grubu ile Ultrason, Lazer ve Kombinasyon Gruplarının TRAP Aktivitelerinin Karşılaştırılması

Ultrason gruplarının 1., 7. ve 11. günlerdeki TRAP aktivitelerinin kontrol grubu ile karşılaştırılmasına ait bulgular Tablo 4.39'da sunulmuştur.

U1 grubunun 1. ve 11. gün TRAP ortalamaları OB+PBMC grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,001, p=0,005). OB+PBMC ve U1 gruplarının 7. gün TRAP ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,959).

U2 grubunun 1. gün TRAP ortalaması OB+PBMC grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,015). OB+PBMC ve U2 gruplarının 7. ve 11. gün TRAP ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,812, p=0,262).

U3 grubunun 1. ve 11. gün TRAP ortalamaları OB+PBMC grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,001, p=0,036). OB+PBMC ve U3 gruplarının 7. gün TRAP ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,716).

U4 grubunun 1. ve 11. gün TRAP ortalamaları OB+PBMC grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,013, p=0,0001). OB+PBMC ve U4 gruplarının 7. gün TRAP ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,462) (Tablo 4.39).

Tablo 4.39: Ultrason gruplarının TRAP aktivitelerinin OB+PBMC grubuyla karşılaştırılması

	TRAP	**OB+PBMC**	**U**	**p***
	1. gün	0,0647±0,0062	0,1119±0,0079	**0,001**
	7. gün	0,2224±0,0131	0,2233±0,0245	0,959
U1	**11. gün**	0,0565±0,0026	0,1011±0,0135	**0,005**
	1. gün	0,0647±0,0062	0,1069±0,0167	**0,015**
	7. gün	0,2224±0,0131	0,227±0,028	0,812
U2	**11. gün**	0,0565±0,0026	0,0627±0,0077	0,262
	1. gün	0,0647±0,0062	0,0951±0,0021	**0,001**
	7. gün	0,2224±0,0131	0,2171±0,0198	0,716
U3	**11. gün**	0,0565±0,0026	0,0712±0,0078	**0,036**
	1. gün	0,0647±0,0062	0,0878±0,0071	**0,013**
	7. gün	0,2224±0,0131	0,2130±0,0153	0,462
U4	**11. gün**	0,0565±0,0026	0,0994±0,0055	**0,0001**

*Bağımsız t testi

Lazer gruplarının 1., 7. ve 11. günlerdeki TRAP aktivitelerinin kontrol grubu ile karşılaştırılmasına ait bulgular Tablo 4.40'da sunulmuştur.

Tablo 4.40: Lazer gruplarının TRAP aktivitelerinin OB+PBMC grubuyla karşılaştırılması

	TRAP	OB+PBMC	L	p*
	1. gün	0,0647±0,0062	0,0940±0,0043	**0,003**
	7. gün	0,2224±0,0131	0,2106±0,0101	0,283
L1	**11. gün**	0,0565±0,0026	0,0599±0,0096	0,589
	1. gün	0,0647±0,0062	0,0838±0,0041	**0,011**
	7. gün	0,2224±0,0131	0,1559±0,0256	**0,016**
L2	**11. gün**	0,0565±0,0026	0,0759±0,0094	**0,026**

*Bağımsız t testi

L1 grubunun 1. gün TRAP ortalaması OB+PBMC grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,003). OB+PBMC ve L1 gruplarının 7. ve 11. gün TRAP ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,283, p=0,589).

L2 grubunun 1. ve 11. gün TRAP ortalamaları OB+PBMC grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek, 7. gün TRAP ortalamaları OB+PBMC grubundan istatiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur (p=0,011, p=0,026, p=0,016) (Tablo 4.40).

Kombinasyon gruplarının 1., 7. ve 11. günlerdeki TRAP aktivitelerinin kontrol grubu ile karşılaştırılmasına ait bulgular Tablo 4.41 ve Tablo 4.42'de sunulmuştur.

Tablo 4.41: Kombinasyon-I gruplarının TRAP aktivitelerinin OB+PBMC grubuyla karşılaştırılması

	TRAP	OB+PBMC	K: U-L	p*
	1. gün	0,0647±0,0062	0,0833±0,0075	**0,030**
K1:	**7. gün**	0,2224±0,0131	0,1893±0,0083	**0,021**
U1-L1	**11. gün**	0,0565±0,0026	0,0930±0,0074	**0,001**
	1. gün	0,0647±0,0062	0,0841±0,0109	0,054
K2:	**7. gün**	0,2224±0,0131	0,0315±0,0095	**0,0001**
U2-L1	**11. gün**	0,0565±0,0026	0,0718±0,0099	0,061
	1. gün	0,0647±0,0062	0,1086±0,0145	**0,008**
K3:	**7. gün**	0,2224±0,0131	0,1363±0,0064	**0,001**
U3-L1	**11. gün**	0,0565±0,0026	0,0922±0,0071	**0,001**
	1. gün	0,0647±0,0062	0,1051±0,0117	**0,001**
K4:	**7. gün**	0,2224±0,0131	0,1840±0,0114	**0,019**
U4-L1	**11. gün**	0,0565±0,0026	0,0076±0,0014	**0,0001**

*Bağımsız t testi

K1 grubunun 1. ve 11. gün TRAP ortalamaları OB+PBMC grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,030, p=0,001). K1 grubunun 7. gün TRAP ortalaması OB+PBMC grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur (p=0,021).

K2 ve OB+PBMC gruplarının 1. ve 11. gün TRAP ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,054, p=0,061). K2 grubunun 7. gün TRAP ortalaması OB+PBMC grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur (p=0,0001).

K3 grubunun 1. ve 11. gün TRAP ortalamaları OB+PBMC grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,008, p=0,001). K3 grubunun 7. gün TRAP ortalaması OB+PBMC grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur (p=0,001).

K4 grubunun 1. gün TRAP ortalaması OB+PBMC grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,001). K4 grubunun 7. ve 11. gün TRAP ortalamaları OB+PBMC grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur (p=0,019, p=0,001) (Tablo 4.41).

Tablo 4.42: Kombinasyon-II gruplarının TRAP aktivitelerinin OB+PBMC grubuyla karşılaştırılması

	TRAP	**OB+PBMC**	**K: U-L**	**p***
K5: U1-L2	**1. gün**	0,0647±0,0062	0,0922±0,0083	**0,010**
	7. gün	0,2224±0,0131	0,0815±0,0071	**0,0001**
	11. gün	0,0565±0,0026	0,0883±0,0068	**0,002**
K6: U2-L2	**1. gün**	0,0647±0,0062	0,0548±0,0086	0,181
	7. gün	0,2224±0,0131	0,1154±0,0088	**0,0001**
	11. gün	0,0565±0,0026	0,0712±0,0024	**0,002**
K7: U3-L2	**1. gün**	0,0647±0,0062	0,1195±0,0077	**0,001**
	7. gün	0,2224±0,0131	0,1685±0,0230	**0,024**
	11. gün	0,0565±0,0026	0,0900±0,0071	**0,002**
K8: U4-L2	**1. gün**	0,0647±0,0062	0,0759±0,0105	0,186
	7. gün	0,2224±0,0131	0,3052±0,0344	**0,018**
	11. gün	0,0565±0,0026	0,1050±0,0053	**0,0001**

*Bağımsız t testi

K5 grubunun 1. ve 11. gün TRAP ortalamaları OB+PBMC grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,010, p=0,002). K5

grubunun 7. gün TRAP ortalaması OB+PBMC grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur (p=0,0001).

K6 ve OB+PBMC gruplarının 1. gün TRAP ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,181). K6 grubunun 7. gün TRAP ortalaması OB+PBMC grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunurken (p=0,0001), K6 grubunun 11. gün TRAP ortalaması OB+PBMC grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,002).

K7 grubunun 1. ve 11. gün TRAP ortalamaları OB+PBMC grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,001, p=0,002). K7 grubunun 7. gün TRAP ortalaması OB+PBMC grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur (p=0,024).

K8 ve OB+PBMC gruplarının 1. gün TRAP ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,186). K8 grubunun 7. ve 11. gün TRAP ortalamaları OB+PBMC grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,018, p=0,0001) (Tablo 4.42).

4.2.6. Lazer Grupları ile Ultrason Gruplarının TRAP Aktivitelerinin Karşılaştırılması

Lazer grupları ile ultrason gruplarının 1., 7. ve 11. günlerdeki TRAP aktivitelerinin karşılaştırılmasına ait bulgular Tablo 4.43 ve Tablo 4.44'de sunulmuştur.

Tablo 4.43: Ultrason gruplarının TRAP aktivitelerinin L1 grubu ile karşılaştırılması

	TRAP	L1	U	p*
	1. gün	0,0940±0,0043	0,1119±0,0079	**0,026**
	7. gün	0,2106±0,0101	0,2233±0,0245	0,453
U1	**11. gün**	0,0599±0,0096	0,1011±0,0135	**0,013**
	1. gün	0,0940±0,0043	0,1069±0,0167	0,263
	7. gün	0,2106±0,0101	0,2270±0,028	0,394
U2	**11. gün**	0,0599±0,0096	0,0627±0,0077	0,719
	1. gün	0,0940±0,0043	0,0951±0,0021	0,710
	7. gün	0,2106±0,0101	0,2171±0,0198	0,640
U3	**11. gün**	0,0599±0,0096	0,0712±0,0078	0,188
	1. gün	0,0940±0,0043	0,0878±0,0071	0,263
	7. gün	0,2106±0,0101	0,2130±0,0153	0,832
U4	**11. gün**	0,0599±0,0096	0,0994±0,0055	**0,001**

*Bağımsız t testi

U1 grubunun 1. ve 11. gün TRAP ortalamaları L1 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,026, p=0,013). U1 ve L1 gruplarının 7. gün TRAP ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,453).

U2 ve L1 gruplarının 1., 7. ve 11. gün TRAP ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,263, p=0,394, p=0,719).

U3 ve L1 gruplarının 1., 7. ve 11. gün TRAP ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,710, p=0,640, p=0,188).

U4 ve L1 gruplarının 1. ve 7. gün TRAP ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,263, p=0,832). U4 grubunun 11. gün TRAP ortalaması L1 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,001) (Tablo 4.43).

Tablo 4.44: Ultrason gruplarının TRAP aktivitelerinin L2 grubu ile karşılaştırılması

	TRAP	**L2**	**U**	**p***
	1. gün	0,0838±0,0041	0,1119±0,0079	**0,005**
	7. gün	0,1559±0,0256	0,2233±0,0245	**0,030**
U1	**11. gün**	0,0759±0,0094	0,1011±0,0135	0,057
	1. gün	0,0838±0,0041	0,1069±0,0167	0,080
	7. gün	0,1559±0,0256	0,2270±0,0280	**0,031**
U2	**11. gün**	0,0759±0,0094	0,0627±0,0077	0,132
	1. gün	0,0838±0,0041	0,0951±0,0021	**0,013**
	7. gün	0,1559±0,0256	0,2171±0,0198	**0,031**
U3	**11. gün**	0,0759±0,0094	0,0712±0,0078	0,541
	1. gün	0,0838±0,0041	0,0878±0,0071	0,448
	7. gün	0,1559±0,0256	0,2130±0,0153	**0,029**
U4	**11. gün**	0,0759±0,0094	0,0994±0,0055	**0,020**

*Bağımsız t testi

U1 grubunun 1. ve 7. gün TRAP ortalamaları L2 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,005, p=0,030). U1 ve L2 gruplarının 11. gün TRAP ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,057).

U2 ve L2 gruplarının 1. ve 11. gün TRAP ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,080, p=0,132). U2 grubunun 7. gün TRAP

ortalaması L2 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,031).

U3 grubunun 1. ve 7. gün TRAP ortalamaları L2 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,013, p=0,031). U3 ve L2 gruplarının 11. gün TRAP ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,541).

U4 ve L2 gruplarının 1. gün TRAP ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,448). U4 grubunun 7. ve 11. gün TRAP ortalamaları L2 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,029, p=0,020) (Tablo 4.44).

4.2.7. Kombinasyon Grupları ile Lazer Gruplarının TRAP Aktivitelerinin Karşılaştırılması

Kombinasyon ile lazer gruplarının 1., 7. ve 11. günlerdeki TRAP aktivitelerinin karşılaştırılmasına ait bulgular Tablo 4.45 ve Tablo 4.46'da sunulmuştur.

Tablo 4.45: Kombinasyon-I gruplarının TRAP aktivitelerinin L1 grubu ile karşılaştırılması

	TRAP	L1	K: U-L	p*
	1. gün	0,094±0,0043	0,0833±0,0075	0,097
K1:	**7. gün**	0,2106±0,0101	0,1893±0,0083	**0,048**
U1-L1	**11. gün**	0,0599±0,0096	0,0930±0,0074	**0,009**
	1. gün	0,094±0,0043	0,0841±0,0109	0,216
K2:	**7. gün**	0,2106±0,0101	0,0315±0,0095	**0,0001**
U2-L1	**11. gün**	0,0599±0,0096	0,0718±0,0099	0,210
	1. gün	0,094±0,0043	0,1086±0,0145	0,169
K3:	**7. gün**	0,2106±0,0101	0,1363±0,0064	**0,0001**
U3-L1	**11. gün**	0,0599±0,0096	0,0922±0,0071	**0,009**
	1. gün	0,094±0,0043	0,1051±0,0117	0,198
K4:	**7. gün**	0,2106±0,0101	0,1840±0,0114	**0,039**
U4-L1	**11. gün**	0,0599±0,0096	0,0076±0,0014	**0,001**

*Bağımsız t testi

L1 ve K1 gruplarının 1. gün TRAP ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,097). K1 grubunun 7. gün TRAP ortalaması L1 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunurken (p=0,048), K1

grubunun 11. gün TRAP ortalaması L1 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,009).

L1 ve K2 gruplarının 1. ve 11. gün TRAP ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,216, p=0,210). K2 grubunun 7. gün TRAP ortalaması L1 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur (p=0,0001).

L1 ve K3 gruplarının 1. gün TRAP ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,169). K3 grubunun 7. gün TRAP ortalaması L1 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunurken (p=0,0001), K3 grubunun 11. gün TRAP ortalaması L1 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,009).

L1 ve K4 gruplarının 1. gün TRAP ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,198). K4 grubunun 7. ve 11. gün TRAP ortalamaları L1 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur (p=0,039, p=0,001) (Tablo 4.45).

Tablo 4.46: Kombinasyon-II gruplarının TRAP aktivitelerinin L2 grubu ile karşılaştırılması

	TRAP	**L2**	**U-L**	**p***
	1. gün	0,0838±0,0041	0,0922±0,0083	0,191
K5:	**7. gün**	0,1559±0,0256	0,0815±0,0071	**0,008**
U1-L2	**11. gün**	0,0759±0,0094	0,0883±0,0068	0,138
	1. gün	0,0838±0,0041	0,0548±0,0086	**0,006**
K6:	**7. gün**	0,1559±0,0256	0,1154±0,0088	0,060
U2-L2	**11. gün**	0,0759±0,0094	0,0712±0,0024	0,443
	1. gün	0,0838±0,0041	0,1195±0,0077	**0,002**
K7:	**7. gün**	0,1559±0,0256	0,1685±0,023	0,560
U3-L2	**11. gün**	0,0759±0,0094	0,09±0,0071	0,108
	1. gün	0,0838±0,0041	0,0759±0,0105	0,291
K8:	**7. gün**	0,1559±0,0256	0,3052±0,0344	**0,004**
U4-L2	**11. gün**	0,0759±0,0094	0,1050±0,0053	**0,010**

*Bağımsız t testi

L2 ve K5 gruplarının 1. ve 11. gün TRAP ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,191, p=0,138). K5 grubunun 7. gün TRAP

ortalaması L2 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur (p=0,008).

K6 grubunun 1. gün TRAP ortalaması L2 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur (p=0,006). L2 ve K6 gruplarının 7. ve 11. gün TRAP ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,060, p=0,443).

K7 grubunun 1. gün TRAP ortalaması L2 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,002). L2 ve K7 gruplarının 7. ve 11. gün TRAP ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,560, p=0,108).

L2 ve K8 gruplarının 1. gün TRAP ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,291). K8 grubunun 7. ve 11. gün TRAP ortalamaları L2 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,004, p=0,010) (Tablo 4.46).

4.2.8. Kombinasyon Grupları ile Ultrason Gruplarının TRAP Aktivitelerinin Karşılaştırılması

Kombinasyon grupları ile ultrason gruplarının 1., 7. ve 11. günlerdeki TRAP aktivitelerinin karşılaştırılmasına ait bulgular Tablo 4.47'de sunulmuştur.

Tablo 4.47: Kombinasyon gruplarının TRAP aktivitelerinin ultrason grupları ile karşılaştırılması

	TRAP	**U1**	**K: U-L**	**p***
K1: U1-L1	**1. gün**	0,1119±0,0079	0,0833±0,0075	**0,010**
	7. gün	0,2233±0,0245	0,1893±0,0083	0,085
	11. gün	0,1011±0,0135	0,0930±0,0074	0,410
K5: U1-L2	**1. gün**	0,1119±0,0079	0,0922±0,0083	**0,040**
	7. gün	0,2233±0,0245	0,0815±0,0071	**0,001**
	11. gün	0,1011±0,0135	0,0883±0,0068	0,215
	TRAP	**U2**	**K: U-L**	**p***
K2: U2-L1	**1. gün**	0,1069±0,0167	0,0841±0,0109	0,118
	7. gün	0,2270±0,0280	0,0315±0,0095	**0,001**
	11. gün	0,0627±0,0077	0,0718±0,0099	0,276
K6: U2-L2	**1. gün**	0,1069±0,0167	0,0548±0,0086	**0,009**
	7. gün	0,2270±0,0280	0,1154±0,0088	**0,003**
	11. gün	0,0627±0,0077	0,0712±0,0024	0,142

Tablo 4.47 (devam)

	TRAP	U3	K: U-L	p*
K3: U3-L1	**1. gün**	0,0951±0,0021	0,1086±0,0145	0,185
	7. gün	0,2171±0,0198	0,1363±0,0064	**0,003**
	11. gün	0,0712±0,0078	0,0922±0,0071	**0,026**
K7: U3-L2	**1. gün**	0,0951±0,0021	0,1195±0,0077	**0,006**
	7. gün	0,2171±0,0198	0,1685±0,023	**0,05**
	11. gün	0,0712±0,0078	0,09±0,0071	**0,037**
	TRAP	**U4**	**K: U-L**	**p***
K4: U4-L1	**1. gün**	0,0878±0,0071	0,1051±0,0117	0,093
	7. gün	0,2130±0,0153	0,1840±0,0114	0,058
	11. gün	0,0994±0,0055	0,0076±0,0014	**0,001**
K8: U4-L2	**1. gün**	0,0878±0,0071	0,0759±0,0105	0,179
	7. gün	0,2130±0,0153	0,3052±0,0344	**0,013**
	11. gün	0,0994±0,0055	0,1050±0,0053	0,272

*Bağımsız t testi

1. günde U1 grubunun TRAP aktivitesi K1 ve K5 grubunun TRAP aktivitesinden (p=0,010**,** p=0,040), U2 grubunun TRAP aktivitesi K6 grubunun TRAP aktivitesinden (p=0,009), K7 grubunun TRAP aktivitesi U3 grubunun TRAP aktivitesinden (p=0,006) istatiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunurken, diğer gruplar arasında istatiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır (p<0,05).

7. günde U1 grubunun TRAP aktivitesi K5 grubunun TRAP aktivitesinden (p=0,001), U2 grubunun TRAP aktivitesi K2 ve K6 grubunun TRAP aktivitesinden (p=0,001, p=0,003), U3 grubunun TRAP aktivitesi K3 ve K7 grubunun TRAP aktivitesinden (p=0,003, p=0,05), K8 grubunun TRAP aktivitesi U4 grubunun TRAP aktivitesinden (p=0,013) istatiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunurken, diğer gruplar arasında istatiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır (p<0,05).

11. günde K3 grubunun TRAP aktivitesi U3 grubunun TRAP aktivitesinden (p=0,026), K7 grubunun TRAP aktivitesi U3 grubunun TRAP aktivitesinden (p=0,037), U4 grubunun TRAP aktivitesi K4 grubunun TRAP aktivitesinden (p=0,001) istatiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunurken, diğer gruplar arasında istatiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır (p<0,05) (Tablo 4.47).

4.2.9. Kombinasyon-I ve Kombinasyon-II Gruplarının TRAP Aktivitelerinin Karşılaştırılması

Kombinasyon-I ve kombinasyon-II gruplarının 1., 7. ve 11. günlerdeki TRAP aktivitelerinin karşılaştırılmasına ait bulgular Tablo 4.48'de sunulmuştur.

Tablo 4.48: Kombinasyon-I ve Kombinasyon-II gruplarının TRAP aktivitelerinin karşılaştırılması

	TRAP	U-L1	U-L2	p*
	1. gün	0,0833±0,0075	0,0922±0,0083	0,238
	7. gün	0,1893±0,0083	0,0815±0,0071	**0,0001**
U1-L	**11. gün**	0,093±0,0074	0,0883±0,0068	0,464
	1. gün	0,0841±0,0109	0,0548±0,0086	**0,021**
	7. gün	0,0315±0,0095	0,1154±0,0088	**0,0001**
U2-L	**11. gün**	0,0718±0,0099	0,0712±0,0024	0,920
	1. gün	0,1086±0,0145	0,1195±0,0077	0,315
	7. gün	0,1363±0,0064	0,1685±0,023	0,080
U3-L	**11. gün**	0,0922±0,0071	0,09±0,0071	0,727
	1. gün	0,1051±0,0117	0,0759±0,0105	**0,032**
	7. gün	0,1840±0,0114	0,3052±0,0344	**0,004**
U4-L	**11. gün**	0,0076±0,0014	0,1050±0,0053	**0,0001**

*Bağımsız t testi

K1 ve K5 gruplarının 1. ve 11. gün TRAP aktiviteleri arasında istatiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,238, p=0,464). K1 grubunun 7. gün TRAP ortalaması K5 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,0001).

K6 grubunun 1. gün TRAP ortalaması K2 grubundan istatiksel olarak anlamlı derecede düşük ve 7. gün TRAP ortalaması K2 grubundan istatiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,021, p=0,0001). K2 ve K6 gruplarının 11. gün TRAP ortalamaları arasında istatiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,920).

K3 ve K7 gruplarının 1., 7. ve 11. gün TRAP aktiviteleri arasında istatiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,315, p=0,080, p=0,727).

K4 ve K8 gruplarının 1., 7. ve 11. gün TRAP aktiviteleri arasında istatiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmiştir. K8 grubunun 1. gün TRAP ortalaması K4 grubundan istatiksel olarak anlamlı derecede düşük, 7. ve 11. gün TRAP ortalamaları K4 grubundan istatiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (Tablo 4.48).

4.3. HÜCRELERİN ALP AKTİVİTELERİNE AİT BULGULAR

4.3.1. Kontrol Gruplarının ALP Aktivitelerine Ait Bulgular

Tüm kontrol gruplarının 1., 7. ve 11. günlerde gösterdiği ALP aktiviteleri Tablo 4.49'da, gruplar arası ALP aktivitesi karşılaştırmaları Tablo 4.50'de ve günler arası ALP aktivitesi karşılaştırmaları Tablo 4.51'de sunulmuştur.

Tablo 4.49: Kontrol gruplarının tüm günlerde gösterdiği ALP aktiviteleri

Gruplar	1. gün	7. gün	11. gün	p‡
OB+PBMC	0,0188±0,0025	0,0373±0,0067	0,0149±0,0026	**0,004**
OB	0,0432±0,0009	0,0693±0,0068	0,0152±0,0028	**0,0001**
PBMC	0,0029±0,0015	0,0062±0,0022	0,0037±0,0011	0,191
p†	**0,0001**	**0,0001**	**0,0001**	

†Tek Yönlü Varyans Analizi ‡Eşlendirilmiş Tek Yönlü Varyans Analizi

Tablo 4.50: 1. gün, 7. gün ve 11. günlerde ALP aktivitesinin kontrol grupları arası karşılaştırılması

Tukey Çoklu Karşılaştırma Testi	1. gün	7. gün	11. gün
OB+PBMC / OB	**0,0001**	**0,001**	0,986
OB+PBMC / PBMC	**0,0001**	**0,001**	**0,002**
OB / PBMC	**0,0001**	**0,0001**	**0,002**

1., 7. ve 11. günlerde ALP aktiviteleri bakımından OB+PBMC, OB ve PBMC grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmiştir (p=0,0001, p=0,0001, p=0,0001). 1. ve 7. günlerde OB grubunun anlamlı derecede en yüksek ALP aktivitesine sahip olduğu gözlenirken, tüm günlerde PBMC grubunun anlamlı derecede en düşük ALP aktivitesine sahip olduğu gözlenmiştir (Tablo 4.49, Tablo 4.50).

Tablo 4.51: Kontrol gruplarının ALP aktivitelerinin günler arası karşılaştırılması

Newman Keuls Çoklu Karşılaştırma Testi	OB+PBMC	OB
1. gün / 7. gün	**0,044**	**0,018**
1. gün / 11. gün	**0,007**	**0,002**
7. gün / 11. gün	**0,027**	**0,002**

OB+PBMC ve OB gruplarının ALP aktiviteleri 1. güne kıyasla 7. günde istatistiksel olarak anlamlı derecede artış gösterirken (p=0,044, p=0,0189), 7. güne kıyasla 11. günde istatistiksel olarak anlamlı derecede düşüş göstermiştir (p=0,027, p=0,002). PBMC grubunun ALP aktiviteleri günler arası karşılaştırıldığında anlamlı farklılık göstermemiştir (p=0,191) (Tablo 4.49, Tablo 4.51).

4.3.2. Ultrason Gruplarının ALP Aktivitelerine Ait Bulgular

Tüm ultrason gruplarının 1., 7. ve 11. günlerde gösterdiği ALP aktiviteleri Tablo 4.52'de, gruplar arası ALP aktivitesi karşılaştırmaları Tablo 4.53'de ve günler arası ALP aktivitesi karşılaştırmaları Tablo 4.54'de sunulmuştur.

Tablo 4.52: Ultrason gruplarının tüm günlerde gösterdiği ALP aktiviteleri

Gruplar	1. gün	7. gün	11. gün	p‡
U1	0,0186±0,0045	0,0382±0,0027	0,0366±0,0044	**0,006**
U2	0,0167±0,0052	0,0416±0,0066	0,0967±0,0097	**0,0001**
U3	0,0193±0,0012	0,0393±0,0051	0,0794±0,0062	**0,0001**
U4	0,0202±0,0041	0,0439±0,0013	0,1813±0,0075	**0,004**
p†	0,754	0,450	**0,0001**	

†Tek Yönlü Varyans Analizi ‡Eşlendirilmiş Tek Yönlü Varyans Analizi

Tablo 4.53: 11. günde ALP aktivitesinin ultrason grupları arası karşılaştırılması

Tukey Çoklu Karşılaştırma Testi	11. gün
U1 / U2	**0,0001**
U1 / U3	**0,0001**
U1 / U4	**0,0001**
U2 / U3	0,072
U2 / U4	**0,0001**
U3 / U4	**0,0001**

1. ve 7. günlerde ALP aktiviteleri bakımından U1, U2, U3 ve U4 grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmezken (p=0,754, p=0,450), 11. günde ALP aktiviteleri bakımından gruplar arasında anlamlı farklılık gözlenmiştir (p=0,0001). 11. günde U1 grubunun anlamlı derecede en düşük ALP aktivitesine ve U4 grubunun anlamlı derecede en yüksek ALP aktivitesine sahip olduğu görülmüştür

(p=0,0001). U2 ve U3 grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,072) (Tablo 4.52, Tablo 4.53).

Tablo 4.54: Ultrason gruplarının ALP aktivitelerinin günler arası karşılaştırılması

Newman Keuls Çoklu Karşılaştırma Testi	U1	U2	U3	U4
1. gün / 7. gün	**0,012**	**0,031**	**0,031**	**0,005**
1. gün / 11. gün	**0,002**	**0,002**	**0,002**	**0,0001**
7. gün / 11. gün	**0,001**	**0,021**	**0,021**	**0,001**

1. günden 7. güne doğru U1, U2, U3 ve U4 grubunun ALP aktiviteleri anlamlı şekilde artmıştır (p=0,012, p=0,031, P=0,031, P=0,005). 7. günden 11. güne doğru U2, U3 ve U4 gruplarının ALP aktiviteleri anlamlı şekilde artarken (p=0,021, p=0,021, p=0,001) U1 grubunun ALP aktivitesi anlamlı şekilde azalmıştır (p=0,001). Tüm ultrason gruplarının 1. güne kıyasla 11. gün ALP aktiviteleri istatiksel olarak anlamlı derecede artmıştır (p=0,001, p=0,021, p=0,021, p=0,001) (Tablo 4.52, Tablo 4.54).

4.3.3. Lazer Gruplarının ALP Aktivitelerine Ait Bulgular

Tüm lazer gruplarının 1., 7. ve 11. günlerde gösterdiği ALP aktiviteleri Tablo 4.55'de ve günler arası ALP aktivitesi karşılaştırmaları Tablo 4.56'da sunulmuştur.

Tablo 4.55: Lazer gruplarının tüm günlerde gösterdiği ALP aktiviteleri

Grup	1. gün	7. gün	11. gün	p‡
L1	0,0147±0,0019	0,0311±0,0054	0,0253±0,0027	**0,0001**
L2	0,0159±0,0006	0,0310±0,0009	0,0938±0,0108	**0,002**
p*	0,391	0,988	**0,0001**	

*Bağımsız t testi ‡Eşlendirilmiş Tek Yönlü Varyans Analizi

1. ve 7. günlerde ALP aktiviteleri bakımından L1 ve L2 grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmezken (p=0,391, p=0,988), 11. günde ALP aktiviteleri bakımından gruplar arasında anlamlı farklılık gözlenmiştir (p=0,0001). 11. günde L2 grubunun ALP aktivitesi L1 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,0001) (Tablo 4.55).

Tablo 4.56: Lazer gruplarının ALP aktivitelerinin günler arası karşılaştırılması

Newman Keuls Çoklu Karşılaştırma Testi	L1	L2
1. gün / 7. gün	**0,048**	**0,003**
1. gün / 11. gün	**0,036**	**0,006**
7. gün / 11. gün	0,297	**0,011**

1. güne kıyasla 7. günde L1 ve L2 gruplarının ALP aktiviteleri istatiksel olarak anlamlı düzeyde artış göstermiştir (p=0,048, p=0,003). 11. günde 7. güne kıyasla L1 grubunun ALP aktivitesinde istatiksel olarak anlamlı farklılık görülmezken (p=0,297), L2 grubunun ALP aktivitesinde anlamlı artış görülmüştür (p=0,011). Her iki grupta da 11. günde 1. güne kıyasla anlamlı artış izlenirken, L2 grubundaki artış istatistiksel olarak daha anlamlı düzeydedir (p=0,036, p=0,006) (Tablo 4.55, Tablo 4.56).

4.3.4. Kombinasyon Gruplarının ALP Aktivitelerine Ait Bulgular

Kombinasyon-I gruplarının 1., 7. ve 11. günlerde gösterdiği ALP aktiviteleri Tablo 4.57'de, gruplar arası ALP aktivitesi karşılaştırmaları Tablo 4.58'de ve günler arası ALP aktivitesi karşılaştırmaları Tablo 4.59'da sunulmuştur.

Tablo 4.57: Kombinasyon-I gruplarının tüm günlerde gösterdiği ALP aktiviteleri

Grup	1. gün	7. gün	11. gün	p‡
K1: U1-L1	0,0144±0,0043	0,0311±0,0048	0,0416±0,0054	**0,0001**
K2: U2-L1	0,0154±0,0047	0,0181±0,0014	0,0698±0,0094	**0,005**
K3: U3-L1	0,0184±0,0060	0,0229±0,0033	0,0490±0,0044	**0,0001**
K4: U4-L1	0,0205±0,0006	0,0372±0,0046	0,0569±0,0043	**0,0001**
p†	0,363	**0,001**	**0,003**	

†Tek Yönlü Varyans Analizi ‡Eşlendirilmiş Tek Yönlü Varyans Analizi

Tablo 4.58: 7. ve 11. günlerde ALP aktivitesinin Kombinasyon-I grupları arası karşılaştırılması

Tukey Çoklu Karşılaştırma Testi	7. gün	11. gün
K1 / K2	**0,013**	**0,002**
K1 / K3	0,111	0,500
K1 / K4	0,272	0,066
K2 / K3	0,459	**0,015**
K2 / K4	**0,001**	0,131
K3 / K4	**0,007**	0,457

1. günde ALP aktiviteleri bakımından K1, K2, K3 ve K4 grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmezken (p=0,363), 7. ve 11. günde ALP aktiviteleri bakımından gruplar arasında anlamlı farklılık gözlenmiştir (p=0,001, p=0,003). 7. günde K1 grubunun ALP aktivitesi K2 grubuna göre, K4 grubunun ALP aktivitesi K2 ve K3 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,013, p=0,001, p=0,007). 11. günde K2 grubunun ALP aktivitesi K1 ve K3 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,002, p=0,015) (Tablo 4.57, Tablo 4.58).

Tablo 4.59: Kombinasyon-I gruplarının ALP aktivitelerinin günler arası karşılaştırılması

Newman Keuls Çoklu Karşılaştırma Testi	K1	K2	K3	K4
1. gün / 7. gün	**0,048**	0,510	0,486	**0,03**
1. gün / 11. gün	**0,006**	**0,004**	**0,031**	**0,006**
7. gün / 11. gün	0,053	**0,013**	**0,008**	**0,004**

1. güne kıyasla 7. günde K1 ve K4 gruplarının ALP aktiviteleri anlamlı derecede artış göstermiştir (p=0,048, p=0,03). 1. güne kıyasla 11. günde tüm grupların ALP aktivitelerinde anlamlı artış görülürken (p<0,05), 7. güne kıyasla 11. günde K2, K3 ve K4 gruplarının ALP aktivitelerinde anlamlı artış görülmüştür (p<0,05) (Tablo 4.57, Tablo 4.59).

Kombinasyon-II gruplarının 1., 7. ve 11. günlerde gösterdiği ALP aktiviteleri Tablo 4.60'da, gruplar arası ALP aktivitesi karşılaştırmaları Tablo 4.61'de ve günler arası ALP aktivitesi karşılaştırmaları Tablo 4.62'de sunulmuştur

Tablo 4.60: Kombinasyon-II gruplarının tüm günlerde gösterdiği ALP aktiviteleri

Gruplar	1. gün	7. gün	11. gün	p‡
K5: U1-L2	0,0181±0,0034	0,0165±0,0053	0,0223±0,0050	0,367
K6: U2-L2	0,0096±0,0030	0,0949±0,0128	0,0846±0,0064	**0,0001**
K7: U3-L2	0,0242±0,0051	0,0475±0,0112	0,1030±0,0066	**0,001**
K8: U4-L2	0,0183±0,0036	0,0576±0,0013	0,0621±0,0041	**0,0001**
p†	**0,011**	**0,0001**	**0,0001**	

†Tek Yönlü Varyans Analizi ‡Eşlendirilmiş Tek Yönlü Varyans Analizi

Tablo 4.61: 1., 7. ve 11. günlerde ALP aktivitelerinin kombinasyon-II grupları arası karşılaştırılması

Tukey Çoklu Karşılaştırma Testi	1. gün	7. gün	11. gün
K5 / K6	0,101	**0,0001**	**0,0001**
K5 / K7	0,276	**0,012**	**0,0001**
K5 / K8	0,999	**0,002**	**0,0001**
K6 / K7	**0,007**	**0,001**	**0,017**
K6 / K8	0,092	**0,004**	**0,005**
K7 / K8	0,300	0,544	**0,0001**

1. günde K6 grubuna kıyasla K7 grubunda anlamlı derecede artış görülürken (p=0,007), diğer gruplar arasında anlamlı farklılık görülmemiştir (p>0,05). 7. günde K5 grubunun istatistiksel olarak anlamlı en düşük ALP aktivitesine sahip olduğu görülürken, K6 grubunun istatistiksel olarak anlamlı en yüksek ALP aktivitesine sahip olduğu görülmüştür. 11. günde K5 grubunun istatistiksel olarak anlamlı en düşük ALP aktivitesine sahip olduğu görülürken, K7 grubunun istatistiksel olarak anlamlı en yüksek ALP aktivitesine sahip olduğu görülmüştür (p<0,05) (Tablo 4.60, Tablo 4.61).

Tablo 4.62: Kombinasyon-II gruplarının ALP aktivitelerinin günler arası karşılaştırılması

Newman Keuls Çoklu Karşılaştırma Testi	K6	K7	K8
1. gün / 7. gün	**0,011**	0,118	**0,005**
1. gün / 11. gün	**0,005**	**0,001**	**0,009**
7. gün / 11. gün	0,117	**0,022**	0,123

1. güne kıyasla 7. günde K6 ve K8 grubunda istatistiksel olarak anlamlı artış görülmüştür (p=0,011, p=0,005). 1. güne kıyasla 11. günde K6, K7 ve K8 grubunda istatistiksel olarak anlamlı artış görülmüştür (p=0,005, p=0,001, p=0,009). 7. güne kıyasla 11. günde K7 grubunda istatistiksel olarak anlamlı artış görülmüştür (p=0,022) (Tablo 4.60, Tablo 4.62).

4.3.5. Kontrol Grubu ile Ultrason, Lazer ve Kombinasyon Gruplarının ALP Aktivitelerinin Karşılaştırılması

Ultrason gruplarının 1., 7. ve 11. günlerdeki ALP aktivitelerinin kontrol grubu ile karşılaştırılmasına ait bulgular Tablo 4.63'de sunulmuştur.

Tablo 4.63: Ultrason gruplarının ALP aktivitelerinin OB+PBMC grubuyla karşılaştırılması

	ALP	OB+PBMC	U	p*
	1. gün	0,0188±0,0025	0,0186±0,0045	0,949
	7. gün	0,0373±0,0067	0,0382±0,0027	0,837
U1	**11. gün**	0,0149±0,0026	0,0366±0,0044	**0,002**
	1. gün	0,0188±0,0025	0,0167±0,0052	0,557
	7. gün	0,0373±0,0067	0,0416±0,0066	0,475
U2	**11. gün**	0,0149±0,0026	0,0967±0,0097	**0,0001**
	1. gün	0,0188±0,0025	0,0193±0,0012	0,783
	7. gün	0,0373±0,0067	0,0393±0,0051	0,697
U3	**11. gün**	0,0149±0,0026	0,0794±0,0062	**0,0001**
	1. gün	0,0188±0,0025	0,0202±0,0041	0,651
	7. gün	0,0373±0,0067	0,0439±0,0013	0,167
U4	**11. gün**	0,0149±0,0026	0,1813±0,0075	**0,0001**

*Bağımsız t testi

OB+PBMC ve U1 gruplarının 1. ve 7. gün ALP ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,949, p=0,837). U1 grubunun 11. gün ALP ortalaması OB+PBMC grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,001).

OB+PBMC ve U2 gruplarının 1. ve 7. gün ALP ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,557, p=0,475). U2 grubunun 11. gün ALP ortalaması OB+PBMC grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,0001).

OB+PBMC ve U3 gruplarının 1. ve 7. gün ALP ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,783, p=0,679). U3 grubunun 11. gün ALP ortalaması OB+PBMC grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,0001).

OB+PBMC ve U4 gruplarının 1. ve 7. gün ALP ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,651, p=0,167). U4 grubunun 11. gün ALP ortalaması OB+PBMC grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,0001) (Tablo 4.63).

Lazer gruplarının 1., 7. ve 11. günlerdeki ALP aktivitelerinin kontrol grubu ile karşılaştırılmasına ait bulgular Tablo 4.64'de sunulmuştur.

Tablo 4.64: Lazer gruplarının ALP aktivitelerinin OB+PBMC grubuyla karşılaştırılması

	ALP	OB+PBMC	L	p*
	1. gün	0,0188±0,0025	0,0147±0,0019	0,090
	7. gün	0,0373±0,0067	0,0311±0,0054	0,276
L1	**11. gün**	0,0149±0,0026	0,0253±0,0027	**0,009**
	1. gün	0,0188±0,0025	0,0159±0,0006	0,116
	7. gün	0,0373±0,0067	0,0310±0,0009	0,181
L2	**11. gün**	0,0149±0,0026	0,0938±0,0108	**0,0001**

*Bağımsız t testi

OB+PBMC ve L1 gruplarının 1. ve 7. gün ALP ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,090, p=0,276). L1 grubunun 11. gün ALP ortalaması OB+PBMC grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,009).

OB+PBMC ve L2 gruplarının 1. ve 7. gün ALP ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,116, p=0,181). L2 grubunun 11. gün ALP ortalaması OB+PBMC grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,0001) (Tablo 4.64).

Kombinasyon gruplarının 1., 7. ve 11. günlerdeki ALP aktivitelerinin kontrol grubu ile karşılaştırılmasına ait bulgular Tablo 4.65 ve Tablo 4.66'da sunulmuştur.

Tablo 4.65: Kombinasyon-I gruplarının ALP aktivitelerinin OB+PBMC grubuyla karşılaştırılması

	ALP	OB+PBMC	U-L	p*
	1. gün	0,0188±0,0025	0,0144±0,0043	0,199
K1:	**7. gün**	0,0373±0,0067	0,0311±0,0048	0,260
U1-L1	**11. gün**	0,0149±0,0026	0,0416±0,0054	**0,002**
	1. gün	0,0188±0,0025	0,0154±0,0047	0,326
K2:	**7. gün**	0,0373±0,0067	0,0181±0,0014	**0,008**
U2-L1	**11. gün**	0,0149±0,0026	0,0698±0,0094	**0,034**
	1. gün	0,0188±0,0025	0,0184±0,006	0,913
K3:	**7. gün**	0,0373±0,0067	0,0229±0,0033	**0,029**
U3-L1	**11. gün**	0,0149±0,0026	0,0490±0,0044	**0,0001**
	1. gün	0,0188±0,0025	0,0205±0,0006	0,318
K4:	**7. gün**	0,0373±0,0067	0,0372±0,0046	0,982
U4-L1	**11. gün**	0,0149±0,0026	0,0569±0,0043	**0,0001**

*Bağımsız t testi

OB+PBMC ve K1 gruplarının 1. ve 7. gün ALP ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,199, p=0,260). K1 grubunun 11. gün ALP ortalaması OB+PBMC grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,002).

OB+PBMC ve K2 gruplarının 1. gün ALP ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,326). K2 grubunun 7. gün ALP ortalaması OB+PBMC grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunurken (p=0,008), K2 grubunun 11. gün ALP ortalaması OB+PBMC grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,034).

OB+PBMC ve K3 gruplarının 1. gün ALP ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,913). K3 grubunun 7. gün ALP ortalaması OB+PBMC grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunurken (p=0,029), K3 grubunun 11. gün ALP ortalaması OB+PBMC grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,0001).

OB+PBMC ve K4 gruplarının 1. ve 7. gün ALP ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,318, p=0,982). K4 grubunun 11. gün ALP ortalaması OB+PBMC grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,0001) (Tablo 4.65).

Tablo 4.66: Kombinasyon-II gruplarının ALP aktivitelerinin OB+PBMC grubuyla karşılaştırılması

	ALP	**OB+PBMC**	**U-L**	**p***
	1. gün	0,0188±0,0025	0,0181±0,0034	0,766
K5:	**7. gün**	0,0373±0,0067	0,0165±0,0053	**0,013**
U1-L2	**11. gün**	0,0149±0,0026	0,0223±0,0050	0,086
	1. gün	0,0188±0,0025	0,0096±0,0030	**0,015**
K6:	**7. gün**	0,0373±0,0067	0,0949±0,0128	**0,002**
U2-L2	**11. gün**	0,0149±0,0026	0,0846±0,0064	**0,0001**
	1. gün	0,0188±0,0025	0,0242±0,0051	0,175
K7:	**7. gün**	0,0373±0,0067	0,0475±0,0112	0,247
U3-L2	**11. gün**	0,0149±0,0026	0,1030±0,0066	**0,0001**
	1. gün	0,0188±0,0025	0,0183±0,0036	0,833
K8:	**7. gün**	0,0373±0,0067	0,0576±0,0013	**0,007**
U4-L2	**11. gün**	0,0149±0,0026	0,0621±0,0041	**0,0001**

*Bağımsız t testi

OB+PBMC ve K5 gruplarının 1. ve 11. gün ALP ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,766, p=0,086). K5 grubunun 7. gün ALP ortalaması OB+PBMC grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur (p=0,013).

K6 grubunun 1. gün ALP ortalaması OB+PBMC grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur (p=0,015). K6 grubunun 7. ve 11. gün ALP ortalamaları OB+PBMC grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,002, p=0,0001).

OB+PBMC ve K7 gruplarının 1. ve 7. gün ALP ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,175, p=0,247). K7 grubunun 11. gün ALP ortalaması OB+PBMC grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,0001).

OB+PBMC ve K8 gruplarının 1. gün ALP ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,833). K8 grubunun 7. ve 11. gün ALP ortalamaları OB+PBMC grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,007, p=0,0001) (Tablo 4.66).

4.3.6. Lazer Grupları ile Ultrason Gruplarının ALP Aktivitelerinin Karşılaştırılması

Lazer grupları ile ultrason gruplarının 1., 7. ve 11. günlerdeki ALP aktivitelerinin karşılaştırılmasına ait bulgular Tablo 4.67 ve Tablo 4.68'de sunulmuştur.

Tablo 4.67: Ultrason gruplarının ALP aktivitelerinin L1 grubu ile karşılaştırılması

	ALP	L1	U	p*
	1. gün	0,0147±0,0019	0,0186±0,0045	0,240
	7. gün	0,0311±0,0054	0,0382±0,0027	0,107
U1	**11. gün**	0,0253±0,0027	0,0366±0,0044	**0,020**
	1. gün	0,0147±0,0019	0,0167±0,0052	0,576
	7. gün	0,0311±0,0054	0,0416±0,0066	**0,009**
U2	**11. gün**	0,0253±0,0027	0,0967±0,0097	**0,0001**
	1. gün	0,0147±0,0019	0,0193±0,0012	**0,026**
	7. gün	0,0311±0,0054	0,0393±0,0051	0,126
U3	**11. gün**	0,0253±0,0027	0,0794±0,0062	**0,0001**
	1. gün	0,0147±0,0019	0,0202±0,0041	0,109
	7. gün	0,0311±0,0054	0,0439±0,0013	**0,016**
U4	**11. gün**	0,0253±0,0027	0,1813±0,0075	**0,0001**

*Bağımsız t testi

U1 ve L1 gruplarının 1. ve 7. gün ALP ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,240, p=0,107). U1 grubunun 11. gün ALP ortalaması L1 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,020).

U2 ve L1 gruplarının 1. gün ALP ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,576). U2 grubunun 7. ve 11. gün ALP ortalamaları L1 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,009, p=0,0001).

U3 grubunun 1. ve 11. gün ALP ortalamaları L1 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,026, p=0,0001). L1 ve U3 gruplarının 7. gün ALP ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,126).

U4 ve L1 gruplarının 1. gün ALP ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,109). U4 grubunun 7. ve 11. gün ALP ortalamaları L1 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,016, p=0,0001) (Tablo 4.67).

Tablo 4.68: Ultrason gruplarının ALP aktivitelerinin L2 grubu ile karşılaştırılması

	ALP	**L2**	**U**	**p***
	1. gün	0,0159±0,0006	0,0186±0,0045	0,348
	7. gün	0,0310±0,0009	0,0382±0,0027	**0,011**
U1	**11. gün**	0,0938±0,0108	0,0366±0,0044	**0,001**
	1. gün	0,0159±0,0006	0,0167±0,0052	0,798
	7. gün	0,0310±0,0009	0,0416±0,0066	0,052
U2	**11. gün**	0,0938±0,0108	0,0967±0,0097	0,744
	1. gün	0,0159±0,0006	0,0193±0,0012	**0,011**
	7. gün	0,0310±0,0009	0,0393±0,0051	**0,048**
U3	**11. gün**	0,0938±0,0108	0,0794±0,0062	0,115
	1. gün	0,0159±0,0006	0,0202±0,0041	0,148
	7. gün	0,0310±0,0009	0,0439±0,0013	**0,0001**
U4	**11. gün**	0,0938±0,0108	0,1813±0,0075	**0,0001**

*Bağımsız t testi

U1 ve L2 gruplarının 1. gün ALP ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,348). U1 grubunun 7. gün ALP ortalaması L2

grubundan, L2 grubunun 11. gün ALP ortalaması U1 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,011, p=0,001).

U2 ve L2 gruplarının 1., 7. ve 11. gün ALP ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,798, p=0,052, p=0,744).

U3 grubunun 1. ve 7. gün ALP ortalamaları L2 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur (p=0,011, p=0,048). U3 ve L2 gruplarının 11. gün ALP ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,115).

U4 ve L2 gruplarının 1. gün ALP ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,148). U4 grubunun 7. ve 11. gün ALP ortalamaları L2 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,0001) (Tablo 4.68).

4.3.7. Kombinasyon Grupları ile Lazer Gruplarının ALP Aktivitelerinin Karşılaştırılması

Kombinasyon grupları ile lazer gruplarının 1., 7. ve 11. günlerdeki ALP aktivitelerinin karşılaştırılmasına ait bulgular Tablo 4.69 ve Tablo 4.70'de sunulmuştur.

Tablo 4.69: Kombinasyon-I gruplarının ALP aktivitelerinin L1 grubu ile karşılaştırılması

	ALP	L1	U-L	p*
	1. gün	0,0147±0,0019	0,0144±0,0043	0,913
K1:	**7. gün**	0,0311±0,0054	0,0311±0,0048	0,999
U1-L1	**11. gün**	0,0253±0,0027	0,0416±0,0054	**0,010**
	1. gün	0,0147±0,0019	0,0154±0,0047	0,842
K2:	**7. gün**	0,0311±0,0054	0,0181±0,0014	**0,016**
U2-L1	**11. gün**	0,0253±0,0027	0,0698±0,0094	**0,001**
	1. gün	0,0147±0,0019	0,0184±0,006	0,372
K3:	**7. gün**	0,0311±0,0054	0,0229±0,0033	0,088
U3-L1	**11. gün**	0,0253±0,0027	0,0490±0,0044	**0,001**
	1. gün	0,0147±0,0019	0,0205±0,0006	**0,008**
K4:	**7. gün**	0,0311±0,0054	0,0372±0,0046	0,209
U4-L1	**11. gün**	0,0253±0,0027	0,0569±0,0043	**0,0001**

*Bağımsız t testi

L1 ve K1 gruplarının 1. ve 7. gün ALP ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,913, p=0,999). K1 grubunun 11. gün ALP ortalaması L1 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,010).

L1 ve K2 gruplarının 1. gün ALP ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,842). K2 grubunun 7. gün ALP ortalaması L1 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunurken (p=0,016), K2 grubunun 11. gün ALP ortalaması L1 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,001).

L1 ve K3 gruplarının 1. ve 7. gün ALP ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,372, p=0,088). K3 grubunun 11. gün ALP ortalaması L1 grubundan anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,001).

K4 grubunun 1. ve 11. gün ALP ortalamaları L1 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,008, p=0,0001). L1 ve K4 gruplarının 7. gün ALP ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,209) (Tablo 4.69).

Tablo 4.70: Kombinasyon-II gruplarının ALP aktivitelerinin L2 grubu ile karşılaştırılması

	ALP	**L2**	**K: U-L**	**p***
	1. gün	0,0159±0,0006	0,0181±0,0034	0,327
K5:	**7. gün**	0,0310±0,0009	0,0165±0,0053	**0,009**
U1-L2	**11. gün**	0,0938±0,0108	0,0223±0,0050	**0,0001**
	1. gün	0,0159±0,0006	0,0096±0,0030	**0,024**
K6:	**7. gün**	0,0310±0,0009	0,0949±0,0128	**0,001**
U2-L2	**11. gün**	0,0938±0,0108	0,0846±0,0064	0,275
	1. gün	0,0159±0,0006	0,0242±0,0051	**0,047**
K7:	**7. gün**	0,0310±0,0009	0,0475±0,0112	0,064
U3-L2	**11. gün**	0,0938±0,0108	0,103±0,0066	0,274
	1. gün	0,0159±0,0006	0,0183±0,0036	0,314
K8:	**7. gün**	0,0310±0,0009	0,0576±0,0013	**0,0001**
U4-L2	**11. gün**	0,0938±0,0108	0,0621±0,0041	**0,009**

*Bağımsız t testi

L2 ve K5 gruplarının 1. gün ALP ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,327). K5 grubunun 7. ve 11. gün ALP

ortalamaları L2 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur (p=0,009, p=0,0001).

K6 grubunun 1. gün ALP ortalaması L2 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük, 7. gün ALP ortalaması L2 grubundan istatiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,024, p=0,001). L2 ve K6 gruplarının 11. gün ALP ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,275).

K7 grubunun 1. gün ALP ortalaması L2 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur (p=0,047). L2 ve K7 gruplarının 7. ve 11. gün ALP ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,064, p=0,274).

L2 ve K8 gruplarının 1. gün ALP ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,314). K8 grubunun 7. gün ALP ortalaması L2 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek, 11. gün ALP ortalaması L2 grubundan istatiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur (p=0,0001, p=0,009).

4.3.8. Kombinasyon Grupları ile Ultrason Gruplarının ALP Aktivitelerinin Karşılaştırılması

Kombinasyon grupları ile ultrason gruplarının 1., 7. ve 11. günlerdeki ALP aktivitelerinin karşılaştırılmasına ait bulgular Tablo 4.71'de sunulmuştur.

Tablo 4.71: Kombinasyon gruplarının ALP aktivitelerinin ultrason grupları ile karşılaştırılması

	ALP	**U1**	**K: U-L**	**p***
K1: U1-L1	**1. gün**	0,0186±0,0045	0,0144±0,0043	0,305
	7. gün	0,0382±0,0027	0,0311±0,0048	0,088
	11. gün	0,0366±0,0044	0,0416±0,0054	0,288
K5: U1-L2	**1. gün**	0,0186±0,0045	0,0181±0,0034	0,869
	7. gün	0,0382±0,0027	0,0165±0,0053	**0,003**
	11. gün	0,0366±0,0044	0,0223±0,0050	**0,020**
	ALP	**U2**	**K: U-L**	**p***
K2: U2-L1	**1. gün**	0,0167±0,0052	0,0154±0,0047	0,761
	7. gün	0,0416±0,0066	0,0181±0,0014	**0,004**
	11. gün	0,0967±0,0097	0,0698±0,0094	**0,026**
K6: U2-L2	**1. gün**	0,0167±0,0052	0,0096±0,0030	0,110
	7. gün	0,0416±0,0066	0,0949±0,0128	**0,003**
	11. gün	0,0967±0,0097	0,0846±0,0064	0,146

Tablo 4.71 (devam)

	ALP	U3	K: U-L	p*
K3: U3-L1	**1. gün**	0,0193±0,0012	0,0184±0,006	0,809
	7. gün	0,0393±0,0051	0,0229±0,0033	**0,010**
	11. gün	0,0794±0,0062	0,0490±0,0044	**0,002**
K7: U3-L2	**1. gün**	0,0193±0,0012	0,0242±0,0051	0,178
	7. gün	0,0393±0,0051	0,0475±0,0112	0,315
	11. gün	0,0794±0,0062	0,1030±0,0066	**0,010**
	ALP	**U4**	**K: U-L**	**p***
K4: U4-L1	**1. gün**	0,0202±0,0041	0,0205±0,0006	0,900
	7. gün	0,0439±0,0013	0,0372±0,0046	0,072
	11. gün	0,1813±0,0075	0,0569±0,0043	**0,001**
K8: U4-L2	**1. gün**	0,0202±0,0041	0,0183±0,0036	0,574
	7. gün	0,0439±0,0013	0,0576±0,0013	**0,001**
	11. gün	0,1813±0,0075	0,0621±0,0041	**0,001**

*Bağımsız t testi

1. günde kombinasyon ve ultrason gruplarının ALP aktiviteleri arasında istatiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir ($p<0,05$).

7. günde U1 grubunun ALP aktivitesi K5 grubunun ALP aktivitesinden ($p=0,003$), U2 grubunun ALP aktivitesi K2 grubunun ALP aktivitesinden ($p=0,004$), K6 grubunun ALP aktivitesi U2 grubunun ALP aktivitesinden ($p=0,03$) U3 grubunun ALP aktivitesi K3 grubunun ALP aktivitesinden, K8 grubunun ALP aktivitesi U4 grubunun ALP aktivitesinden istatiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunurken, diğer gruplar arasında istatiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır ($p<0,05$).

11. günde U1 grubunun ALP aktivitesi K5 grubunun ALP aktivitesinden, U2 grubunun ALP aktivitesi K2 ve K6 grubunun ALP aktivitesinden ($p=0,003$), U3 grubunun ALP aktivitesi K3 grubunun ALP aktivitesinden ($p=0,010$), K8 grubunun ALP aktivitesi U4 grubunun ALP aktivitesinden ($p=0,001$) istatiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunurken, diğer gruplar arasında istatiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır ($p<0,05$) (Tablo 4.71).

4.3.9. Kombinasyon-I ve Kombinasyon-II Gruplarının ALP Aktivitelerinin Karşılaştırılması

Kombinasyon-I grupları ile kombinasyon-II gruplarının 1., 7. ve 11. günlerdeki ALP aktivitelerinin karşılaştırılmasına ait bulgular Tablo 4.72'de sunulmuştur.

Tablo 4.72: Kombinasyon-I ve Kombinasyon-II gruplarının ALP aktivitelerinin karşılaştırılması

	ALP	U-L1	U-L2	p*
	1. gün	0,0144±0,0043	0,0181±0,0034	0,312
	7. gün	0,0311±0,0048	0,0165±0,0053	**0,024**
U-L	**11. gün**	0,0416±0,0054	0,0223±0,005	**0,011**
	1. gün	0,0154±0,0047	0,0096±0,003	0,149
	7. gün	0,0181±0,0014	0,0949±0,0128	**0,0001**
U-L	**11. gün**	0,0698±0,0094	0,0846±0,0064	0,087
	1. gün	0,0184±0,006	0,0242±0,0051	0,268
	7. gün	0,0229±0,0033	0,0475±0,0112	**0,002**
U-L	**11. gün**	0,049±0,0044	0,103±0,0066	**0,0001**
	1. gün	0,0205±0,0006	0,0183±0,0036	0,340
	7. gün	0,0372±0,0046	0,0576±0,0013	**0,002**
U-L	**11. gün**	0,0569±0,0043	0,0621±0,0041	0,203

*Bağımsız t testi

K1 ve K5 gruplarının 1. gün ALP ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,312). K1 grubunun 7. ve 11. gün ALP ortalamaları K5 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,024, p=0,0001).

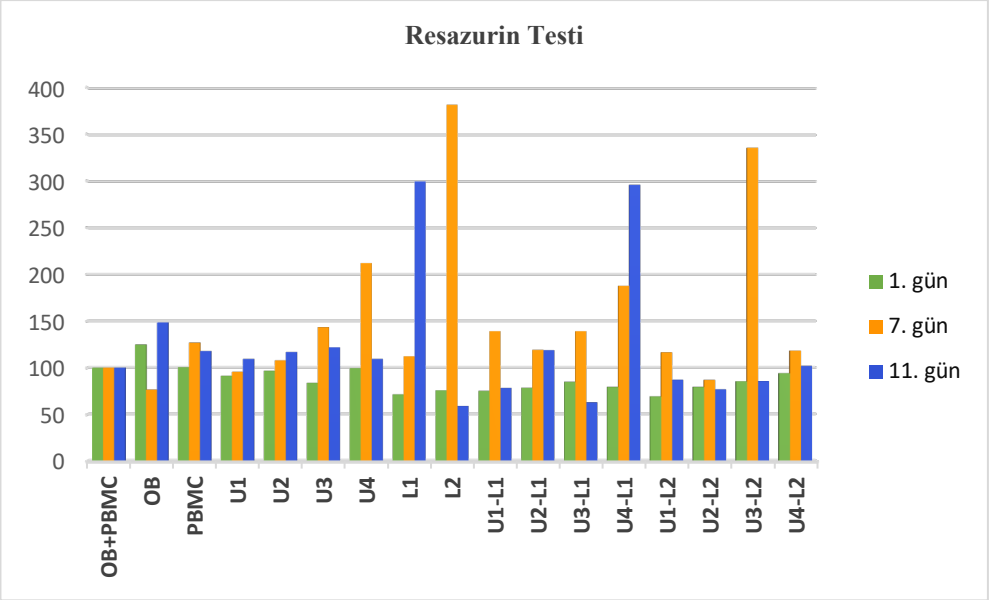
K2 ve K6 gruplarının 1. ve 11. gün ALP ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,149, p=0,087). K6 grubunun 7. gün ALP ortalaması K2 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,0001).

K3 ve K7 gruplarının 1. gün ALP ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,268). K7 grubunun 7. ve 11. gün ALP ortalamaları K3 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,002, p=0,0001).

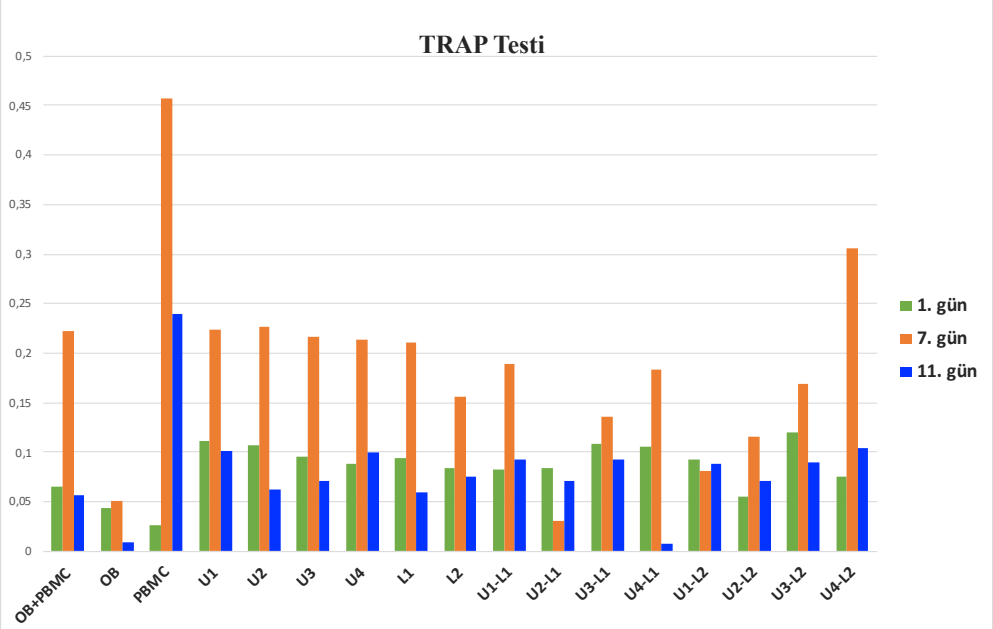
K4 ve K8 gruplarının 1. ve 11. gün ALP ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,340, p=0,203). K8 grubunun 7. gün ALP ortalaması K4 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,002) (Tablo 4.72).

4.4. HÜCRELERİN CANLILIK, TRAP VE ALP ANALİZLERİNE AİT GRAFİKLER

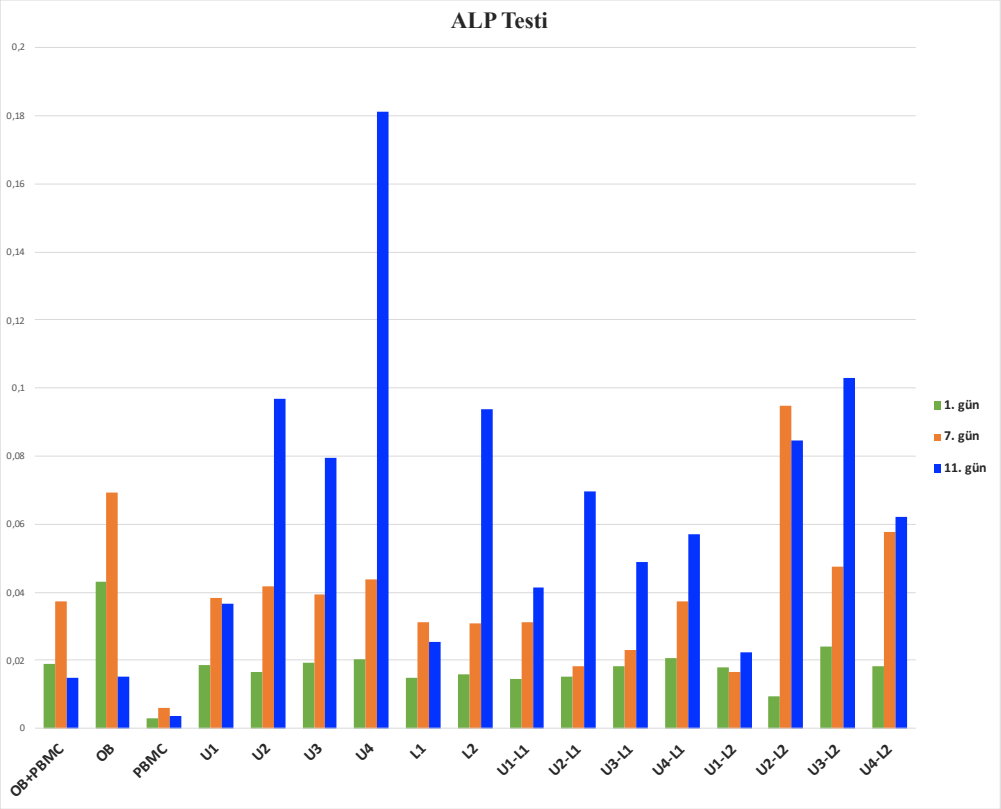
Şekil 4.1-3'de hücrelerin canlılık, TRAP ve ALP analizlerine ait bulgular grafikler ile gösterilmiştir.



Şekil 4.1: 1., 7. ve 11. günler resazurin testi sonuçları



Şekil 4.2: 1., 7. ve 11. günler TRAP enzim aktivitesi sonuçları

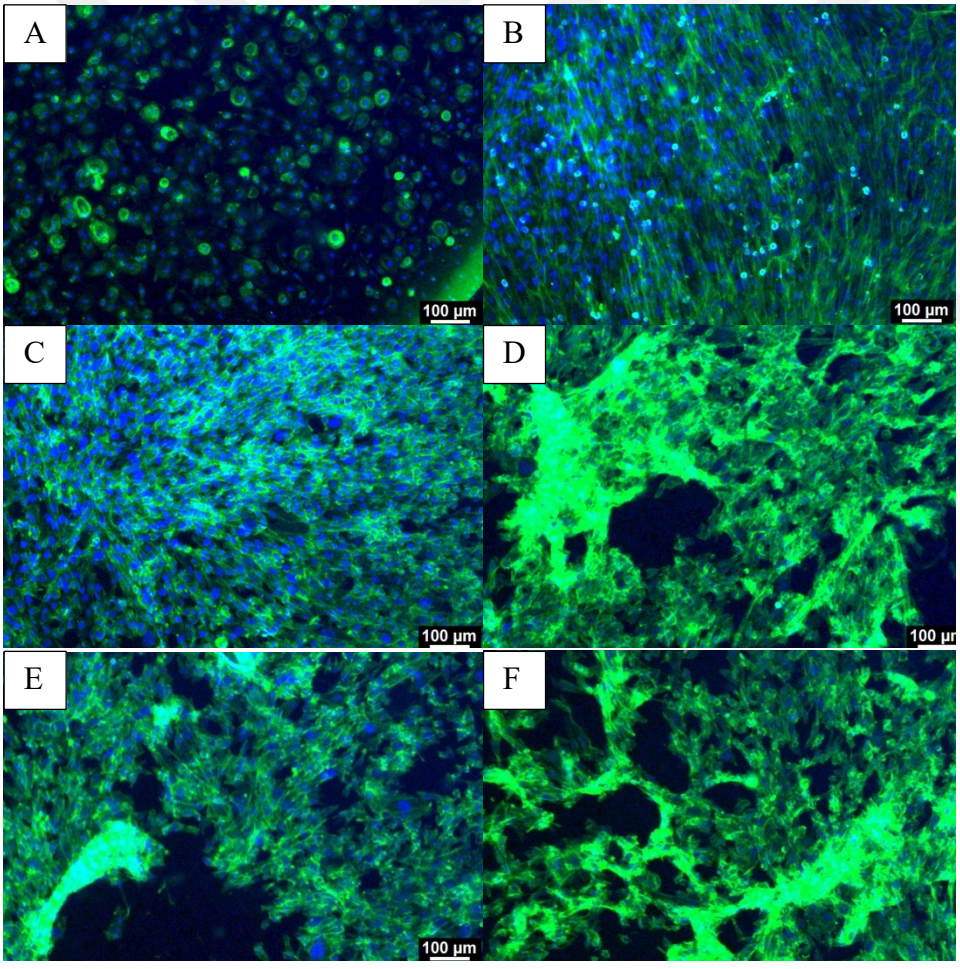


Şekil 4.3: 1., 7. ve 11. günler ALP enzim aktivitesi sonuçları

4.5. HÜCRELERİN MORFOLOJİK GÖRÜNÜMLERİNE AİT BULGULAR

4.3.1. Aktin Boyama Görüntüleri

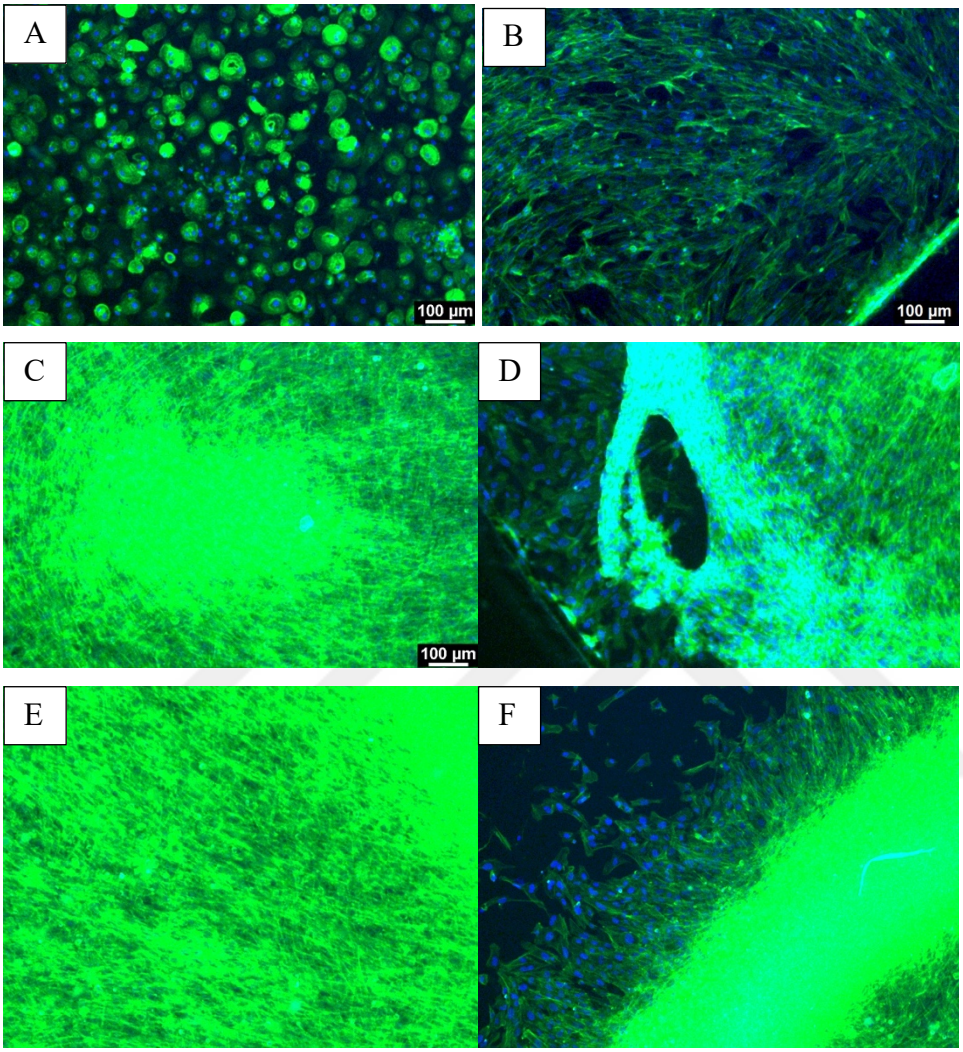
Şekil 4.4'de hücrelerin 1. gün aktin boyamalarına ait görüntüler yer almaktadır.



Şekil 4.4: 1. günde kontrol ve deney gruplarına ait aktin boyama görüntüleri

Not: **A)** PBMC gruplarına ait görüntü **B)** OB grubuna ait görüntü **C)** OB+PBMC grubuna ait görüntü **D)** U4 grubuna ait görüntü **E)** L2 grubuna ait görüntü **F)** U3-L2 grubuna ait görüntü

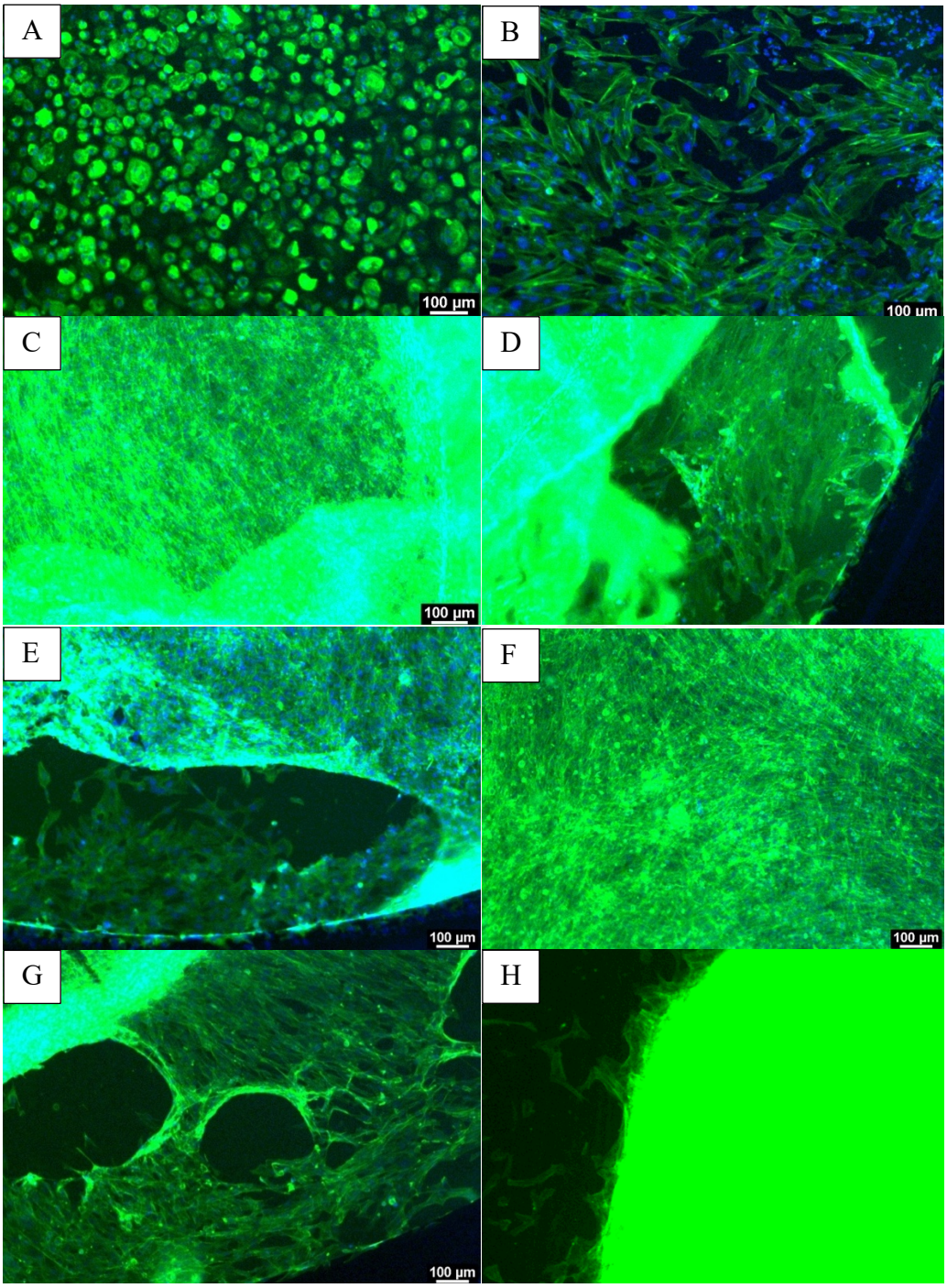
Şekil 4.5'de hücrelerin 7. gün aktin boyamalarına ait görüntüler yer almaktadır.



Şekil 4.5: 7. günde kontrol ve deney gruplarına ait aktin boyama görüntüleri

Not: **A)** PBMC kontrol grubuna ait görüntü **B)** OB kontrol grubuna ait görüntü **C)** OB-PBMC kontrol grubuna ait görüntü **D)** U4 grubuna ait görüntü **E)** L2 deney grubuna ait görüntü **F)** U4-L2 kontrol grubuna ait görüntü

Şekil 4.6'da hücrelerin 11. gün aktin boyamalarına ait görüntüler yer almaktadır.

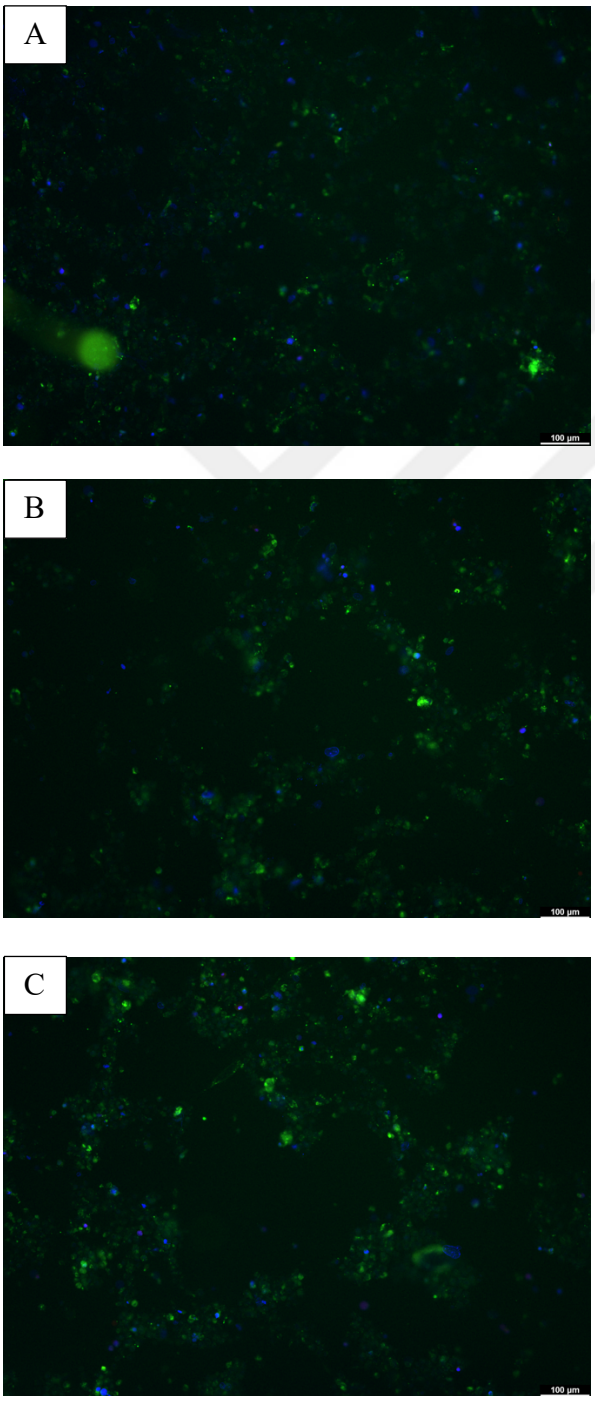


Şekil 4.6: 11. günde kontrol ve deney gruplarına ait aktin boyama görüntüleri

Not: A) PBMC kontrol grubuna ait görüntü B) OB kontrol grubuna ait görüntü C-D) OB-PBMC kontrol grubuna ait görüntüler E) U4 grubuna ait görüntü F) L2 grubuna ait görüntü G) U4-L2 grubuna ait görüntü H) U4-L1 grubuna ait görüntü

4.3.2. Hücrelerin Apoptoz Görüntüleri

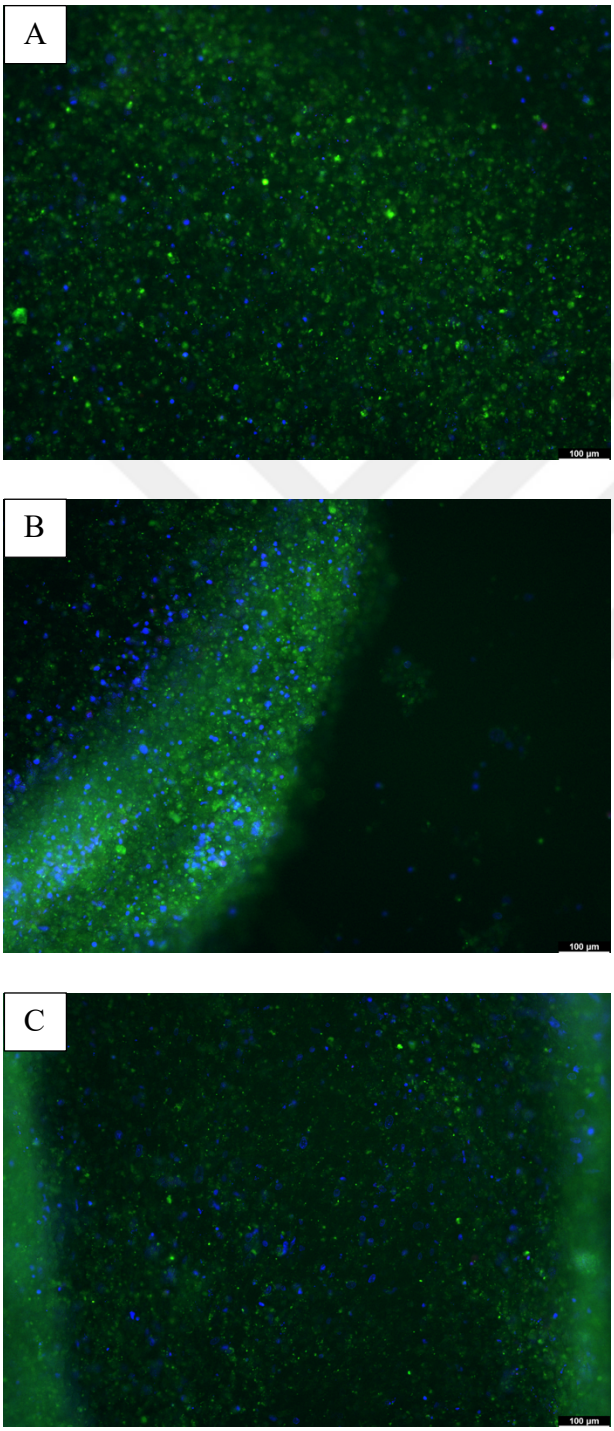
Şekil 4.7'de hücrelerin 1. gün apoptoz aktivitelerine ait görüntüler yer almaktadır.



Şekil 4.7: Hücrelerin 1. gün apoptoz sürecine ait görüntüler

Not: **A)** Kontrol grubu **B)** U4 grubu **C)** U4-L1 grubu

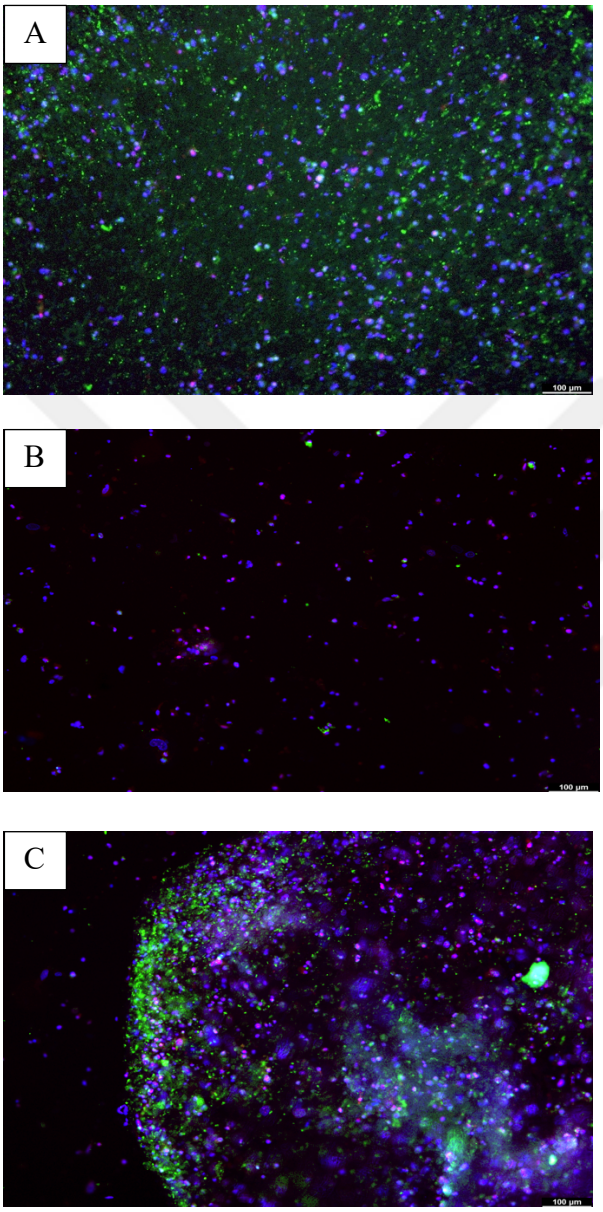
Şekil 4.8'de hücrelerin 7. gün apoptoz aktivitelerine ait görüntüler yer almaktadır.



Şekil 4.8: Hücrelerin 7. gün apoptoz sürecine ait görüntüler

Not: **A)** Kontrol grubu **B)** L2 grubu **C)** U3-L2 grubu

Şekil 4.9'da hücrelerin 11. gün apoptoz aktivitelerine ait görüntüler yer almaktadır.



Şekil 4.9: Hücrelerin 11. gün apoptoz sürecine ait görüntüler

Not: **A)** Kontrol grubu **B)** L1 grubu **C)** L2 grubu

5. TARTIŞMA

5.1. AMAÇ, GEREÇ VE YÖNTEMİN TARTIŞILMASI

Diş hekimliğinin birçok alanında kullanılan terapötik ultrason ve lazer teknolojisinin doku iyileşmesi üzerindeki olumlu etkileri (133-135), bu teknolojik uygulamaların ortodontik tedavide kullanım alanlarını da artırmıştır. Literatürde DSLT ve DYKU'nun kemikteki iyileşme paternini hızlandırarak ortodontik tedavi süresini kısalttığı (136,137) ve tedavi sırasında meydana gelen ağrı (138,139), inflamasyon (140,141), kök rezorpsiyonu (48,49,82,142,143) gibi yan etkileri azaltarak tedavi sürecini daha konforlu hale getirdiği ile ilgili çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalardan elde edilen çok sayıda olumlu bulgu raporuna rağmen, DSLT ve DYKU'nun biyokimyasal etki mekanizmalarının altında yatan nedenlerin tam olarak anlaşılamaması ve uygun doz seçimi için çok sayıda parametre arasından seçim yapmanın karmaşıklığı, DSLT ve DYKU uygulamalarıyla ilgili soru işaretlerini de beraberinde getirmiştir.

Literatür incelemesi sonunda, DSLT ve DYKU ile yapılan deneysel çalışmaların birbiriyle tartışmalı sonuçlar verdiğini; DSLT için enerji düzeyi, dalga boyu, güç ve uygulama süresi, DYKU için yoğunluk, frekans, uygulama süresi ve sıklığı konusunda net bir bilginin olmadığını tespit ettik. Çalışmamızda *in vitro* DSLT ve DYKU uygulamalarının farklı enerji düzeyleri ve uygulama sürelerindeki etkilerini birbiriyle kıyaslayarak ortodontik açıdan avantaj ve dezavantajlarını ortaya koyabilmeyi, her iki yöntemin birlikte kullanılmasının daha etkin olup olmadığını tespit etmeyi ve böylece DSLT ve DYKU'nun ortodonti pratiğinde hangi doz ve sürelerde uygulanmasının ne gibi etkilere sebep olabileceğini belirleyerek klinik uygulamalarda daha etkili kullanımını sağlamayı hedefledik.

Bilimsel çalışmalarda *in vivo* yöntemlerin kullanılmasının avantajları olmakla birlikte, her bilimsel yöntem gibi *in vivo* deneylerin de kendine özgü dezavantajları bulunmaktadır. *In vivo* deneylerde canlı organizmaların kullanılması etik ikilemler yaratmaktadır ve çevresel değişkenleri kontrol etmek çok daha zor olmaktadır. Bu nedenle sonuçlar her zaman güvenilir olmadığı gibi daha geniş bir popülasyon için de geçerli olmayabilmektedir (144). Yapılan bir çalışma, *in vivo* hayvan deneylerinden geçen ilaçların %90 kadarının sonraki insan deneylerinde başarısızlığa uğradığını,

dolayısıyla hayvan testlerinin her zaman insan deneylerinin sonuçlarını öngöremediğini göstermiştir (145).

In vitro deneyler, karmaşık, canlı organizmalar yerine hücreler veya biyolojik moleküller gibi biyolojik bileşenleri kullanarak canlı bir organizmanın dışında, bir test tüpünde ya da kültür kabında gerçekleştirilen deneylerdir. Bu testlerin *in vivo* testlere göre ana avantajı daha kontrollü bir ortamda gerçekleştiriliyor olmalarıdır. Bununla birlikte *in vitro* deneyler hayvan testi miktarını azalttığı için daha etiktir, daha geniş popülasyonlarda kullanılabilir ve genellikle daha ekonomiktir (146). Tüm bu bilgiler ışığında DSLT ve DYKU için etkin dozları belirlemeyi planladığımız çalışmamızı *in vitro* hücre kültür modelleri üzerinde gerçekleştirmeye karar verdik.

Bilindiği üzere kemik, çeşitli fonksiyonlara sahip, karmaşık ve dinamik, vasküler mineralize bir dokudur. Doku mühendisliği bağlamında kemik, multipotent hücrelerin ana kaynağıdır ve hematopoezin merkezi olan kemik iliğine ev sahipliği yapar (147). Bard ve ark. (148) tarafından 1972 yılında gerçekleştirilen yetişkin insan kemiğinden OB hücrelerinin ilk izolasyonundan bu yana, kemik biyolojisi ve özellikle osteoblastik hücreler hakkındaki bilgilerde büyük bir gelişme kaydedilmiştir. Hücre farklılaşmasının düzenlenmesi, sitokin ve hormonal düzenleme, matriks proteinlerinin sentezi ve salgılanması, kemik hastalıklarının moleküler mekanizmaları ve ilaç farmakokinetiğinin *in vitro* araştırmaları için model olacak şekilde stabilize osteoblastik hücre hatları geliştirilmiştir. Geçmişten günümüze OB hücre biyolojisini incelemek için farklı türlerden primer hücreler, pluripotent kök hücrelerden indüklenen OB'lar, immortalize ve malign hücre dizileri dâhil olmak üzere çeşitli hücre kültürü modelleri kullanılmıştır (147). Bu OB modellerinin kullanımına başlamadan önce göz önünde bulundurulması gereken bazı avantaj ve dezavantajlar vardır. Örneğin, osteosarkom hücre hatları, daha güvenilir tekrarlanabilirlik avantajıyla, zaman alıcı izolasyon veya etik kurul onayı gerektirmeden sınırsız sayıda üretilebilme kapasitesine sahipken, klinik olarak yetersiz uygulanabilirlik düzeyindedir (149). Primer hücreler ise, doğrudan doğal vücut dokusundan türetildiği ve değiştirilmediği için *in vivo* durumu ve fizyolojiyi oldukça iyi taklit ederek daha fazla klinik öncesi ve klinik uygulanabilirliğe sahiptir (150). Hayvan hücrelerinden elde edilen primer hücrelerdeki mevcut tür farklılıkları, insan klinik hastalığına ve tedavi sonuçlarına ilişkin ekstrapolasyonu zorlaştırmaktadır (151). Primer insan OB hücrelerini kullanmanın ana avantajı, diğer hayvan hücresi kaynakları kullanıldığında ortaya çıkan klinik uygulanabilirlik ve türler arası

farklılıkları hesaba katma ihtiyacını azaltması ve aynı zamanda bu hücrelerin farklılaşmış fenotiplerini de koruma eğiliminde olmasıdır (147).

DSLT ve DYKU'nun kemik üzerine etkilerinin araştırıldığı birçok çalışmada hücre türü olarak fare kalvaryası kökenli preosteoblast hücre dizisi MC3T3-E1 (152-154), insan osteosarkom hücre hattı Saos-2 (155,156), insan fetal OB hücresi hFOB (157-159), insan mezenkimal kök hücresi hMSC (160), kemik kanser hücre hattı MG-63 (161) kullanılmıştır. Bizim çalışmamızda ise primer insan OB hücrelerinin klinik uygulanabilirlik avantajından dolayı, hFOB hücrelerinin kullanımı tercih edilmiştir.

Kemiğin yeniden şekillenmesi, kemiği oluşturan OB'ler ve kemiği rezorbe eden OC'ler arasındaki karşılıklı ilişkiye dayanır. Literatürde kemik fizyolojisi ve hastalıklarını incelemek için OB-OC ko-kültürlerinin kullanıldığı birçok çalışma bulunmaktadır. Yalnız OB veya yalnız OC kültürü ile karşılaştırıldığında, ortak kültür sisteminin *in vivo* mikro çevreye çok daha benzer olduğu görülmüştür (162). Burada, iki hücre tipi arasındaki doğrudan ve dolaylı hücre etkileşimleri sürece dâhil edildiğinden, birden fazla hücre tipinin kullanılması *in vivo* ortam şartlarının monokültürlerden daha iyi bir şekilde temsil edilmesiyle sonuçlanır. Kemik oluşumu ve rezorpsiyonu sırasındaki önemli rolleri nedeniyle, OB'lerin ve OC'lerin ortak kültürü, hayvan deneylerinden daha öngörülü klinik öncesi sonuçlar verme potansiyeline sahiptir (163). Çalışmamızın amacı elde ettiğimiz bulguların sonuçlarını DSLT ve DYKU'nun ortodonti kliniğinde kullanımına yönelik olarak yorumlamak olduğu için çalışmamızda yalnız OB hücresi yerine, kemik dokusuna çok daha benzer olan OB-OC ortak hücre kültürü sistemini kullanmayı tercih ettik. Literatürde yer alan DYKU ve DSLT'nin kemik hücreleri üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmalar incelendiğinde, OB-OC ortak hücre kültür sisteminin kullanıldığı yalnızca bir çalışmanın olduğu ve bu çalışmada yalnızca terapötik lazerin hücreler üzerindeki etkilerinin incelendiği görülmüştür (164). Bizim çalışmamız ise terapötik ultrason ve lazerin hem tek başına hem de birbirleriyle kombine edilerek OB-OC ortak kültür sistemi üzerine etkilerinin incelendiği tek çalışmadır.

Ortak hücre kültür sistemlerinde birden fazla hücre tipi yer aldığı için, bu sistemlerin oluşturulma süreci tek hücre tipinden meydana gelen monokültürel sistemlere göre daha karmaşık yapıdadır. Ancak primer hücrelerin kaynağı, uzaysal ve zamansal ekim parametreleri, farklı hücre tipleri arasındaki oran, takviyeli veya takviyesiz kültür ortamının kompozisyonu dâhil olmak üzere çeşitli parametreler özenle

seçildiğinde optimize edilmiş ortak kültür sistemlerinin oluşturulma süreci daha basit hale gelmektedir (165).

Literatürde yer alan çalışmalar incelendiğinde, OB-OC ortak kültürü oluşturmak için insan primer hücreleri olarak OB hücreleri, mezenkimal kök hücreler, mezenkimal stroma hücreleri, osteoprogenitör hücreler, sıçan primer hücreleri, rat primer hücreleri gibi çok çeşitli OB kaynakları kullanılmış olduğu bildirilse de ağırlıklı olarak insan primer hücrelerinin kullanıldığı görülmektedir. Bununla birlikte ortak kültür sisteminin neredeyse yarısı OB hücreleri ile başlatılırken, diğerleri progenitör hücrelerle başlatılmıştır. OB ekim yoğunlukları 0.9×10^3 hücre/cm^2 ile 60×10^3 hücre/cm^2 arasında değişmekle birlikte ortalama yoğunluk $11x10^3$ hücre/cm^2 olarak belirlenmiştir. OC'ler açısından literatür incelemesi yapıldığında ise araştırmacıların ağırlıklı olarak insan primer hücrelerini, hayvan primer hücrelerini veya rezorbsiyon için herhangi bir hücre dizisini kullandıkları görülmektedir. Kültürler çoğunlukla OC progenitörleri ile başlatılmış ve ağırlıklı olarak monositler, mononükleer hücreler, makrofajlar ve diğer OC prekürsörleri kullanılmıştır. Bir fare hücre hattı olan ST-2 hücre hattını insan monositleriyle birleştiren tek bir istisna çalışma dışında, tüm çalışmalarda OB ve OC kaynağı için yalnızca tek bir türün hücreleri kullanılmıştır. OC ekim yoğunluğu, $5x10^3$ hücre/cm^2 ile $15x10^6$ hücre/cm^2 arasında değişmekle birlikte ortalama $19x10^4$ hücre/cm^2'dir. OB:OC ekim oranları oldukça değişkendir ve literatürde 1:1 ile 1:1500 arasında değiştiği bildirilmiştir (163).

Hong ve ark. (164) yapmış oldukları bir çalışmada, OB-OC ortak kültür sistemi oluşturmak için 1 gün ara ile 48 kuyucuklu plakada kuyucuk başına önce $2x10^4$ kalvaryal OB hücresi ve sonra 10 nM D3 vitamini ve 1 uM prostaglandin E2 varlığında kuyucuk başına $2x10^5$ OC öncüsü makrofaj hücresi ekerek, ortalama 5-7 gün içinde olgun OB veya OC'leri gözlemlemiştir. Chevalier ve ark. (166) ise hücre kültürü protokollerini cm^2 başına $1,8x10^4$ OB ve $2,6x10^4$ OC öncüsü hücre olacak şekilde dizayn etmişlerdir. Kültürün sonunda osteoklastogenez veya osteoblastogenezin kapsamı sırasıyla TRAP boyama veya ALP boyama ile değerlendirilmiştir.

Literatürde OB ve OC hücrelerinin ekim yoğunluğuyla ilgili birbirinden oldukça farklı veriler yer aldığından hücre ekim sayılarımızı belirleyebilmek için yaptığımız öncül çalışmalarda; öncelikle $1x10^3$ hücre/cm^2 ile $2,5x10^4$ hücre/cm^2 arasında değişen yoğunlukta OB hücresi ekerek mikroskopta OB'lerin kültür kabı yüzeyindeki dağılımlarını gözlemledik. Akabinde kuyucuk başına ekim oranları 1:1, 1:3, 1:6 OB:OC

olacak şekilde OC öncüsü hücrelerinin ekimini gerçekleştirerek, en ideal OB-OC ortak kültür modelini 1:6 oranında ekim yaptığımız hücrelerde gözlemledik. Çalışmamızda yer alan grup sayısının fazlalığı, her grup için 3 tekrar yapmanın gerekliliği ve OC hücrelerinin proliferasyonu esnasında yaşanan zorluklar nedeniyle OB:OC oranını 1:5 olacak şekilde belirleyerek, $1x10^4$ hücre/cm^2 yoğunluğunda OB hücresi ve $5x10^4$ yoğunluğunda OC hücresi ekerek OB-OC ortak kültür modelini oluşturduk.

Bir redoks indikatörü olan resazurin hücresel metabolik aktiviteyle metabolik redüksiyona uğrayarak rezorufin adını alır. Rezorufin yüksek derecede floresan özellik gösteren pembe renkli bir bileşiktir. Resazurin ancak solunum yapan, yani canlı olan ve oksidatif fosforilasyon yapabilen hücrelerde rezorufine dönüşür. Bu nedenle, oluşan floresansın şiddeti solunum yapabilen canlı hücre sayısıyla doğru orantılıdır. Hücrelerdeki rezorufin miktarının belirlenmesi hücrenin hem sağlığı ve canlılığı, hem de sitotoksisitesi hakkında bilgi verir (167).

MTT testinin iyi bir alternatifi olan ve alamarBlue testi olarak da bilinen resazurin redüksiyon yöntemi ilk kez 2000 yılında O'Brien ve ark. (168) tarafından kullanılmıştır. Fenoksazin-3-on yapısındaki resazurin, non-toksik özellik gösteren ve hücre içine girebilen mavi floresan bir indikatördür. Ucuz bir yöntem olması, birçok farklı yöntemle kombine bir şekilde kullanılabilmesi ve MTT ve WST gibi yaygın bir şekilde kullanılan tetrazolium tuzlarına dayalı testlerden bile daha yüksek hassasiyet göstermesi (167,169) sebebiyle çalışmamızın hücresel canlılık ve proliferasyon değerlendirmeleri için resazurin redüksiyon yöntemini tercih ettik.

Alkalen fosfataz aktivitesi, tip I kollajen sentezi, osteokalsin salgılanması ve mineralize matriks üretimi kemik yapımı belirteçlerindendir. OB fenotipiyle ilgili en yaygın olarak tanınan biyokimyasal belirteç ise ALP'dir (170). ALP, alkali pH'ta fosfat esterlerinin hidrolizini katalize eden bir enzimdir. Yapılan çalışmalar ALP'nin kemik mineralizasyonunda önemli bir rolü olduğunu göstermektedir (171). Literatürde, gelişmekte olan kemikte görülen matriks veziküllerinin oluşumu esnasında büyüyen OB'lerin plazma membranı ile ALP'nin ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (172,173). *In vitro* çalışmalar, fetal rat kalvaryasındaki ALP aktivitesinin, kollajen üretim hızı ile orantılı olduğunu göstermiştir (174). Anormal iskelet mineralizasyonu ile karakterize hipofosfatazyalı hastalarda ALP defekti görülmesi, ALP üretimi ile kemik yapımı arasındaki ilişkiyi ortaya koyan en net verilerden biridir (175).

Burstone (176) OC'lerde güçlü ACP aktivitesinin, OB'lerde ise ALP aktivitesinin bulunduğunu bildirmiştir. OC'lerin asit fosfataz aktivitesinin, tartrat varlığında fosfataz aktivitesini koruyan tipte (TRAP) olduğu gösterilmiştir. Araştırmacılar uzun yıllardır OC için bir histokimyasal belirteç olarak kullanılan TRAP enziminin kemik rezorpsiyonu sırasında salgılandığını ve aktif enzimin memelilerin serumunda saptanabildiğini bildirmişlerdir (177,178). Serum TRAP aktivitesi, kemik rezorpsiyonunun arttığı Gaucher hastalığı, hiperparatiroidizm ve bazı kanser türlerinde patolojik olarak artar. TRAP aktivitesinin, iltihaplı sinovyal eklemle bağlantılı sıvı ve dokularda da arttığı görülmüştür (179). TRAP enziminin varlığı aynı zamanda süt dişlerinin rezorpsiyonundan sorumlu olan odontoklastlarda da tanımlanmıştır (180).

Kemik metabolizması karşılıklı olarak dengelenmiş osteoblastogenez ve osteoklastogenez sürecinden oluştuğundan, iki enzim belirteci ile eş zamanlı değerlendirme yapılmasının daha uygun olacağı düşünülerek çalışmamızda kemik metabolizmasında yer alan OC oluşumunun belirteci olan TRAP ve OB oluşumunun belirteci olan ALP enzimlerinin aktivitelerinin aynı anda saptanmasını sağlayan TRACP & ALP Test Kiti kullanılmıştır. Çalışmamızda kullandığımız TRACP & ALP Test Kiti, p-nitro-fenil fosfat (pNPP) substratı kullanılarak TRAP ve ALP aktivitesinin basit ve hızlı bir şekilde tespit edilebilmesi için tasarlanmıştır. Aynı zamanda bu kitte sulu bir substratın kullanılıyor olması, reaktifin absorbansını ölçerek sonuçları hızlıca elde etmemizi sağlamıştır.

5.2. BULGULARIN TARTIŞILMASI

Literatürde DSLT ve DYKU ile ilgili birçok çalışma mevcut olmasına rağmen, bu iki uygulamanın kombine etkilerini araştıran çalışma sayısı oldukça kısıtlı olmakla birlikte bu etkiler yalnızca *in vivo* ortamda araştırılmıştır. Bizim çalışmamız DSLT ve DYKU'nun kombine etkilerini kemik remodeling sitemini oldukça iyi taklit eden OB-OC ortak kültür sistemi üzerinde, *in vitro* olarak, araştıran ilk çalışmadır.

Çalışmamızda yer alan deney gruplarının canlılık yüzdeleri 1. günden 7. güne doğru artma, 7. günden 11. güne doğru azalma eğilimi göstermiştir. 11. günde hücrelerin canlılık yüzdelerinde bir düşüş gerçekleşmesine rağmen, bu değerler 1. günde kaydedilen değerlere göre anlamlı derecede yüksektir. Bu nedenle çalışmamızın 7. gününde hücrelerin proliferasyon fazının pik noktasına ulaştığını ve bu noktadan sonra hücre canlılığında azalma meydana geldiğini düşünmekteyiz. Literatür incelemesi

yapıldığında bizim bulgularımızın osteoblast hücrelerinin proliferasyon ve diferansiyasyon süreçleriyle uyumlu olduğu görülmektedir.

Çalışmamızın sonuçlarını hücrelerin canlılık oranları bakımından değerlendirdiğimizde; 1. günde deney grupları ile kontrol grubu arasında anlamlı farklılık bulunmadığını, 7. günde L2 lazer uygulamasının, 11. günde L1 lazer uygulamasının en iyi sonuçlara yol açtığını belirledik. Ultrason uygulamalarının süresi arttıkça hücrelerin canlılık oranlarında artış kaydetmemize rağmen, ultrasona kıyasla oldukça kısa süren lazer uygulamalarıyla hücrelerde daha yüksek canlılık oranları elde ettik. Çalışmamızın 11. gününde, daha önce 7. günde %381,74 oranında canlılık gösteren L2 grubunun canlılık düzeyinde ani bir düşüş tespit ederek bu oranın %58,91'e gerilediğini gördük. Bu durumun enerji yoğunluğu arttıkça lazerin hücrelerde oluşturduğu termal etkiler ve yüksek oranda artan hücre popülasyonuna kültür besiyerinin yetmemesi nedeniyle meydana gelmiş olabileceği kanaatindeyiz.

Osteopregenitör hücreler OB'lere dönüştükçe ALP aktivitesi artar ve bu artan enzim düzeyi kemik oluşumunun en önemli belirteçlerindendir (181). Çalışmamızda yer alan deney gruplarının ALP enzim düzeyinin 1. günden 7. güne ve 7. günden 11. güne doğru giderek artma eğiliminde olduğunu tespit ettik. Literatürde ALP aktivitesinin 14. ve 15. günde en yüksek seviyeye ulaştığını bildiren çalışmalar mevcuttur. Biz de ALP aktivitesi için en yüksek değerleri deneyimizi sonlandırdığımız 11. günde elde ettik.

Çalışmamızın sonuçlarını hücrelerin ALP aktivitesi bakımından değerlendirdiğimizde; 1. günde deney grupları ile kontrol grubu arasında anlamlı farklılık bulunmadığını, 7. günde U2-L2 kombinasyon grubunun, 11. günde U4 grubunun en iyi sonuçlara yol açtığını tespit ettik. 11. günde ultrason gruplarının L1 grubuna kıyasla daha yüksek ALP aktivitesine sahip olduğunu ve L2 grubu ile ultrason grupları kıyaslandığında ALP aktivitesi bakımından yalnızca U4 grubunun 11. günde L2 grubundan anlamlı derecede yüksek aktivite göstermiş olduğunu gözlemledik. Bu nedenle ultrason uygulamalarının süresini yahut sıklığını arttırarak lazer uygulamalarından daha yüksek düzeyde ALP aktivitesi elde edilebileceğini düşünmekteyiz.

Bourouni ve ark. (123) MG-63 osteoblast benzeri hücre hattı, primer insan gingival fibroblast hücreleri ve bu iki hücreden elde edilen ortak kültür sistemine uyguladıkları 810 nm dalga boyu, 15 J/cm^2 enerji yoğunluğundaki diyot lazerin hücre

canlılığı, proliferasyonu, kollajen tip 1a ve ALP ekspresyonu üzerine etkilerini incelemişler ve DSLT'nin tüm deney gruplarında hücre çoğalmasını ve canlılığını olumlu yönde etkilediği, 7. günde ALP ekspresyonu açısından istatiksel olarak anlamlı artışın sadece MG-63 hücrelerinde gözlendiği ve her iki hücre kültüründe de ekstraselüler matriks oluşum sinyalinin indüklenerek kollajen tip 1a gen ekspresyonunun artmasına sebep olduğu sonucuna varmışlardır. Her ne kadar bu çalışmanın hücresel canlılık ve OB hücrelerinde ALP ekspresyonu bakımından sonuçları bizim çalışmamızla paralellik gösterse de bizim çalışmamızdan farklı olarak ortak kültür sisteminde ALP aktivitesinde artış izlenememiş olması fibroblast hücrelerinden salgılanan sitokinlerin osteoblastik hücrelerin farklılaşma kapasitesini değiştirmiş olma ihtimaliyle açıklanabilir.

Silva ve ark. (127) DSLT'nin RME üzerine etkilerini araştırmak için yaptıkları bir çalışmada, yalnızca RME ve RME ile birlikte 830 nm dalga boyu, 160 J/cm^2 enerji yoğunluğundaki DSLT uygulamaları sonrası ratların midpalatal suturlarından toplanan osteoblastik hücreleri incelemişlerdir. Çalışmanın sonucunda RME+DSLT uygulanan midpalatal suturdan elde edilen hücrelerin büyümesinde anlamlı artış izlendiği, deney grubunun kontrol grubundan daha yüksek ALP, Runx2, osteokalsin, tip I kollajen ve kemik sialoprotein mRNA seviyelerine sahip olduğu bildirilmiştir. Bu sonuçlar, RME'den sonra uygulanan DSLT'nin midpalatal suturdan elde edilen hücrelerde osteoblastik fenotipin proliferasyonunu ve ekspresyonunu artırabildiğini göstermektedir. Bizim çalışmamızda, kültürdeki osteoblastik hücrelere doğrudan DSLT uygulandıktan sonra hücre proliferasyonu ve ALP aktivitesi açısından benzer gelişmeler gözlenmiştir. Birbiriyle uyumlu olan bu sonuçların, DSLT'nin kemik üzerinde *in viv*o veya izole edilmiş hücreler üzerinde *in vitro* uygulanmasının osteoblastik aktivitede artışı indükleyebildiğinin göstergesi olduğunu düşünmekteyiz.

Rech ve ark. (182) oral keratinosit hücreleri, insan gingival fibroblast hücreleri ve Saos-2 osteoblast hücrelerini 13 mm çaplı titanyum disk varlığında ekerek, 24., 48. ve 72. saatlerde hücre kültürleri üzerinde 780 nm dalga boyu, 3 J/cm^2 enerji yoğunluğundaki DSLT uygulamalarını 810 nm dalga boyuna sahip LED uygulamaları ile karşılaştırmalı olarak gerçekleştirmişlerdir. Çalışmanın sonuçlarının değerlendirildiği 96. saatte DSLT grubunda, LED ve kontrol grubuna kıyasla osteoblast hücrelerinin hücresel canlılık ve ALP düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı artış kaydedilmiş ve

DSLT uygulamalarının implant çevresindeki doku iyileşmesini destekleyeceği yönünde görüş bildirilmiştir. Bizim çalışmamızın sonuçları, bu araştırmanın hücresel canlılık ve ALP ekpresyonu bakımından sonuçlarını doğrular niteliktedir.

Emes ve ark. (183) primer rat osteoblast hücrelerinde 808 nm dalga boyu ve 1,5 J/cm^2 enerji yoğunluğuna sahip DSLT uygulamalarının etkilerini incelemek amacıyla yaptıkları bir çalışmada, bizim çalışmamızdan farklı olarak lazer grubunda kontrol grubuna kıyasla daha düşük seviyede hücre çoğalması ve canlılığın gözlendiğini, gruplar arasında ALP ekspresyonu açısından istatiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadığını bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda lazer probu literatürdeki birçok çalışma gibi hücre kültürlerinden 10 mm uzakta olacak şekilde konumlandırılmıştır. Bu çalışmadaki farklılığın nedeninin lazer probunun hedeften 15 cm uzakta bir konumda sabitlenmesi olduğunu düşünmekteyiz. Buna ek olarak Emes ve ark. lazer cihazının gücünü rapor etmiş olmalarına rağmen, enerji yoğunluğunun tam olarak hesaplanması için gerekli olan lazer açıklığının boyutunu da bildirmemişlerdir.

Bueno ve ark. (184) yaptıkları bir çalışmada, diyabetli ve sağlıklı rat femuru kaynaklı mezenkimal kök hücrelerden diferansiye edilen osteoblast hücrelerine 72 saatte bir 660 nm dalga boyu ve 5 J/cm^2 enerji yoğunluğunda 6 kez DSLT uygulamışlar ve deney grubundan bağımsız olarak zamanla hücre canlılığında genel bir artış fark etmişlerdir. 7. günde uygulama yapılan deney gruplarının canlılık düzeylerinin kontrol gruplarından düşük olduğu görülse de 10. gün sonunda DSLT uygulanan hücrelerin canlılık düzeyinin kontrol grubundan yüksek olduğu gözlenmiştir. Literatürde ışınlama periyodikliği geniş ölçüde tartışılmış ve tartışmalı sonuçlar açıklanmıştır. Bazı literatür raporları, uzun süreli lazer ışınına maruz kalınmasının, tedavinin olumlu sonucunu engelleyebilecek yüksek seviyelerde ROT ürettiğini öne sürmektedir (185). Bu çalışmada bizim çalışmamızda yer verdiğimiz tek doz uygulama yerine 72 saatte bir, toplamda 6 doz uygulama yapılmıştır. Hücresel canlılık düzeyleri bakımından farklı sonuçlar elde edilmesinin buna bağlı olabileceğini düşünmekteyiz. Bu araştırmada bizim çalışmamızın sonuçlarıyla benzer şekilde tüm deney gruplarında zamanla artan bir ALP aktivitesi gözlenmiştir ve DSLT'nin DM tarafından bozulan ALP aktivitesini 7. ve 14. günlerde kayda değer bir şekilde arttırdığı bildirilmiştir.

Rat kalvaryal osteoblast hücrelerinde 660 ve 808 nm dalga boyundaki, 5 ve 8,3 J/cm^2 enerji yoğunluğundaki DSLT ve 3-5 sn. süreli LED uygulamalarının etkilerini

incelemek için yapılan bir çalışmada, DSLT'nin rat osteoblast canlılığını artırdığı ve *in vitro* yara kapanmasını hızlandırdığı; ışınlama süresinin daha uzun olduğu gruplarda, hücresel canlılığının daha fazla uyarıldığı ve yara kapanmasının daha hızlı gerçekleştiği bildirilmiştir. ALP aktivitesi açısından bulgular değerlendirildiğinde, 7. günde tüm ışınlama protokolleri tarafından ALP aktivitesinin uyarıldığı ve 14. ile 21. günlerde gruplar arasında istatiksel olarak anlamlı farklılık bulunamadığı rapor edilmiştir. Buna ek olarak ALP aktivitelerinin 7. günde en yüksek seviyeye ulaştığı, 14. günde azaldığı ve 21. günde tekrar arttığı kaydedilmiştir (186). Literatürde ALP aktivitesinin MC3T3-E1 hücrelerinde 35. günde, osteosarkom hücrelerinde 7. günde zirveye ulaştığını bildiren birbirinden farklı çalışmalar bulunmaktadır (187,188). Çalışmamızda ALP aktivitesi zamanla bir artış göstermiş ve 11. günde en yüksek seviyeye ulaşmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda, ALP aktivasyonu bakımından her hücre tipinin DSLT'ye farklı tepki verebileceğini düşünmekteyiz.

Oliveria ve ark. (189) MC3T3-E1 preosteoblast hücrelerine uyguladıkları 660 ve 780 nm dalga boyu, 1,9 ve 3,8 J/cm^2 enerji yoğunluğundaki lazerin; hücre canlılığı, ALP, MMP-2 ve -9 aktiviteleri üzerindeki etkilerini 24., 48. ve 72. saatte değerlendirmişlerdir. 24. ve 48. saatlerde DSLT'nin deney grubundaki hücrelerin canlılığını ışınlanmamış kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde arttırdığı rapor edilirken, ALP aktivitesinin enerji yoğunluklarına bağlı olarak 24. ve 72. saatlerde arttığı kaydedilmiştir. Saos-2 hücreleri üzerinde 670 nm dalga boyu ve 1 ve 2 J/cm^2 enerji yoğunluğunda DSLT'nin biyostimulatif etkilerinin değerlendirildiği başka bir çalışmada ise; özellikle 1 J/cm^2 yoğunluğundaki lazerin hücre canlılığı ve ALP aktivitesinde anlamlı artışa sebep olduğu bildirilmiştir (190). Bizim çalışmamızda da ALP aktivitesi 1. günden 11. güne doğru anlamlı düzeyde artarak bu çalışmalar ile uyumlu sonuçlar göstermektedir.

Stein ve ark. (191) insan osteoblast hücrelerine 632 nm dalga boyuna sahip lazer cihazı ile 1, 3 ve 10 sn. boyunca 0,14, 0,43 ve 1,43 J/cm^2 enerji yoğunluğunda DSLT uygulamışlar ve hücrelerin proliferasyon ve canlılık oranlarında artış tespit etmişlerdir. ALP aktivitesi bakımından sonuçları incelediklerinde, 1 ve 3 sn.'lik lazer gruplarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde artış gözlendiğini, 10 sn. ışınlama yapılan grupta ALP aktivitesinin hafifçe artmış olmasına rağmen bu artışın istatiksel olarak anlamlı olmadığını bildirmişlerdir. Bu sonuçlar çalışmamızın sonuçlarıyla uyumlu

olmakla birlikte, 1,43 J/cm^2 lazer grubunda çalışmamızdan farklı olarak artış gözlenememesinin sebebinin ölçümlerin yalnızca 24. ve 48. saatlerde yapılmış olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Maung ve ark. (128) murin periosteumundan türetilen hücrelere, 3 MHz frekans, 30 mW/cm^2 yoğunluk ve 1:4 görev döngüsü ile günlük 20 dk. olacak şekilde 21 gün DYKU uygulaması yapmışlardır. Çalışmanın sonuçlarına göre, ultrason stimülasyonunun hücrelerin proliferasyonunu önemli ölçüde etkilemediği, ancak 7. günde ALP aktivitesini önemli ölçüde arttırdığı ve 21. günde mineralize nodüllerin oluşumunu belirgin şekilde desteklediği bildirilmiştir. DYKU'nun, periosteal hücrelerin *in vitro* osteojenik farklılaşmasını teşvik ettiğini bildiren bu çalışmanın sonuçları bizim çalışmamızın sonuçlarını destekler niteliktedir.

Sawauchi ve ark. (132), mezenkimal kök hücrelerini iki gruba ayırarak deney grubuna 20 dk., 1,5 MHz frekans, 200 µs atım süresi, 1 kHz atım tekrar hızı ve 30 mW/cm^2 güç yoğunluğunda DYKU uygulamışlardır. Deney grubunda kontrol grubuna kıyasla ALP aktivitesi (7. günde %113,4 ve 14. günde %130,1), osteoblastla ilişkili genlerin ekspresyonu ve hücrelerin mineralizasyonu (21. günde %135,2) istatiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek bulunurken, hücre proliferasyonunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı farklılık bulunmadığı bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda ALP aktivitesi kontrol grubuna göre bu çalışmadaki sonuçlardan farklı olarak daha fazla oranda artış göstermiştir ve hücre proliferasyonunda da anlamlı artış izlenmiştir. Bu farklılığın çalışmamızda tek tip osteoblast hücresi yerine kemik formasyon sürecini taklit etmekte daha başarılı olan OB-OC ortak kültür sistemini ve yüzeyel dokulara daha iyi penetre olan 3 MHz frekans düzeyini tercih etmemizden kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz.

İnsan mezenkimal kök hücrelerine günde 20 dk., 1 MHz frekans, %20 görev döngüsü, 400 mW/cm^2 yoğunlukta DYKU uygulanarak yapılan bir çalışmada; 1., 11. ve 16. günlerde ultrason stimülasyonunun etkileri incelenmiştir. Kantitatif sonuçlar, ultrason varlığında hücrelerin 11. günde önemli ölçüde daha fazla ALP ürettiğini göstermiştir (192). Bizim çalışmamızın sonuçlarına göre de DYKU uygulamalarının ALP aktivitesini arttırdığı ve 11. günde en yüksek seviyeye ulaştığı görülmüştür.

MC3T3-E1 rat preosteoblast hücrelerine 30 dk. boyunca, 1 MHz frekans, %20 görev döngüsü, 0,2 W/cm^2 yoğunlukta DYKU uygulanarak 48., 96. ve 192. saatlerde

hücrelerin kollajen, fosfat, ALP, kalsiyum ve TGF-β1 konsantrasyonlarının değerlendirildiği bir çalışmada ALP aktiviteleri açısından sonuçlar incelendiğinde, en yüksek ALP düzeyinin 192. saatte izlendiği, gruplar arasında ALP aktivitesi bakımından istatiksel olarak anlamlı farklılık görülemediği tespit edilmiştir (193). Kemik oluşum sürecinde matriks kollajen üretimi mineralizasyondan önce gelmektedir. Bu nedenle kollajen matriks üretiminin daha fazla ALP üretimi ile, mineralizasyonun ise daha fazla osteokalsin üretimi ile uyumlu olduğu bilinmektedir. Mevcut çalışmada boyama yöntemiyle tespit edilen mineralizasyon nodüllerine rağmen ALP aktivitesinde değişiklik izlenememesi dikkat çekicidir.

Feng ve ark. (194) MC3T3-E1 rat preosteoblast hücrelerine günde 20 dk., 1 ve 3,2 MHz frekans, 1 μs atım süresi, 40 mW/cm^2 yoğunlukta DYKU uygulamışlar ve 1., 3., 5., 7., 9. günlerde yapılan analizler neticesinde gruplar arasında hücre proliferasyonu açısından anlamlı farklılık bulunmadığını bildirmişlerdir. ALP aktivitesi bakımından sonuçlar değerlendirildiğinde ise, bizim çalışmamızın sonuçlarını destekler nitelikte, 4., 7. ve 10. günlerde deney gruplarının ALP aktivitelerinin kontrol gruplarına kıyasla istatiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu ve DYKU'nun osteoblast hücrelerinin erken diferansiyasyonunu destekleyebileceği görüşü bildirilmiştir.

İnsan umblikal ven endotel hücreleri ve MG-63 osteoblast hücrelerinden oluşan ortak kültür sisteminde 1,5 MHz frekans, 200 μs atım süresi, 1 kHz atım tekrar hızı ve 30 mW/cm^2 güç yoğunluğunda 20 ve 40 dk. DYKU stimülasyonunun etkilerini araştırmak için yapılan bir çalışmada, DYKU'nun hücresel göç kabiliyetini önemli ölçüde artırabileceği ve endotel hücrelerinin anjiyogenezinde tüp oluşumunu destekleyebileceği gözlenmiştir. Ayrıca, DYKU'nun; Runx-2, ALP, Osteorix ve siklin-D1 gibi osteoblastlar üzerindeki osteogenez ile ilişkili genlerin ekspresyonunu önemli ölçüde artırarak ortak kültür sisteminde pre-osteogenez etkisi gösterdiği ve 40 dk.'lık DYKU grubundaki osteogenez ile ilgili genlerin ekspresyonlarının 20 dk.'lık DYKU grubundan daha yüksek bulunduğu bildirilmiştir (195). Bizim çalışmamızda da bu çalışmayla uyumlu olarak ışınlama süresi arttıkça hücresel canlılık ve ALP düzeylerinin arttığı görülmektedir.

Katiyar ve ark. (196) MC3T3-E1 hücrelerine 0,5, 1,5 ve 5 MHz frekans, 200 μs atım süresi, 1-500 mW/cm^2 arasında değişen farklı güç yoğunluklarında, 5, 10, 20 ve 30'ar dk.'lık DYKU uygulamışlar ve 75 mW/cm^2 güç yoğunluğu ile yapılan

uygulamaların optimal sonuçlar verdiğini gözlemlemişlerdir. Daha yüksek yoğunlukta (yaklaşık 465 mW/cm^2) ultrason maruziyetinin MC3T3-E1 hücrelerinde proliferasyonu önemli ölçüde azalttığı, osteoblast proliferasyon hızının frekansa bağlı olmadığı, DYKU 10 dk./gün veya 30 dk./gün uygulandığında proliferasyon oranındaki artışta istatiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadığı bildirilmiştir. DYKU'nun optimum yoğunlukta kısa süreli bir stimülasyonun, kemik oluşumunda ve hızlandırılmış kırık iyileşmesinde önemli rol oynayan pre-osteoblast benzeri kemik hücrelerinin çoğalmasını arttırabileceği sonucuna varılmıştır. Çalışmamızda ışınlama süresiyle doğru orantılı olarak hücresel canlılığın ve ALP aktivitesinin arttığı gözlenmektedir. Bu çalışmada ise 30 dk.'lık uzun bir stimülasyonun hücrelerde bir alışkanlık tepkisine sebep olmuş olabileceğini, osteoblastlar uzun mekanik stimülasyonlara daha az duyarlı hale geldiğinden, aralıklı nöbetler halinde uygulanan DYKU ile kemik kütlesinin arttırabileceğini düşünmekteyiz.

MC3T3-C1 hücrelerine 1,5 MHz frekansta, %20 görev döngüsünde, 20 dk. DYKU ile indüklenmiş osteojenik medyum eklenerek yapılan bir çalışmanın sonuçlarına göre, deney grubunda kontrol grubuna kıyasla hücrelerin proliferasyonunda 1. günden itibaren artmış bir inhibisyon gözlenmiştir. 10. günde yapılan analizlere göre ALP aktivitesinin bir dereceye kadar yukarı regüle olduğu ancak kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı farklılık göstermediği bildirilmiştir. Bizim çalışmamızla karşıt sonuçların elde edildiği bu çalışmada, DYKU'ya yanıt olarak osteosit hücrelerinden salınan çözünebilir medyatörlerin osteoblast proliferasyonunun inhibisyonundan sorumlu olabileceği kanaatindeyiz (197).

Kombinasyon gruplarını canlılık aktivitesi açısından ele aldığımızda 7. günde U3-L2 grubunda artmış canlılık oranı tespit etmemize rağmen bu oranın L2 grubunun canlılık düzeyinden anlamlı derecede düşük olduğunu gördük. Benzer şekilde 11. günde U4-L1 grubunun, en yüksek aktivite gösteren L1 grubuna yakın bir canlılık oranı gösterdiği, ama gruplar arasında istatiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadığını belirledik. Hücrelerin canlılık aktivitesi açısından bu sonuçları değerlendirdiğimizde, lazerin ultrasonla kombinasyonunun sinerjik etki yaratmadığı kanaatine vardık.

Kombinasyon gruplarını ALP aktivitesi açısından ele aldığımızda; 7. günde U2-L2 grubunun en yüksek düzeyde ALP enzim aktivitesine sahip olduğunu, buna karşın 11. günde tek başına 10 dk. süre ile uygulanan ultrasonun anlamlı derecede daha iyi

ALP düzeyine yol açtığını gözlemledik. Bu bulgular ışığında, uzun süreli ultrason uygulamaları yerine daha kısa süreli ultrason maruziyetine ek olarak dozu artırılmış bir lazer uygulamasının hücrelerin ALP düzeyini arttırarak kemik oluşumunu indükleyebileceği kanaatine varmaktayız.

Babuccu ve ark. (198) DSLT+DYKU'nun kemik onarımı üzerindeki etkilerini göstermek amacıyla kısmi tibial kemik osteotomisi uyguladıkları 128 Wistar ratını 4 gruba ayırarak; birinci grubu 820 nm dalga boyu, 16 J/cm^2 enerji yoğunluğunda DSLT, ikinci grubu 1 MHz frekans, 1:4 görev döngüsü, 0.5 W güç yoğunluğunda DYKU, üçüncü grubu DSLT ve DYKU gruplarının kombine tedavi protokolleri ile 14 gün boyunca gün aşırı tedavi etmiş ve dördüncü grubu kontrol grubu olarak belirlemişlerdir. 14. ve 21. günlerde yapılan histolojik değerlendirme, DSLT+DYKU grubunda artmış kemik trabekülleri, artmış vaskülarizasyon ve azalmış inflamasyonu göstermiştir. Mekanik değerlendirme, DSLT+DYKU grubunda maksimum kuvvet, maksimum stres ve sertlik dahil olmak üzere artan biyomekanik özellikleri ortaya çıkarmıştır. Kombine DSLT+DYKU tedavisi hem histolojik hem de mekanik olarak kemik iyileşmesini arttırmış ve tek başına DSLT veya DYKU ile tedaviye kıyasla tedavi süresinin uzunluğunu kısaltmıştır. Alazzawi ve ark. (199) ortodontik diş hareketi üzerinde kombine DSLT+DYKU uygulamalarının etkilerini değerlendirmek amacıyla yaptıkları bir çalışmada, 14. ve 21. günlerde OPG, Runx-2, RANKL ve RANK genlerinin ekpresyonlarında artış meydana geldiğini, en fazla artışın ise DSLT ve DYKU'nun kombine uygulanmasıyla ortaya çıktığını bildirmişlerdir. Çalışmanın sonucuna göre DYKU ve DSLT kombine uygulamalarının kemik formasyonu üzerinde en iyi etkiye yol açtığı görüşüne yer verilmiştir. Alazzawi ve ark. çalışması protokolünü; 0-7. günler arasında 940 nm dalga boyunda, 45 J/cm^2 enerji yoğunluğunda, günlük 6 dk. lazer ve 1,5 MHz frekans, 30 mW/cm^2 yoğunluğunda, günlük 20 dk. ultrason uygulayacak şekilde dizayn etmişlerdir. Bizim çalışmamızda yer alan lazer uygulama dozlarının farklılığı ve periyodik uygulamalar yerine tek seferlik uygulamalar gerçekleştirilmesinin Babuccu ve ark. ile Alazzawi ve ark.'nın çalışmalarından farklı sonuçlar elde etmemize neden olduğu kanaatindeyiz.

Çalışmamızın sonuçlarını hücrelerin TRAP aktivitesi bakımından değerlendirdiğimizde; 1. günde deney gruplarının TRAP aktivitesinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede artış gösterdiğini, 7. günde L1 ve ultrason gruplarında kontrol

grubuna kıyasla anlamlı farklılık olmadığını, L2 ve kombinasyon gruplarında TRAP aktivitesinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede düşüş gösterdiğini ve K8 grubunun en yüksek TRAP aktivitesine sahip olduğunu gözlemledik. 11. günde K8 grubunun en yüksek TRAP aktivitesi gösterdiğini tespit etmemize rağmen, bu artışın U4 grubuna kıyasla anlamlı olmadığını ve ultrason gruplarının TRAP aktivitesini artırmada lazer gruplarından daha iyi olduğunu tespit ettik.

Çalışmamızda yer alan deney gruplarının TRAP aktiviteleri 1. günden 7. güne doğru artma, 7. günden 11. güne doğru azalma eğilimi göstermiştir. 1. güne göre 11. günde TRAP aktivitesinde anlamlı derecede düşüş gözlenmesi nedeniyle osteoklast hücrelerinin proliferasyon fazının pik döneminin 1-7 günler arasında gerçekleştiğini düşünmekteyiz. Literatürde kemik remodeling süreci erken bir rezorpsiyon dalgası (3-5 gün), ardından bunun tersine çevrildiği bir dönem (5-7 gün) ve geç bir oluşum dalgası (7-14 gün) olarak tanımlanır (211). Bizim çalışmamızda TRAP aktivitesinin günler içersinde gösterdiği değişim bu literatür bilgisiyle uyumludur.

Ribeiro ve ark. (46) 60 Wistar ratını iki gruba ayırarak, deney grubunda sol üst 1. molar dişi çekilen hayvanlara 4 kez, 830 nm dalga boyu, 54 J/cm^2 enerji yoğunluğunda, 42 sn. DSLT uygulamışlar ve alveolar kemik formasyonunun 5. ve 7. günlerde kontrol grubuna kıyasla deney grubunda daha yüksek düzeyde olduğunu gözlemlemişlerdir. 10. günde ise kemik formasyonu açısından gruplar arası istatiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadığını tespit etmişlerdir. TRAP aktivitesi bakımından sonuçlar incelendiğinde ise 1-5. günler arası deney grubu TRAP düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla istatiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu bildirilirken, 7. ve 10. günde gruplar arası TRAP aktiviteleri arasında istatiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilememediği bildirilmiştir. Bu sonuçlar DSLT'nin hücre proliferasyonu üzerindeki etkisi ile meydana gelen kemik onarım sürecini hızlandırdığını düşündürmektedir. Bizim çalışmamızda da bu çalışmayla uyumlu olacak şekilde 1. günde TRAP aktivitesinin her iki lazer grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığı, tüm gruplarda 7. güne doğru TRAP aktivitesinin arttığı ve 11. günde TRAP aktivitesinin azaldığı, ancak bu çalışmadan farklı olarak bizim çalışmamızda ışınlama dozu arttıkça TRAP aktivitesinin de artarak kontrol grubuna göre anlamlı farklılık oluşturduğu gözlemlenmiştir. Bizim çalışmamız hücre kültürü çalışması olduğundan *in vivo* çalışmaya göre lazerin hücreler üzerindeki etkisi doğrudan gözlendiğinden bu farklılığın meydana gelmiş olabileceğini düşünmekteyiz.

Hsu ve ark. (200) ratlarda ortodontik diş hareket hızının üzerine DSLT'nin etkilerini incelemek amacıyla yaptıkları bir çalışmada, 970 nm dalga boyuna sahip lazer cihazı ile 750 J/cm^2 ile 15000 J/cm^2 enerji yoğunluğu arasında farklı dozlarda DSLT uygulamaları gerçekleştirmişlerdir. 1250 J/cm^2 ve 15000 J/cm^2 gruplarında kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde artmış ortodontik diş hareketi tespit ederlerken, 750 J/cm^2 grubunda anlamlı farklılık bulunmadığını bildirmişlerdir. Mikro-BT sonuçları ile DSLT'nin kemiğin yeniden şekillenmesini artırdığını ve maksiler birinci molarların furkasyon alanlarında kemik mineral yoğunluğunu azaltabileceğini göstermişlerdir. TRAP aktivitesi açısından sonuçlar incelendiğinde ise, özellikle 15. günde yüksek doz DSLT grubunda TRAP-pozitif osteoklastların düşük doz grubuyla kıyaslandığında anlamlı derecede yüksek olduğu bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda ise 11. günde lazer grupları arasında TRAP aktivitesi bakımından anlamlı farklılık görülmemiştir. Bu araştırmada bizim çalışmamızdan farklı olarak uygulanan enerji dozunun çok yüksek olduğu görülmektedir. Bu nedenle elde edilen sonuçlardaki farklılığın parametreler arasındaki farklılıktan kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Yapılan bir çalışmada ratlardan elde edilen kemik iliği hücrelerine 808 nm dalga boyunda, 4 J/cm^2 enerji yoğunluğunda lazer cihazı ile DSLT uygulanması sonucu, deney grubu ile kontrol grubu arasında hücre proliferasyonu ve canlılığı bakımından istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülememiştir. 7. günde TRAP-pozitif hücreler sayılarak osteoklast mevcudiyeti analiz edilmiş, ancak kontrol grubuyla deney grubu arasında istatiksel olarak anlamlı farklılık bulunamayarak, DSLT'nin osteoklast formasyonu üzerinde hiçbir etkisinin bulunmadığı görüşüne yer verilmiştir (201). Bizim çalışmamızda 1. günde tüm lazer gruplarının TRAP aktivitesi kontrol grubundan yüksek bulunurken, 7. günde 4 J/cm^2 yoğunluğundaki lazer grubunun mevcut çalışmayla benzer sonuçlar verdiği, 8 J/cm^2 yoğunluğundaki lazer grubunun TRAP aktivitesinin kontrol grubuna kıyasla 7. günde istatiksel olarak anlamlı düşüş ve 11. günde anlamlı artış gösterdiği izlenmiştir. Çalışmaların sonuçları arasındaki farklılığın uygulanan dozlar arası farklılıklardan kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Kim ve ark. (202) 12 beagle köpeğinin maksiller premolarlarını her grupta 6 diş olacak şekilde dört gruba ayırarak, sadece ortodontik kuvvet, ortodontik kuvvet+kortizyon, ortodontik kuvvet+DSLT, ortodontik kuvvet+DSLT+kortizyon uygulamaları gerçekleştirmişlerdir. Ortodontik diş hareketi miktarı bakımından sonuçlar incelendiğinde ortodontik kuvvvet+DSLT ve ortodontik kuvvet+kortizyon

uygulamalarının en iyi sonuçlar verdiğini ve bu iki grup arasında istatiksel olarak anlamlı farklılık görülmediği bildirilmiştir. 8. haftada katabolik aktivite TRAP-pozitif multinükleer osteoklast ve preosteoklastların sayısıyla ölçülmüş ve bu aktivitenin ortodontik kuvvet+DSLT grubunda anlamlı olarak arttığı rapor edilmiştir.

Lee ve ark. (203) farelerden elde edilen makrofaj hücrelerine, 635 nm dalga boyu ve 18 J/cm^2 enerji yoğunluğunda LED uygulamışlar ve deney grubundaki hücrelerin TRAP aktivitesinin kontrol grubundaki hücrelere göre azaldığını tespit etmişlerdir. Bu çalışmada bizim çalışmamızdan farklı olarak lazer uygulaması hücre kuyucuklarından 10 cm uzaklıktan gerçekleştirilmiş ve tek bir hücre tipine daha yüksek dozda uygulama yapılmıştır. Bu nedenle bu çalışmanın sonuçlarından farklı sonuçlar elde ettiğimizi düşünmekteyiz.

Terapötik ultrasonun osteoklast hücre kültürlerinin rezorpsiyon aktivitesi üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla yapılan bir çalışmada, 1 kHz tekrarlama oranı, 30 mW/cm^2 yoğunluk ve 1,5 MHz atım frekansı ile günde 10 ve 20 dk. olmak üzere 1 hafta boyunca deney gruplarına her gün DYKU uygulanmıştır. Çalışmanın sonuçları düzenli bir şekilde DYKU uygulanmasının osteoklastların rezorptif aktivitesini arttırdığını, ayrıca günlük ultrason uygulaması daha uzun sürdüğünde rezorpsiyonun en yüksek seviyede olduğunu göstermiştir (129). Bu çalışmada, DYKU'nun osteoblastların yokluğunda osteoklastların absorpsiyon aktivitesini arttırmış ve bu aktivitenin ışınlama süresinden etkilenmiş olabileceğini düşünmekteyiz. Literatürde, bir kez DYKU uygulanan grupla karşılaştırıldığında, üç kez DYKU uygulanan grupta osteoklast farklılaşma oranının anlamlı derecede arttığını bildiren çalışmalar mevcuttur (204). Çalışmamızda DYKU grupları arası TRAP aktivitelerini karşılaştırdığımızda TRAP aktivitesinin ışınlama zamanıyla aynı doğrultuda bir artış göstermediğini tespit ettik. Bizim çalışmamız ile bu çalışmanın sonuçları arasında osteoklastik aktivite bakımından gözlemlenen farklılığın DYKU uygulamalarımızı osteoblast ve osteoklast hücrelerinden oluşan ortak kültür sistemi üzerinde gerçekleştirmemiz ve hücrelere tek doz ışınlama protokolü uygulamamızdan kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Meng ve ark. (130) DYKU'nun osteoklast formasyonunu ve aktivitesini etkileme mekanizmasını araştırmak amacıyla yaptıkları bir çalışmada, monosit/makrofaj prekürsörlerinden elde edilen osteoklast hücrelerine 1,5 MHz frekans, 1 kHz tekrarlama hızı, 200 μs atım süresi ve 30 mW/cm^2 güç yoğunluğunda günde 20 dk. DYKU

uygulamışlardır. Çalışmanın sonuçlarına göre; TRAP-pozitif hücreler 3. günde ortaya çıkmaya başlamış ve 2 gün içinde daha çok sayıda olgun osteoklastlara farklılaşmıştır. DYKU'nun ekstraselüler reseptör kinazla ilgili sinyal yolağının inhibisyonu aracılığıyla osteoklast oluşumu üzerinde inhibitor bir etki gösterdiği, ancak olgun osteoklast fonksiyonu üzerinde anlamlı etkisinin bulunmadığı bildirilmiştir. Farhad ve ark. (205) MG-63 hücrelerini 4 gruba ayırarak birinci gruba 2 mg/mL doksisiklin, ikinci gruba DSLT, üçüncü gruba doksisiklin+DSLT uygulamışlar ve dördüncü grubu kontrol grubu olarak dizayn etmişlerdir. Bu çalışmanın sonuçları, DSLT ve doksisiklinin, MG-63 hücrelerinden türetilen, osteoklastların ve osteoklastogenezin aktivitesinde azalma ile sonuçlandığının bir belirteci olan RANKL/OPG oranını azalttığını ortaya koymuştur. Bazı yeni çalışmalar, DYKU'nun farklı yoğunluklarının osteoklastlar üzerinde zıt etkilere neden olduğunu göstermiştir. 100 mW/cm^2 ve 125 mW/cm^2 güç yoğunluğunda DYKU uygulamalarının osteoklast aktivitelerini azalttığı bildirilirken, 20 dk.'lık DYKU stimülasyonunun RAW264.7 hücrelerinin osteoklastik rezorptif aktivitesi üzerinde indükleyici bir etki gösterdiği bildirilmiştir (129,206,207). Meng ve ark. (130) ile Farhad ve ark. (205) bizim çalışmamızdan farklı olarak 30 mW/cm^2 DYKU uygulamasının osteoklastik aktivitede azalmaya sebep olduğunu rapor etmişlerdir. Bu durumun, çalışmalarda kullanılan hücre tipleri arasındaki farklılıklardan kaynaklanıyor olabileceğini düşünmekteyiz.

Amuk ve ark. (208) DSLT ile DYKU'nun etkilerini karşılaştırmak amacıyla 49 Wistar ratını; ortodontik apareyle tedavi edilen pozitif ve tedavi edilmeyen negatif kontrol grubu, 618 nm dalga boyu, 20 mW/cm^2 güç yoğunluğunda DSLT uygulanan grup ve 1,5 MHz frekans, 30 mW/cm^2 güç yoğunluğunda DYKU uygulanan grup olmak üzere 4 gruba ayırarak OOİKR oranlarını değerlendirmişlerdir. Pozitif kontrol grubuna göre DSLT ve DYKU uygulamaları ile osteoklast sayısı, rezorpsiyon laküna sayısı ve rezorpsiyon alan oranının azaldığı, toplam hücre sayısının ise arttığını rapor etmişlerdir. Pozitif kontrol grubuna göre DSLT ve DYKU gruplarının RANKL reseptör aktivatör seviyeleri daha düşük ve OPG seviyeleri daha yüksek bulunurken, DSLT ve DYKU grupları arasında anlamlı farklılık gözlenmediği bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda da bu çalışmayla uyumlu olarak deney gruplarında hücre canlılığı artmış, ALP ve TRAP aktivitesi bakımından ise hem DSLT hem de DYKU gruplarında kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı artış izlenmiştir.

Kombinasyon gruplarını TRAP aktivitesi açısından ele aldığımızda; 7. günde K8 grubu haricindeki tüm grupların TRAP aktivitelerinin kontrole kıyasla anlamlı düzeyde düşüş gösterdiğini, 7. ve 11. günlerde en yüksek TRAP aktivitesinin K8 grubunda ve en düşük TRAP aktivitesinin 7. günde K2, 11. günde K4 grubunda gerçekleştiğini gözlemledik. Bu bulgulardan hareketle tek başına ultrason veya düşük dozda lazer uygulanmasının TRAP aktivitesini azaltmada etkin olmadığını, kombine uygulamaların TRAP aktivitesinde düşüşe yol açarak osteoklastik aktiviteyi yavaşlatabileceği kanaatine varmaktayız.

Acar ve ark. (209) DSLT ve DYKU'nun etkilerini karşılaştırmak ve kombinasyonlarını araştırmak amacıyla cerrahi olarak kalvaryal defekt oluşturulan 16 Yeni Zelanda tavşanını 4'lü gruplara ayırarak, DSLT grubuna 810 nm dalga boyu, 4 J/cm^2 enerji yoğunluğunda 6 doz 120 sn./gün lazer terapisi, DYKU grubuna 1,5 MHz frekans, 1 kHz atım tekrar hızı ve 30 mW/cm^2 yoğunlukta 6 doz 20 dk./gün ultrason terapisi, kombinasyon grubuna 12 saat aralıklarla belirtilen dozlarda DSLT ve DYKU terapisi uygulamışlardır. Çalışmanın sonucunda, kontrol grubuna kıyasla deney gruplarında daha fazla kalsifiye kemik adacıkları ve önemli ölçüde osteoblast aktiviteleri tespit edilmiştir. Deney gruplarında kontrol grubuna göre daha yüksek bir yüzdede yeni kemik oluşumu görülse de gruplar arasında istatiksel olarak anlamlı farklılık kaydedilmemiştir. Bizim çalışmamızda da bu çalışmayla uyumlu olarak 4 J/cm^2 DSLT ile kombine uygulanan DYKU'nun hücresel canlılık, TRAP ve ALP düzeyleri bakımından istatiksel olarak anlamlı farklılık oluşturmadığı görülürken, DSLT dozu 8 J/cm^2'ye çıkarıldığında kombinasyon gruplarında istatiksel olarak anlamlı farklılıklar elde edilmiştir. Bu nedenle, çalışmaların sonuçları arası farklılığın dozlar arası farklılığa bağlı olduğunu düşünmekteyiz.

Ortodontik diş hareketi sırasında kemik döngüsü, tipik olarak, gerilim tarafında sürekli kemik birikimi ve basınç bölgelerinde sürekli kemik rezorpsiyonu ile karakterize edilen dengeli bir süreç olarak tanımlanmıştır (210). Bununla birlikte, son zamanlarda, histomorfometrik veriler, bu sürecin bu klasik paradigmadan daha karmaşık olabileceğini düşündürmektedir. Bir kemirgen modelinde meydana getirilen ortodontik diş hareketi sırasında, alveoler kemiğin hem basınç hem de gerilim tarafında erken bir rezorpsiyon dalgası (3-5 gün), ardından bunun tersine çevrilmesi (5-7 gün) ve geç bir oluşum dalgası (7-14 gün) tanımlanmıştır. Osteoklastlar ve makrofajlar gibi rezorptif hücrelerin yüksek ACP aktivitelerine, osteoblast gibi kemik oluşturan hücrelerin ise

yüksek ALP aktivitelerine sahip olduğu gösterilmiştir (211). Bunlara ek olarak, osteoklastların gelişmiş TRAP aktivitelerine sahip olduğu gösterilmiştir (212). Serum ve alveolar kemikte ACP, TRAP ve ALP değişiklikleri, ortodontik diş hareketi sırasında kısa vadede kemik döngüsünün dengeli olmadığını açıkça göstermektedir. Bunun yerine, kemik rezorpsiyonunun baskın olduğu bir erken dönem ve kemik oluşumunun birincil olduğu daha sonraki bir dönemin var olduğu düşünülmektedir (213). Biswas ve ark. (214) 288 ratta ortodontik diş hareketi esnasında ACP, TRAP ve ALP aktivitelerini değerlendirdikleri bir çalışmada, serum ACP ve TRAP'teki erken pikin, kemikteki pikin yanı sıra histomorfometrik olarak ölçülen çeşitli rezorptif parametrelerdeki pikten önce geldiğini tespit etmişlerdir. Bu erken serum piki, kemik döngüsünün indüksiyon (aktivasyon) fazı sırasında meydana gelmiş ve bu sırada hiçbir kemik değişikliği histolojik olarak ölçülememiştir. Serum piki 3. günde düşüşe geçmiş ve gözlem süresinin sonuna kadar düşük seviyede kalmıştır. Kemik ACP ve TRAP aktivitelerindeki pik ise daha uzun sürmüştür (3-7 gün) ve 7-10. günler arasında tersine dönerek, 10. ve 14. günlerde düşük seviyede kalmıştır. 7. günde hem serumda hem de alveolar kemikte ALP aktivitesinde bir pik gözlenmiştir. Bununla birlikte, serum ve kemikte ALP aktivitesi 10. günde düşmeye başlamıştır. 14. günde ise serumda ikinci, ancak önemli geç bir pik gözlenirken kemikte istatiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir.

Keeling ve ark. (215) 288 yetişkin ratta ortodontik diş hareketi sırasında serum ve alveolar kemikte TRAP ve ALP değişikliklerini incelemişler ve ortodontik diş hareketi sırasında enzim aktivitelerinin arttığını bildirmişlerdir. Ayrıca serumda birinci gün, kemikte üçüncü gün yüksek düzeyde TRAP seviyeleri saptanırken, kemikte ALP aktivitesinin yedinci günde en yüksek düzeye ulaştığı bildirilmiştir. Aparey aktivasyonundan 7 gün sonrasına kadar ortodontik olarak tedavi edilmiş dişlerin basınç tarafında ACP artışı ile ALP aktivitelerinde azalma ve gerilim tarafında ACP ile ALP aktivitelerinde artış bildirmiştir. Perinetti ve ark. (216), ortodontik diş hareketi sırasında DOS'taki ALP aktivitesini incelemişler ve ALP aktivitesinin ortodontik kuvvet uygulanan dişlerin kompresyon bölgelerinden ziyade gerilim bölgelerinde anlamlı olarak daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir.

Asma ve ark. (217) kemik oluşum hızının ALP aktivitesinden etkilenebileceğini bildirmişlerdir. TRAP aktivitesinin ortodontik kuvvetin büyüklüğüyle doğru orantılı olarak arttığı bildirilmiştir.

Wahab ve ark. (218) 12 hastada kanin retraksiyonu esnasında ALP aktiviteleri ölçümlerini değerlendirmişler ve başlangıçta kontrol grubuyla 150 gr kuvvet uygulanan deney grubu arasında anlamlı farklılık gözlemlemişlerdir. Bununla birlikte, ALP aktivitesinin kaninlerin mezial kısmında 1. haftada pik yaptığı, 2. haftadan itibaren azalarak 4. haftada stabilize olduğu tespit edilmiştir. 100 gr kuvvet uygulanan deney grubunda ise ALP aktivitesinin 2. haftada pik yaptığı, 3. haftadan itibaren azalarak 2 hafta sonra stabilize olduğu bildirilmiştir.

Batra ve ark. (219) insanlarda ortodontik diş hareketi esnasında DOS'taki ALP aktivitesini 1., 7., 14. ve 21. günlerde inceleyerek, 7., 14. ve 21. günlerde, deney gruplarının mezial ve distal yüzeylerinde ALP aktivitesi bakımından istatiksel olarak anlamlı farklılık tespit etmişlerdir. Enzim aktivitesinde pik, retraksiyonun başlamasının 14. gününde meydana gelmiş, ardından aktivitede özellikle mezial yönde önemli bir düşüş görülmüştür.

Yapılan bir çalışmada, 150 ve 100 gr kuvvet altında kanin retraksiyonu sırasında TRAP aktivitelerinin paterni, 0. haftadan 5. haftaya kadar hem mezial hem de distal bölgelerde gözlenmiştir. 150 gr grubunda, TRAP aktivitesi mezial bölgelerde başlangıca göre 3. haftada zirve yaparken, 4. ve 5. haftalarda azalmaya başlamıştır. Distal bölgede ise TRAP aktivitesinin 4. haftada pik yaptığı görülmüştür. 100 gr kuvvet grubunda 2. haftada mezial bölgede istatiksel olarak anlamlı olmayan bir artış göstererek pik noktasına ulaşmıştır. Distal bölgede ise TRAP aktivitesinin 5. haftada pik yaptığı, ancak bu farklılığın istatiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür (220). Bu bulgulardan hareketle, kemikte rezorpsiyonun baskın olduğu erken dönemde K8 grubu uygulamalarının TRAP aktivitesindeki artışı destekleyerek, formasyonun baskın olduğu geç dönemde ise U4 grubu uygulamalarının ALP aktivitesindeki artışı destekleyerek ortodontik diş hareketini hızlandırmaya katkısı olabileceğini düşünmekteyiz. Bununla birlikte 7. günde K8 haricindeki kombinasyon uygulamaları ve 11. günde en düşük TRAP aktivitesinin izlendiği K4 grubu uygulamalarındaki parametrelerin kemik formasyonunu desteklemek için kullanılabileceği kanaatindeyiz.

Casa ve ark. (221), 4 haftalık tork uygulaması sırasında klastik hücrelerin dağılımını saptamak için TRAP histokimyasal yöntemini kullanmışlar ve mononükleer

TRAP pozitif hücrelerin 2. haftada ortaya çıktığını, multinükleer TRAP pozitif hücrelerin ise 3. ve 4. haftalarda çok sayıda olduğunu bulmuşlardır. Rody ve ark. kompresyon bölgesinde ACP aktivitesinin arttığını bildirmişlerdir. Bu bulgulardan hareketle K8 grubu parametrelerinin ortodontik tedavi esnasında dişlerde tork hareketini hızlandırmak için kullanabileceğini düşünmekteyiz.

RME sonrası kemik rezorpsiyonu ve apozisyon moleküllerinin incelendiği bir çalışmada, 7. gün ve 14. günlerde analiz edilen tüm osteoblastik belirteçlerde istatiksel olarak anlamlı artış görülmekle birlikte, 14. günde elde edilen değerlerin 7. güne kıyasla istatiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu bildirilmiştir. Rezorpsiyon açısından sonuçlar incelendiğindeyse RANKL/OPG oranı hariç tüm osteoklastik belirteçlerin kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde arttığı, bazı parametrelerde 14. günde düşüşler izlendiği bildirilmiştir. Genel olarak, kuvvet uygulamasından hemen sonra osteoklastik belirteçlerin anlamlı ifadesi görülürken, osteoblastik ifadenin sonraki zaman noktasında belirgin olduğu görülmektedir (222). Yine bu bulgulardan hareketle RME uygulamalarında osteoklastik aktivitenin arttığı erken safhalarda K8 grubu uygulamalarının TRAP aktivitesindeki artışı destekleyeceği, osteoblastik aktivitenin arttığı geç safhalarda U4 grubu uygulamalarının ALP aktivitesini destekleyeceği, böylelikle DSLT ve DYKU uygulamalarının RME'nin iyileşme ve stabilizasyon süreçlerine katkı sağlayabileceğini düşünmekteyiz.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

DSLT ve DYKU'nun osteoblast ve osteoklast hücrelerinden oluşan ortak hücre kültür sistemi üzerine etkilerinin ortodontik açıdan değerlendirildiği bu çalışmada aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır:

1. DSLT, DYKU ve kombinasyon uygulamaları osteoblast-osteoklast ortak hücre kültüründe canlılık ve proliferasyonu aktive etmektedir. 7. günde 8 J/cm^2 enerji yoğunluğunda 20 sn. DSLT uygulaması ve 11. günde 4 J/cm^2 enerji yoğunluğunda 10 sn. DSLT uygulaması ile en iyi sonuçlar elde edilmiştir. Ultrasona kıyasla oldukça kısa süren lazer uygulamalarıyla hücrelerde daha yüksek canlılık oranları elde edilmekte, ancak lazerin ultrasonla kombinasyonu hücrelerin canlılık ve proliferasyon aktivitesinde sinerjik etki yaratmamaktadır.
2. ALP aktivitesi bakımından 1. günde deney grupları ile kontrol grubu arasında anlamlı farklılık bulunmazken, 7. günde 3 dk. ultrason + 20 sn. lazer kombinasyon grubunun (K6), 11. günde ise 10 dk. ultrason grubunun (U4) en iyi ALP düzeyine yol açtığı görülmektedir. Buna göre ultrason uygulamalarının süresini/sıklığını arttırarak yahut daha kısa süreli bir ultrason uygulamasını lazerle kombine ederek tek başına lazer uygulamalarından daha yüksek düzeyde ALP aktivitesi elde edilebileceğini düşünmekteyiz.
3. 1. günde deney gruplarının TRAP aktivitesi kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede artmış, 7. günde kombinasyon-II gruplarında TRAP aktivitesi kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede düşmüş ve 7 ile 11. günlerde en yüksek TRAP aktivitesini 10 dk. ultrason+20 sn. lazer grubu (K8) göstermiştir.
4. Kemikte rezorpsiyonun baskın olduğu erken dönemde 10 dk. ultrason+20 sn. lazer grubu (K8) uygulamalarının TRAP aktivitesindeki artışı destekleyerek, formasyonun baskın olduğu geç dönemde ise 10 dk. ultrason grubu (U4) uygulamalarının ALP aktivitesindeki artışı destekleyerek ortodontik diş

hareketini ve RME iyileşme dönemini hızlandırmaya katkısı olabileceğini düşünmekteyiz. Bununla birlikte 7. günde 10 dk. ultrason+20 sn. lazer grubu (K8) haricindeki kombinasyon uygulamaları ve 11. günde en düşük TRAP aktivitesinin izlendiği 10 dk. ultrason+10 sn. lazer grubu (K4) uygulamalarındaki parametrelerin OOİİKR'yi azaltmakta faydalı olabileceği kanaatindeyiz.

5. Çalışmamız DSLT ve DYKU'nun kombine etkilerini OB-OC ortak hücre kültürü üzerinde inceleyen ilk çalışma olduğundan, OB-OC ortak kültür sistemi üzerinde DSLT ve DYKU uygulamalarını inceleyen daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Coluzzi, D. J. (2008). Fundamentals of lasers in dentistry: basic science, tissue interaction, and instrumentation. *Journal of Laser Dentistry*, 16, 4-10.
2. Andersen, K. (2003). Laser Technology-a Surgical Tool of the Past, Present, and Future. *AORN Journal,* 78, 794-807
3. Einstein, A. (1917). Zur Quantentheorie der Strahlung. *Physikalische Zeitschrift*, 18, 121-128.
4. Houk, L.D., Humphreys, T. (2007). Masers to magic bullets: an updated history of lasers in dermatology. *Clinics in Dermatology*, 25, 434-442.
5. Larsson, U. (2001). Cultures of creativity: the centennial exhibition of the Nobel prize. *Canton (MA): Science History Publications*, 216, 3.
6. Stewart, N., Lim, A.C., Lowe, P.M., Goodman, G. (2013). Lasers and laser-like devices: Part one. *Australasian Journal of Dermatology*, 54, 173-183.
7. Zaret, M.M, Breinin, G.M, Schidt, H. (1961). Ocular lesions produced by and optical maser (laser). *Science*, 134, 1525-1526.
8. Franck, P., Henderson, P.W., Rothaus, K.O. (2016). Basics of Lasers: History, Physics, and Clinical Applications. *Clinics in Plastic Surgery*, 43, 505-513.
9. Green, J., Weiss, A., Stern, A. (2011). Lasers and radiofrequency devices in dentistry. *Dental Clinics of North America*, 55, 585-597.
10. Guttenberg, S.A., Emery, R.W. (2004). Laser physics and tissue interaction. *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America*, 16, 143-147.
11. Felice, E de. (2010). Shedding light: Laser physics and mechanism of action. *Phlebology*, 25, 11-28.
12. Reinisch, L. (1996). Laser Physics and Tissue Interactions. *Laser Applications in Otolaryngoology,* 20, 893-914
13. Goldberg, D.J. (2005). *Laser Dermatology*. Berlin: Springer-Verlag.
14. Anderson, R., Parrish, J. (1983). Selective photothermolysis: precise microsurgery by selective absorption of pulsed radiation. *Science*, 220, 524-527.
15. Coluzzi, D.J. (2004). Fundamentals of dental lasers: Science and instruments. *Dental Clinics of North America*, 48, 751-770.
16. Sean, W.L. (2000). *Lasers in Dermatology.* London: Springer-Verlag.
17. Carruth, J.A.S, McKenzie, A.L. (1986). *Medical Lasers. Science and Clinical Practice*. Bristol: Adam Hilger.
18. Ronald, W.W. (2002). *Lasers in Medicine*. Florida: CRC Press.
19. Convissar, R.A. (2015). *Principles and Practice of Laser Dentistry, 2nd Edition.* Amsterdam: Elsevier-Health Sciences Division
20. Parker, S. (2007). Lasers in dentistry: introduction and overview. *Dental Nursing*, 3, 310-314.
21. Gracco, A., Tracey, S., Lombardo, L., Siciliani, G. (2011). Soft tissue laser in Orthodontics. *Progress in Orthodontics*, 12, 66-72.
22. Görüş, Z., Meşe, A., Tokgöz Çetindağ, M., Evran, O.E. (2018). Dişhekimliğinde Kullanılan Er: YAG Lazerler. *Dicle Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Dergisi*, 39, 1-7.
23. Uyar, H.A. (2013). Dental lazerler ve sert doku uygulamaları. *Gulhane Medical Journal*, 55, 70-75.
24. Hamblin, M.R., Victor, M., Sousa, P. (2017). *Handbook of Low-Level Laser Therapy.* Singapore: Pan Stanford.
25. Kreisler, M., Christoffers, A.B., Willershausen, B., D'Hoedt, B. (2003). Effect of low-level GaAlAs laser irradiation on the proliferation rate of human periodontal ligament fibroblasts: An in vitro study. *Journal of Clinical Periodontology*, 30, 353-358.
26. Schartinger, V. H., Galvan, O., Riechelmann, H., Dudás, J. (2012). Differential responses of fibroblasts, non-neoplastic epithelial cells, and oral carcinoma cells to low-level laser therapy. *Supportive Care in Cancer*, 20, 523-529.
27. Karu, T.I. (2010). Multiple roles of cytochrome c oxidase in mammalian cells under action of red and IR-A radiation. *IUBMB Life*, 62, 607-610.
28. Manuscript, A., Nuts, T. (2013). The Nuts and Bolts of Low-level Laser (Light) Therapy. *Ann Biomed Eng*, 40, 516-533.
29. Sommer, A.P. (2019). Mitochondrial cytochrome c oxidase is not the primary acceptor for near infrared light-it is mitochondrial bound water: the principles of low-level light therapy. *Annals of Translational Medicine*, 7, 13.

30. Hamblin, M.R., Huang, Y.Y., Sharma, S.K., Carroll, J. (2011). Biphasic dose response in low level light therapy - an update. *Dose-Response*, 9, 602-618.
31. Campbell, K.J, Perkins, N.D. (2006). Regulation of NF-kappaB function. *Biochemical Society Symposium*, 73, 165-80.
32. Amaroli, A., Ferrando, S., Benedicenti, S. (2019). Photobiomodulation Affects Key Cellular Pathways of all Life-Forms: Considerations on Old and New Laser Light Targets and the Calcium Issue. *Photochemistry and Photobiology*, 95, 455-459.
33. Reddy, G. K. (2004). Photobiological basis and clinical role of low-intensity lasers in biology and medicine. *Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery*, 22, 141-150.
34. Sakurai, Y., Yamaguchi, M., Abiko, Y. (2000). Inhibitory effect of low-level laser irradiation on LPS-stimulated prostaglandin E2 production and cyclooxygenase-2 in human gingival fibroblasts. *European Journal of Oral Sciences*, 108, 29-34.
35. Nóbrega, C., Da Silva, E.M.K., De MacEdo, C.R. (2013). Low-level laser therapy for treatment of pain associated with orthodontic elastomeric separator placement: A placebo-controlled randomized double-blind clinical trial. *Photomedicine and Laser Surgery*, 31, 10-16.
36. Qamruddin, I., Alam, M.K., Mahroof, V., Fida, M., Khamis, M.F., Husein, A. (2021). Photobiostimulatory Effect of a Single Dose of Low-Level Laser on Orthodontic Tooth Movement and Pain. *Pain Research and Management,* 2021.
37. Almallah, M.M.E., Almahd, W.H., Hajeer, M.Y. (2016). Evaluation of the use of low-level laser therapy in pain control in orthodontic patients: A randomized split-mouth clinical trial. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 10, 23-28.
38. Heravi, F., Moradi, A., Ahrari, F. (2014). The effect of low-level laser therapy on the rate of tooth movement and pain perception during canine retraction. *Oral Health and Dental Management*, 13, 183-8.
39. Kaya, Y., Alkan, Ö., Kömüroglu, A.U., Keskin, S. (2021). Effects of ibuprofen and low-level laser therapy on orthodontic pain by means of the analysis of interleukin 1-beta and substance P levels in the gingival crevicular fluid. *Journal of Orofacial Orthopedics*, 82, 143-152.
40. Rma, A.A. (2011). Düşük enerji seviyeli lazer uygulamasının hızlı üst çene genişletmesi sonrası midpalatal sutur rejenerasyonu üzerine etkisi. *Türk Ortodonti Dergisi*, 24, 83-96.
41. Ekizer, A., Uysal, T., Güray, E., Yüksel, Y. (2013). Light-emitting diode photobiomodulation: Effect on bone formation in orthopedically expanded suture in rats - Early bone changes. *Lasers in Medical Science*, 28, 1263-1270.
42. Ferreira, F.N.H., Gondim, J.O., Neto, J.J.S. M., Dos Santos, P.C.F., de Freitas Pontes, K.M., Kurita, L.M., de Araújo, M.W.A. (2016). Effects of low-level laser therapy on bone regeneration of the midpalatal suture after rapid maxillary expansion. *Lasers in Medical Science*, 31, 907-913.
43. Çokakoğlu S., Aydoğan F., Aydın B. (2018). Low Level Laser Therapy in Orthodontics. *Meandros Medical and Dental Journal*, 99-105.
44. Zheng, J., Yang, K. (2021). Clinical research: low-level laser therapy in accelerating orthodontic tooth movement. *BMC Oral Health*, 21, 1-7.
45. Genc, G., Kocadereli, I., Tasar, F., Kilinc, K., El, S., Sarkarati, B. (2013). Effect of low-level laser therapy (LLLT) on orthodontic tooth movement. *Lasers in Medical Science*, 28, 41-47.
46. Ribeiro, L.N.S., de Figueiredo, F.A.T., da Silva Mira, P.C., Arnez, M.F.M., Matsumoto, M.A.N., de Menezes, L.M., Küchler, E.C., Stuani, M.B.S. (2022). Low-level laser therapy (LLLT) improves alveolar bone healing in rats. *Lasers in Medical Science*, 37, 961-969.
47. Santinoni, C., Oliveira, H., Batista, V., Lemos, C.A.A., Verri, F.R. (2017). Influence of low-level laser therapy on the healing of human bone maxillofacial defects: A systematic review. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 169, 83-89.
48. Nayyer, N., Tripathi, T., Rai, P., Kanase, A. (2021). Effect of photobiomodulation on external root resorption during orthodontic tooth movement - a randomized controlled trial. *International Orthodontics*, 19, 197-206.
49. Ozturk, T., Gül Amuk, N. (2020). Effects of photobiomodulation at different wavelengths on orthodontically induced root resorption in orthodontic retention period: a micro-CT and RT-PCR study. *Lasers in Medical Science*, 35, 1419-1429.
50. Melo Conti, C., Suzuki, H., Garcez, A.S., Suzuki, S.S. (2019). Effects of photobiomodulation on root resorption induced by orthodontic tooth movement and rankl/opg expression in rats. *Photochemistry and photobiology*, 95, 1249-1257.
51. Gurler, G., Gursoy, B. (2018). Investigation of effects of low-level laser therapy in distraction osteogenesis. Journal of Stomatology, *Oral and Maxillofacial Surgery*, 119, 469-476.

52. Taha, S.K., El Fattah, S.A., Said, E., Abdel-Hamid, M.A., Nemat, A.H., El Shenawy, H. (2018). Effect of Laser Bio-Stimulation on Mandibular Distraction Osteogenesis: An Experimental Study. *Journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons,* 76, 2411–2421.
53. Safavi, S.M., Kazemi, B., Esmaeili, M., Fallah, A., Modarresi, A., Mir, M. (2008). Effects of low-level He-Ne laser irradiation on the gene expression of IL-1β, TNF-α, IFN-γ, TGF-β, bFGF, and PDGF in rat's gingiva. *Lasers in Medical Science*, 23, 331-335.
54. Attia, M.S., Hazzaa, H.H., Al-Aziz, F.A., Elewa, G.M. (2019). Evaluation of adjunctive use of low-level diode laser biostimulation with combined orthodontic regenerative therapy. *Journal of the International Academy of Periodontology*, 21, 63-73.
55. John, S.S., Mohanty, S., Chaudhary, Z., Sharma, P., Kumari, S., Verma, A. (2020). Comparative evaluation of Low-Level Laser Therapy and cryotherapy in pain control and wound healing following orthodontic tooth extraction: A double blind study. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, 48, 251-260.
56. El-bialy, T., Tanaka, E., Aizenbud, D. (2018). *Therapeutic Ultrasound in Dentistry.* Alberta: Springer.
57. Luis, F., Moncayo, G. No (Ed.) (2021). *Handbook of Laser Technology and Applications.* Abingdon: CRC Press.
58. Vincent, L.M. (1988). Ultrasound of soft tissue abnormalities of the extremities. *Radiologic clinics of North America*, 26, 131-144.
59. Shah, N., Bansal, N., & Logani, A. (2014). Recent advances in imaging technologies in dentistry. *World Journal of Radiology*, 6, 794-807.
60. Hangiandreou, N.J. (2003). AAPM/RSNA physics tutorial for residents. Topics in US: B-mode US: basic concepts and new technology. Radiographics: a review publication of the Radiological Society of North America, *Inc*, 23, 1019-1033.
61. Rose, J.S. (1997). *Ultrasound in Emergency and Ambulatory Medicine*. St Louis: Mosby-Yearbook Inc.
62. Rose, J.S., Bair A.E. (2006). *Practical Guide To Emergency Ultrasound*. PA: Lippincott Williams and Wilkins.
63. Schuler, A. (2008). *Image artifacts and pitfalls - Chest sonography*. New York: Springer.
64. Hangiandreou N.J., (2003). AAPM/RSNA physics tutorial for residents. Topics in US: B-mode US: basic concepts and new technology. *Radiographics*, 4, 1019-33.
65. Watson, T. Therapeutic Ultrasound (İnternette) 2012. Erişim 27.12.2021, http://www.electrotherapy.org/assets/Downloads/Therapeutic_Ultrasound_2015.pdf
66. Aldrich, J.E. (2007). Basic physics of ultrasound imaging. *Critical Care Medicine*, 35, 131-137.
67. Watson, T. (2015). Ultrasound Treatment Dose Calculations. 1–2.
68. Li J., Chow R.M., Vadivelu N., Kaye A.D. (2021). *Ultrasound Fundamentals: An Evidence-Based Guide for Medical Practitioners.* Los Angeles: Springer.
69. Coltrera, M.D. (2010). Ultrasound physics in a nutshell. *Otolaryngologic Clinics of North America*, 43, 1149-1159.
70. Repacholi, M.H., Grandolfo, Rindi A. (1986). *Ultrasound-Medical Applications, Biological Effects, And Hazard Potential*. New York: Plenum Press.
71. Mukai, S., Ito, H., Nakagawa, Y., Akiyama, H., Miyamoto, M., Nakamura, T. (2005). Transforming growth factor-b1 mediates the effects of low-intensity pulsed ultrasound in chondrocytes. *Ultrasound Medicine and Biology*, 31, 1713-1721.
72. Scheven, B.A., Man, J., Millard, J.L., Cooper, P.R., Lea, S.C., Walmsley, A.D., Smith, A.J. (2009). VEGF and odontoblast-like cells: stimulation by low frequency ultrasound. *Archives of Oral Biology*, 54,185-191.
73. Mostafa, N.Z., Uludag, H., Dederich, D.N., Doschak, M.R., El-Bialy, T.H. (2009). Anabolic effects of low-intensity pulsed ultrasound on human gingival fibroblasts. *Archives of Oral Biology*, 54, 743-748.
74. Nakamura, T., Fujihara, S., Katsura, T., Yamamoto, K., Inubushi, T., Tanimoto, K., Tanaka, E. (2010). Effects of low intensity pulsed ultrasound on the expression and activity of hyaluronic synthase and hyaluronidase in IL-1b-stimulated synovial cells. *Annals of Biomedical Engineering*, 38, 3363-3370.
75. Dalla-Bona, D.A., Tanaka, E., Oka, H., Yamano, E., Kawai, N., Miyauchi, M., Takata, T.K. (2006) Effects of ultrasound on cementoblast metabolism in vitro. *Ultrasound Medicine and Biology*, 32, 943-948.
76. Harle, J., Salih, V., Mayia, F., Knowles, J.C., Olsen, I. (2001) Effects of ultrasound on the growth and function of bone and periodontal ligament cells in vitro. *Ultrasound Medicine and Biology*, 27, 579-586.
77. Naruse, K., Miyauchi, A., Itoman, M., Mikuni-Takagaki, Y. (2003). Distinct anabolic response of osteoblasts to low-intensity pulsed ultrasound. *Journal of Bone Mineral Research*, 18, 360-369.

78. Schumann, D., Kujat, R., Zellner, J., Angele, M.K., Nerlich, M., Mayr, E., Angele, P. (2006). Treatment of human mesenchymal stem cells with pulsed low intensity ultrasound enhances the chondrogenic phenotype in vitro. *Biorheology*, 43, 431-443.
79. Nagata, K., Nakamura, T., Fujihara, S., Tanaka, E. (2013). Ultrasound modulates the inflammatory response and promotes muscle regeneration in injured muscles. *Annals of Biomedical Engineering*, 41, 1095-1105.
80. Khan, Y., Laurencin, C.T. (2008). Fracture repair with ultrasound: clinical and cell-based evaluation. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 90, 138-144.
81. Shiro I. (1964). Study on the ultrasonic irradiation in orthopedic surgery. *Hirosaki Medicine,* 16, 242-253.
82. Liu, Z., Xu, J., Lingling, E., Wang, D. (2012). Ultrasound enhances the healing of orthodontically induced root resorption in rats. *The Angle orthodontist*, 82, 48-55.
83. Qamruddin, I., Alam, M.K., Mahroof, V., Karim, M., Fida, M., Khamis, M.F., Husein, A. (2021). Biostimulatory effects of low-intensity pulsed ultrasound on rate of orthodontic tooth movement and associated pain, applied at 3-week intervals: a split-mouth study. *Pain Research & Management*, 2021, 6624723.
84. Dahhas, F.Y., El-Bialy, T., Afify, A.R., Hassan, A.H. (2016). Effects of Low-Intensity Pulsed Ultrasound on Orthodontic Tooth Movement and Orthodontically Induced Inflammatory Root Resorption in Ovariectomized Osteoporotic Rats. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 42, 808-814.
85. Xue, H., Zheng, J., Cui, Z., Bai, X., Li, G., Zhang, C., He, S., Li, W., Lajud, S. A., Duan, Y., Zhou, H. (2013). Low-intensity pulsed ultrasound accelerates tooth movement via activation of the bmp-2 signaling pathway. *Plos one*, 8, 68926.
86. Alshihah, N., Alhadlaq, A., El-Bialy, T., Aldahmash, A., Bello, I. (2020). The effect of low intensity pulsed ultrasound on dentoalveolar structures during orthodontic force application in diabetic ex-vivo model. *Archives of Oral Biology*, 119, 104883.
87. Kaur, H., El-Bialy, T. (2020). Shortening of overall orthodontic treatment duration with low-intensity pulsed ultrasound (Lipus). *Journal of Clinical Medicine*, 9, 1303.
88. Ganzorig, K., Kuroda, S., Maeda, Y., Mansjur, K., Sato, M., Nagata, K., Tanaka, E. (2015). Low-intensity pulsed ultrasound enhances bone formation around miniscrew implants. *Archives of Oral Biology*, 60, 902-910.
89. Miura, K., Motoyoshi, M., Inaba, M., Iwai, H., Karasawa, Y., Shimizu, N. (2014). A preliminary study of the effects of low-intensity pulsed ultrasound exposure on the stability of orthodontic miniscrews in growing rats. *European Journal of Orthodontics*, 36, 419-424.
90. Xie, L.K., Wangrangsimakul, K., Suttapreyasri, S., Cheung, L.K., Nuntanaranont, T. (2011). A preliminary study of the effect of low intensity pulsed ultrasound on new bone formation during mandibular distraction osteogenesis in rabbits. *International journal of oral and maxillofacial surgery*, 40, 730-736.
91. Raza, H., Saltaji, H., Kaur, H., Flores-Mir, C., El-Bialy, T. (2016). Effect of low-intensity pulsed ultrasound on distraction osteogenesis treatment time: A meta-analysis of randomized clinical trials. *Journal of Ultrasound in Medicine*, 35, 349-358.
92. Hadaegh, Y., Uludag, H., Dederich, D., El-Bialy, T. H. (2021). The effect of low intensity pulsed ultrasound on mandibular condylar growth in young adult rats. *Bone Reports*, 15, PMC8433121.
93. Kaur, H., Uludağ, H., Dederich, D. N., El-Bialy, T. (2017). Effect of increasing low-intensity pulsed ultrasound and a functional appliance on the mandibular condyle in growing rats. *Journal of the American Institute of Ultrasound in Medicine*, 36, 109-120.
94. Qamruddin, I., Alam, M. K., Mahroof, V., Karim, M., Fida, M., Khamis, M. F., Husein, A. (2021). Biostimulatory effects of low-intensity pulsed ultrasound on rate of orthodontic tooth movement and associated pain, applied at 3-week intervals: a split-mouth study. *Pain research & Management,* 2021, 6624723.
95. Tehranchi, A., Badiee, M., Younessian, F., Badiei, M., Haddadpour, S. (2017). Effect of low-intensity pulsed ultrasound on postorthognathic surgery healing process. *Annals of Maxillofacial Surgery*, 7, 25-29.
96. Morgan, E.F., Barnes, G.L., Einhorn, T.A. (2013). The bone organ system: Form and function. *Osteoporosis*, 3-20.
97. Jeon, H.H., Teixeira, H., Tsai, A., Grassia, V., D'apuzzo, F. (2021). Clinical medicine mechanistic insight into orthodontic tooth movement based on animal studies: a critical review. *Journal Clinical Medicine*, 10, 1733.
98. Reitan, K. (1967). Clinical and histologic observations on tooth movement during and after orthodontic treatment. *American Journal of Orthodontics*, 53, 721-745.

99. Böhl, M., Kuijpers-Jagtman, A.M. (2009). Hyalinization during orthodontic tooth movement: a systematic review on tissue reactions. *European Journal of Orthodontics*, 31, 30-36.
100. Temiyasathit, S., Jacobs, C.R. (2010). Osteocyte primary cilium and its role in bone mechanotransduction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1192, 422–428.
101. Uematsu, S., Mogi, M., Deguchi, T. (1996). Interleukin (IL)-1β, IL-6, tumor necrosis factor-α, epidermal growth factor, and β2-microglobulin levels are elevated in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement. *Journal of Dental Research*, 75, 562–567.
102. Ren, Y., Hazemeijer, H., Haan, B. de, Qu, N., Vos, P. de (2007). Cytokine profiles in crevicular fluid during orthodontic tooth movement of short and long durations. *Journal of Periodontology*, 78, 453-458.
103. Garlet, T.P., Coelho, U., Silva, J.S., Garlet, G.P. (2007). Cytokine expression pattern in compression and tension sides of the periodontal ligament during orthodontic tooth movement in humans. *European Journal of Oral Sciences*, 115, 355-362.
104. Kang, Y.G., Nam, J.H., Kim, K.H., Lee, K.S. (2010). FAK pathway regulates PGE2 production in compressed periodontal ligament cells. *Journal of Dental Research*, 89, 1444-1449.
105. Krishnan, V., Davidovitch, Z. (2009). On a path to unfolding the biological mechanisms of orthodontic tooth movement. *Journal of Dental Research*, 88, 597-608.
106. Yamaguchi, M. (2009). RANK/RANKL/OPG during orthodontic tooth movement. *Orthodontics & Craniofacial Research*, 12, 113-119.
107. Glantschnig, H., Fisher, J.E., Wesolowski, G., Rodan, G.A., Reszka, A.A. (2003). M-CSF, TNFα and RANK ligand promote osteoclast survival by signaling through mTOR/S6 kinase. *Cell Death & Differentiation*, 10, 1165-1177.
108. Garlet, T.P., Coelho, U., Repeke, C.E., Silva, J.S., Cunha, F. de Q., Garlet, G.P. (2008). Differential expression of osteoblast and osteoclast chemmoatractants in compression and tension sides during orthodontic movement. *Cytokine*, 42, 330-335.
109. Patil, A., Shetty, A., Setty, S., Thakur, S. (2013). Understanding the advances in biology of orthodontic tooth movement for improved ortho-perio interdisciplinary approach. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 17, 309-318.
110. Harada, S.I., Rodan, G.A. (2003). Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature*, 423, 349-355.
111. Sandy, J.R., Farndale, R.W., Meikle, M.C. (1993). Recent advances in understanding mechanically induced bone remodeling and their relevance to orthodontic theory and practice. *American Journal Of Orthodontics And Dentofacial Orthopedics*, 103, 212-222.
112. Kurata, K., Heino, T.J., Higaki, H., Väänänen, H.K. (2006). Bone marrow cell differentiation induced by mechanically damaged osteocytes in 3D gel-embedded culture. *Journal Of the American Society For Bone And Mineral Research*, 21, 616-625.
113. Zhao, S., Kato, Y., Zhang, Y., Harris, S., Ahuja, S.S., Bonewald, L.F. (2002). MLO-Y4 osteocyte-like cells support osteoclast formation and activation. *Journal of the American Society For Bone And Mineral Research*, 17, 2068-2079.
114. Nomura, S., Takano-Yamamoto, T. (2000). Molecular events caused by mechanical stress in bone. *Journal Of the International Society For Matrix Biology*, 19, 91-96.
115. Oshiro, T., Shiotani, A., Shibasaki, Y., Sasaki, T. (2002). Osteoclast induction in periodontal tissue during experimental movement of incisors in osteoprotegerin-deficient mice. *The Anatomical Record*, 266, 218-225.
116. Theoleyre, S., Wittrant, Y., Tat, S.K., Fortun, Y., Redini, F., Heymann, D. (2004). The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 15, 457-475.
117. Weinbaum, S., Cowin, S.C., Zeng, Y. (1994). A model for the excitation of osteocytes by mechanical loading-induced bone fluid shear stresses. *Journal of Biomechanics*, 27, 339-360.
118. Aarden, E.M., Nijweide, P.J., Burger, E.H. (1994). Function of osteocytes in bone. *Journal of Cellular Biochemistry*, 55, 287-299.
119. Deldar, A., Weiss, L., Lewis, H. (1985). Bone lining cells and hematopoiesis: An electron microscopic study of canine bone marrow. *The Anatomical Record*, 213, 187-201.
120. Agata, H., Asahina, I., Yamazaki, Y., Uchida, M., Shinohara, Y., Honda, M. J., Kagami, H., Ueda, M. (2007). *Effective bone engineering with periosteum-derived cells. Journal of Dental Research*, 86, 79-83.
121. Agas, D., Hanna, R., Benedicenti, S., de Angelis, N., Sabbieti, M.G., Amaroli, A. (2021). Photobiomodulation by near-infrared 980-nm wavelengths regulates pre-osteoblast proliferation and viability through the pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 7586.

122. Shimohira, T., Niimi, H., Ohsugi, Y., Tsuchiya, Y., Morita, K., Yoshida, S., Hatasa, M., Shiba, T., Kadokura, H., Yokose, S., Katagiri, S., Iwata, T., Aoki, A. (2021). Low-level erbium-doped yttrium aluminum garnet laser irradiation induced alteration of gene expression in osteogenic cells from rat calvariae. *Photobiomodulation, Photomedicine, and Laser Surgery*, 39, 566-577.
123. Bourouni, I., Kyriakidou, K., Fourmousis, I., Vrotsos, I. A., Karoussis, I.K. (2021). Low level laser therapy with an 810-nm diode laser affects the proliferation and differentiation of premature osteoblasts and human gingival fibroblasts in vitro. *Journal of Lasers in Medical Sciences,* 12, 1-6.
124. Li, Q., Li, C., Xi, S., Li, X., Ding, L., Li, M. (2019). The effects of photobiomodulation therapy on mouse pre-osteoblast cell line MC3T3-E1 proliferation and apoptosis via miR-503/Wnt3a pathway. *Lasers in Medical Science*, 34, 607-614.
125. Tschon, M., Incerti-Parenti, S., Cepollaro, S., Checchi, L., Milena, F. (2015). Photobiomodulation with low-level diode laser promotes osteoblast migration in an in vitro micro wound model. *Journal of Biomedical Optics*, 20, 78002.
126. Tsuka, Y., Kunimatsu, R., Gunji, H., Nakajima, K., Kimura, A., Hiraki, T., Nakatani, A., Tanimoto, K. (2019). Effects of Nd:YAG low-level laser irradiation on cultured human osteoblasts migration and ATP production: in vitro study. *Lasers in medical science*, 34, 55-60.
127. da Silva, A.P.R.B., Petri, A.D., Crippa, G.E., Stuani, A.S., Stuani, A.S., Rosa, A.L., Stuani, M.B.S. (2012). Effect of low-level laser therapy after rapid maxillary expansion on proliferation and differentiation of osteoblastic cells. *Lasers in medical science*, 27, 777-783.
128. Maung, W.M., Nakata, H., Miura, M., Miyasaka, M., Kim, Y.K., Kasugai, S., Kuroda, S. (2021). Low-intensity pulsed ultrasound stimulates osteogenic differentiation of periosteal cells in vitro. *Tissue Engineering*, 27, 63-73.
129. Feres, M.F.N., Kucharski C., (2016). Effect of low-intensity pulsed ultrasound on the activity of osteoclasts: An in vitro study. *Archives of Oral Biology*, 70, 73-78.
130. Meng, J., Hong, J., Zhao, C., Zhou, C., Hu, B., Yang, Y., Jiang, G., Li, S., Shi, Z., Cai, X.Z., Yan, S.G. (2018). Low-intensity pulsed ultrasound inhibits RANKL-induced osteoclast formation via modulating ERK-c-Fos-NFATc1 signaling cascades. *American Journal of Translational Research*, 10, 29-371.
131. Coskun, M.E., Coskun, K.A., Tutar, Y. (2018). Determination of optimum operation parameters for low-intensity pulsed ultrasound and low-level laser-based treatment to induce proliferation of osteoblast and fibroblast cells. *Photomedicine And Laser Surgery*, 36, 246-252.
132. Sawauchi, K., Fukui, T., Oe, K., Kumabe, Y., Oda, T., Yoshikawa, R., Takase, K., Matsushita, T., Matsumoto, T., Hayashi, S., Kuroda, R., Niikura, T. (2022). Low-intensity pulsed ultrasound promotes osteogenic differentiation of reamer-irrigator-aspirator graft-derived cells in vitro. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 48, 313-322.
133. Choung, H.W., Lee, S.H., Ham, A.R., Lee, N.R., Kim, B., Pang, K.M. (2019). Effectiveness of Low-Level Laser Therapy with a 915 Nm Wavelength Diode Laser on the Healing of Intraoral Mucosal Wound: An Animal Study and a Double-Blind Randomized Clinical Trial. *Medicina*, 55, 405.
134. Oliveira, P.C., Reis, J.A., Lacerda, J.A., Silveira, N.T., Santos, J.M., Vitale, M.C. (2009) Laser Light May Improve the Symptoms of Oral Lesions of Cicatricial Pemphigoid: A Case Report. *Photomedicine and Laser Surgery.* 27, 825-828.
135. da Guarda, M.G., Paraguassú, G.M., Cerqueira, N.S., Cury, P.R., Farias, J.G., Ramalho, L.M.P. (2012). Laser GaAlAs (λ860 nm) Photobiomodulation for the Treatment of Bisphosphonate-Induced Osteonecrosis of the Jaw. *Photomedicine and Laser Surgery,* 30, 293-297.
136. Nimeri, G., Kau, C.H., Abou-Kheir, N.S., Corona, R. (2013). Acceleration of tooth movement during orthodontic treatment - a frontier in Orthodontics. *Progress in Orthodontics*, 14, 1-8.
137. Arai, C., Kawai, N., Nomura, Y., Tsuge, A., Nakamura, Y., Tanaka, E. (2020). Low-intensity pulsed ultrasound enhances the rate of lateral tooth movement and compensatory bone formation in rats. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial* Orthopedics, 157, 59-66.
138. Badiee, M., Tehranchi, A., Behnia, P., Khatibzadeh, K. (2021) Efficacy of Low-Intensity Pulsed Ultrasound for Orthodontic Pain Control: A Randomized Clinical Trial. *Frontiers in Dentistry,* 4, 17-29
139. Wu, S., Chen, Y., Zhang, J., Chen, W., Shao, S., Shen, H. (2018). Effect of low-level laser therapy on tooth-related pain and somatosensory function evoked by orthodontic treatment. *International Journal of Oral Science*, 10, 1-8.
140. Harrison, A., Lin, S., Pounder, N., Mikuni-Takagaki, Y. (2016). Mode & mechanism of low intensity pulsed ultrasound (LIPUS) in fracture repair. *Ultrasonics*, 70, 45-52.
141. Omasa, S., Motoyoshi, M., Arai, Y., Ejima, K.I., Shimizu, N. (2012) Low-Level Laser Therapy Enhances the Stability of Orthodontic Mini-Implants via Bone Formation Related to BMP-2 Expression in a Rat Model. *Photomedicine and Laser Surgery,* 30, 255-261.

142. Inubushi, T., Tanaka, E., Rego, E.B., Ohtani, J., Kawazoe, A., Tanne, K. (2013) Ultrasound stimulation attenuates resorption of tooth root induced by experimental force application. *Bone*. 53, 497-506.
143. Hamblin, M.R., Demidova, T.N. (2006). Mechanisms of low level light therapy. *Proceedings Of Spie - The International Society For Optical Engineering,* 15, 23-28.
144. Arango, M.T., Quintero-Ronderos, P., Castiblanco, J., Montoya-Ortíz, G. (2013). Cell culture and cell analysis. *Autoimmunity: From Bench to Bedside* (İnternette) 2013. Erişim 01.04.2022 https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459464/
145. Marshall, L.J., Austin, C.P., Casey, W., Fitzpatrick, S.C., Willett, C. (2018). Recommendations toward a human pathway-based approach to disease research. *Drug Discovery Today*. 23, 1824-1832.
146. Biologydictionary.net Editors. *In Vivo*. (Ekim, 2020). Erişim 17.06.2022, https://biologydictionary.net/in-vivo/.
147. Hayes, J. (2012). Osteoblast models for matrix research. *European Cells and Materials*, 24, 1-17.
148. Bard, D.R., Dickens, M.J., Smith, A.U., Zarek, J.M. (1972). Isolation of Living Cells from Mature Mammalian Bone. *Nature*, 236, 314-315.
149. Fernandes, R.J., Harkey, M.A., Weis, M., Askew, J.W., Eyre, D.R. (2007). The post-translational phenotype of collagen synthesized by SAOS-2 osteosarcoma cells. *Bone*, 40, 1343-1351.
150. Gallager, J.A. (2003). *Human osteoblast culture. In: Bone Research Protocols*. New Jersey: Humana Press.
151. Roman-Roman, S., Garcia, T., Jackson, A., Theilhaber, J., Rawadi, G., Connolly, T. (2003). Identification of genes regulated during osteoblastic differentiation by genome-wide expression analysis of mouse calvaria primary osteoblasts in vitro. *Bone,* 32, 474-482.
152. Chang, B., Qiu, H., Zhao, H., Yang, X., Wang, Y., Ji, T. (2019). The effects of photobiomodulation on MC3T3-E1 cells via 630 nm and 810 nm light-emitting diode. *Medical Science Monitor*, 25, 8744-8752.
153. Sabino, V.G., Ginani, F., da Silva, T.N., Cabral, A.A., Mota-Filho, H.G., Freire, M.C.L.C. (2020). Laser therapy increases the proliferation of preosteoblastic MC3T3-E1 cells cultured on poly(lactic acid) films. *Journal of Tissue Engineering Regenative Medicine*, 1, 1792-1803.
154. Tassinary, J.A.F, Lunardelli, A., Basso, B. de S., Dias, H.B., Catarina, A.V., Stülp, S. (2018). Low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) stimulates mineralization of MC3T3-E1 cells through calcium and phosphate uptake. *Ultrasonics*, 84, 290-295.
155. Hauser, J., Hauser, M., Muhr, G., Esenwein, S. (2009). Ultrasound-induced modifications of cytoskeletal components in osteoblast-like SAOS-2 cells. *Journal of Orthopaedic Research*, 27, 286-294.
156. Ghidini, G., Mori, D., Pulcini, S., Vescovi, P., Sala, R. (2021). Photobiomodulation with a 645 nm Diode Laser of Saos-2 Cells and Platelet-Rich Plasma: The Potential for a New Mechanism of Action. *Photobiomodulation, Photomedicine, and Laser Surgery*, 9, 86-93.
157. Shin, S.H., Kim, K.H., Choi, N.R., Kim, I.R., Park, B.S., Kim, Y.D. (2016). Effect of low-level laser therapy on bisphosphonate-treated osteoblasts. *Maxillofacial and Plastic Reconstrictive Surgery*, 3, 1-8.
158. Mahmood, M., Adam, J., Ahmad, H., Mohammad, A., Alam, K., Hassan, R. (2013). Effect of 940 nm low-level laser therapy on osteogenesis in vitro. *Journal of Biomedical Optics,* 18, 12-18.
159. Jeong, S.Y., Hong, J.U., Song, J.M., Kim, I.R., Park, B.S., Kim, C.H. (2018). Combined effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 and low level laser irradiation on bisphosphonate-treated osteoblasts. *Journal of the Korean Associaton of Oral and Maxillofacial Surgery*, 44, 259-268.
160. Tani, A., Chellini, F., Giannelli, M., Nosi, D., Zecchi-Orlandini, S., Sassoli, C. (2018). Red (635 nm), Near-Infrared (808 nm) and Violet-Blue (405 nm) Photobiomodulation Potentiality on Human Osteoblasts and Mesenchymal Stromal Cells: A Morphological and Molecular In Vitro Study. *International Journal of Molecular Sciences,* 19, 1946.
161. Bayat, M., Virdi, A., Rezaei, F., Chien, S. (2018). Comparison of the in vitro effects of low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound therapy on bony cells and stem cells. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 133, 36-48.
162. Liao, N.S., Chen, W.L., Huang, Y.M., Chen, S.N. (2013). Research propress of co-culture system of osteoblast with osteoclast and its applications. *Zhongguo Gu Shang*, 26, 349-353.
163. Remmers, S.J.A, de Wildt, B.W.M, Vis, M.A.M, Spaander, E.S.R., de Vries, R.B.M., Ito, K. (2021). Osteoblast-osteoclast co-cultures: A systematic review and map of available literature. *Plos One*, 16, 1-26.
164. Hong, J.U., Kwon, J.J., Heo, S.C., Shin, S.H., Kim, H.J., Lee, J.Y. (2021). Effects of photobiomodulation on bone remodeling in an osteoblast–osteoclast co-culture system. *Lasers in Medical Science,* 37, 1049-1059.

165. Borciani, G., Montalbano, G., Baldini, N., Vitale-Brovarone, C., Ciapetti, G. (2022). Protocol of Co-Culture of Human Osteoblasts and Osteoclasts to Test Biomaterials for Bone Tissue Engineering. *Methods and Protocols*, 5, 73-79.
166. Chevalier, C., Çolakoğlu, M., Brun, J., Thouverey, C., Bonnet, N., Ferrari, S. (2021). Primary mouse osteoblast and osteoclast culturing and analysis. *Star Protocolss-Cell Press*, 182, 452-459.
167. Rampersad, S.N. (2012). Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors (Basel)*, 12, 47-60.
168. O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., Pognan, F. (2000). Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*, 267, 5421-5426.
169. Vega-Avila, E., Pugsley, M.K. (2011). An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells. *Proceedings of the Western Pharmacology Society,* 54, 10-14.
170. Skjodt, M., Russell, G. (1992). *Bone cell biology and the regulation of bone turnover*. Florida: CRC Press.
171. Harris, H. (1990). The human alkaline phosphatases: What we know and what we don't know. *Clinica Chimica Acta*, 186, 133-150.
172. Robison R. (1923). The Possible Significance of Hexosephosphoric Esters in Ossification. *Biochemical Journal*, 17, 286-93.
173. Siffert, R.S. (1951). The role of alkaline phosphatase in osteogenesis. *Journal of Experimental Medicine*, 93, 415-426.
174. Canalis, E. (1983). Effect of hormones and growth factors on alkaline phosphatase activity and collagen synthesis in cultured rat calvariae. *Metabolism,* 32,14-20.
175. Sabokbar, A., Millett, P.J., Rushton, N. (1994). A rapid, quantitative assay for measuring alkaline phosphatase activity in osteoblastic cells in vitro. *Bone and Mineral*, 27, 57-67
176. Burstone, M.S. (1959). Histochemical demonstration of acid phosphatase activity in osteoclasts. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 7, 39-41.
177. Chambers, T.J., Fuller, K., Darby, J.A. (1987). Hormonal regulation of acid phosphatase release by osteoclasts disaggregated from neo- natal rat bone. *Journal of Cell Physiology*, 132, 90-97
178. Shaffer–Brehme, C., Roman, S., Shaffer, J., Wolfert, W. (1999). Tartrate-resistant acid phosphatase forms complexes with c-macroglobulin in serum. *Journal of Bone and Mineral Research*, 14, 311-318.
179. Luukkainen, R., Talonen, R., Kaarela, K., Merilahti–Palo, R., Rintala, E. (1990). Synovial fluid acid phosphatase in seropositive and se- ronegative arthritides. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 8, 63-65
180. Sahara, N., Ashizawa, Y., Nakamura, K., Deguchi, T., Suzuki, K. (1998). Ultrastructural features of odontoclasts that resorb enamel in human deciduous teeth prior to shedding. *The Anatomical Record*, 252, 215-228
181. Yamaji, K., Nishimura, M., Nishitani, Y., Izawa, S., Hoshika, T., Shiode, S. (2010). Effects of ultrasound on bone formation induced by BMP-2. *Journal of Oral Tissue*, 8, 47-51.
182. Rech, C.A., Pansani, T.N., Cardoso, L.M., Ribeiro, I.M., Silva-Sousa, Y.T.C., de Souza Costa, C.A., Basso, F.G. (2022). Photobiomodulation using LLLT and LED of cells involved in osseointegration and peri-implant soft tissue healing. *Lasers in Medical Science*, 37, 573-580.
183. Emes, Y., Akça, K., Aybar, B., Yalçın, S., Çavuşoğlu, Y., Baysal, U., Işsever, H., Atalay, B., Vural, P., Ergüven, M., Çehreli, M.C., Bilir, A. (2013). Low-level laser therapy vs. pulsed electromagnetic field on neonatal rat calvarial osteoblast-like cells *Lasers in Medical Science*, 28, 901-909.
184. Bueno, N.P., Copete, I.N., Lopes, H.B., Arany, P.R., Marques, M.M., Ferraz, E.P. (2021). Recovering the osteoblastic differentiation potential of mesenchymal stem cells derived from diabetic rats by photobiomodulation therapy. *Journal of Biophotonics*, 14, 93-102.
185. Chang, S.Y., Carpena, N.T., Kang, B.J., Lee, M.Y. (2020). Effects of Photobiomodulation on Stem Cells Important for Regenerative Medicine. *Medical Lasers; Engineering, Basic Research, and Clinical Application*, 9, 134-141.
186. Cardoso, M.V., do Vale Placa, R., Sant'Ana, A.C.P., Greghi, S.L.A, Zangrando, M.S.R, de Rezende, M.L.R, Oliveira, R.C, Damante, C.A. Laser and LED photobiomodulation effects in osteogenic or regular medium on rat calvaria osteoblasts obtained by newly forming bone technique. *Lasers in Medical Science*, 36, 541-553.

187. Pagin, M.T., de Oliveira, F.A., Oliveira, R.C., Sant'Ana, A.C.P., de Rezende, M.L.R., Greghi, S.L.A., Damante, C.A. (2012). Laser and light-emitting diode effects on pre-osteoblast growth and differentiation. *Lasers in Medical Science,* 29, 55-59.
188. Renno, A.C, McDonnell, P.A., Parizotto, N.A., Laakso, E.L. (2007). The Effects of Laser Irradiation on Osteoblast and Osteosarcoma Cell Proliferation and Differentiation in Vitro, *Photomedicine and Laser Technology,* 25, 275-280.
189. Oliveira, F.A. de, Matos, A.A., Matsuda, S.S., Buzalaf, M.A.R. (2017). Low level laser therapy modulates viability, alkaline phosphatase and matrix metalloproteinase-2 activities of osteoblasts. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 169, 35-40.
190. Stein, E., Koehn, J., Sutter, W., Wendtlandt, G., Wanschitz, F., Thurnher, D. (2008). Initial effects of low-level laser therapy on growth and differentiation of human osteoblast-like cells. *Wien Klin Wochenschr*, 120, 112-117.
191. Stein, A., Benayahu, D., Maltz, L., Oron, U. (2005). Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. *Photomedicine and Laser Surgery,* 23,161-166.
192. Chiu, C.Y., Tsai, T.L., Vanderby, R., Bradica, G., Lou, S.L., Li, W.J. (2015). Osteoblastogenesis of mesenchymal stem cells in 3-D culture enhanced by low-intensity pulsed ultrasound through soluble receptor activator of nuclear factor Kappa B ligand. *Ultrasound in Medicine and Biology,* 41, 1842-1852.
193. Tassinary, J.A.F, Lunardelli, A., Basso, B. de S., Dias, H.B., Catarina, A.V., Stülp, S. (2018). Low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) stimulates mineralization of MC3T3-E1 cells through calcium and phosphate uptake. *Ultrasonics*, 84, 290-295.
194. Feng, L., Liu, X., Cao, H., Qin, L., Hou, W., Wu, L. (2019). A comparison of 1- and 3.2-MHz low-intensity pulsed ultrasound on osteogenesison porous titanium alloy scaffolds: An in vitro and in vivo study. *Journal of Ultrasound in Medicine*, 38, 191-202.
195. Zhou, X.Y., Wu, S.Y., Zhang, Z.C., Wang, F., Yang, Y.L., Li, M. (2017). Low-intensity pulsed ultrasound promotes endothelial cell-mediated osteogenesis in a conditioned medium coculture system with osteoblasts. *Medicine (United* States), 96, 42-49.
196. Katiyar, A., Duncan, R.L., Sarkar, K. (2014). Ultrasound stimulation increases proliferation of MC3T3-E1 preosteoblast-like cells. *Journal of Therapeutic Ultrasound*, 2, 78-82.
197. Li, L., Yang, Z., Zhang, H., Chen, W., Chen, M., Zhu, Z. (2012). Low-intensity pulsed ultrasound regulates proliferation and differentiation of osteoblasts through osteocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 418, 296-300.
198. Babuccu C., Keklikoğlu N., Baydoğan M., Kaynar A. (2014). Cumulative effect of low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound on bone repair in rats. *International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery,* 43, 769-776.
199. Alazzawi, M.M.J., Husein, A., Alam, M.K., Hassan, R., Shaari, R., Ahmad, A., Salzihan, M.S. (2018). Effect of low level laser and low intensity pulsed ultrasound therapy on bone remodelling during orthodontic tooth movement in rats. *Journal of International Dental and Medical Research*, 12, 886-893.
200. Hsu, L.F., Tsai, M.H., Chang, B.E., Chen, Y.J., Yao, C.C.J. (2018). 970 nm low-level laser affects bone metabolism in orthodontic tooth movement. *Journal of Photochemistry and Photobiology,* 186, 41-50.
201. Bouvet-Gerbettaz, S., Merigo, E., Rocca, J.P., Carle, G.F., Rochet, N. (2009) Effects of low-level laser therapy on proliferation and differentiation of murine bone marrow cells into osteoblasts and osteoclasts. *Lasers in Surgery and Medicine*, 41, 291-297.
202. Kim, S.J., Moon, S.U., Kang, S.G., Park, Y.G. (2009). Effects of low-level laser therapy after Corticision on tooth movement and paradental remodeling. *Lasers in Surgery and Medicine*, 41, 524-533.
203. Lee, G., Kim, B., Ko, Y., Park, M., Kim, D., Ryu, K.H. (2017). Regulation of RANKL-Induced Osteoclastogenesis by 635-nm Light-Emitting Diode Irradiation Via HSP27 in Bone Marrow-Derived Macrophages. *Photomedicine and Laser Surgery,* 35, 78-86.
204. Higashi, Y., Inami, K., Shimizu, H., Matsumoto, N. (2020). Effect of low intensity pulsed ultrasound on osteoclast differentiation. *Orthodontic Waves*, 79, 163-169.
205. Farhad, S.Z., Siadat, A., Sadeghian, N., Abrishamkar, S., Khosraviani, F., Khazaei, P. (2020). The effect of low-level laser radiation and doxycycline on the levels of osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand. *Lasers in Medical Science*, 35, 1975-1979.
206. Monici, M., Bernabei, P.A., Basile V., Romano G., Conti A., Breschi L. (2007). Can ultrasound counteract bone loss? Effect of low-intensity ultrasound stimulation on a model of osteoclastic precursor. *Acta Astronautica*, 60, 383-90.
207. Chen, S.H., Wu, C.C., Wang, S.H., Li, W.T. (2012). The inhibition effect of low-intensity pulsed ultrasound on osteoclasts progenitor cells. *IEEE International Ultrasonics Symposium*, 2012, 607-610.

208. Gul, Amuk N., Kurt, G., Guray, E. (2018). Effects of Photobiomodulation and Ultrasound Applications on Orthodontically Induced Inflammatory Root Resorption; Transcriptional Alterations in OPG, RANKL, Cox-2: An Experimental Study in Rats. *Photomedicine and Laser Surgery,* 36, 653-659.
209. Acar, A.H., Yolcu, Ü., Altindiş, S., Gül, M., Alan, H., Malkoç, S. (2016). Bone regeneration by low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound therapy in the rabbit calvarium. *Archive of Oral Biology*, 61, 60-65.
210. Krishnan, V., Davidovitch, Z. (2006). Cellular, molecular, and tissue-level reactions to orthodontic force. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*,129, 469.e1-469.e32.
211. Masella, R.S, Meister M. (2006). Current concepts in the biology of orthodontic tooth movement. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 129, 458-468.
212. Meikle, M.C. (2006). The tissue, cellular, and molecular regulation of orthodontic tooth movement: 100 years after Carl Sandstedt. *European Journal of Orthodontics*, 28, 221-240.
213. Yu, X., Huang, Y., Collin-Osdoby, P., Osdoby, P. (2003). Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) recruits osteoclast precursors by inducing chemotaxis, matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activity, and collagen transmigration. *Journal of Bone and Mineral Research*, 18, 1404-1418.
214. Biswas, S. (2020). Effects of Orthodontic Force on Osteoblasts and Alkaline Phosphatase. *Journal of West Bengal University Health Science*,1, 57-63.
215. Keeling, S.D., King, G.J., McCoy, E.A., Valdez, M. (1993) Serum and alveolar bone phosphatase changes reflect bone turnover during orthodontic tooth movement. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 103, 320-326.
216. Perinetti, G., Paolantonio, M., D'Attilio, M., D'Archivio, D., Tripodi, D., Femminella, B. (2002). Alkaline phosphatase activity in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics,* 122, 548-556.
217. Asma, A.A.A., Rohaya, M.A.W, Shahrul Hisham, Z.A. (2008). Crevicular alkaline phosphatase activity during orthodontic tooth movement: Canine retraction stage. *Journal of Medical Sciences*, 8, 228-233.
218. Wahab, R., Dasor, M., Senafi, S., Abang Abdullah, A.A., Yamamoto, Z., Jemain, A.A. (2013). Crevicular alkaline phosphatase activity and rate of tooth movement of female orthodontic subjects under different continuous force applications. *International Journal of Dentistry*, 20, 33-39.
219. Batra, P., Kharbanda, O.P., Duggal, R., Singh, N., Parkash, H. (2006). Alkaline phosphatase activity in gingival crevicular fluid during canine retraction. *Orthodontics Craniofacial Research*, 9, 44-51.
220. Wahab, R.M.A, Dasor, M.M., Senafi, S., Abdullah, A.A.A., Jemain, A.A., Kasim, N.A. (2011). Crevicular tartrate resistant acid phosphatase activity and rate of tooth movement under different continuous force applications. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 20, 2213-2219.
221. Casa, M.A., Faltin, R.M., Faltin, K., Arana-Chavez, V.E. (2006). Root Resorption on Torqued Human Premolars Shown by Tartrate-Resistant Acid Phosphatase Histochemistry and Transmission Electron Microscopy. *The Angle Orthodontist*, 76, 1015–1021.
222. Guerrero, J.A., Silva, R.S., de Abreu Lima, I.L., Rodrigues, B.C.D., Barrioni, B.R., Amaral, F.A. (2020). Maxillary suture expansion: A mouse model to explore the molecular effects of mechanically-induced bone remodeling. *Journal of Biomechanics*, 108, 90-97.

EKLER

EK-1. Etik Kurul Uygunluk Kararı

Evrak Tarih ve Sayısı: 07/07/2020-E.21677

T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
Hamidiye Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 46418926-050.03.04
Konu : Araştırma Projesi Değerlendirme Raporu (20/258)

Sayın Prof. Dr. Şeniz KARAÇAY

Kurulumuza değerlendirilmek üzere sunulan 20/258 kayıt numaralı, ***"Düşük Seviyeli Lazer ve Düşük Yoğunlukta Kesikli Ultrason Uygulamalarının Osteoblast Hücreleri Üzerindeki Etkilerinin Farklı Sinyal Yolakları Aracılığıyla In Vitro Olarak İncelenmesi***" başlıklı proje önerisi kurulumuzun 26.06.2020 tarihli toplantısında değerlendirilmiş ve etik açıdan uygun bulunmuştur. İlgili kurul kararı Ek'te sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

e-imzalıdır
Prof. Dr. Fatih GÜLTEKİN
Başkan

Ek: Kurul Kararı

Adres:Mekteb-i Tıbbiye-i Şahane Kampüsü, Tıbbiye Cad. No:38 Selimiye
Telefon:0216 346 36 38 Faks0216 346 36 40
Elektronik Ağ:http://sbu.edu.tr
Bilgi için: Arş.Gör.Ronayı COŞKUN
Unvanı: Sekreter

Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

EK-2. Etik Kurul Tez Başlığı Değişikliği Onayı

Evrak Tarih ve Sayısı: 29.12.2022-197667

T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
Hamidiye Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : E-46418926-050.99--197667 29.12.2022
Konu : 20/258 No'lu Çalışmanın Başlık Değişikliği

Sayın Dilek TEKİN

İlgi : dilekçe (1).pdf

Kurulumuza değerlendirilmek üzere sunulan 20/258 kayıt numaralı, ***"Düşük Seviyeli Lazer ve Düşük Yoğunlukta Kesikli Ultrason Uygulamalarının Osteoblast Hücreleri Üzerindeki Etkilerinin Farklı Sinyal Yolakları Aracılığıyla In Vitro Olarak İncelenmesi"*** başlıklı proje önerisi kurulumuzun 26.06.2020 tarihli toplantısında uygun bulunmuş olup ilgi dilekçenize istinaden çalışma başlığınızın ***"Düşük Seviyeli Lazer ve Düşük Yoğunlukta Kesikli Ultrason Uygulamalarının Osteoblast-Osteoklast Ortak Hücre KültürüSistemi Üzerindeki Etkilerinin In Vitro Olarak Incelenmesi"*** olarak değiştirilmesi arşiv kayıtlarımıza eklenmiştir.

Gereğini rica ederim.

Doç. Dr. Yasemin AYDIN KARTAL
Başkan

Ek:İlgi Yazı (1 Sayfa)

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Belge Doğrulama Kodu :*BSV5EU53F0* Pin Kodu :42042 Belge Takip Adresi : https://www.turkiye.gov.tr/sbu-ebys

Adres:Mekteb-i Tıbbiye-i Şahane Kampüsü, Tıbbiye Cad. No:38 Selimiye
Telefon:0216 346 36 38 Faks:0216 346 36 40
Web:http://sbu.edu.tr
Kep Adresi:sbu@hs01.kep.tr

Bilgi için: Ali CEYLAN
Unvanı: Memur

Bu belge güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır