

Effect of superpulsed laser irradiation on bone formation in a human osteoblast-like cell line

G. MARTINASSO, M. MOZZATI, R. POL, R.A. CANUTO, G. MUZIO

Aim. The effect superpulsed of low-level laser therapy (SLLT) on bone regeneration has been the focus of recent research. This preliminary study investigated the effect of superpulsed laser irradiation on proliferation and bone formation in human osteoblast-like cells MG-63.

Methods. Human osteoblast-like cells MG-63 were exposed every 24 h to superpulsed low-level laser produced by the device Lumix 2 HF-PL Dental (Fisioline s.n.c., Verduno, Cuneo, Italy); the experimental protocol comprised 4 days of treatment. At each experimental time, cell proliferation and some markers of osteoblast activity were evaluated.

Results. Numbers of laser-treated cells increased starting from day 2 of treatment. The ability of SLLT irradiation to stimulate bone production was evaluated by determining the expression of osteocalcin and alkaline phosphatase, proteins involved in calcium nodule formation. These proteins increased markedly after 3 days of laser treatment.

Conclusion. These preliminary results show that repeated SLLT irradiation stimulates cell proliferation in human osteoblast-like cells and, importantly, increases the expression of proteins essential for bone formation.

Key words: Superpulsed - Lasers - Osteogenesis - Osteoblasts - Osteocalcin - Alkaline phosphatase.

Received on December 21, 2006.

Accepted for publication on January 30, 2007.

Address reprint requests to: Prof.ssa R. A. Canuto, Dipartimento di Medicina ed Oncologia Sperimentale, Università degli Studi di Torino, Corso Raffaello 30, 10125 Torino.
E-mail: rosangela.canuto@unito.it

Department of Medicine
and Experimental Oncology
Turin University, Turin, Italy

Superpulsed low-level laser therapy (SLLT) is a new approach increasingly used in medicine, which has been shown to have several different effects, including pain relief, wound healing, and nerve regeneration. *In vitro* studies to elucidate the mechanisms underlying the positive effects of SLLT indicate that laser exposure increases TGF- β and PDGF release from fibroblasts, and induces the formation of small amounts of reactive oxygen species, which can trigger cell stimulation via stimulation of ATP formation.¹

The effect of SLLT on bone regeneration has been the focus of more recent research, including in dentistry. Studies have investigated the ability of superpulsed low-level laser irradiation to stimulate both bone production and bone-implant interaction. With regard to bone production, *in vivo* experiments have found that superpulsed laser irradiation with a high peak power increases osteoblast activity and decreases osteoclast numbers.² These results have been confirmed by *in vitro* studies showing that low-energy laser can stimulate both the proliferation of nodule-forming osteoblasts and the differentiation of osteoblast precursors.³ Regarding bone-implant interactions, both *in vivo* and *in vitro* studies suggest that

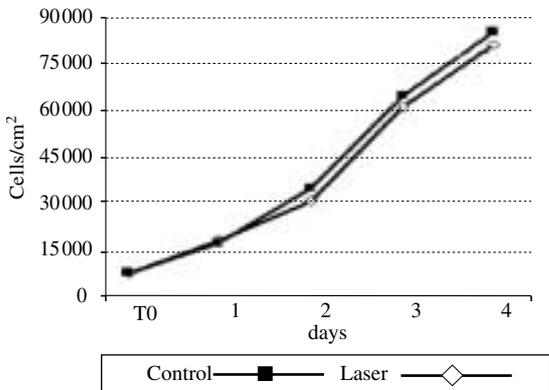


Figure 1.—Number of MG-63 cells treated or not with superpulsed low-level laser irradiation.

superpulsed low-level laser irradiation might improve tissue healing and consolidation of implants, increasing implant success.⁴ This preliminary study aimed to investigate the effect of superpulsed laser irradiation on proliferation and bone formation in human osteoblast-like cells MG-63.

Materials and methods

Low-level laser irradiation

Human osteoblast-like MG-63 cells were seeded (10 000/cm²) in MEM medium containing 2 mM L-glutamine, 1% (v/v) antibiotic/antimycotic solution, 1 mM sodium pyruvate, and 10% (v/v) foetal bovine serum (FBS). Twenty-four hours after seeding, cells were exposed to superpulsed low-level laser irradiation under a laminar flow hood. A

Lumix 2 HFPL Dental device (Fisioline s.n.c., Verduno, Cuneo, Italy) was used. Experimental parameters were: modulation 100%, frequency 30 kHz, energy 60 J, exposure time 5 min. Cells were exposed to laser irradiation every 24 h for the times reported in Figures 1, 2.

Cell proliferation

Cell growth was evaluated in monolayer and culture medium using a Burker chamber, and is expressed as number of cells/cm².

Markers of osteoblast activity

Cells detached from the monolayer were examined for parameters that are markers of osteoblast activity. Alkaline phosphatase (ALP) and osteocalcin mRNA content were analysed by real time PCR.

The increase was defined as the relative expression compared to that at time 0 (time of seeding cells), calculated as $2^{-\Delta\Delta Ct}$, where $\Delta Ct = Ct_{sample} - Ct_{GAPDH}$ and $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{sample} - \Delta Ct_{time 0}$.

Results

Figure 1 reports the effect of superpulsed low-level laser irradiation on proliferation of MG-63 cells. Cell number increased in laser-treated cells starting from day 2 of treatment and remained elevated during subsequent days. No induction of cell death was apparent.

The ability of superpulsed low-level laser irradiation to stimulate bone production was

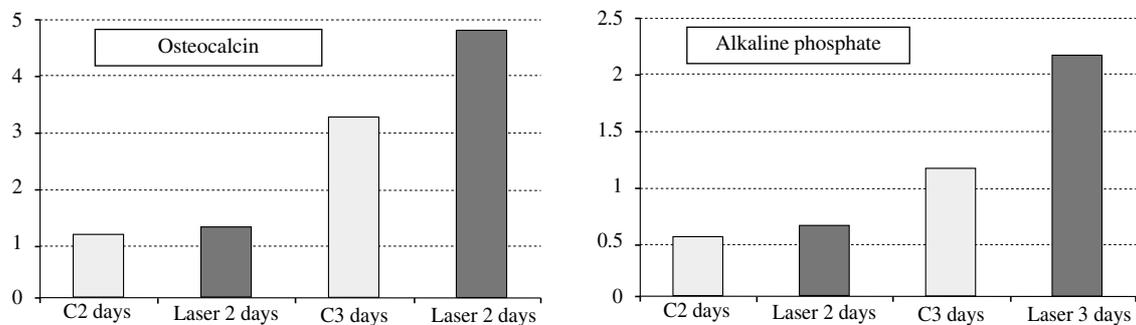


Figure 2.—mRNA content of osteocalcin and ALP in MG-63 cells treated or not with superpulsed low-level laser irradiation.

evaluated by determining the expression of some proteins involved in calcium nodule formation: osteocalcin and ALP. Figure 2 reports the mRNA content of osteocalcin and ALP determined at day 2 and day 3 of treatment. In both untreated and treated cells, osteocalcin increased *versus* the level found in cells at time 0, but the increase was much higher in laser-treated cells than in untreated ones. As regards ALP, the values were higher in laser-treated cells than in untreated ones although, after 2 days' treatment, the values were lower than those of cells at time 0.

Conclusions

These preliminary results show that repeated superpulsed low-level laser irradiation

stimulates cell proliferation in human osteoblast-like cells and, importantly, increases the expression of proteins essential in bone formation.

References

1. Lubart R, Eichler M, Lavi R, Friedman H, Shainberg A. Low-energy laser irradiation promotes cellular redox activity. *Photomed Laser Surg* 2005;23:3-9.
2. Ninomiya T, Hosoya A, Nakamura H, Sano K, Nishisaka T, Ozawa H. Increase of bone volume by a nanosecond pulsed laser irradiation is caused by a decreased osteoclast number and an activated osteoblasts. *Bone* 2007;40:140-8.
3. Ozawa Y, Shimizu N, Kariya G, Abiko Y. Low-energy laser irradiation stimulates bone nodule formation at early stages of cell culture in rat calvarial cells. *Bone* 1998;22:347-54.
4. Khadra M, Ronold HJ, Lyngstadaas SP, Ellingsen JE, Haanaes HR. Low-level laser therapy stimulates bone-implant interaction: an experimental study in rabbits. *Clin Oral Implants Res* 2004;15:325-32.

Effetto della radiazione laser superpulsata sulla formazione di osso in osteoblasti umani in coltura

La terapia con laser superpulsato (emissione oltre i 30000 Hz) a bassi livelli energetici (superpulsed low-level laser therapy, SLLLT) è una nuova metodica che si sta affermando in medicina. È stato dimostrato che la SLLLT può avere effetti in diverse condizioni patologiche, tra cui gli stati dolorosi, la guarigione di ferite e la rigenerazione dei nervi. Gli esperimenti condotti *in vitro*, che hanno studiato i meccanismi che sottostanno agli effetti positivi della SLLLT, hanno evidenziato che l'esposizione alla radiazione laser aumenta il rilascio di TGF- β , e di PDGF dai fibroblasti e induce la formazione di piccole quantità di specie reattive dell'ossigeno in grado di stimolare le funzioni cellulari attraverso l'induzione della produzione di ATP¹.

L'effetto della SLLLT sulla rigenerazione ossea è stato oggetto delle ricerche più recenti, anche in odontoiatria. Gli studi condotti hanno investigato la capacità del laser a bassi livelli energetici (60 joule) di stimolare sia la produzione di nuovo osso, sia l'interazione tra osso e impianto. Per quanto riguarda la produzione di osso, gli esperimenti *in vivo* hanno dimostrato che la radiazione laser superpulsata con un alto picco di potenza aumenta l'attività degli osteoblasti e diminuisce il numero degli osteoclasti². Questi risultati sono stati confermati da studi *in vitro* che hanno evidenziato che il laser superpulsato a bassi livelli energetici può stimolare la proliferazione degli

osteoblasti, la formazione di noduli di calcio e il differenziamento dei precursori degli osteoblasti³. Per quanto riguarda l'interazione osso-impianto, sia gli studi *in vivo* che quelli *in vitro* hanno suggerito che il laser superpulsato a bassi livelli energetici possa migliorare la guarigione dei tessuti e l'integrazione degli impianti, aumentando il successo dell'impianto stesso⁴. Questo studio ha avuto lo scopo di indagare l'effetto della radiazione laser superpulsata sulla proliferazione e sulla formazione di osso nella linea cellulare di osteoblasti umani MG-63.

Materiali e metodi

Irradiazione con laser superpulsato a bassi livelli energetici

Gli osteoblasti umani MG-63 sono stati seminati (10 000/cm²) in terreno MEM contenente L-glutamina 2 mM, 1% (v/v) di una soluzione di antibiotici/antimicotici, piruvato di sodio 1 mM e 10% (v/v) siero bovino fetale (foetal bovine serum, FBS). Ventiquattro ore dopo la semina, le cellule sono state esposte alla radiazione laser superpulsata a bassi livelli energetici sotto la cappa a flusso laminare. È stato utilizzato il laser Lumix 2 HFPL Dental (Fisioline s.n.c., Verduno, Cuneo), con i seguenti parametri sperimentali: 100%

di modulazione, 30 kHz di frequenza, 60 J di energia, e un tempo di esposizione di 5 min. Le cellule sono state esposte alla radiazione laser ogni 24 h per i tempi sperimentali riportati nelle Figure 1, 2.

Proliferazione cellulare

La crescita cellulare è stata valutata contando le cellule presenti nel monostato e nel terreno di coltura utilizzando una camera di Burker, ed espressa come numero di cellule/cm².

Marker dell'attività degli osteoblasti

Le cellule staccate dal monostato sono state esaminate per valutare i parametri dell'attività degli osteoblasti. Il contenuto di RNAm codificante per la fosfatasi alcalina (ALP) e l'osteocalcina è stato valutato con la metodica real-time PCR.

Il cambiamento di espressione (numero di volte) è stato definito come espressione relativa rispetto al tempo 0 (tempo in cui sono state seminate le cellule), calcolato come $2^{-\Delta\Delta Ct}$, dove $\Delta Ct = Ct_{\text{campione}} - Ct_{\text{GAPDH}}$ and $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{campione}} - \Delta Ct_{\text{time 0}}$.

Risultati

La Figura 1 riporta gli effetti della radiazione laser superpulsata a bassi livelli energetici sulla proliferazione delle cellule MG-63. L'incremento del numero delle cellule è evidente nelle cellule trattate con il laser a partire dal secondo giorno e permane anche nei giorni successivi. Non è stata evidenziata induzione di morte cellulare.

La capacità della radiazione laser a bassi livelli energetici di stimolare la produzione di osso è stata valutata determinando l'espressione di alcune proteine coinvolte nella produzione di noduli di calcio: osteocalcina e ALP. La Figura 2 riporta il contenuto relativo di RNAm dell'osteocalcina e dell'ALP determinato a 2 e 3 giorni di trattamento con la radiazione laser a bassi livelli energetici. Sia nelle cellule irradiate che in quelle non irradiate l'osteocalcina aumenta rispetto alle cellule al tempo 0, ma l'aumento è più marcato nelle cellule che hanno subito il trattamento con il laser rispetto a quelle che non l'hanno avuto. Per quanto riguarda l'ALP, i valori sono più alti nelle cellule che sono state irradiate rispetto a quelle che non lo sono state, anche se, dopo 2 giorni di

trattamento, i valori sono più bassi rispetto a quelli delle cellule al tempo 0.

Conclusioni

I risultati preliminari ottenuti in questo studio hanno evidenziato che l'irradiazione ripetuta con il laser superpulsato a bassi livelli energetici stimola la proliferazione cellulare negli osteoblasti umani in coltura e, ancora più importante, aumenta l'espressione di proteine essenziali per la formazione di osso.

Riassunto

Obiettivo. L'effetto della terapia con laser superpulsato a bassi livelli energetici (superpulsed low-level laser therapy, SLLLT) sulla rigenerazione ossea è stato oggetto di recenti ricerche. Questo studio ha lo scopo di indagare l'effetto della radiazione laser superpulsata sulla proliferazione e sulla formazione di osso nella linea cellulare di osteoblasti umani MG-63.

Metodi. Gli osteoblasti umani MG-63 sono stati esposti ogni 24 h alla radiazione laser superpulsata a bassi livelli energetici emessa dall'apparecchio Lumix 2 HFPL Dental (Fisioline s.n.c., Verduno, Cuneo); il protocollo sperimentale prevedeva 4 giorni di trattamento. Per ogni tempo sperimentale sono stati valutati la proliferazione cellulare e alcuni marker dell'attività cellulare, con la metodica della real-time PCR.

Risultati. Nelle cellule trattate con il laser è stato osservato un incremento del numero delle cellule dopo 2 giorni di trattamento. La capacità della radiazione laser superpulsata a bassi livelli energetici di stimolare la produzione di osso è stata valutata determinando l'espressione di osteocalcina e fosfatasi alcalina, proteine coinvolte nella formazione di noduli di calcio. Queste proteine aumentano soprattutto a 3 giorni nelle cellule trattate con il laser.

Conclusioni. I risultati preliminari ottenuti in questo studio hanno evidenziato che l'irradiazione ripetuta con il laser superpulsato a bassi livelli energetici stimola la proliferazione cellulare negli osteoblasti umani in coltura e, ancora più importante, aumenta l'espressione di proteine essenziali per la formazione di osso.

Parole chiave: Laser superpulsato - Osteogenesi - Osteoblasti umani - Osteocalcina - Fosfatasi alcalina.