



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Utilizarea laserului în tratamentul malformațiilor vasculare și al tumorilor benigne orale și maxilo-faciale

Doctorand **Bogdan Vasile Crișan**

Conducător de doctorat **Prof. Dr. Grigore Băciuț**

CLUJ-NAPOCA 2013

CUPRINS

INTRODUCERE	11
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Laserul: principii și funcționare	15
1.1. Componentele unui sistem laser	15
1.2. Modul de funcționare și caracteristicile de emisie ale unui dispozitiv laser	17
1.3. Tipuri de Laser cu aplicații în domeniul medical	18
1.3.1. Dispozitivele laser cu gaz	19
1.3.2. Dispozitivele laser cu diode	21
1.3.3. Dispozitivele laser cu corp solid	22
2. Interacțiunea radiației laser cu țesuturile	25
2.1. Efectele radiației laser asupra țesuturilor	27
2.1.1. Efectul termic al radiației laser	28
2.1.2. Efectul mecanic al radiației laser	30
2.1.3. Efectul fotochimic al radiației laser	30
2.1.4. Efectul fotoablativ al radiației laser	31
3. Utilizarea laserului în chirurgia orală și maxilo-facială	33
3.1. Utilizarea laserului în tratamentul hemangioamelor și malformațiilor vasculare	34
3.2. Utilizarea laserului în tratamentul tumorilor benigne de părți moi orale și maxilo-faciale	35
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
Ipoteza de lucru/obiective	41
4. Studiul 1 - Studiu experimental privind efectele radiației laser asupra fibroblaștilor umani	43
4.1. Introducere	43
4.2. Ipoteza de lucru	43
4.3. Material și metodă	44
4.3.1. Cultura de celule	44
4.3.2. Procedura de iradiere LASER	44
4.3.3. Testul de viabilitate celulară	46
4.4. Rezultate	47
4.5. Discuții	51
4.6. Concluzii	53

5. Studiul 2. Influența diferitelor lungimi de undă laser asupra componentelor nanostructurale din fibroblaștii umani	55
5.1. Introducere	55
5.2. Ipoteza de lucru	56
5.3. Material și metodă	56
5.3.1. Cultura de celule	56
5.3.2. Procedura de iradiere cu laser	57
5.3.3. Testul de viabilitate celulară	59
5.4. Rezultate	60
5.5. Discuții	67
5.6. Concluzii	69
6. Studiul 3- Influența a trei lungimi de undă laser asupra fibroblaștilor umani din culturile celulare	71
6.1. Introducere	71
6.2. Ipoteza de lucru	71
6.3. Material și metodă	72
6.3.1. Cultura de celule	72
6.3.2. Procedura de iradiere laser	72
6.3.3. Testul de viabilității celulare (Testul MTT)	73
6.3.4. Testul de apoptoză	73
6.4. Rezultate	74
6.5. Discuții	77
6.6. Concluzii	80
7. Studiul 4. Tratamentul laser al hemangioamelor și malformațiilor vasculare orale și maxilo-faciale	81
7.1. Introducere	81
7.2. Ipoteza de lucru	81
7.3. Material și metodă	82
7.3.1. Procedura de laser terapie	84
7.3.2. Procedura de scleroterapie	85
7.3.3. Procedura de excizie chirurgicală asistată laser	86
7.3.4. Procedura de excizie chirurgicală clasică	87
7.4. Rezultate	88
7.5. Discuții	92
7.6. Concluzii	93

8. Studiul 5. Tratatamentul tumorilor benigne de părți moi orale utilizând laserul	95
8.1. Introducere	95
8.2. Ipoteza de lucru	95
8.3. Material și metodă	95
8.3.1. Procedura de tratament chirurgical laser	98
8.3.2. Procedura de excizie chirurgicală clasică	99
8.4. Rezultate	103
8.5. Discuții	107
8.6. Concluzii	110
9. Concluzii generale	111
10. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	113
REFERINȚE	115
ANEXE	125

CUVINTE-CHEIE: laser terapie, malformații vasculare, hemangioame, tumori benigne, fibroblaști, proliferare, inhibiție, nanoparticule, apoptoză, fotocoagulare, laser terapie de putere mică.

INTRODUCERE

Utilizarea luminii și a radiației luminoase pentru tratarea diferitelor afecțiuni a fost folosită încă din cele mai vechi timpuri de către egipteni, datorită proprietăților benefice ale acesteia. Energia transportată și eliberată de către fotoni spre țesuturi și celule are ca rezultat o intensificare a metabolismului acestora, o creștere a ratei de diviziune celulară și o stimulare a regenerării tisulare.

Malformațiile vasculare și tumorile vasculare de tipul hemangioamelor reprezintă o patologie care apare tot mai frecvent în rândul populației încă de la o vârstă fragedă. Aceste leziuni vasculare sunt prezente în diferite regiuni la nivelul organismului, dar cele cu localizare orală și maxilo-facială afectează pacientul atât din punct de vedere estetic cât și funcțional. De asemenea tumorile benigne de părți moi din sfera orală și maxilo-facială implică o afectare psihologică importantă datorită modificărilor morfologice, funcționale și estetice pe care pacienții le percep în mod deosebit, în momentul apariției acestora. Utilizarea radiației laser la nivelul țesuturilor moi a reprezentat un prim domeniu de aplicare clinică a laserului în chirurgia orală și maxilo-facială din țara noastră. Pentru a putea dezvolta aplicațiile laserului în cadrul patologiilor enumerate anterior, cercetările noastre trebuiau să se bazeze pe înțelegerea efectelor diferitelor lungimi de undă și a celorlalți parametri ai laserului, la nivelul celulelor și țesuturilor.

Luând în considerare aceste aspecte, lucrarea de față își propune să elaboreze scheme de tratament complexe în abordarea acestor afecțiuni. Aceste scheme terapeutice inovative urmăresc să includă atât etapele clinice cât și cele paraclinice, de la stabilirea diagnosticului până la realizarea diferitelor proceduri de tratament chirurgical laser asistat. Rezultatele cercetărilor noastre au urmărit să evidențieze rolul laserului în tratamentul leziunilor vasculare de tipul hemangioamelor sau malformațiilor vasculare și respectiv a formațiunilor tumorale benigne de părți moi cu localizare orală. Identificarea parametrilor optimi de iradiere în vederea obținerii unui efect maxim în cadrul laser terapiei s-a materializat prin trei studii in vitro pe culturi celulare de fibroblaști umani. Rezultatele acestor studii au fost validate prin analiză statistică și prin publicarea lor în reviste cotate ISI cu factor de impact. Studiile clinice realizate pe parcursul mai multor ani, au urmărit să identifice efectele benefice ale laser terapiei comparativ cu metodele clasice de tratament a acestor patologii. Rezultatele preliminare ale studiilor clinice efectuate au fost de asemenea publicate în reviste din fluxul internațional de publicații.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Ipoteza de lucru/obiective

Utilizarea laserului în tratamentul leziunilor vasculare și al tumorilor benigne de părți moi orale și maxilo-faciale a reprezentat o temă de interes pentru cercetători de-a lungul timpului^{i ii iii iv v}. Folosirea unor lungimi de undă laser diferite și observarea efectelor produse de acestea la nivelul țesuturilor țintă a reprezentat o provocare în cadrul diferitelor grupuri de cercetare. Identificarea mecanismelor și a modificărilor pe care le produce radiația laser la nivelul celulelor vii au preocupat în mod continuu pe oamenii de știință^{vi vii}. În contextul acestor teme de cercetare am urmărit să evidențiem efectele benefice ale laserului în patologia leziunilor vasculare de tipul hemangioamelor sau malformațiilor vasculare și respectiv a formațiunilor tumorale benigne de părți moi cu localizare orală.

Pe baza observațiilor clinice care au arătat o mai bună vindecare a leziunilor vasculare și a zonelor de excizie a formațiunilor tumorale în urma tratamentului cu laser am încercat să identificăm avantajele acestui tip de tratament comparativ cu alte metode terapeutice.

Prin realizarea unor studii in vitro am urmărit să identificăm parametrii optimi de iradiere cu o lungime de undă laser specifică a fibroblaștilor din culturile celulare în vederea obținerii unui efect maxim de proliferarea a acestora. De asemenea am urmărit modificarea activității mitocondriale și a gradului de afectare celulară în cazul utilizării unor lungimi de undă laser diferite. Tot în cadrul studiilor in vitro am evaluat și influența radiațiilor laser cu trei lungimi de undă diferite asupra proliferării sau apoptozei fibroblaștilor umani implicați în procesele de vindecare și regenerare tisulară.

Studiile clinice realizate au urmărit să evidențieze efectele benefice ale laser terapiei în tratamentul hemangioamelor și malformațiilor vasculare comparativ cu tratamentele prin scleroterapie sau excizie chirurgicală, iar în cazul tumorilor benigne de părți moi orale să demonstreze eficacitatea exciziei chirurgicale asistate laser față de excizia chirurgicală clasică cu bisturiul.

Efectele iradierii laser asupra proliferării culturilor de fibroblaști umani

Ipoteza de lucru

Scopul acestui studiu a fost de a urmări efectul radiației laser din spectrul infraroșu apropiat cu lungimea de undă de 830 nm asupra proliferării fibroblaștilor din culturile celulare. În principal studiul a urmărit care sunt parametrii laser ce produc cea mai mare rată de proliferare a fibroblașilor în cazul lungimii de undă folosite^{viii}.

Material și metodă

Cultura de celule

În acest studiu s-a utilizat o linie celulară de fibroblaști umani Hfl (human fibroblast lung).

Procedura de iradiere LASER

Pentru iradiere s-a utilizat un dispozitiv laser de tip BTL-10 cu semiconductori (Beautyline, Ltd, Prague, Czech Republic) cu lungimea de undă de 830 nm și cu o piesă de mână cu emisie convergentă a radiației. Iradierea s-a realizat atât în modul de lucru continuu (0 Hz) cât și în modul pulsant la frecvențele de 5, 50, 500, 5000 Hz. Densitatea de energie folosită a fost de 2, 4, 8, 16, 32 și 64 J/cm² iar puterea emisă a variat între 20 și 100 mW. Suprafața de iradiere a fost de 0,40 cm² cât reprezintă aria unui godeu, iar distanța de iradiere de 1,1 cm cât reprezintă înălțimea godeului. Piesa de mână a laserului a fost fixată pe un dispozitiv fix la distanță egală de 1,1 cm de baza godeului, venind în contact cu marginea godeului. Iradierea laser s-a realizat într-o singură ședință pentru toate cele trei plăci de cultură, la densitățile de energie și frecvențele stabilite conform protocolului de lucru, fiecare placă de cultură conținând 60 de godeuri cu suspensie celulară.

Testul de viabilitate celulară

Determinarea activității de proliferare celulară la nivelul fibroblaștilor iradiați laser a fost realizată utilizând testul MTT. Plăcile de cultură numerotate de la 1 la 3 au fost supuse testului MTT la 24, 48 și respectiv 72 de ore de la procedura de iradiere laser. Rezultatele măsurătorilor testului MTT au fost analizate statistic.

Rezultate

Astfel la 24 de ore după iradiere s-a obținut o stimulare a creșterii numărului de celule la o densitate a energiei de 2 J/cm² în modul de lucru pulsant și o frecvență de 5 Hz, de asemenea s-a obținut stimularea creșterii numărului de fibroblaști și la o densitate a energiei de 4 J/cm² și o frecvență de 5 Hz în mod pulsant.

În urma analizelor efectuate la 48 de ore după iradierea laser s-a obținut o creștere semnificativă a numărului de fibroblaști în cazul godeurilor iradiate laser cu o densitate a energiei de 8 J/cm² și respectiv 32 J/cm² și cu o frecvență de 50 Hz în modul pulsant.

La 72 de ore după iradierea laser s-au obținut creșteri ale numărului de fibroblaști în cazul iradierii la densități ale energiei de 8 J/cm², 16 J/cm² și 32 J/cm² și cu o frecvență de 5 Hz în mod pulsant.

În cazul iradierii laser a fibroblaștilor de la nivelul godeurilor cu o densitate de energie de 64 J/cm², s-a constatat că nu există o diferență semnificativă între populațiile celulare iradiate și cele neiradiate. La această densitate de energie proliferarea celulară nu a fost cu mult mai mare la grupurile iradiate față de grupul de control.

Analiza microscopică a suspensiei de fibroblaști de la nivelul godeurilor, imediat după iradierea laser și la 24 de ore după incubare arată o creștere a numărului de celule.

Influența diferitelor lungimi de undă laser asupra componentelor nanostructurale din fibroblaștii umani

Ipoteza de lucru

Scopul acestui studiu a fost de a evalua influența diferitelor lungimi de undă laser asupra nanoparticulelor componente de la nivelul fibroblaștilor umani proveniți din tumorile orale.

Am dorit de asemenea să evaluăm dacă laserele cu lungimi de undă din spectrul infraroșu și respectiv infraroșu apropiat produc distrucții la nivelul structurilor celulare ale fibroblaștilor, cum ar fi complexul mitocondrial al acestora.

Studiul a urmărit de asemenea să găsească care sunt cele mai adecvate lungimi de undă și respectiv parametrii laser cei mai utili în tratamentul tumorilor cu componentă predominant fibroblastică de la nivel oral ^{ix}.

Material și metodă

Cultura de celule

În cadrul acestui studiu s-a utilizat o linie celulară de fibroblaști umani de proveniență orală.

Procedura de iradiere cu laser

Pentru primele trei serii de tuburi s-a folosit pentru iradiere un dispozitiv laser cu semiconductor (model BTL-10 Beautyline, Ltd., Prague, Czech Republic) care emite o radiație convergentă cu lungimea de undă de 830 nm. Primul tub din fiecare serie a fost păstrat ca și control iar restul tuburilor au fost iradiate laser. Iradierea s-a realizat

în modul pulsant la frecvențe de 5 Hz și 50 Hz, iar densitățile de energie folosite au fost de 4,4 J/cm² și respectiv 8,8 J/cm².

În următoarele trei serii de tuburi s-a utilizat un laser cu diode (model Ceralas D15, Ceramoptec, Jena, Germany) cu Galiu-Aluminiu-Arsen (Ga-Al-As) și lungimea de undă de 980 nm. În acest caz procedura de iradiere laser a fost realizată în modul continuu și la o densitate a energiei de 2,15 J/cm², iar în modul pulsant la o densitate a energiei de 1,15 J/cm².

Ultimele trei serii de tuburi au iradiate de un laser Erbium: Yttrium-Aluminium-Garnet (Er:YAG) (Fotona, Ljubljana, Slovenia) cu lungimea de undă de 2940 nm. Parametrii laser folosiți pentru iradiere au fost: energie de 250 mJ, mod SP (short-pulsed) și LP (long-pulsed), frecvență de 6 Hz și 12 Hz.

Testul de viabilitate celulară

Activitatea mitocondrială a celulelor fibroblastice orale a fost analizată utilizând testul MTT. Rezultatele măsurătorilor efectuate cu testul MTT au fost analizate statistic și prezentate ca și coloane. Testul Dunnett's Multiple Comparison a fost utilizat pentru a compara suspensiile de celule iradiate cu cele neiradiate.

Rezultate

În cazul lungimii de undă de 830 nm la 24 de ore după incubație, nu au existat diferențe în ceea ce privește viabilitatea celulară, între suspensiile de celule iradiate și cele neiradiate. În timp ce la 48 de ore și 72 de ore după iradiere diferențele au fost mult mai semnificative. Activitatea mitocondrială a fibroblaștilor a crescut în cazul iradierii cu densitățile de energie de 4,4 J/cm² și respectiv 8,8 J/cm². Rezultatele testului MTT au fost semnificative statistic ($p < 0,05$). Iradierea în modul pulsant la frecvențele de 5 Hz sau 50 Hz a produs o proliferare mai intensă a fibroblaștilor la 72 de ore în comparație cu grupul de control.

Iradierea cu lungimea de undă de 980 nm a produs distrucție celulară mult mai intens în modul de lucru continuu decât în modul de lucru pulsant. La 24, 48 și 72 de ore de la procedură inhibarea activității mitocondriale, chiar distrugerea celulelor din suspensie a fost mult mai mare în cazul populațiilor iradiate față de celulele neiradiate ($p < 0,05$). În toate suspensiile de celule fibroblastice radiația laser continuă a fost mult mai distructivă decât cea pulsantă, chiar și în cazul folosirii aceleiași densități de putere.

Lungimea de undă laser de 2940 nm nu a produs diferențe semnificative în ceea ce privește activitatea mitocondrială între grupul de control și celulele iradiate la 24 și 48 de ore. În schimb o importantă afectare a celulelor fibroblastice iradiate cu energia de 250 mJ, în modurile SP și LP, la frecvența de 12 Hz a fost obținută doar la 72 de ore post procedură, față de grupul de control ($p < 0,05$).

Evaluarea microscopică a fibroblaștilor umani din culturile celulare efectuată înainte și după procedura de iradiere laser, cât și după perioadele de incubație de 24, 48 și 72 de ore, la o mărire de 200 x, a confirmat rezultatele statistice.

Influența a trei lungimi de undă laser asupra fibroblaștilor umani din culturile celulare

Ipoteza de lucru

Scopul acestui studiu a fost de a evalua influența a trei lungimi de undă laser asupra culturii de fibroblaști umani proveniți de la nivelul pielii ^x.

Material și metodă

Cultura de celule

În acest studiu s-a utilizat o linie de celule HF's (human fibroblast skin), fibroblaști umani proveniți de la nivelul pielii.

Procedura de iradiere laser

Grupul A: acest grup a fost iradiat folosind un dispozitiv laser cu semiconductori de tip BTL-10 (10 Beautyline, Ltd., Prague, Czech Republic), ce emite o radiație convergentă de 830 nm.

Grupul B: în cadrul acestui grup s-a utilizat un dispozitiv laser cu diode tip Ceralas D15 (Ceramoptec, Jena, Germany) ce emite o lungime de undă de 980 nm.

Grupul C: în cazul acestui grup dispozitivul utilizat a fost un laser Er:YAG (Fotona, Ljubljana, Slovenia) cu o lungime de undă de 2940 nm.

Testul de viabilității celulare (Testul MTT)

După procedura de iradiere laser suspensiile de celule fibroblastice au fost supuse protocolului de pregătire în vederea efectuării testului MTT.

Testul de apoptoză

Simultan a fost realizat și un test de apoptoză a fibroblaștilor iradiati laser. Răspunsul celulelor apoptotice a fost examinat printr-o dublă metodă de colorare utilizând chitid de detecție al apoptozei cu V-Annexin FITC/Propidium iodide (PI) (BD Bioscience, San Jose, California, USA), conform cu instrucțiunile producătorului.

Rezultate

La 24 de ore după iradierea laser, analiza statistică a rezultatelor testului MTT a arătat că în Grupul A iradiat cu lungimea de undă de 830 nm, activitatea mitocondrială a fost semnificativ crescută în comparație cu Grupul de Control neiradiat laser ($p < 0,05$). În cazul Grupului B iradiat cu lungimea de undă de 980 nm, funcția mitocondrială a crescut în comparație cu Grupul de Control, dar mult mai puțin față de Grupul A. Pentru Grupul C iradiat cu lungimea de undă de 2940 nm rezultatele au arătat o scădere a funcției mitocondriale comparativ cu Grupul de Control.

La 48 de ore după procedura de iradiere laser, rezultatele testului MTT au fost similare cu cele obținute la 24 de ore. O creștere a activității mitocondriale semnificativă statistic ($p < 0,05$) a fost înregistrată atât în cazul Grupului A cât și al Grupului B, în comparație cu Grupul de Control. În Grupul C lungimea de undă de 2940 nm a produs o inhibiție a activității mitocondriale și chiar distrugerea celulelor din

suspensie, care a fost semnificativ mai crescută la populațiile tratate laser față de celulele din grupul neiradiat ($p < 0,05$).

În analizele datelor obținute la 72 de ore, în ceea ce privește activitatea mitocondrială, nu există diferențe între Grupul A și Grupul B. O creștere a funcției mitocondriale în celulele fibroblastice a fost observată atât la lungimea de undă de 830 nm cât și la cea de 980 nm, comparativ cu celulele din Grupul de Control. Rezultatele fiind semnificative statistic ($p < 0,05$). În Grupul C la 72 de ore s-a obținut o importantă inhibiție a funcției mitocondriale în celulele iradiate cu lungimea de undă de 2940 nm.

Pentru testul de apoptoză, a fost realizată și o evaluare microscopică a celulelor din culturile de fibroblaști umani proveniți de la nivelul pielii, la o mărire de 400x, care a confirmat analiza statistică a rezultatelor testului MTT.

Tratamentul laser al hemangioamelor și malformațiilor vasculare orale și maxilo-faciale

Ipoteza de lucru

Scopul acestui studiu a fost de a evalua eficacitatea fotocoagulării realizată cu ajutorul laserului cu diode (Ga-Al-As) de 980 nm în tratamentul leziunilor vasculare cu localizare orală și maxilo-facială, utilizând ultrasonografia color-Doppler pre și post operatorie pentru interpretarea rezultatelor ^{xi xii xiii xiv}.

De asemenea am realizat și o comparație între diferitele metode de tratament: terapie laser, scleroterapie, excizia chirurgicală asistată laser și excizia chirurgicală clasică, în vederea stabilirii unor protocoale și recomandări terapeutice asociate acestei patologii.

Material și metodă

Am realizat un studiu clinic controlat pe un grup de 92 de pacienți (38 de sex masculin și 54 de sex feminin, cu o medie de vârstă de 36 de ani) ce prezentau hemangioame și malformații vasculare cu flux scăzut localizate la nivel oral și maxilo-facial. Toate leziunile vasculare tratate au fost localizate în regiuni cu semnificație estetică și funcțională mare pentru pacient. Am utilizat ultrasonografia color-Doppler pentru stabilirea unui diagnostic de acuratețe. Pacienții din cadrul acestui studiu clinic au beneficiat de una din modalitățile de tratament a leziunilor vasculare de tipul hemangioamelor sau malformațiilor vasculare: laser terapie, scleroterapie, excizie chirurgicală asistată laser sau excizie chirurgicală clasică.

Procedura de laser terapie

Pentru tratamentul hemangioamelor și malformațiilor vasculare cu flux scăzut am utilizat un dispozitiv laser cu diode (Ga-Al-As) de 980 nm (model Ceralas D15, Ceramoptec, Jena, Germany). Parametrii laser folosiți în timpul procedurii au fost: modul de lucru continuu (cw), la o putere cuprinsă între 9 W și 11 W, iar energia transmisă țesuturilor a fost în medie de 1000 J pe unitatea de suprafață (cm²).

Procedura de scleroterapie

Pentru procedura de scleroterapie s-au utilizat diferiți agenți sclerozanți ce au fost injectați direct la nivelul formațiunilor vasculare în vederea sclerozării vaselor de sânge ce asigurau perfuzia acestora.

Procedura de excizie chirurgicală asistată laser

Excizia chirurgicală asistată laser a leziunilor vasculare din sfera orală și maxilo-facială a constat în vaporizarea acestora sau îndepărtarea lor cu ajutorul laserului. Pentru realizarea acestor proceduri s-au utilizat un laser cu diode (Ga-Al-As) de 980 nm (model Ceralas D15, Ceramoptec, Jena, Germany) și respectiv un laser de tip Er:YAG (Fotona, Ljubljana, Slovenia) cu o lungime de undă de 2940 nm.

Procedura de excizie chirurgicală clasică

Intervențiile de excizie chirurgicală clasică a formațiunilor vasculare au constat în îndepărtarea acestora cu bisturiul, după prealabila ligatură sau cauterizare cu ajutorul electrocauterului sau radiofrecvenței a vaselor de sânge care asigurau aportul la nivelul acestora.

În urma procedurilor efectuate la pacienții luați în studiu am realizat o analiză comparativă între laser terapie și scleroterapie, respectiv între excizia chirurgicală asistată laser și cea clasică.

În cazul procedurilor de excizie chirurgicală asistată laser și excizie chirurgicală clasică am realizat o analiză comparativă în ceea ce privește vindecarea postoperatorie și apariția eventualelor complicații sau recidive locale. Confortul pacienților legat de procedura terapeutică utilizată cât și aspectul estetic rezultat au fost de asemenea documentate în toate fazele de tratament. Evaluarea pacienților luați în studiu a fost realizată și la 6 luni, respectiv 12 luni după finalizarea tratamentului.

Rezultate

În urma laser terapiei am obținut o reducere în dimensiuni a hemangioamelor sau malformațiilor vasculare la toți pacienții ce au beneficiat de o astfel de procedură, iar rezultatele estetice au fost favorabile, leziunile rămânând vizibile doar la 9 cazuri (20,45%) din totalul cazurilor tratate prin laser terapie. Regresia în suprafață a leziunilor și reducerea semnalului vascular măsurate ultrasonografic au variat între 45% și 95%. Nu s-au constatat reperfuzii sau recanalizări vasculare la nivelul leziunilor tratate laser după o perioadă medie de control de 6 până la 12 luni. Fotocoagularea laser a fost bine tolerată de către toți pacienții fără a fi prezente reacții adverse intra sau postoperatorii. Toți pacienții au prezentat o vindecare poschirurgicală favorabilă fără afectare funcțională la nivelul ariei tratate.

În cazul scleroterapiei s-a obținut de asemenea o reducere a dimensiunii leziunilor vasculare într-o proporție ce a variat între 23% și 72%. Din punct de vedere estetic leziunile au rămas vizibile la 5 cazuri (35,71%) dintre cele tratate prin scleroterapie.

Rezultatele obținute în urma exciziilor chirurgicale asistate laser și exciziilor chirurgicale clasice au arătat o evoluție favorabilă a pacienților imediat postoperator. Vindecarea la nivelul zonelor de excizie s-a realizat fără apariția unor cicatrici inestetice sau a unor afectări funcționale a ariilor tratate, cu excepția unui caz la care s-a practicat excizie chirurgicală clasică și la care formațiunea vasculară a rămas vizibilă din punct de vedere estetic.

Tratamentul tumorilor benigne de părți moi orale utilizând laserul

Ipoteza de lucru

Studiul de față și-a propus să evalueze eficacitatea, indicațiile și aplicațiile laserului chirurgical și laser terapiei de putere mică (Low-Level Laser Therapy- LLLT) în tratamentul tumorilor benigne de părți moi orale, comparativ cu intervenția chirurgicală clasică a acestor tumori. De asemenea s-a urmărit și gradul de satisfacție al pacienților în urma terapiei cu laser față de terapia clasică ^{xv}.

Material și metodă

Studiul clinic realizat a fost unul de tip controlat pe un grup de 93 de pacienți cu vârsta cuprinsă între 0 și 90 de ani (34 de sex masculin și 59 de sex feminin, cu o medie de vârstă de 52 de ani), din cadrul pacienților tratați în Clinica de Chirurgie Cranio-Maxilo-facială Cluj-Napoca, în perioada 2005 – 2008 și care prezentau forme variate de formațiuni tumorale benigne de părți moi orale.

La subiecții luați în studiu au fost examinate pre și postoperator formațiunile tumorale benigne. Aceste formațiuni tumorale au fost măsurate liniar, fotografiate, iar aceste date au fost înregistrate în formularul raportului de caz.

Pacienții luați în studiu care au corespuns din punct de vedere al criteriilor de includere au beneficiat fie de tratament chirurgical laser sau de tratamentul chirurgical clasic.

Procedura de tratament chirurgical laser

Intervențiile chirurgicale de excizie-biopsie asistate laser a formațiunilor tumorale benigne de la nivel oral au fost realizate utilizând un dispozitiv laser cu diode (Ga-Al-As) de 980 nm (model Ceralas D15, Ceramoptec, Jena, Germany) sau un laser Er:YAG (Fotona, Ljubljana, Slovenia) cu o lungime de undă de 2940 nm. Parametrii laser folosiți în timpul intervenției chirurgicale au fost: pentru laserul cu diode modul de lucru continuu (cw), la o putere cuprinsă între 6 W și 8 W, iar energia transmisă a variat în funcție de dimensiunile formațiunilor tumorale. În cazul laserului Er:YAG parametrii de iradiere au fost modul de lucru LP sau VLP, energia de 200 – 250 mJ, frecvența de 10-20 Hz, iar timpul de iradiere pentru ambele tipuri de laser a variat în funcție de situațiile clinice specifice fiecărui caz tratat.

Procedura de excizie chirurgicală clasică

Intervențiile de excizie-biopsie clasică a formațiunilor tumorale benigne au constat în îndepărtarea acestora cu ajutorul bisturiului.

Postoperator la subiecții luați în studiu au fost analizate suprafețele de excizie ale zonelor afectate în funcție de situația clinică. Aceste suprafețe au fost măsurate liniar, fotografiate, iar datele obținute au fost consemnate de asemenea în formularul raportului de caz.

Postoperator a fost realizată și o evaluare subiectivă a evoluției, funcționalității și complicațiilor postoperatorii prin completarea de către pacienți a unei fișe de evaluare postoperatorie.

Rezultate

Rezultatele examinărilor histopatologice au arătat prezența la nivelul părților moi orale a unor variate forme de formațiuni tumorale benigne de tipul: polipului fibroepitelial (13,98%), hiperplaziei pseudoepiteliomatoase (11,83%), epulisului fisuratum (9,68%) și granuloamelor periferice cu celule gigante (9,68%).

La pacienții la care s-au aplicat doze terapeutice de laser pentru biostimularea zonei operate s-a observat clinic o epitelizare mult mai rapidă a patului tumoral în primele zile postoperator prin formarea unor depozite de fibrină la nivelul zonelor de excizie.

La două săptămâni după tratamentul laser chirurgical, s-a observat o bună vindecare fără cicatrici sau disconfort la nivelul zonei de excizie în cazul grupului de pacienți ce au beneficiat de intervenție chirurgicală asistată laser, comparativ cu pacienții ce au beneficiat de tratament chirurgical clasic care au avut neplăceri din cauza sângerării, a durerii și disconfortului funcțional la nivelul zonei operate.

Evoluția postoperatorie din punct de vedere al pacienților care au fost tratați cu laser a fost favorabilă. La pacienții la care s-a optat pentru o intervenție chirurgicală clasică, evoluția postoperatorie imediată a fost în majoritatea cazurilor una favorabilă.

Complicațiile cele mai frecvente în cazul tratamentului chirurgical clasic au fost reprezentate de hemoragia postoperatorie imediată și tardivă, urmată de durerea postoperatorie moderată și de edemul postoperator.

Concluzii generale

Radiația laser pulsată s-a dovedit a fi mult mai eficientă în stimularea proliferării fibroblaștilor decât radiația continuă. Stimularea fibroblaștilor de către radiația laser cu lungime de undă specifică de 830 de nm a variat în funcție de doza de iradiere și de modul de lucru folosit.

Lungimea de undă de 980 nm a produs un efect inhibitor asupra activității mitocondriale a fibroblaștilor, când a fost utilizată în modul de lucru continuu. În timp

ce lungimea de undă de 2940 nm a produs o inhibiție și chiar un efect distructiv asupra celulelor fibroblastice.

Lungimile de undă laser de 830 nm și 980 nm în modul pulsant și cu o densitate de energie scăzută au produs o creștere a activității mitocondriale și o apoptoză similară la nivelul celulelor fibroblastice umane iradiate.

Laserul cu diode de 980 nm s-a dovedit un instrument eficient în tratamentul hemangioamelor și malformațiilor vasculare din sfera orală și maxilo-facială.

În tratamentul leziunilor vasculare terapia laser a reprezentat o procedură mai eficientă decât scleroterapia.

Datorită complicațiilor și recidivelor locale excizia chirurgicală clasică s-a dovedit o procedură mai puțin sigură decât excizia asistată laser a leziunilor vasculare.

Tratamentul chirurgical realizat cu ajutorul laserului în cazul formațiunilor tumorale benigne de părți moi orale s-a dovedit a fi mai eficient decât tratamentul clasic cu bisturiul, atât din punct de vedere al confortului intra și postoperator, cât și din punct de vedere al satisfacției pacienților.



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

PhD THESIS SUMMARY

Using laser in the treatment of oral and maxillofacial vascular malformations and benign tumors

PhD Student **Bogdan Vasile Crișan**

PhD Scientific Coordinator **Prof. Dr. Grigore Băciuț**

CLUJ-NAPOCA 2013

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	11
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	
1. Laser: principles and operation	15
1.1. Components of a laser system	15
1.2. Method of operation and features in the emission of a laser device	17
1.3. Types of laser with applications in medicine	18
1.3.1. Gas laser devices	19
1.3.2. Diode laser devices	21
1.3.3. Solid state laser devices	22
2. Interaction of laser radiation with tissue	25
2.1. Effects of laser radiation on tissue	27
2.1.1. The thermal effect of laser radiation	28
2.1.2. The mechanical effect of laser radiation	30
2.1.3. Photochemical effect of laser radiation	30
2.1.4. The photoablation effect of laser radiation	31
3. Using the laser in oral and maxillofacial surgery	33
3.1. Using the laser in the treatment of hemangiomas and vascular malformations	34
3.2. The use of laser in the treatment of oral and maxillofacial soft tissue benign tumors	35
PERSONAL CONTRIBUTION	
Working hypothesis / objectives	41
4. Study 1 - Experimental study on the effects of laser radiation on human fibroblasts	43
4.1. Introduction	43
4.2. Working hypothesis	43
4.3. Materials and methods	44
4.3.1. Cell culture	44
4.3.2. Laser irradiation procedure	44
4.3.3. Cell viability assay	46
4.4. Results	47
4.5. Discussion	51
4.6. Conclusions	53

5. Study 2 - Influence of different laser wavelengths on nanostructure components of human fibroblasts	55
5.1. Introduction	55
5.2. Working hypothesis	56
5.3. Materials and methods	56
5.3.1. Cell culture	56
5.3.2. Laser irradiation procedure	57
5.3.3. Cell viability assay	59
5.4. Results	60
5.5. Discussion	67
5.6. Conclusions	69
6. Study 3- Influence of three laser wavelengths on human fibroblast cell culture	71
6.1. Introduction	71
6.2. Working hypothesis	71
6.3. Materials and methods	72
6.3.1. Cell culture	72
6.3.2. Laser irradiation procedure	72
6.3.3. Cell viability assay (MTT assay)	73
6.3.4. Apoptosis assay	73
6.4. Results	74
6.5. Discussion	77
6.6. Conclusions	80
7. Study 4 - Laser treatment of oral and maxillofacial hemangiomas and vascular malformations	81
7.1. Introduction	81
7.2. Working hypothesis	81
7.3. Materials and methods	82
7.3.1. Laser therapy procedure	84
7.3.2. Sclerotherapy procedure	85
7.3.3. Laser assisted surgical excision procedure	86
7.3.4. Conventional surgical excision procedure	87
7.4. Results	88
7.5. Discussion	92
7.6. Conclusions	93

8. Study 5 - Treatment of oral soft tissues benign tumors using laser	95
8.1. Introduction	95
8.2. Working hypothesis	95
8.3. Materials and methods	95
8.3.1. Laser surgery procedure	98
8.3.2. Conventional surgical excision procedure	99
8.4. Results	103
8.5. Discussion	107
8.6. Conclusions	110
9. Overall Conclusions of the Thesis	111
10. Originality and Innovative Input of the Thesis	113
REFERENCES	115
ANNEXES	125

KEYWORDS: laser, vascular malformations, hemangiomas, benign tumors, fibroblasts, proliferation, inhibition, nanoparticles, apoptosis, photocoagulation, low level laser therapy.

INTRODUCTION

Using light and illuminated for treating various diseases has been used since ancient times by the Egyptians because of its beneficial properties. The energy carried by the photons, and released to the tissues and cells results in an increase of their metabolism, an increase in the rate of cell division and a stimulation of tissue regeneration.

Vascular malformations and vascular tumors such as hemangiomas is a pathology that occurs more frequently among people from a very early age. These vascular lesions are present in different regions of the body, but those with oral and maxillofacial localization affect the patient both aesthetically and functionally. The benign tumors of the soft tissues of the oral and maxillofacial area involve a significant psychological harm due to morphological, functional and aesthetic changes, that patients perceive particularly at the time of their occurrence. Use of laser radiation in the soft tissues was one of the first areas in which the laser is used in oral and maxillofacial surgery in our country. To develop laser applications in pathologies listed above, our research should be based on understanding the effects of different wavelengths and other parameters of the laser, on the cells and tissues.

Considering these issues, this paper aims to develop complex treatment regimens in addressing these pathologies. The innovative regimens intended to include both the clinical and laboratory stages from diagnosis to achieve different laser assisted surgery procedures. The results of our research aimed to highlight the role of the laser in the treatment of vascular lesions such as hemangiomas or vascular malformations and oral soft tissue benign tumors. Identifying optimal irradiation parameters to achieve a maximum effect in laser therapy has resulted in three in vitro studies on cell cultures of human fibroblasts. The results of these studies were validated by statistical analysis and publication in ISI journals with impact factor. Clinical trials conducted over a number of years have sought to identify the beneficial effects of laser therapy compared to conventional methods of treatment of these pathologies. Preliminary results of clinical trials have also been published in the international publications.

PERSONAL CONTRIBUTION

Working hypothesis / objectives

Using laser to treat oral and maxillofacial vascular lesions and benign tumors of the soft tissues has been a topic of interest for researchers over time ^{i, ii, iii, iv, v}. The use of different laser wavelengths and observing the effects of these on targeted tissues has been a challenge in various research groups. Identifying mechanisms and changes that occur in the living cell produced by laser continuously preoccupied scientists ^{vi, vii}. In the context of these research topics we have sought to highlight the benefits of laser in the pathology of vascular lesions such as hemangiomas or vascular malformations and oral soft tissue benign tumors.

Based on clinical observations that showed better healing of vascular lesions and areas of excision of the tumor after laser treatment we tried to identify the advantages of this type of treatment compared with other therapeutic methods.

By carrying out in vitro studies we have sought to identify the optimum irradiation with a specific laser wavelength on fibroblast cell culture in order to obtain a maximum effect of their proliferation. We also studied the modification of mitochondrial activity and the degree of cell injury with the use of different laser wavelengths. Also in vitro studies we have evaluated the influence of laser radiation with three different wavelengths on human fibroblast proliferation or apoptosis processes involved in healing and tissue regeneration.

In the clinical trials we have sought to highlight the benefits of laser therapy in the treatment of hemangiomas and vascular malformations compared with sclerotherapy treatments or surgical excision, and in the oral soft tissues benign tumors we tried to demonstrate the effectiveness of laser assisted surgical excision to conventional surgical excision with a scalpel.

Effects of laser irradiation on human fibroblasts cell culture proliferation

Working hypothesis

The aim of this study was to assess the effect of near infrared laser radiation with a wavelength of 830 nm on the proliferation of fibroblasts in cell culture. The main objectives of the study are to assess the laser parameters that produce the highest rate of proliferation of fibroblasts in case of the wavelength used ^{viii}.

Materials and methods

Cell Culture

The cells of a Hfl (human fibroblast lung) cell line were used in this study.

Laser Irradiation Procedure

For irradiation there has been used a semiconductor laser type BTL-10 (Beautyline, Ltd., Prague, Czech Republic) with a wavelength of 830 nm and a hand piece with a convergent radiation emission. The irradiation was carried out both in continuous mode (0 Hz) and pulsed mode at frequencies of 5, 50, 500, 5000 Hz. The energy density used was 2, 4, 8, 16, 32 and 64 J/cm² and power output was between 20 and 100 mW. Irradiation surface was 0.40 cm² as are the area of a well, and the irradiation distance of 1.1 cm as height of a well. Laser handpiece has been fixed at equal distance of 1.1 cm from the base of a well, coming into contact with the edge of the well. Laser irradiation was performed in a single session for all three culture plates at the density of energy and frequency determined in accordance with this protocol, each culture plate containing 60 wells cell suspension.

Cell viability assay

Determination of cellular proliferation fibroblasts irradiated with laser, was carried out using the MTT assay. Culture plates numbered from 1 to 3 were tested with MTT assay at 24, 48 and 72 hours after the laser irradiation procedure. The MTT assay results were statistically analyzed.

Results

At 24 hours after irradiation was obtained a stimulatory effect by increasing the cells numbers at energy density of 2 J/cm² in a pulsed mode and a frequency of 5 Hz, also the number of fibroblasts increased at a energy density of 4 J/cm² and a frequency of 5 Hz.

As a result of analysis carried out at 48 hours after laser irradiation we achieved an increase in the number of fibroblasts in the case of wells irradiated with a laser energy density of 8 J/cm² and 32 J/cm² and at a frequency of 50 Hz in the pulse mode.

At 72 hours after laser irradiation are obtained increase in the number of fibroblasts, in the case of the energy density irradiation of 8 J/cm², 16 J/cm² and 32 J/cm² and at a frequency of 5 Hz in the pulse mode.

In the case of laser irradiation of fibroblasts from the wells with an energy density of 64 J/cm² it was found that there is not a significant difference between

irradiated and non-irradiated cell populations. On this energy density the cell proliferation was not significantly higher in irradiated groups compared to the control group.

Microscopic examination of the suspension of fibroblasts in the wells, immediately after the laser irradiation and at 24 hours of incubation showed an increase in the number of cells.

Influence of different laser wavelengths on nanostructure components of human fibroblasts

Working hypothesis

The aim of this study was to assess the influence of different laser wavelengths on the nanoparticle components in the human fibroblasts derived from oral tumors.

We also wanted to evaluate if lasers with wavelengths in the infra-red and near infra-red range have any influence in damage of cellular structures like mitochondrial complex of fibroblasts.

The study also tried to find the most suitable wavelengths and laser parameters that are most useful in the treatment of tumors with predominant oral fibroblast components ^{ix}.

Materials and methods

Cell Culture

In this study the cells of an oral human fibroblast cell line were used.

Laser Irradiation Procedure

For the first three series of tubes a laser device with semiconductors (type BTL-10 Beautyline, Ltd., Prague, Czech Republic) emitting an 830 nm convergent beam was used. The first tube of each series was used as a control and the remaining tubes were laser irradiated. The irradiation was performed in pulse mode (5 Hz and 50 Hz) and the energy density of 4.4 J/cm² and 8.8 J/cm².

In the next three series of tubes a diode laser (type Ceralas D15, Ceramoptec, Jena, Germany) with Gallium-Aluminum-Arsenide (Ga-Al-As) and a wavelength of 980 nm was used. In this case the laser irradiation procedure was performed in continuous mode at the energy density of 2.15 J/cm² and pulse mode the energy density of 1.15 J/cm².

The last three series of tubes were irradiated by an Erbium: Yttrium-Aluminium-Garnet (Er: YAG) laser (Fotona, Ljubljana, Slovenia) with a 2940 nm wavelength. The laser parameters used for irradiation were energy of 250 mJ, SP (short-pulsed) and LP (long-pulsed) mode and frequency 6 Hz and 12 Hz.

Cell viability assay

The mitochondrial activity of oral fibroblast cells was assessed using the MTT assay. The results of cell number measurements with MTT assay were statistically analyzed and presented as columns. The Dunnett's Multiple Comparison Test was used for comparing irradiated and non-irradiated cell suspensions.

Results

In the case of 830 nm wavelength at 24 h, there were no differences in cell viability between the irradiated and non-irradiated cell suspensions, whereas at 48 and 72 h these differences were more significant. Fibroblast mitochondrial activity was increased in case of irradiation with energy density 4.4 J/cm² and 8.8 J/cm². The MTT assay results were statistically significant ($p < 0.05$). Irradiation in the pulsed mode (5 Hz or 50 Hz) produced a proliferation of fibroblasts at 72 h in comparison with the control.

The irradiation with 980 nm wavelength produced cell destruction in continuous mode more than irradiation in pulsed mode. At 24, 48 and 72 h the inhibition of mitochondrial activity, even destroying of the cells in suspension was significantly higher in the irradiated populations than in the non-irradiated cells ($P < 0.05$). In all oral fibroblast cell cultures, the continuous laser light was more destructive than the pulsed one applied at the same power.

The 2940 nm laser wavelength produced no significant differences in case of mitochondrial activity between the control and the irradiated cells at 24 and 48 h. An important destruction of fibroblast cells irradiated with the same energy densities 250 mJ in SP and LP mode and frequency of 12 Hz, in comparison with control ($p < 0.05$) was obtained only at 72 h.

Microscopic evaluation of the human fibroblast cell culture taken before and after laser irradiation procedure and after incubation periods of 24, 48 and 72 hours, at a magnification of (200x), has confirmed the statistics.

Influence of three laser wavelengths on human fibroblast cell culture

Working hypothesis

The aim of this study was to assess the influence of three laser wavelengths on human skin fibroblasts in culture ^x.

Materials and methods

Cell Culture

In this study, an HFs (human fibroblast skin) cell line was used.

Laser Irradiation Procedure

Group A: This group was irradiated using a laser device with semiconductors (type BTL-10 Beautyline, Ltd., Prague, Czech Republic), emitting an 830 nm convergent beam.

Group B: This group was irradiated using a diode laser (type Ceralas D15, Ceramoptec, Jena, Germany) with Gallium-Aluminium-Arsenide (Ga-Al-As) and a wavelength of 980 nm.

Group C: This group was irradiated using an Erbium: Yttrium-Aluminium-Garnet (Er: YAG) laser (Fotona, Ljubljana, Slovenia) with a 2940 nm wavelength.

Cell viability assay (MTT assay)

After laser irradiation procedure fibroblast cell suspensions were prepared according to the protocol for the MTT assay.

Apoptosis assay

Simultaneously, an apoptosis assay was conducted on the irradiated fibroblasts. The apoptosis cell response was examined by a double staining method using FITC-labeled Annexin V/PI apoptosis detection kit (BD Bioscience, San Jose, California, USA) according to the manufacturer's instructions.

Results

At 24 hours after laser irradiation, the statistical analysis of MTT results showed that in Group A irradiated with 830 nm laser wavelength, the mitochondrial activity was significantly increased in comparison with the non-irradiated Control Group ($P < 0.05$). In case of Group B irradiated with 980 nm laser wavelength, the mitochondrial function increased in comparison with the Control Group, but less than in Group A. For Group C irradiated with 2940 nm laser wavelength the results showed a decreasing mitochondrial function in comparison with the Control Group.

At 48 hours after laser irradiation procedure, the MTT assay results were similar with those at 24 hours. A statistically significant ($P < 0.05$) increased mitochondrial activity was found in Group A and Group B in comparison with Control Group. In Group C, the 2940 nm wavelength produced an inhibition of mitochondrial activity, even the destruction of the cells in suspension was significantly higher in the laser treated populations than in the non-treated cells group ($P < 0.05$).

At 72 hours analysis there were no differences in mitochondrial activity between Group A and Group B. An increased mitochondrial function in fibroblast cells was observed in both 830 nm and 980 nm wavelength compared with the Control Group. The results were statistically significant ($p < 0.05$). In Group C at 72 hours an important inhibition of mitochondrial function in cell culture irradiated with 2940 nm laser wavelength was obtained.

For the apoptosis assay, a microscopic evaluation of human fibroblast skin cell cultures was made at a magnification of (400x) and confirmed the results of MTT assay statistical analysis.

Laser treatment of oral and maxillofacial hemangiomas and vascular malformations

Working hypothesis

The aim of this study was to evaluate the efficacy of the laser photocoagulation performed with a diode laser (Ga-Al-As) 980 nm wavelength in the treatment of vascular lesions which are located on the oral and maxillofacial areas, using pre- and postoperative color Doppler ultrasonography for evaluation of the results ^{xi, xii, xiii, xiv}.

We also made a comparison between the different methods of treatment: laser therapy, sclerotherapy, laser assisted surgical excision and conventional surgical excision in order to establish treatment protocols and recommendations associated with this pathology.

Materials and methods

We conducted a controlled study on a group of 92 patients (38 male and 54 female, with an average age of 36 years) having low flow hemangiomas and vascular malformations localized in oral and maxillofacial area. All vascular lesions treated were located in regions with high aesthetic and functional significance for the patient. We used color Doppler ultrasonography for diagnosis accuracy. Patients in this trial received one of the methods of treatment for vascular lesions such as hemangiomas and vascular malformations: laser therapy, sclerotherapy, laser assisted surgical excision or conventional surgical excision.

Laser therapy procedure

For the treatment of low flow hemangiomas and vascular malformations we used a diode laser (Ga-Al-As) 980 nm (model Ceralas D15 Ceramoptec, Jena, Germany). Laser parameters used during the procedure were: continuous mode (CW) at a power between 9 W to 11 W, and the energy sent to the tissue was average of 1000 J per unit area (cm²).

Sclerotherapy procedure

For the procedure of sclerotherapy there have been used different sclerosing agents that have been injected directly at the level of vascular lesions to produce sclerosis of vascular blood vessels which filled the infusion of these tumors.

Laser assisted surgical excision procedure

Surgical laser-assisted excision of oral and maxillofacial vascular lesions consisted of vaporizing them or their removal by laser.

To achieve these procedures were used a diode laser (Ga-Al-As) 980 nm (model Ceralas D15 Ceramoptec, Jena, Germany) and a laser type Er: YAG (Fotona, Ljubljana, Slovenia) with a wavelength of 2940 nm.

Conventional surgical excision procedure

Conventional interventions for surgical excision of vascular lesions consisted in removing them with a scalpel after preliminary ligature or cauterization with electrocautery or radiofrequency of the blood vessels that provided input to their level.

After the procedures performed on patients in this study, we realized a comparative analysis between laser therapy and sclerotherapy, or between laser assisted surgical excision and conventional excision.

In case of the procedures for conventional surgical excision and laser assisted surgical excision we performed a comparative analysis regarding postoperative healing and the occurrence of any complications or local recurrence. Patients comfort during therapeutic procedures used and the aesthetic results were also documented in

all phases of treatment. Evaluation of patients in the study was performed at 6 months and 12 months after complete treatment.

Results

After laser therapy we have achieved a reduction in size of hemangiomas and vascular malformations in all patients who were treated with such a procedure, and the aesthetic results were favorable, only in 9 cases lesions remaining visible, (20.45 %) of all cases treated by laser therapy. The surface regression of the lesions and the reduction of vascular signal as measured ultrasonographically varied between 45% and 95%. No reperfusion or recanalization of laser treated vascular lesions was observed after an average follow-up of 6 to 12 months. Laser photocoagulation was well tolerated by all patients without intra or postoperative side effects. All patients had a favorable postsurgical healing without functional impairment in the treated area.

In case of sclerotherapy was also obtained a reduction in the size of vascular lesions in an amount which varied between 23 % and 72 %. From an aesthetic point of view in 5 cases the lesions remained visible, (35.71%) of those treated by sclerotherapy.

The results of laser-assisted surgical excision and conventional surgical excision showed a favorable evolution of patients immediately after surgery. Healing in the area of excision evolved without the appearance of unaesthetic scars or functional impairment of treated areas, except for one case which underwent conventional surgical excision that aesthetically remained visible.

Treatment of oral soft tissues benign tumors using laser

Working hypothesis

This study aimed to evaluate the efficacy, indications and applications of surgical laser and Low-Level Laser Therapy (LLLT) in the treatment of oral soft tissues benign tumors, compared with conventional surgery of these tumors. Also we evaluated the patient satisfaction after laser therapy compared to conventional therapy^{xv}.

Materials and methods

We conducted a controlled study on a group of 93 patients aged between 0 and 90 years (34 males and 59 females, with a mean age of 52 years), of the patients treated in the Clinic of Cranio - Maxillofacial Surgery Cluj- Napoca, in the period 2005 - 2008 and who had various forms of oral soft tissues benign tumors.

With the subjects in the study pre- and postoperative the benign tumors were examined. These tumors were measured, photographed, and these data have been recorded in the case report form.

The patients in the study which matched in terms of inclusion criteria received either laser surgery or conventional surgery.

Laser surgery procedure

Surgery laser assisted excision biopsies of oral benign tumors were made using a diode laser device (Ga-Al-As) 980 nm (model Ceralas D15 Ceramoptec, Jena, Germany) or a laser Er: YAG (Fotona, Ljubljana, Slovenia) with a wavelength of 2940 nm. Laser parameters used during surgery were: for diode laser continuous mode (cw) at a power from 6 W to 8 W, and the energy transmitted varied depending on the size of the tumor. In the case of Er: YAG laser irradiation parameters were: LP mode or VLP, energy 200-250 mJ, the frequency of 10-20 Hz, and the irradiation time for both lasers varied depending on the specific clinical situations case treated.

Conventional surgical excision procedure

The interventions of the conventional biopsy excision of benign tumors consisted in removing them using scalpel.

Postoperatively, with the subjects in the study excision surfaces of affected areas were analyzed according to the clinical situation. These areas were measured, photographed, and data were also recorded in the case report form.

Postoperatively there was also performed a subjective evaluation of the evolution, function and postoperative complications, using postoperative evaluation sheets which were completed by the patients.

Results

The results of histopathological examination showed the presence in the oral soft parts of various forms of benign tumors, like: fibroepithelial polyp (13.98 %), pseudoepitheliomatous hyperplasia (11.83 %), epulis fissuratum (9.68 %) and peripheral granulomas with giant cell (9.68 %).

On the patients who have applied therapeutic doses of laser for biostimulation in the operated area it was observed clinically a much faster wound healing in the first days after the treatment by the formation of fibrin deposits in the area of excision.

Two weeks after surgical laser treatment, there was a good healing without scarring or discomfort at the site of excision for the group of patients who received laser assisted surgery compared to patients who received conventional surgical treatment which had trouble because of bleeding, pain and functional discomfort in the operated area.

Postoperative evolution from the point of view of patients who have been treated with laser was positive. In patients who opted for conventional surgery, immediate postoperative evolution was in most of the cases a favorable one.

The most common complications for conventional surgical treatment were the immediate and delayed postoperative hemorrhage, followed by moderate postoperative pain and swelling after surgery.

Overall Conclusions

Pulsed laser radiation has been shown to be more effective in stimulating the proliferation of fibroblasts than continuous radiation. Stimulating the fibroblasts of the laser radiation of a specific wavelength of 830 nm varied depending on the irradiation dose and the mode used.

Wavelength of 980 nm produced an inhibitory effect on mitochondrial activity of fibroblasts, when used in continuous mode. While the wavelength of 2940 nm produced an inhibition and even destructive effect on fibroblast cells.

Laser wavelengths of 830 nm and 980 nm in pulsed mode with a low energy density have produced an increase in mitochondrial activity and similar apoptosis to human fibroblastic cells which had been irradiated.

The 980 nm diode laser has been proved to be an effective tool in the treatment of hemangiomas and vascular malformations in oral and maxillofacial area.

Laser therapy in the treatment of vascular lesions was more effective than sclerotherapy procedure.

Due to complications and local recurrence the conventional surgical excision procedure proved to be less reliable than laser assisted excision of vascular lesions.

Surgery performed by laser for oral soft tissues benign tumors has been shown to be more effective than conventional treatment with a scalpel, both in terms of intra- and postoperative comfort and in terms of patient satisfaction.

REFERINȚE SELECTIVE

SELECTED REFERENCES

170 de referințe bibliografice / references

-
- ⁱ Vesnaver A, Dovsak DA. Treatment of vascular lesions in the head and neck using Nd:YAG laser. *J Craniomaxillofac Surg.* 2006;34(1): 17-24.
- ⁱⁱ Vesnaver A, Dovsak DA. Treatment of large vascular lesions in the orofacial region with the Nd:YAG laser. *J Craniomaxillofac Surg.* 2009;37(4):191-5.
- ⁱⁱⁱ Angiero F, Benedicenti S, Benedicenti A, Arcieri K, Bernè E. Head and neck hemangiomas in pediatric patients treated with endolesional 980-nm diode laser. *Photomed Laser Surg.* 2009;27(4):553-9.
- ^{iv} Maiorana C, Salina S, Censi R, Fontana F, Borgonovo A. Nd:YAG Laser in Soft Tissue Surgery: A Two-year Retrospective Study on 130 Patients. *Journal of Oral Laser Applications.* 2001;1(1):59 – 63.
- ^v Maiorana C. Lasers in the Treatment of Soft Tissue Lesions. *Journal of Oral Laser Applications.* 2002;2(4):213 – 222.
- ^{vi} Harris DM. Biomolecular mechanisms of laser biostimulation. *J Clin Laser med Surg.* 1991;9(4):277-279.
- ^{vii} Loevschall H, Arenholt-Bindslev D. Effects of low level diode laser (GaAlAs) irradiation on fibroblast of human oral mucosa in vitro. *Lasers Surg Med.* 1994;14:347-354.
- ^{viii} Crișan B, Sorițău O, Băciuț M, Băciuț G, Câmpian R, Crișan L, Lucaciu O. Effects of BTL-10 Laser Irradiation on Human Fibroblasts Cell Culture Proliferation, *Radioterapie și Oncologie Medicală.* 2007; 13(4): 312–317.
- ^{ix} Crișan B, Sorițău O, Băciuț M, Câmpian R, Crișan L, Băciuț G. Influence of Different Lasers Wavelengths on Nanoparticles Components of Human Fibroblasts. *Part Sci Tech* 2013; 31(2):168-173.
- ^x Crișan B, Sorițău O, Băciuț M, Câmpian R, Crișan L, Băciuț G. Influence of three laser wavelengths on human fibroblasts cell culture. *Lasers Med Sci* 2013; 28(2):457-463.
- ^{xi} Crișan B, Băciuț MF, Băciuț G, Câmpian RS, Bran S, Rotaru H, Lucaciu O, Dinu C, Crișan L. Laser treatment in oral and maxillofacial vascular tumors and malformations. *OHDMBSC* 2006;5(2):46-50.
- ^{xii} Băciuț MF, Băciuț G, Crișan B, Crișan L, Câmpian RS, Hurubeanu L, Dinu C, Bran S, Rotar H, Lucaciu O. Laser treatment of vascular lesions in maxillofacial surgery, *Monduzzi Editore International Proceedings Division*, vol. ISBN 88-7587-281-3, CD ISBN 88-7587-282-1, 2006, pp.131 – 134.
- ^{xiii} Băciuț M, Băciuț G, Câmpian RS, Crișan B, Crișan L, Hurubeanu L, Albu S, Bran S, Rotar H, Dinu C, Mitre I, Almașan H. Utilizarea laserterapiei pentru tratamentul hemangioamelor orale și maxilofaciale. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi.* 2007;111(1), supl. 1:454-458.

^{xiv} Crișan BV, Băciuț M, Băciuț G, Câmpian RS, Crișan L. Laser Treatment in Oral and Maxillofacial Hemangioma and Vascular Malformations. *TMJ* 2010; 60(1):34-38.

^{xv} Crișan B, Băciuț G, Băciuț MF, Hurubeanu L, Câmpian RS, Crișan L, Lucaciu O. Treatment of oral soft tissue benign tumours using the 980-nm diode laser. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*. 2008;112(1),supl. 1: 302-305.