



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO-BICOCCA

DIPARTIMENTO DI CHIRURGIA E MEDICINA INTERDISCIPLINARE

Dottorato di Ricerca in Parodontologia Sperimentale

***VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DI LOW LEVEL LASER
THERAPY SUI FIBROBLASTI: STUDIO IN VITRO***

Coordinatore: Prof. Marco Giovanni Baldoni

Tutore: Prof. Marco Giovanni Baldoni

Tesi di Dottorato di:

Dott. ssa Teresa Fumagalli

Matricola n° 064644

Ciclo XXV - ANNO ACCADEMICO 2011 - 2012

*"Siamo come nani
sulle spalle
di giganti..."*

Bernardo di Chartres

Ringraziamenti

A Igna per essere un compagno di vita eccezionale.

Al Prof Marco Baldoni e al Dottor Massimo Mingardi per gli insegnamenti ricevuti in questi anni.

Al Dottor Alessandro Leonida, al Dottor Gianluigi Caccianiga e al Gruppo di Parodonto per il sostegno avuto in questo percorso.

Un ringraziamento a Roberto per l'aiuto e la pazienza dimostrata.

INDICE

INTRODUZIONE	7
1. CENNI DI ANATOMIA E ISTOLOGIA DEL CAVO ORALE.....	10
1.1 LE LABBRA	13
1.2 LE GUANCE.....	13
1.3 LE ARCADE DENTALI E STRUTTURE ASSOCIATE	14
1.3.1 I Denti	14
1.3.2 Il legamento parodontale	17
1.3.3 L'alveolo	17
1.3.4 Le gengive.....	18
1.4 IL PALATO.....	19
1.5 LA LINGUA	20
2. I PROCESSI DI GUARIGIONE DELLE FERITE.....	22
2.1 BIOLOGIA CELLULARE DELLA GUARIGIONE DELLE FERITE.....	24
2.1.1 La fase infiammatoria	24
2.1.2 La fase proliferativa.....	28
2.1.3 La fase di rimodellamento	30

2.2	MODALITA DI GUARIGIONE DELLE FERITE.....	33
2.3	FATTORI CHE INFLUENZANO LA GUARIGIONE DELLE FERITE	34
3.	IL LASER	39
3.1	PRINCIPIO FISICO E STRUTTURA DEL LASER.....	41
3.2	PROPRIETA' DELLA LUCE LASER	43
3.3	IMPATTO LUCE LASER SUI TESSUTI.....	45
3.3.1	Interazione termica	49
3.3.2	Interazione elettromeccanica.....	52
3.3.3	Interazione chimica	53
3.4	CLASSIFICAZIONE DEI LASER A USO MEDICO.....	55
3.5	LOW LEVEL LASER THERAPY (LLLT).....	58
3.5.1	Aspetti Biologici.....	59
3.5.2	Applicazioni Cliniche	61
3.5.3	Aspetti Contradditori in LLLT	63
	PARTE SPERIMENTALE	65
1.	OBIETTIVO DELLO STUDIO	65
2.	MATERIALI E METODI.....	66
2.1	COLTURA CELLULARE.....	66

2.2	DISEGNO DELLO STUDIO.....	67
2.3	IRRADIAZIONE LASER.....	68
2.4	TEST DI VITALITA' CELLULARE (MTT).....	70
2.5	TEST DI PROLIFERAZIONE (SRB).....	73
2.6	ANALISI STATISTICHE.....	74
3	RISULTATI.....	75
3.1	TEST DI VITALITÀ (MTT).....	75
3.2	TEST DI PROLIFERAZIONE (SRB).....	83
4	DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....	91
	BIBLIOGRAFIA.....	95

INTRODUZIONE

Nel momento in cui si ha un insulto chirurgico, si innesca un network di segnali che porta alla guarigione della ferita attraverso la fase infiammatoria, la fase proliferativa e la fase di rimodellamento. La guarigione di una ferita nel cavo orale risente della colonizzazione batterica, nonché delle sollecitazioni meccaniche a cui sono sottoposti i tessuti durante la fonazione, la masticazione e la deglutizione. A un quadro complessivo non favorevole possono aggiungersi condizioni che riducono le capacità riparative dei tessuti danneggiati quali malattie debilitanti, infezioni sistemiche, alterata risposta immunitaria, radioterapia, diabete, carenze nutrizionali che rallentano la guarigione. Una corretta gestione del paziente può contribuire a minimizzare la morbilità postoperatoria attraverso norme a domicilio e un supporto farmacologico, l'ausilio di una terapia biostimolante (LLLT) che accelera la guarigione della ferita riduce il rischio di complicanze e fallimento soprattutto in chirurgia rigenerativa. Low-level laser therapy (LLLT) è una metodica usata nella guarigione delle ferite e nella medicina rigenerativa poiché si è dimostrata possedere effetti biostimolatori sul metabolismo tissutale[1][2]. Usando un laser a diodi con una lunghezza d'onda compresa tra 600-1100 nm si applica ai tessuti un fascio di luce continua o pulsata costante con una densità di energia compresa tra 0.04-50 J/cm². Gli effetti biologici che si ottengono sono la crescita cellulare, la proliferazione e la differenziazione di diverse linee cellulari quali fibroblasti, cheratinociti, osteoblasti, cellule endoteliali e molte altre [3][4][5]il tutto attraverso la trasformazione dell'energia fotonica in energia chimica (ATP) che attiva i meccanismi cellulari che portano allo sviluppo e proliferazione[6][7][8]. La stimolazione delle cellule con questa

metodica determina la guarigione delle ferite, la sintesi di collagene, incentiva il rimodellamento e la riparazione dell'osso, attenua il dolore, modula il sistema immunitario [9][10][11]. In particolare Wilden e coll.[12] hanno individuato che il range compreso tra 600-700 nm dava una biostimolazione maggiore rispetto ad altri valori, range confermato dal gruppo di Yu[13]che usando una lunghezza d'onda di 660 nm è stato in grado di aumentare la produzione di bFGF (basic fibroblast growth factor), Pourreau-Schneider e coll. [14] hanno individuato che una lunghezza d'onda di 632,8 nm trasformava i fibroblasti in miofibroblasti e si è visto che lo stesso valore determinava un aumento della produzione di cheratinociti [15]. E' stato anche riportato che la proliferazione massima di fibroblasti si aveva a 665 nm e 675 nm, mentre a 810 nm si inibiva la proliferazione cellulare degli stessi [16]. Altri gruppi di ricerca hanno riportato, invece, risultati differenti, presentando la proliferazione cellulare con laser con una lunghezza d'onda maggiore[17][18]. La biostimolazione in vitro appare dipendente anche dal tempo di irradiazione, dalla potenza di uscita della radiazione e soprattutto dalla densità di energia [19][20]. Per quanto concerne quest'ultima sembrerebbe che la densità di energia tra 0.5 e 4 J/cm² determini una maggiore proliferazione di molte linee cellulari rispetto a valori più alti che tendono a inibire la proliferazione [21][22]. LLLT è stata applicata anche alle cellule staminali, cellule dotate di plasticità e multipotenzialità, tanto da riuscire a differenziarsi in diverse linee cellulari se adeguatamente indotte [23][24][25]. Queste cellule possono interagire con altri fenotipi cellulari nei microambienti del midollo osseo, in modo tale da influenzare e regolare il rimodellamento osseo [26][27], l'ematopoiesi [28][29][30] e l'angiogenesi [31]. Si può notare che anche in queste cellule la LLLT con una densità di energia entro i 4 J/cm² determina una proliferazione cellulare [32][33] e la secrezione di fattori di crescita (VEGF, NGF) [34]. LLLT appare una metodica valida in grado di migliorare e velocizzare la proliferazione di linee cellulari utili nella pratica clinica e nella ricerca, ma non si hanno ancora dei riferimenti standard. La nostra ricerca

VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DI LOW-LEVEL LASER THERAPY SUI
FIBROBLASTI: STUDIO IN VITRO

prevede la sperimentazione sui fibroblasti poiché è la popolazione cellulare più importante nella guarigione delle ferite, attraverso l'utilizzo di un laser a diodi con lunghezza d'onda di 980 nm. Dopo un background sull'istologia dei tessuti del cavo orale, sui meccanismi biologici e molecolari che si attivano nella guarigione delle ferite e un'analisi del funzionamento del laser e dell'interazione con i tessuti, si presenta una sperimentazione per valutare se i valori di densità di energia individuati dagli altri ricercatori siano applicabili a un laser con una lunghezza d'onda maggiore, anche se sempre compresa nella banda degli infrarossi, e individuare il valore di densità di energia che biostimola maggiormente i fibroblasti.

1. CENNI DI ANATOMIA E ISTOLOGIA DEL CAVO ORALE

La cavità orale è uno spazio delimitato da labbra e guance anteriormente e lateralmente, dal palato superiormente e da un pavimento muscolare inferiormente. Comunica con l'esterno attraverso un'apertura tra le labbra denominata rima buccale ed è in comunicazione con la faringe attraverso l'istmo delle fauci. Nella cavità orale si distinguono due parti tra loro in successione: *il vestibolo della bocca e la cavità orale propriamente detta*. Il primo è lo spazio delimitato dalle labbra e dalle guance anteriormente e lateralmente e dai denti e processi alveolari posteriormente e medialmente. La cavità orale propriamente detta è delimitata dalle arcate dentali e dal palato duro e molle, contiene la lingua che è connessa al pavimento buccale attraverso un dispositivo mobile (Fig.1)

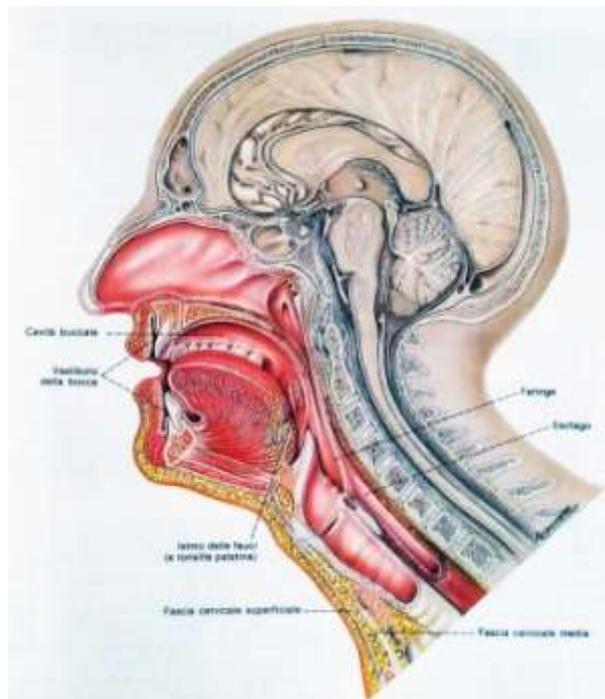


Figura 1 Immagine tratta da "Anatomia Umana" Balboni GC, III edizione EdiErmes

La cavità orale è rivestita da un epitelio squamoso stratificato che poggia sulla lamina propria e sulla sottomucosa(Fig. 2), è diviso da essi dalla membrana basale. La lamina propria è costituita da fibre collagene, fibroblasti, vasi, nervi immersi in una sostanza amorfa, la matrice. L'epitelio presenta uno strato basale formato da cellule cubiche che poggiano sulla membrana basale: queste cellule sono in grado di dividersi e da esse si rinnova l'epitelio. Al di sopra dello strato di cellule cubiche, vi è lo strato delle cellule spinose di forma poliedrica. Sopra lo strato spinoso sono presenti le cellule granulose, più grandi e appiattite contenenti granuli basofili. Lo strato più esterno(strato corneo) è costituito da cellule appiattite, contenenti cheratina. In base all'entità della corneificazione, variabile a seconda della zona anatomica, la mucosa orale si divide in *mucosa di rivestimento non cheratinizzata* (versante vestibolare delle labbra, mucosa vestibolare, pavimento orale, ventre linguale e palato molle) e *mucosa masticatoria cheratinizzata* (bordo vermiglio delle labbra, gengiva aderente, dorso linguale e palato duro). La struttura dell'epitelio non cheratinizzato presenta variazioni regionali con creste epiteliali più o meno sviluppate e contiene nella sottomucosa ghiandole salivari, vasi e tessuto linfatico. La mucosa masticatoria presenta uno strato pronunciato di corneificazione e creste epiteliali sottili e irregolari, separate da lunghe papille connettivali.

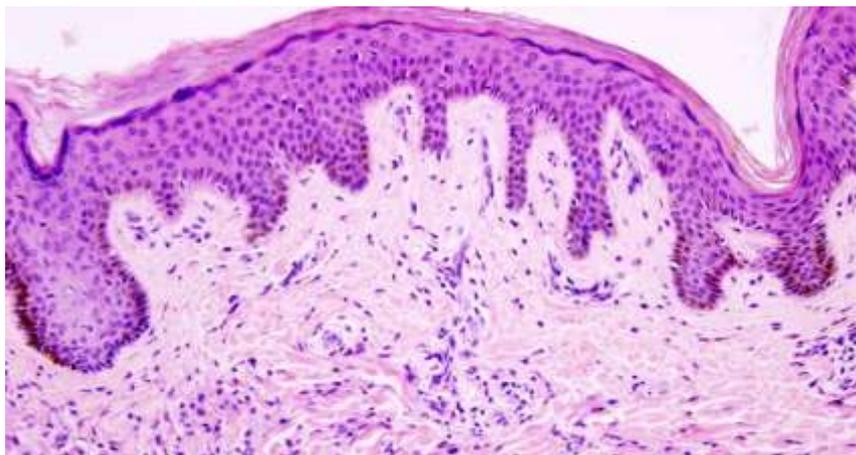


Figura 2 Istologia epitelio squamoso stratificato cheratinizzato del cavo orale

1.1 LE LABBRA

Distinte in superiore e inferiore, le labbra sono due pieghe che servono all'assunzione del cibo, solido e liquido e cooperano alla fonazione. La parete della labbra è costituita da tessuto muscolare, responsabile della loro mobilità. Ogni labbro può essere suddiviso in tre regioni: *area esterna*, *area rossa*, *area di mucosa interna*. La porzione esterna del labbro è ricoperta da uno strato sottile di cute, a cui sono associate ghiandole sebacee, follicoli piliferi e occasionali ghiandole sudoripare. Questa regione si continua con l'area rossa, ricoperta da cute sottile. Tale area è priva di ghiandole sudoripare e follicoli piliferi, ma possono esservi ghiandole sebacee non funzionanti. Le interdigitazioni tra epitelio e tessuto connettivo della mucosa orale sono molto sviluppate, il letto capillare delle papille dermiche viene a trovarsi molto vicino alla superficie esterna e il sangue conferisce il caratteristico colore rosso a quest'area. La porzione interna delle labbra è formata dalla mucosa orale, rivestita da epitelio pavimentoso stratificato non cheratinizzato. Il tessuto connettivo sottostante è fibroso, denso, irregolare, ospita ghiandole di tipo mucoso e ghiandole salivari minori.

1.2 LE GUANCE

Presentano costituzione simile a quella delle labbra e forma irregolare quadrilatera, si individuano al di sotto dello zigomo, lungo il corpo della mandibola, anteriormente al margine anteriore del muscolo massetere e in avanti sono delimitate dal solco labiogenieno. Le guance sono formate da una lamina di muscolatura striata rivestita all'esterno da cute e all'interno da mucosa. La lamina propria della mucosa accoglie numerose ghiandole simili a quelle labiali. Nello spessore della parte posteriore si trova la bolla di Bichat, un accumulo di grasso avvolto entro una capsula fibrosa con la funzione di materiale di riempimento, è voluminoso nel bambino e tende a ridursi con l'età.

1.3 LE ARCATE DENTALI E STRUTTURE ASSOCIATE

Le arcate dentali sono formate dai processi alveolari delle ossa mascellari e della mandibola ricoperti da una tonaca mucosa che forma le gengive, dai denti e dal legamento parodontale (Fig.4).

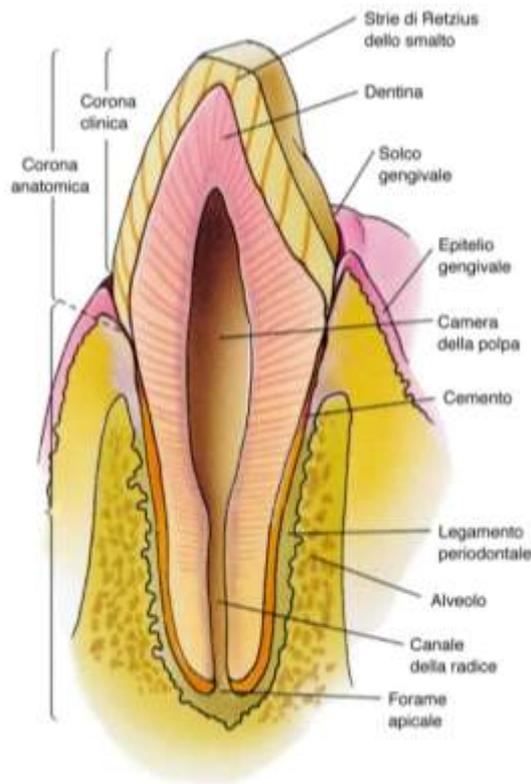


Figura 4 Immagine tratta da "Istologia" Gartner LP, Hiatt JL II edizione EdiSES. Rappresentazione schematica di un dente e delle strutture associate

1.3.1 I Denti

Nell'uomo, durante lo sviluppo, si hanno due serie di dentizioni, i 20 denti decidui vengono sostituiti da 32 denti permanenti. Ogni dente è inserito in una cavità ossea, l'*alveolo* per mezzo del legamento parodontale, costituito da tessuto connettivo di tipo fibroso denso. La gengiva funge da supporto ai denti e il suo epitelio separa la cavità orale dal connettivo subepiteliale. La porzione visibile del dente è detta corona, mentre la regione racchiusa dall'alveolo è

detta radice, tra di esse si trova la zona di passaggio definita colletto del dente. Dal punto di vista istologico il dente è costituito da tre sostanze calcificate che racchiudono un tessuto connettivo molle, la polpa. Quest'ultima è contenuta nella camera pulpare e nei canali ed è in comunicazione con il legamento parodontale per mezzo del forame apicale. Le strutture mineralizzate del dente sono lo smalto, la dentina e il cemento. La dentina costituisce la maggior parte della componente minerale, circonda la camera della polpa e il canale della radice, a livello della corona è ricoperta dallo smalto e a livello della radice dal cemento.

Smalto

Lo smalto è il materiale più duro del corpo umano, è traslucido e la colorazione è dovuta alla dentina sottostante. È formato per il 96% di fosfato di calcio, sotto forma di cristalli di idrossiapatite e per il 4% di acqua e materiale organico. La porzione calcificata è costituita da cristalli ricoperti da uno strato sottile di matrice organica, formata da enameline, proteine ad elevato peso molecolare ricche di tirosina, simili alle cheratine. Lo smalto è organizzato in prismi, è privo di vita poiché gli ameloblasti, le cellule che lo formano, muoiono prima dell'eruzione del dente.

Dentina

La dentina è il secondo tessuto più duro del corpo, è di colore giallognolo e ha un'elasticità che permette di proteggere lo smalto sovrastante da fratture. È composta da 65-70% da cristalli di idrossiapatite, 20-25% da materiale organico e 10% da acqua. La gran parte della sostanza organica è costituita da collagene di tipo I associato a proteoglicani e glicoproteine. Le cellule che la producono sono gli odontoblasti, localizzati alla periferia della polpa con estensioni citoplasmatiche che occupano i canali della dentina. Quest'ultimi sono pieni di fluido e si diramano verso la giunzione smalto-dentina della corona e cemento-dentina della radice. La dentina è in grado di rigenerare

poiché gli odontoblasti rimangono vitali per tutta la vita, nel corso degli anni tende a occupare lo spazio della camera pulpare portando a una sclerosi della polpa: questo tipo di dentina si chiama dentina secondaria.

Cemento

Il cemento è circoscritto nella regione della radice, è costituito da 45-50% di idrossiapatite, 55-60% da materiale organico e acqua ad esso legata. La sostanza organica è rappresentata perlopiù da collagene di tipo I associato a glicoproteine e proteoglicani. La regione apicale del cemento è simile all'osso in quanto anch'esso ospita i cementociti in spazi lenticolari, i cui processi citoplasmatici si estendono verso i vasi del legamento parodontale attraverso canalicoli. Il cemento prodotto dai cementociti è detto cemento cellulare, mentre quello in prossimità della corona è detto acellulare, ma entrambi contengono i cementoblasti che producono cemento per tutta la vita del dente, rivestendolo nell'interfaccia con il legamento parodontale.

Polpa

La polpa del dente è formata da tessuto connettivo lasso, ricco di proteoglicani e glicosaminoglicani, cellule linfatiche migranti, fibre nervose e vasi sanguigni. È collegata al legamento parodontale attraverso il forame apicale, una piccola apertura all'apice della radice, da cui passano vasi e nervi. La polpa è formata da :

- Zona odontoplastica, parte più esterna formata da uno strato di odontoblasti, i cui processi si estendono nella dentina adiacente.
- Zona priva di cellule, situata al di sotto della zona odontoplastica.
- Zona ricca di cellule, come fibroblasti, cellule mesenchimali.
- Nucleo formato da tessuto simile a un tessuto connettivo lasso, privo di adipociti, riccamente vascolarizzato con alcuni elementi calcificati (calcarei della polpa). La polpa presenta al suo interno fibre nervose simpatiche che controllano il diametro del lume dei vasi sanguigni e sensorie responsabili della

trasmissione del dolore. Queste ultime sono sottili, mielinizzate e si uniscono formando il plesso di Raschkow, per poi attraversare la polpa dirigendosi verso la dentina.

1.3.2 Il legamento parodontale

Il legamento parodontale si trova nello spazio tra il cemento della radice e l'osso alveolare e misura meno di 0,5 mm di ampiezza. È costituito da tessuto connettivo denso e irregolare, riccamente vascolarizzato, con gruppi di fibre principali di collagene di tipo I disposte in modo da assorbire le forze che si generano durante la masticazione. Le porzioni terminali delle fibre, note come fibre di Sharpey, sono immerse nell'alveolo e nel cemento, mantenendo fisso il dente all'alveolo. I fibroblasti rappresentano la popolazione cellulare più abbondante del legamento parodontale, si occupano della sintesi del collagene e dei componenti intercellulari e del loro riassorbimento. I nervi del legamento sono fibre autonome che regolano il diametro del lume delle arteriole, fibre dolorifiche che recepiscono le sensazioni di dolore e le fibre propriocettive che permettono la percezione spaziale.

1.3.3 L'alveolo

I processi alveolari sono quella parte della mascella e della mandibola che forma e sostiene gli alveoli dei denti. Insieme al cemento radicolare e al legamento parodontale. L'osso alveolare costituisce l'apparato di attacco dei denti, la cui principale funzione è quella di distribuire e riassorbire le forze generate nel corso della masticazione o di altri contatti fra i denti. Gli alveoli sono formati da due lamine corticali che rivestono la spongiosa al cui interno scorrono le arterie deputate al nutrimento dell'osso alveolare propriamente detto (strato di osso compatto).

1.3.4 Le gengive

Le gengive sono formate da quella parte ispessita, consistente e non mobile della mucosa del vestibolo e della cavità orale propriamente detta che riveste la faccia esterna e interna dei processi alveolari insinuandosi negli spazi interdentali e costituendo un anello intorno al colletto dei denti e a quella porzione della loro radice che sporge dagli alveoli. In ciascuna gengiva si distingue una parte vestibolare, una parte linguale e una interdentale. La parte vestibolare delle gengive continua con la mucosa dei solchi vestibolari, la parte linguale prosegue superiormente nella mucosa del palato duro e inferiormente nella mucosa del solco sottolinguale. Le gengive hanno colorito biancoroseo che si accentua nelle regioni dove la mucosa è meno aderente ai piani profondi. La gengiva può essere differenziata in due parti:

- Gengiva libera: è di colore rosa corallo, ha una superficie opaca e consistenza compatta
- Gengiva aderente: presenta consistenza rosa corallo e presenta piccole depressioni superficiali che le conferiscono un aspetto a “buccia d’arancia”

L’epitelio è totalmente o parzialmente cheratinizzato, invia in profondità sottili cordoni o lamine che individuano papille connettivali formando una giunzione epitelio-connettivale frastagliata che risulta particolarmente accentuata in corrispondenza della gengiva libera dove riveste il margine osseo libero dei processi alveolari. La lamina propria è formata da fasci di collagene stipati, è povera di fibre elastiche e si solleva in papille riccamente vascolarizzate, conferendo un caratteristico colorito roseo. La lamina propria aderisce strettamente al periostio del piano osseo e al colletto dei denti. La mucosa gengivale è priva di ghiandole.

1.4 IL PALATO

La cavità nasale e quella orale sono separate l'una dall'altra dal *palato duro e molle*. Il *palato duro* è provvisto di uno scheletro formato dai processi palatini delle due ossa palatine. Si presenta come una superficie concava nel cui mezzo è presente un rilievo, il rafe palatino, che indica la linea di fusione delle due lamine palatine; il rafe termina in avanti con un piccolo rilievo, la papilla interincisiva. Nel terzo anteriore del palato duro si osservano alcune creste arcuate note come pieghe palatine trasverse. Il palato duro presenta una mucosa fortemente aderente al periostio che riveste il piano scheletrico, la tonaca mucosa è costituita da epitelio squamoso cheratinizzato e la sottomucosa da fasci di fibre di collagene irregolari, anteriormente vi sono alcune cellule adipose, mentre posteriormente vi sono acini di ghiandole salivari di tipo mucoso.

Il palato molle si presenta come una lamina muscolare rivestita sulle due facce da mucosa, ha la funzione di isolare il rinofaringe durante la deglutizione. Presenta una faccia inferiore, buccale, liscia e concava che è percorsa nel mezzo dal rafe del palato molle; una faccia superiore, faringea, con la superficie irregolare per la presenza di piccoli rilievi, un margine anteriore che continua nel palato duro; due margini laterali che si fissano alla lamina mediale dei processi pterigoidei dello sfenoide e al di sotto di questa continuano nelle pareti laterali della faringe, un margine inferiore che delimita superiormente l'istmo delle fauci e presenta nel bel mezzo un'appendice appuntita di circa 1,5 cm, l'ugola palatina. Il palato molle presenta una tonaca mucosa che l'avvolge completamente, ricoprendo due lamine elastiche denominate, aponeurosi palatine. La tonaca mucosa della faccia inferiore ha le medesime caratteristiche della mucosa del palato duro, presenta infatti, un epitelio di rivestimento squamoso stratificato e una lamina fibrosa densa. Profondamente alla lamina propria, si trova la lamina elastica al di sotto della quale si trovano le ghiandole palatine di tipo mucoso. La tonaca della faccia superiore è costituita da epitelio

squamoso stratificato con isole di epitelio respiratorio (cilindrico pseudo stratificato cigliato), la lamina propria contiene ghiandole tubulo acinose ramificate a secrezione mista.

1.5 LA LINGUA

La lingua è la più grande struttura della cavità orale. La presenza di un'importante componente muscolare, costituita da fibre muscolari scheletriche, le conferisce una grande mobilità. È rivestita da una tonaca mucosa che insieme al solco sottolinguale forma il pavimento della cavità orale propriamente detta. La lingua ha un ruolo fondamentale nell'assunzione del cibo, nella masticazione, nella formazione del bolo alimentare e nella deglutizione; è la sede principale della sensibilità gustativa, presenta una forte componente tattile ed è importante durante la fonazione. La lingua è costituita da uno scheletro fibroso in cui si inseriscono muscoli estrinseci ed intrinseci. I primi sono responsabili del movimento della lingua dentro e fuori dalla bocca e da un lato e dall'altro, i secondi ne modificano la forma.

La lingua presenta una superficie dorsale, costituita da una parte più ampia anteriore e una più piccola posteriore, separate dal solco terminale, solco a forma di "V" con un apice posteriore e una cavità, detta forame cieco. La porzione posteriore è irregolare con tonsille linguali, mentre quella anteriore e quelle laterali presentano le papille linguali. Quest'ultime sono classificate in base alla loro struttura e funzione in quattro tipi: filiformi, fungiformi, foliate e circumvallate.

➤ Le papille filiformi sono strutture numerose e sottili, conferiscono un aspetto vellutato alla superficie dorsale dell'organo. Presentano tessuto epiteliale squamoso stratificato cheratinizzato e servono a rimuovere il cibo dalla superficie del palato.

- Le papille fungiformi hanno una parte espansa collegata da un esile gambo al dorso linguale. Presentano un epitelio squamoso stratificato non cheratinizzato e nella porzione espansa vi sono i calici gustativi
- Le papille foliate sono localizzate lungo il margine posterolaterale della lingua. Appaiono come solchi verticali, nel neonato hanno funzione di calici gustativi, per poi degenerare nel secondo e terzo anno di vita.
- Le papille circumvallate sono disposte a “V” davanti al solco terminale, sono immerse nella parte superficiale della lingua e circondate da un epitelio alla cui base si aprono i sottili dotti delle ghiandole di Von Ebner. L’epitelio del solco e della porzione laterale, ma non del dorso delle papille contiene calici gustativi.

2. I PROCESSI DI GUARIGIONE DELLE FERITE

La riparazione delle ferite è una delle espressioni della capacità del nostro organismo di riparare i tessuti. La riparazione tissutale può aver luogo per *rigenerazione* ove le cellule danneggiate sono sostituite con cellule dello stesso tipo e il tessuto connettivo sottostante è integro oppure per *sostituzione* con tessuto connettivo. Nel primo caso la riparazione non dà luogo a esiti cicatriziali di rilievo, mentre, nel secondo caso, si ha la formazione di una cicatrice permanente. Un fattore determinante è costituito dalle caratteristiche intrinseche delle cellule costituenti il tessuto: la grande maggioranza dei tessuti è costituita da diverse popolazioni cellulari, alcune delle quali attivamente proliferanti, altre quiescenti ma che possono entrare in proliferazione e altre ancora assolutamente incapaci di proliferare. Nel 1894 il patologo Bizzozzero propose di classificare le cellule in base alla loro capacità replicativa in cellule *labili* (in attiva proliferazione), *stabili* (normalmente quiescenti, ma in grado di riprendere la proliferazione), e *perenni* (definitivamente uscite dal ciclo cellulare e pertanto incapaci di proliferare) (Fig.5).

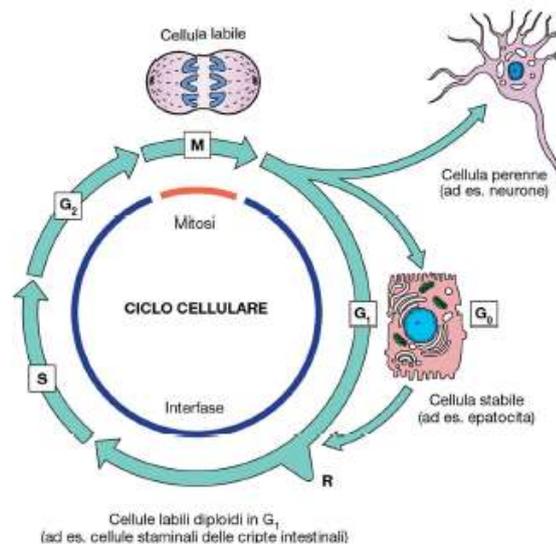


Figura 5 Rappresentazione schematica della capacità replicativa delle cellule

Questa suddivisione permette anche di classificare i tessuti dell'organismo in base all'origine istologica in tessuti labili, stabili e perenni. I primi sono gli epitelii di rivestimento, gli epitelii mucosecarnenti e le cellule emopoietiche. In questi tessuti la capacità proliferativa risiede in un ricco corredo di cellule staminali che mantengono intatta la capacità di intraprendere differenti cammini differenziativi. I secondi sono rappresentati dalle cellule parenchimali degli organi ghiandolari (fegato, reni, pancreas), dalle cellule mesenchimali (fibroblasti e cellule muscolari lisce), dagli endoteli vascolari. I terzi corrispondono ai neuroni e alle cellule muscolari scheletriche e cardiache. La capacità delle cellule labili e stabili di proliferare non implica la ricostruzione dell'architettura tissutale normale nel corso del processo di riparazione, poiché le cellule devono stabilire un intimo rapporto con le strutture connettivali, in particolare con la membrana basale. Nei tessuti epiteliali, per esempio, la distruzione della membrana basale altera profondamente la polarità di crescita e le relazioni reciproche delle cellule epiteliali, ciò rende difficile ripristinare l'originaria architettura. Nel caso di cellule e tessuti perenni, una modesta attività proliferativa è presente nel muscolo striato scheletrico a opera delle cellule satelliti periferiche, ma raramente si ha una rigenerazione efficiente, spesso si ha la formazione di una cicatrice fibrosa. Nel sistema nervoso centrale, infine, i neuroni danneggiati vengono sostituiti dalla proliferazione delle cellule gliali.

Nella guarigione delle ferite si ha sempre la più o meno formazione di una cicatrice fibrosa, la modalità di guarigione determinerà se la cicatrice sarà più o meno ampia, più o meno visibile e più o meno lesiva delle proprietà meccaniche del tessuto.

2.1 BIOLOGIA CELLULARE DELLA GUARIGIONE DELLE FERITE

Nel processo complessivo di guarigione possono essere riconosciute tre fasi:

- *la fase infiammatoria*
- *la fase proliferativa*
- *la fase di rimodellamento.*

2.1.1 La fase infiammatoria

La *fase infiammatoria* avviene nei primi cinque giorni è caratterizzata da una risposta vascolare e da una risposta cellulare. Nella prima si osserva il processo di emostasi di formazione di un coagulo, che rappresenta il substrato per la successiva organizzazione fibrinica (Fig. 6). La seconda si esplica attraverso l'infiltrazione tissutale di elementi leucocitari, come i granulociti neutrofilici ed eosinofili, linfociti e macrofagi dotati dell'attività fagocitaria.

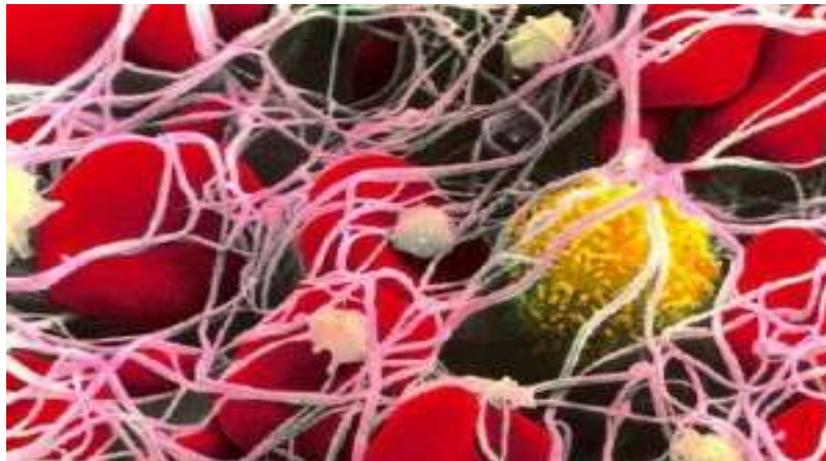


Figura 6 Rappresentazione della struttura del coagulo

Subito dopo la lesione tissutale si produce una transiente vasocostrizione arteriosa dovuta in parte a un riflesso vasocostrittore neurogeno e in parte al rilascio locale di endotelina; successivamente si ha l'emostasi primaria determinata dall'attivazione piastrinica e quindi l'emostasi secondaria che porta alla formazione del coagulo di fibrina. Infine la fibrina polimerizzata e gli

aggregati piastrinici formano un tappo solido e permanente per impedire l'emorragia. Si attivano quindi meccanismi contro regolatori per limitare il tappo emostatico alla sede della lesione.

In questo processo assumono un ruolo fondamentale le piastrine, elementi circolanti altamente reattivi. Nel momento in cui viene scoperta la matrice extracellulare subendoteliale a causa di un trauma, si innescano una serie di processi che determinano:

- Adesione piastrinica: mediata dal fattore di von Willebrand che agisce da ponte tra i recettori di superficie delle piastrine e il collagene esposto.
- Secrezione (reazione di rilascio) del contenuto dei granuli alpha e densi. In particolare del Calcio che è coinvolto nella cascata della coagulazione e ADP che promuove l'aggregazione piastrinica. Si liberano anche mediatori preformati che potenziano ulteriormente l'aggregazione e la formazione del coagulo e vengono esposti dei complessi fosfolipidici che forniscono i siti di legame per il Calcio e i fattori della coagulazione. Dai granuli piastrinici vengono rilasciati anche fattori di crescita come PDGF (platelet-derived growth factor,) e il TGF- β (transforming growth factor- β).
- Aggregazione piastrinica: viene innescata dal trombossano A2 (TXA2) e da ADP che danno inizio a una reazione autocatalitica che porta a costituire il tappo emostatico primario. Nell'emostasi è molto importante anche la deformazione delle piastrine stesse (*shape change*) che porta alla fusione dei singoli elementi in una massa vischiosa amorfa che stabilizza ulteriormente il coagulo primario.

L'adesione, l'aggregazione e l'attivazione piastriniche sono indissolubilmente legate alla cascata coagulativa vera e propria da cui si genera la trombina, che si lega a un recettore sulle piastrine e causa la contrazione delle stesse. La trombina converte il fibrinogeno in fibrina stabilizzando il tappo emostatico secondario. In condizioni quiescenti il recettore del fibrinogeno espresso sulla membrana delle piastrine ha una bassissima affinità per il fibrinogeno stesso,

ed è incapace di legarlo. In presenza di ADP, secreto dalle piastrine, questo recettore subisce una variazione che ne aumenta l'affinità e gli permette di legare efficacemente il fibrinogeno. In questo modo è possibile formare un solido legame tra piastrine adiacenti e stabilizzarne l'interazione. La cascata della coagulazione è costituita dalla via intrinseca ed estrinseca (Fig.7).

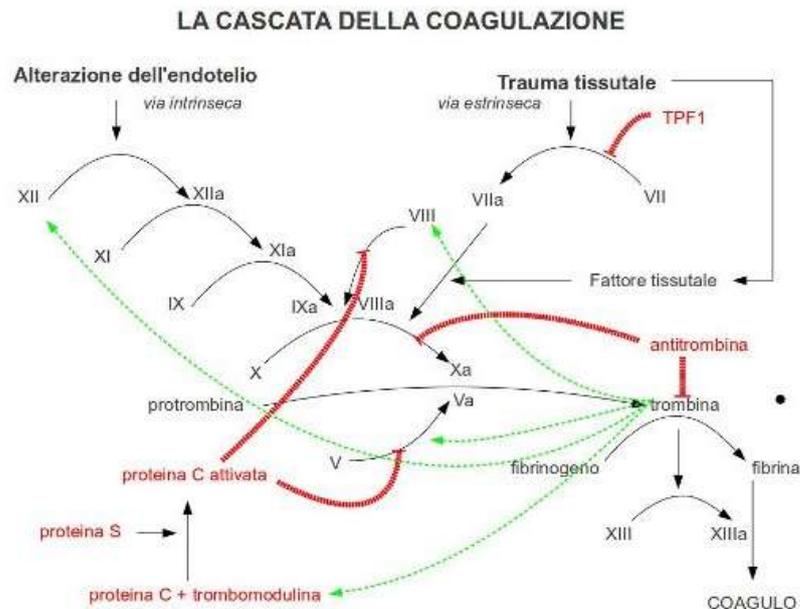


Figura 7 Rappresentazione schematica della cascata della coagulazione

La via intrinseca è innescata dall'attivazione del fattore XII (fattore di Hageman) a contatto con il collagene subendoteliale, mentre la via estrinseca è innescata dalla tromboplastina tissutale (fattore tissutale) liberata dai tessuti lesi. Questo fattore è presente sulla membrana di cellule di diversa origine istologica (fibroblasti, cellule muscolari lisce) o può essere prodotta sotto stimolo da cellule endoteliali e fagociti mononucleati. La cascata coagulativa culmina con la degradazione del fibrinogeno in fibrina, la cui rete polimerica intrappola gli elementi figurati del sangue formando il coagulo. Quest'ultimo è fondamentale anche per la riparazione della lesione, poiché i leucociti

intrappolati al suo interno e attivati in seguito all'adesione con la rete di fibrina e con le altre cellule adiacenti, rilasciano mediatori infiammatori precoci e tardivi. Questi mediatori, insieme con i prodotti di degradazione della fibrina, esercitano una potente azione chemiotattica sui leucociti del sangue e su quelli residenti nell'interstizio tissutale, stimolano il reclutamento e l'attivazione dei granulociti polimorfonucleati, dei fibroblasti, dei monociti/macrofagi e delle cellule dendritiche. In particolare i fibrinopeptidi prodotti dall'azione della trombina sul fibrinogeno (e la trombina stessa) stimolano la produzione di specie radicaliche e la esocitosi dei granuli secretori, il fattore di Hageman attivato agisce sul chininogeno e sul sistema del complemento per produrre chinine vasoattive e fattori attivati del complemento (C5a, C3a ecc.). Oltre ad enzimi ad attività degradativa contenuti nei granuli specifici, azzurrofilo o terziari (elastasi, collagenasi, e gelatinasi), i neutrofilo producono anche citochine e chemiochine quali TNF- α (*tumor necrosis factor- α*), IL-1 α , e IL-1 β (*interleukin-1 α* e 1 β), le proteine chemiotattiche per i monociti 1 e 2 (monocyte chemotactic protein, MCP-1 ed MCP-2), la proteina infiammatoria macrofagica 1 α (*macrophage inflammatory protein, MIP1 α*). Il tutto è ulteriormente potenziato dall'arrivo dei macrofagi che producono fattori di crescita e di modulazione cellulare, oltre ad IL-1 e TNF- α , producono TGF- β (*transforming growth factor β*), il PDGF, il IGF (*insulin-like growth factor*). Di questi fattori di crescita, il TGF- β è probabilmente il più importante nel processo di riparazione, per i suoi potenti effetti su quasi tutte le cellule coinvolte nel processo riparativo.

2.1.2 La fase proliferativa

La *fase proliferativa* avviene in 5-14 giorni e consiste in una riparazione epiteliale e connettivale. La prima si realizza velocemente per migrazione e proliferazione delle cellule epiteliali con conseguente chiusura della ferita. Questo processo prevede un letto di supporto in grado di favorire la proliferazione e la migrazione tissutale. La seconda avviene attraverso i fibroblasti che nelle prime 48-72 ore cominciano a sintetizzare collagene. L'aggregazione del collagene porta alla formazione di microfibrille che organizzandosi in fasci e fibre determinano la formazione di collagene di tipo III e in seguito di tipo I. La fase di proliferazione è caratterizzata dalla formazione del tessuto di granulazione, che origina dai margini della ferita ed è costituito da fibroblasti, miofibroblasti, cellule infiammatorie, matrice extracellulare endoteliale e soprattutto vasellini neoformati. È così definito per l'aspetto granuloso impartito alla sua superficie proprio dalla ricca trama di gettoni vascolari neoformati che lo caratterizzano. La ricca componente vascolare e le alte concentrazioni di mediatori vasoattivi, provocano la formazione nel tessuto di granulazione di un ricco essudato infiammatorio, che lo rende fortemente edematoso. Nella formazione del tessuto di granulazione, e più in generale nel processo di riparazione della ferita, una fase cruciale è costituita dall'angiogenesi (Fig. 8). Per *angiogenesi* si intende quel processo attraverso cui i vasi pre-esistenti producono per gemmazione vasellini neoformati. L'angiogenesi è un processo fondamentale non solo nella riparazione delle ferite, ma anche nell'infiammazione cronica, nella risposta tissutale all'ipossia e nella crescita tumorale.

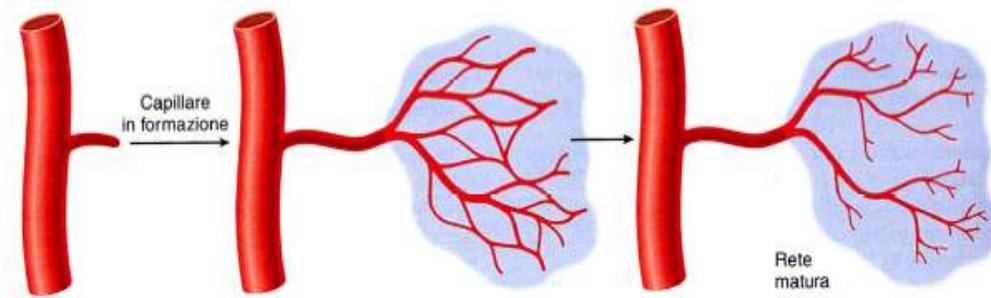


Figura 8 Meccanismi di angiogenesi

Schematicamente l'angiogenesi procede attraverso le seguenti fasi:

1. produzione di uno stimolo angiogenetico locale;
2. digestione proteolitica della membrana basale dei vasi vicini per permettere la gemmazione e la migrazione delle cellule endoteliali nell'interstizio cellulare;
3. proliferazione delle cellule endoteliali lungo la nuova direttrice di migrazione con formazione di gettoni endoteliali solidi;
4. inibizione della proliferazione ed induzione del differenziamento dei gettoni cellulari solidi in tubi capillari;
5. reclutamento e differenziamento delle cellule periendoeliali.

L'angiogenesi è stimolata da VEGF (vascular endothelium growth factor) prodotto da tutte le cellule in condizioni di ipossia. Poiché l'angiogenesi è un processo coordinato, vengono secreti anche fattori con attività inibitoria sulla motilità e sulla proliferazione e con azione differenziativa. L'angiogenesi è un processo che ricostituisce una rete vascolare tridimensionale, è controllata anche dall'interazione tra cellule endoteliali e la matrice extracellulare subendoeliale. In particolare le integrine hanno un ruolo importante nel determinare la polarità di crescita e la stabilizzazione dei vasellini neoformati.

2.1.3 La fase di rimodellamento

Nella *fase di rimodellamento* che avviene dopo il 14° giorno, ha inizio il fenomeno della contrazione tissutale in cui i fibroblasti vengono sostituiti da cellule simili, ma con capacità contrattili denominate miofibroblasti. La presenza di queste cellule porta ad un rimodellamento e una riorganizzazione delle fibre di collagene che si completano dopo 6-7 settimane. La sostituzione del tessuto di granulazione con tessuto cicatriziale comporta una variazione nella matrice extracellulare. Il bilancio netto di sintesi e degradazione definisce il rimodellamento del tessuto connettivo. La degradazione del collagene e delle altre proteine della matrice avviene a opera delle metalloproteinasi della matrice (matrix metallo proteases, MMPs), un insieme di enzimi degradanti il connettivo. Nel corso del processo di riparazione delle ferite questi enzimi sono sottoposti ad un accurato processo di attivazione/disattivazione per permettere il rimodellamento del tessuto neoformato e la formazione della cicatrice. Diversi fattori di crescita, citochine e ormoni stimolano (PDGF, IL-1, TNF- α) o inibiscono (TGF- β , corticosteroidi) la sintesi di MMPs modulandone l'espressione genica, mentre la plasmina provoca l'attivazione proteolitica dei precursori (proMMPs). Una volta attivate le MMPs vengono rapidamente inibite dagli inibitori tissutali delle proteinasi (TIMPs).

VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DI LOW-LEVEL LASER THERAPY SUI FIBROBLASTI: STUDIO IN VITRO

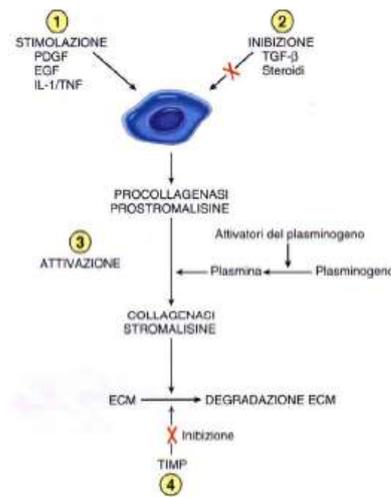


Figura 9 Processi biologici durante la fase di rimodellamento

Nella fase di rimodellamento, la contrazione della ferita, è tanto più importante quanto più estesa è stata la perdita di tessuto e la formazione di tessuto di granulazione. La contrazione è dovuta sia alla disidratazione del coagulo (soprattutto alla superficie esposta all'aria), sia all'azione dei miofibroblasti. La formazione di cicatrici fibrose, più o meno estese, è una conseguenza inevitabile di qualsiasi lesione tissutale. Il tessuto fibroso cicatriziale presenta sempre un'organizzazione più disordinata del tessuto originario, e questo può dar luogo a danni estetici o funzionali rilevanti, e nel caso di lesioni profonde può gravemente alterare la funzionalità viscerale (fibrosi polmonare, cirrosi epatica, ostruzione intestinale). In alcuni casi il processo riparativo può assumere aspetti così esuberanti da produrre cicatrici ipertrofiche e cheloidi. In genere si parla di cheloidi quando il processo cicatriziale esuberante ha le caratteristiche dell'irreversibilità e si estende al di là dei margini della lesione.

In alcuni casi le ferite non mostrano tendenza alla cicatrizzazione spontanea. Queste lesioni a lenta o assente rimarginazione danno luogo a vere e proprie ulcerazioni. La cronicizzazione è dovuta all'alterazione del normale processo di riparazione. Ciò può dipendere dalla scarsa risposta infiammatoria iniziale

che porta ad una ridotta produzione di tessuto di granulazione ed a una ridotta migrazione di cellule epiteliali a ricoprire la ferita. Oppure una persistente contaminazione batterica può mantenere un sostenuto stimolo infiammatorio acuto, così da impedire il fisiologico instaurarsi della fase infiammatoria cronica e la successiva fase di sostituzione del tessuto di granulazione con tessuto connettivo.

Di seguito è riportato un grafico riassuntivo delle tre fasi della guarigione di una ferita (Fig. 10).

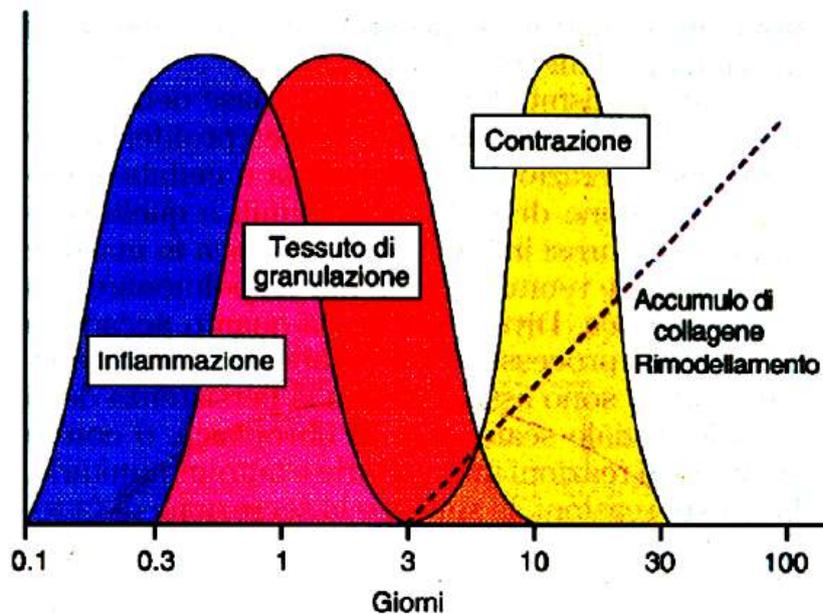


Figura 10 Fasi della guarigione di una ferita

2.2 MODALITA DI GUARIGIONE DELLE FERITE

Clinicamente sono usati il termine di guarigione per *prima* e *seconda intenzione* per distinguere le due modalità attraverso cui può avvenire il processo riparativo.

➤ La guarigione per prima intenzione avviene quando i lembi si trovano senza tensione a diretto contatto tra loro. È la guarigione più auspicabile, in quanto avviene in tempi brevi e riduce il rischio di infezione dovute alla penetrazione di germi nei piani sottomucosi o sottocutanei. Durante la guarigione si presentano le tre fasi descritte precedentemente. Brevemente in seguito alla fase infiammatoria che porta alla formazione di una rete di fibrina, i cordoni cellulari provenienti da cellule basali dell'epitelio si fondono per chiudere la ferita. La migrazione e la proliferazione del tessuto connettivale sottostante portano alla formazione di un tessuto riparativo cicatriziale che matura e si riorganizza.

➤ La guarigione per seconda intenzione avviene quando non è possibile avvicinare i margini della ferita che rimangono separati (per esempio in caso di alveoli post estrattivi, lacerazione o perdita traumatica di tessuti molli, deiscenza precoce dei margini dei lembi). In questo tipo di guarigione lo spazio che separa i margini della ferita sarà riparato da tessuto di granulazione che evolve in tessuto fibroso denso, cicatriziale caratterizzato da fibre collagene neoformate e addensate tra loro. Gli esiti cicatriziali delle ferite che vanno incontro a riparazione per seconda intenzione sono dettati dalle caratteristiche intrinseche del processo riparativo che richiede una intensa attività delle cellule infiammatorie (per la rimozione delle cellule necrotiche, dei detriti tissutali, dell'esteso coagulo) ed un'estesa formazione di tessuto di granulazione, con la concomitante produzione di matrice extracellulare subendoteliale e vasellini neoformati. Maggiore è l'estensione del tessuto di granulazione maggiore è l'estensione della cicatrice connettivale. In Fig. 11 sono rappresentati le due modalità di guarigione.

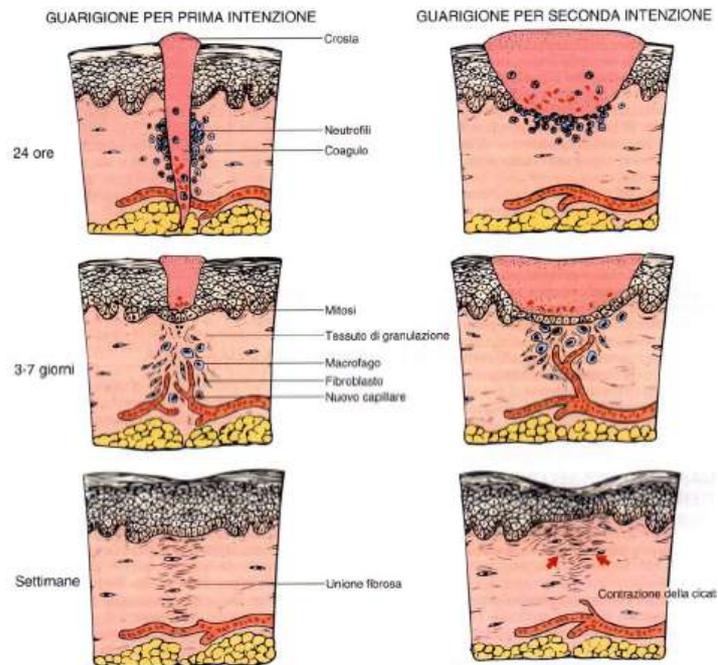


Figura 11

2.3 FATTORI CHE INFLUENZANO LA GUARIGIONE DELLE FERITE

La guarigione nel cavo orale risente della colonizzazione batterica e delle sollecitazioni meccaniche a cui sono continuamente sottoposti i tessuti durante la fonazione, masticazione e deglutizione. Il processo di guarigione può essere influenzato da fattori generali e locali.

Fattori generali

Sono fattori che possono ridurre le capacità riparative dei tessuti, quali malattie debilitanti, infezioni sistemiche, trattamento con farmaci steroidei, alterata risposta immunitaria, radioterapia, diabete, carenze nutrizionali.

Le principali malattie che ostacolano la cicatrizzazione sono:

- Diabete mellito
- Disturbi della coagulazione
- Anemia
- Sindrome di Werner
- Vasculopatia aterosclerotica
- Vasculiti
- Flebopatie con stasi venosa
- Linfoedema
- Scompenso cardiaco
- Insufficienza renale cronica
- Sindrome di Cushing
- Ipertiroidismo
- Deficit immunitari
- Broncopneumopatia cronica
- Cirrosi epatica
- Tumori

In particolare il *diabete* a causa della sua diffusione rappresenta l'afezione che maggiormente incide sulla guarigione delle ferite. Si hanno disfunzioni a carico dei fibroblasti e dei neutrofilii, dovute all'effetto tossico esercitato dall'iperglicemia e dall'accumulo dei prodotti della glicosilazione. La neuropatia sensoriale impedisce la risposta neuroinfiammatoria, mentre la neuropatia autonoma ostacola il mantenimento dell'integrità della cute, del tono vascolare e della risposta termoregolatoria. La coesistenza di lesioni macro e micro vascolari determinano ipossia tissutale e quindi rallentano la proliferazione dei fibroblasti e la neoangiogenesi.

I farmaci più coinvolti sono:

- Glucocorticoidi
- , Anticoagulanti
- Antineoplastici
- Ciclosporina A
- Colchicina
- Penicillamina
- Solfato di Zinco (alte dosi).

In particolare, i glucocorticoidi rallentano la guarigione delle ferite con azione diretta, attraverso molteplici meccanismi: riduzione della risposta infiammatoria, inibizione della sintesi delle proteine e del collagene, aumento del catabolismo del collagene pre-esistente. Gli anticoagulanti, invece, interferiscono indirettamente nel processo di cicatrizzazione aumentando la probabilità di emorragie e della formazione di ematomi.

Carenze nutrizionali (Tabella 1)

Un bilancio azotato negativo rallenta la proliferazione dei fibroblasti, la produzione di matrice extracellulare, la risposta immunitaria umorale e rende meno efficace la fagocitosi.

<i>Carenza vitaminica</i>	<i>Conseguenze</i>
Vitamina A	Riepitelizzazione rallentata, ridotta sintesi collagene, aumentata suscettibilità alle infezioni
Vitamina C	Produzione di collagene instabile e soggetto a collagenolisi
Vitamina K	Difettosa produzione di alcuni fattori della coagulazione (II, VII, IX, X)

Tabella 1

Fattori locali

Infezione: rappresenta la più comune causa di prolungamento del processo di guarigione. Tutte le ferite sono contaminate dalla flora batterica tuttavia l'infezione diventa clinicamente manifesta solo quando i patogeni raggiungono un numero critico. I batteri allungano la guarigione attivando la via alternativa del complemento e ampliando la fase infiammatoria. Essi, inoltre, elaborano tossine e proteasi che possono danneggiare direttamente le cellule contigue. Da ultimo i batteri competono con i tessuti per l'ossigeno e l'acido lattico, che viene prodotto in condizioni di ipossia, favorisce la liberazione di enzimi proteolitici altamente lesivi. La presenza di abbondante tessuto necrotico, di ematomi e di corpi estranei sono condizioni predisponenti l'insorgenza di processi infettivi locali.

Tecnica chirurgica: sono di fondamentale importanza i seguenti aspetti:

- l'incisione
- la manipolazione dei margini deve essere delicata;
- la tensione del lembo deve essere adeguata
- la sutura non deve essere troppo stretta in quanto ciò favorisce l'ischemia e la necrosi tessutale. Il materiale di sutura deve avere caratteristiche tali da escludere una reazione da corpo estraneo.

Reazione da corpo estraneo: La presenza di un corpo estraneo nella ferita attiva la via alternativa del complemento e prolunga la fase infiammatoria. Le ferite contenenti corpi estranei sono caratterizzate da un basso pH e da una bassa PO₂, fattori che rallentano la guarigione.

Ischemia tessutale: L'ipossia locale riduce la resistenza alle infezioni e rallenta la proliferazione cellulare e la sintesi di collagene.

Gestione corretta del paziente

Una corretta gestione postoperatoria del paziente può ridurre la morbilità e favorire la guarigione. I fattori che devono essere controllati sono rappresentati dall'edema, il dolore, il sanguinamento e l'infezione.

- Controllo dell'edema e del dolore: applicazione di impacchi di ghiaccio per le prime 6/8 ore dopo l'intervento alternando 15-20 minuti di applicazione a tempi uguali di sospensione. Il tutto coadiuvato da farmaci antinfiammatori non steroidei come nimesulide, ketoprofene, paracetamolo.
- Controllo del sanguinamento: compressione della ferita con garza inumidita con acqua o soluzione fisiologica per 10-15 minuti.
- Controllo dell'infezione: sciacqui con collutorio a base di clorexidina con concentrazione 0,12% e 0,2 %, corretta igiene orale, il tutto coadiuvato da terapia antibiotica con penicilline o macrolidi (se il paziente è allergico alle prime) in caso di fattori che possano rallentare la guarigione o interventi che prevedono l'innesto di materiali alloplastici.

3. IL LASER

Laser è acronimo anglosassone di amplificazione della luce per emissione stimolata di radiazione. Si tratta di energia radiante emessa da un mezzo attivo che può essere un solido, un liquido, un gas o un semiconduttore. L'insieme di tutte le possibili frequenze delle radiazioni elettromagnetiche è definito spettro elettromagnetico. Le radiazioni elettromagnetiche sono onde elettromagnetiche caratterizzate da una *lunghezza d'onda* (distanza tra due picchi), da una *frequenza* (numero di oscillazioni nell'unità di tempo, Hertz) e da un'*ampiezza* (altezza del picco rispetto al valore medio) (Fig.12). Poiché la lunghezza d'onda e la frequenza di una radiazione sono inversamente proporzionali, tanto minore sarà la lunghezza d'onda, tanto maggiore sarà la frequenza e quindi l'energia trasportata.

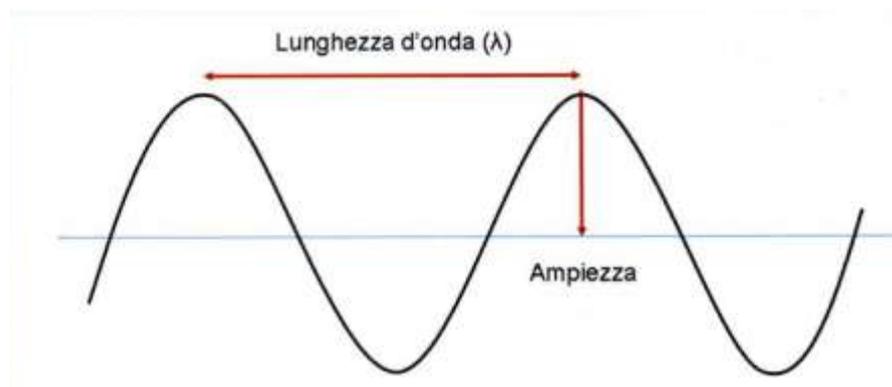


Figura 12 Rappresentazione schematica delle caratteristiche della radiazione elettromagnetica

Pur essendo lo spettro continuo, è possibile una suddivisione puramente convenzionale ed indicativa in vari intervalli o bande di frequenza, dettata a partire dallo spettro visibile. Quest'ultimo è la parte dello spettro elettromagnetico che cade tra il rosso e il violetto includendo tutti i colori percepibili dall'occhio umano. La lunghezza d'onda della luce visibile nell'aria

va indicativamente dai 380 ai 760 nm. Non contiene come si può pensare tutti i colori che l'occhio e il cervello possono distinguere: il marrone, il rosa, il magenta, per esempio, sono assenti, in quanto si ottengono dalla sovrapposizione di diverse lunghezze d'onda. Le radiazioni con una lunghezza d'onda inferiore a 380 nm sono denominate luce ultravioletta. Questa banda arriva fino a una lunghezza d'onda di circa 350 nm. Al di sotto della quale, si trovano i raggi X che si estendono fino a una lunghezza d'onda di circa 6 nm. La parte inferiore dello spettro si compone di raggi gamma. Dalla parte dello spettro, dove la luce ha lunghezza d'onda maggiore, cioè oltre il rosso, si trova la zona denominata infrarossa. Quest'ultima va da 0,7 μm a 0,4 mm. Quindi, è presenta la zona delle microonde, con lunghezze d'onda da 0,4 mm a 100 cm. Oltre a questa, vi sono tre campi di onde radio: onde corte da 1 m a 100 m; onde medie da 200 m a 600 m; onde lunghe superiori a 600 m. Le onde radio possono essere generate da scariche che producono onde elettromagnetiche. Le radiazioni adottate dal laser sono le radiazioni infrarosse. In Fig.13 è rappresentato lo spettro elettromagnetico.

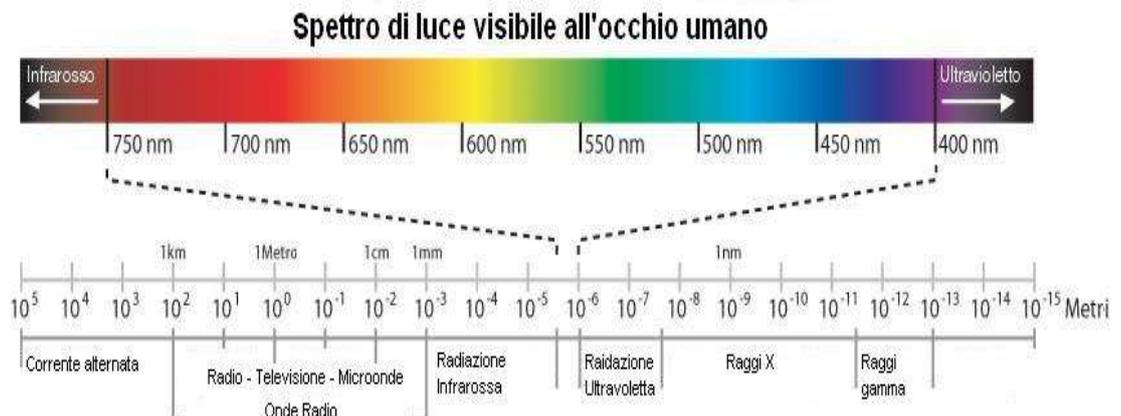


Figura 13 Spettro elettromagnetico

3.1 PRINCIPIO FISICO E STRUTTURA DEL LASER

Il fenomeno fisico sul quale si base il suo funzionamento è quello dell'emissione stimolata, enunciato da A. Einstein nel 1917 e preso in considerazione, a livello applicativo, negli anni '50 nell'ambito della ricerca sugli orologi atomici, che portò alla realizzazione del primo MASER (Microwave - Amplification - by Stimulated - Emission - of Radiation) ad ammoniaca. I fotoni emessi hanno le medesime caratteristiche dei fotoni incidenti in direzione e frequenza e viaggiano in fase coi fotoni stimolatori, ovvero, come onde elettromagnetiche, non c'è sfasamento tra le onde che stimolano l'emissione e le onde emesse. Questo fenomeno prende il nome di emissione per stimolazione (Fig.14).

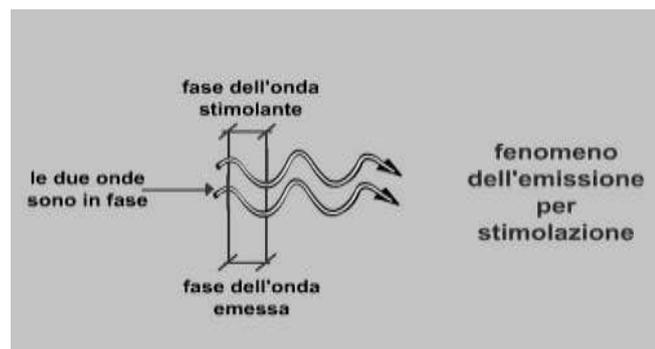


Figura 14 Emissione per stimolazione

Perché ci sia l'emissione laser c'è bisogno di due componenti: un mezzo attivo (aggregato atomico solido, liquido, gassoso o semiconduttore) e un meccanismo di pompaggio o energia incidente (elettrica, chimica, luminosa o laser) che eccita il mezzo attivo e provoca l'emissione stimolata di fotoni. Il mezzo attivo è confinato in una struttura detta "risonatore ottico" che consente ai fotoni emessi di innescare la stimolazione e generare il fascio laser, il risonatore presenta 2 specchi al suo interno. In Fig.15 sono rappresentati i componenti strutturali di un laser.

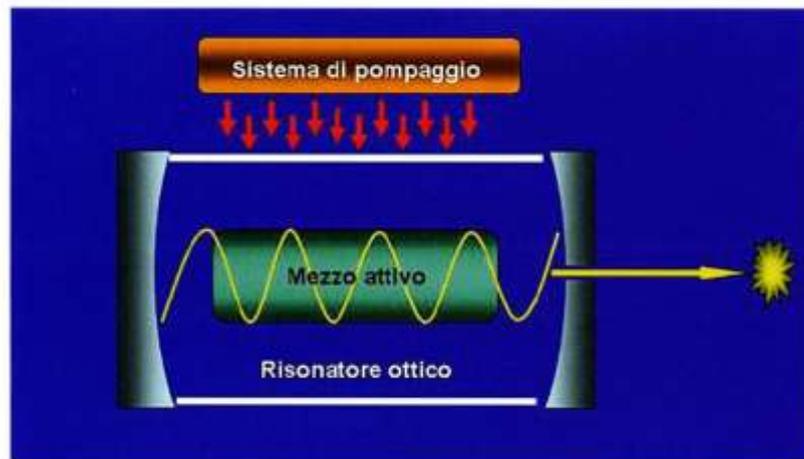


Figura 15

I fotoni, passando vicino agli atomi eccitati, producono il decadimento degli elettroni dall'orbita instabile a maggiore energia, a quella stabile a energia inferiore con conseguente emissione di altri fotoni, tutti rigorosamente della stessa frequenza e della stessa fase, che vengono anche loro costretti a oscillare in avanti e indietro fra i due specchi. Raggiunta una certa intensità, i fotoni riescono ad uscire dallo specchio semitrasparente (1%) in un unico raggio perfettamente monocromatico e in fase, perché generato dall'emissione stimolata di atomi tutti assolutamente eguali, e perfettamente rettilineo, perché prodotto dopo un innumerevole numero di oscillazioni in linea retta che ne garantiscono la direzione rettilinea.

I mezzi attivi possono essere solidi, l'erbio e il neodimio, ad esempio, hanno come mezzo attivo una barretta di vetro o cristallo che contiene gli atomi drogati (o ioni dopanti) che danno luogo all'emissione stimolata costituita da flash di luce sul materiale attivo. Se gassosi, come il laser a CO₂, si ha una miscela di gas che fluisce in un tubo dove ha luogo la scarica elettrica che provoca l'emissione laser. Se il mezzo attivo è semiconduttore (laser a diodi) gli atomi fanno parte di un reticolo cristallino e vengono stimolati da una corrente elettrica. Le lunghezze d'onda maggiormente utilizzate in odontoiatria sono 808/810nm e 980nm.

3.2 PROPRIETA' DELLA LUCE LASER

Unidirezionalità

La luce Laser si propaga in una direzione ben definita, a differenza della luce di una normale lampadina a incandescenza che emette luce in tutte le direzioni.

Monocromaticità

La radiazione laser presenta sempre una stessa frequenza mentre una lampadina a incandescenza emette radiazione composta da fotoni di energie differenti (Fig.16).

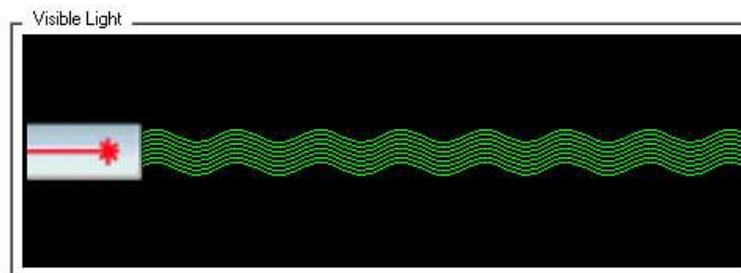


Figura 16

Coerenza

La proprietà di unidirezionalità dei fasci laser è legata alla coerenza spaziale ed è una conseguenza della struttura della cavità risonante del laser formata da due specchi paralleli che creano in uscita un fascio di fotoni con direzione esattamente perpendicolare alla loro superficie (Fig.17).

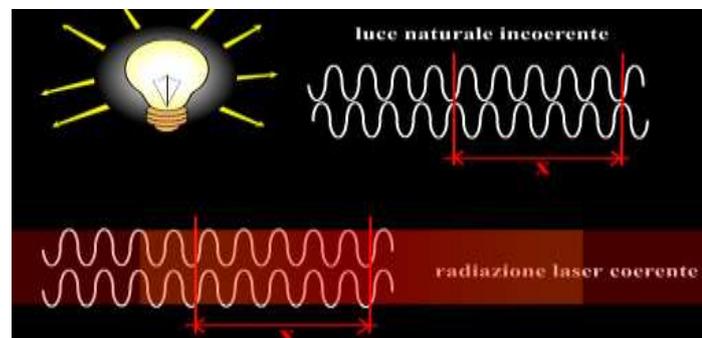


Figura 17

I parametri fondamentali della luce laser sono:

- la lunghezza d'onda espressa in nanometri
- la potenza, cioè l'energia nell'unità di tempo espressa in Watt
- la fluenza (densità di energia), cioè l'energia per unità di superficie
Joule/cm²
- la densità di potenza, cioè l'energia per unità di tempo (potenza) e di
superficie espressa in Watt/cm².

Il laser può operare in regime a *emissione continua* o in regime *pulsato*. Nel primo caso l'energia radiante viene rilasciata dall'operatore con un flusso regolare che può essere interrotto in qualsiasi momento.

Nel secondo caso l'emissione avviene tramite impulsi che si ripetono nel tempo con una frequenza e un duty cycle modificabile. Si valutano due parametri fisici dell'impulso: il numero di impulsi per secondo (la frequenza) e la lunghezza dei singoli impulsi (time on) in rapporto alla pausa tra un impulso e quello successivo (time off). L'emissione pulsata ha due vantaggi clinici importanti:

- consente (durante il time off) il rilassamento termico (tipico del tessuto 50 ms), e quindi un non accumulo di calore da parte dei tessuti (minore insulto chirurgico);
- consente di lavorare senza l'impiego di anestesia.

MEZZI DI TRASPORTO DELLA LUCE LASER

Ogni laser possiede un sistema di trasmissione che deve soddisfare due esigenze fondamentali:

- conservare una potenza radiante nel punto di applicazione, quanto più simile a quella della fonte di emissione;
- essere maneggevole.

Il mezzo ideale per la trasmissione laser è la fibra ottica, anche se non tutte le lunghezze d'onda viaggiano in maniera ottimale in questo mezzo; le fibre in silice permettono di veicolare bene le lunghezze d'onda del diodo, le fibre dei fluoruri si adattano a veicolare le lunghezze d'onda tipiche del laser ad erbio, le fibre policristalline sono adoperate per veicolare onde elettromagnetiche ad alta frequenza come quelle del laser CO₂. Particolare importanza ricopre il diametro delle fibre, poiché diminuendo si assiste ad un aumento dell'intensità di energia dovuta alla maggior concentrazione del fascio.

3.3 IMPATTO LUCE LASER SUI TESSUTI

La luce laser si comporta come qualsiasi radiazione elettromagnetica e la caratteristica più importante dal punto di vista clinico è l'assorbimento della luce da parte dei tessuti. L'assorbimento può essere selettivo quando riguarda pigmenti sensibili alla lunghezza d'onda del raggio laser utilizzato, oppure non selettivo come quello dell'acqua che è il più grande assorbitore di energia nella regione spettrale dell'infrarosso. Il raggio laser che incontra un tessuto non affine alle sue caratteristiche viene *riflesso* dalla superficie e i fotoni possono colpire la retina dell'occhio per cui appare fondamentale difendere le strutture oculari con appositi occhiali filtranti la lunghezza d'onda specifica del laser. Se il raggio si espande a livello tissutale con decremento della densità energetica si parla di *diffusione*, proprietà sfruttata per la polimerizzazione delle resine e per lo sbiancamento dei denti. Se il raggio laser attraversa il tessuto senza danneggiarlo fino al bersaglio prestabilito, si parla di *trasmissione*, fenomeno particolarmente utile in Oftalmologia. La selettività del laser è data nella capacità di alcuni costituenti tissutali, i cromofori, di assorbire in modo specifico alcune lunghezze d'onda. I cromofori biologici essenziali sono l'acqua, l'emoglobina, l'ossiemoglobina, la melanina e numerose altre costituenti come coenzimi, citocromi che ne giustificano l'azione a livello biochimico. La capacità di un laser di interagire con un determinato tessuto dipende dalle caratteristiche ottiche di quest'ultimo, ossia dalla presenza e

concentrazione di cromofori e del loro spettro di assorbimento. Alcuni cromofori sono assorbiti nell'ultravioletto come acidi nucleici (DNA, RNA), amminoacidi, proteine; i tetrapirroli macrociclici (emoglobina, mioglobina, catalasi, citocromo) e lineari (acidi biliari), le flavine, la melanina sono assorbiti nello spettro visibile, l'acqua, la melanina, l'emoglobina nell'infrarosso, come presentato nella Fig. 18:

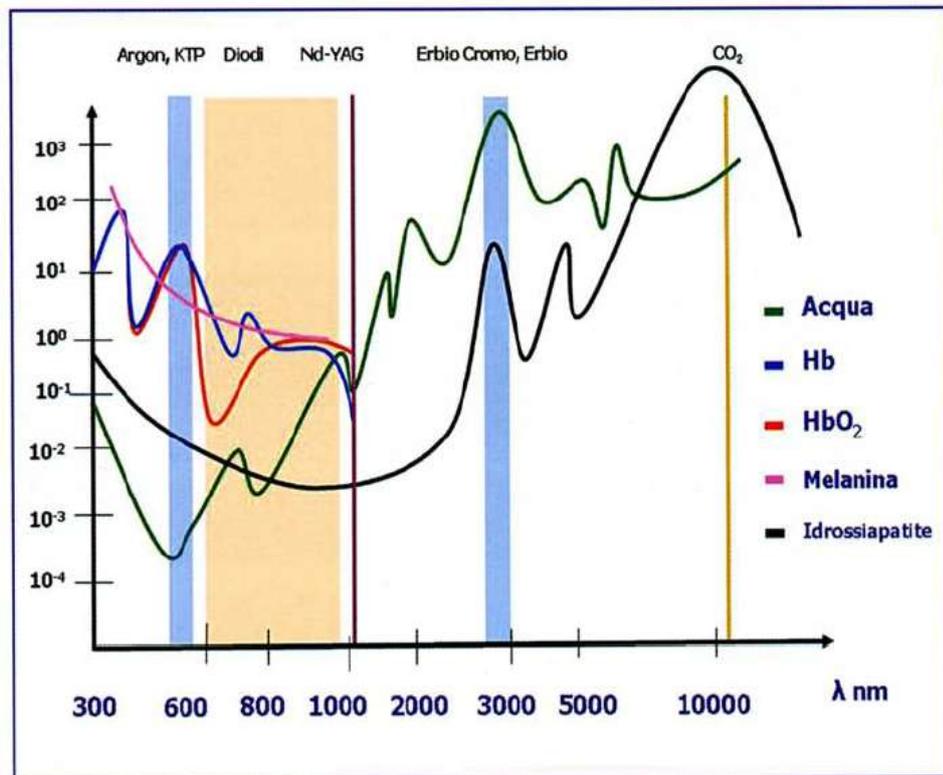


Figura 18

Per cui un tessuto fibroso, bianco esangue risulta trasparente alla lunghezza d'onda di un laser a diodi che emette a 810 nm, mentre un laser all'Erbio o CO₂ grazie all'affinità con l'acqua ha il bersaglio ideale nei tessuti idratati.

Gli effetti dell'emissione del laser sui tessuti sono determinati da vari fattori:

- 1) lunghezza d'onda dell'energia radiante
- 2) potenza applicata
- 3) tempo di interazione
- 4) angolo di incidenza
- 5) distanza dal campo di applicazione
- 6) tipo di tessuto da trattare e relativo coefficiente di assorbimento

1) Lunghezza d'onda

All'interno dello spettro elettromagnetico, raggi gamma (frequenze elevate) e onde radio (frequenze basse), sono collocate le radiazioni visibili ed invisibili che riguardano le emissioni laser. La maggior parte dei laser si trovano nel campo dell'infrarosso (Diodi, CO₂, ed Erblio). Ogni tessuto ha un suo coefficiente di assorbimento ottimale in relazione alla lunghezza d'onda. Il sangue ha 960 nm (prossimo ai 980nm dei diodi), l'osso ha 1064 nm (nd-YAG) la dentina 1053 nm (prossimo al nd-YAG) lo smalto 1053. Tessuti ad alto contenuto acquoso assorbono bene radiazioni a lunghezze d'onda elevate come l'erbio e il CO₂.

2) Densità di potenza

Se la potenza esprime la quantità di energia per unità di tempo, la densità di potenza è l'energia che, per un certo tempo, incide sull'unità di superficie perpendicolare al fascio di radiazione. Per esempio, se 2 W vengono portati da una fibra di 200 micron o da una fibra di 600, gli effetti sul tessuto sono assolutamente diversi pur mantenendo costante il tempo di irradiazione.

3) Tempo di interazione

È un parametro fondamentale per stabilire gli effetti della radiazione sui tessuti. Si deve trovare, per ogni occasione, il rapporto giusto di energia/tempo di esposizione per ottenere l'effetto desiderato sul tessuto obiettivo terapeutico

senza coinvolgere il tessuto adiacente. Due sono gli strumenti operativi per ridurre i tempi di irraggiamento: movimento del terminale del manipolo e pulsazione dell'irraggiamento, il primo strumento empirico, il secondo strumento impostabile dal software del laser.

4) Angolo di incidenza

Man mano che ci si allontana dall'angolo di 90° gradi dalla superficie da irradiare, si diminuisce la densità di potenza del raggio laser. Si aumenta infatti la riflessione dell'emissione elettromagnetica e diminuisce la diffusione e l'assorbimento della stessa.

5) Distanza dal campo di applicazione

Allontanandosi dal campo di applicazione si ha una defocalizzazione del raggio, il che diminuisce la quantità di energia irradiata al tessuto.

In Fig. 19 sono rappresentati gli effetti della densità di potenza e del tempo sui tessuti

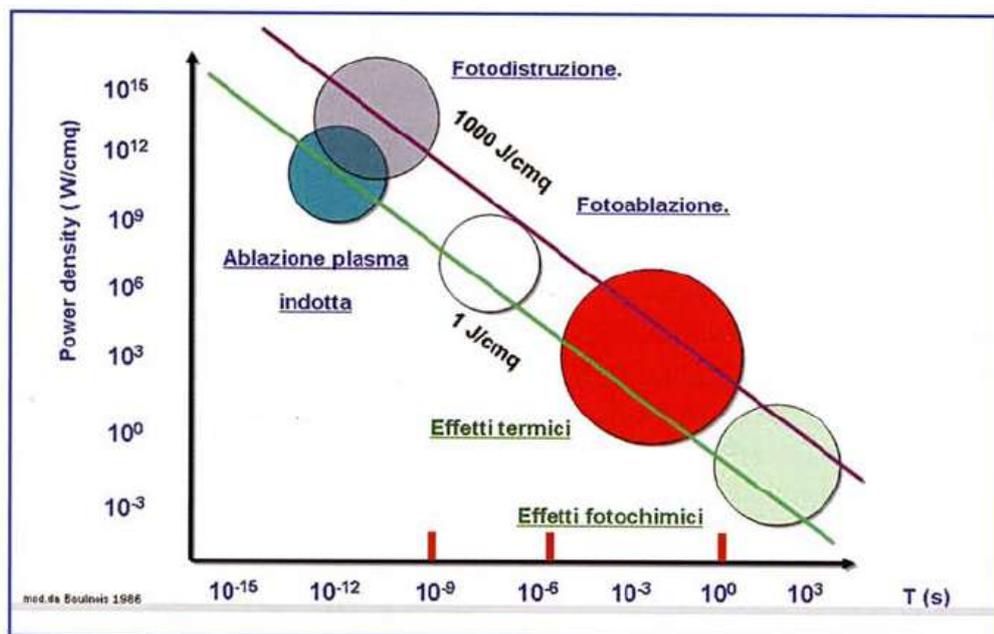


Figura 19

3.3.1 Interazione termica

Si ha interazione termica quando la durata dell'impulso laser va dai 10^{-3} ai 5 secondi. Per ottenere tale effetto si utilizza l'estrema concentrabilità dell'energia luminosa in spot micro o millimetrici con una conseguente conversione di energia elettromagnetica in energia termica. Da un punto di vista microscopico si ha:

- assorbimento di un fotone da parte di una molecola
- transizione della molecola in uno stato eccitato, ossia a maggior energia
- diseccitazione della molecola per urto anelastico con le molecole circostanti, con aumento della loro energia cinetica

Questo determina un aumento della temperatura locale.

Da un punto di vista macroscopico, si producono effetti biologici differenti a seconda dei processi termodinamici a cui corrispondono le principali modificazioni istologiche (Tabella 2)

<i>Temperatura</i>	<i>Effetto</i>
43°C-45°C	Ipertermia, cambiamenti conformazionali delle cellule
50°C	Riduzione dell'attività degli enzimi, immobilità cellulare, inibizione fenomeni riparativi
60°C	Denaturazione proteine e collagene, coagulazione, necrosi cellulare
80°C	Permeabilizzazione membrane, alterazioni biochimiche irreversibili
100°C	Vaporizzazione e ablazione, formazione di vacuoli di vapore, disidratazione
>100°C	Carbonizzazione

Tabella 2

- le temperature intorno ai 44°C determinano la denaturazione di aggregati biologici (lipidi, proteine, collagene) dovute ad alterazioni delle strutture cellulari e dei legami molecolari (idrogeno); queste alterazioni possono essere in parte reversibili con tempi di esposizione non prolungati. La proprietà denaturante a queste temperature viene sfruttata per il trattamento delle cellule tumorali molto sensibili al regime ipertermico di questo tipo

- Per temperature superiori (50°C) inizia la denaturazione molecolare degli aggregati precedentemente citati

- A 60° le cellule vanno incontro a collasso coagulativo con scioglimento delle proteine. Il collagene è una proteina fibrosa largamente diffusa e svolge una funzione di supporto del tessuto connettivo e delle pareti dei vasi sanguigni. È formato da fibre costituite da fibrille, organizzate in modo diverso a seconda la funzione biologica del tessuto connettivo. Le fibrille sono costituite da subunità polipeptidiche chiamate tropocollagene e disposte testa contro coda in fasci paralleli. Le molecole di tropocollagene così formate si associano con disposizione sfalsata generando le fibre di collagene. L'aumento di temperatura distrugge l'organizzazione spaziale delle catene macromolecolari, e le spire si distribuiscono in modo casuale, con forti cambiamenti negli spettri di assorbimento e di diffusione della radiazione ottica. Questa transizione è accompagnata anche da una contrazione strutturale delle fibre di collagene. Il processo di denaturazione produce la *coagulazione* del tessuto, che si manifesta all'osservazione visiva con uno sbiancamento della superficie irradiata.

- A 80° si ha la permeabilizzazione delle membrane con alterazioni biochimiche irreversibili

- A 100° C inizia la vaporizzazione e il disseccamento dei tessuti dovuto alla perdita di liquidi. E con temperature >100°C si ha la carbonizzazione.

In genere diversi effetti termici si producono contemporaneamente nel tessuto biologico in dipendenza dei parametri laser impiegati (Fig. 20)

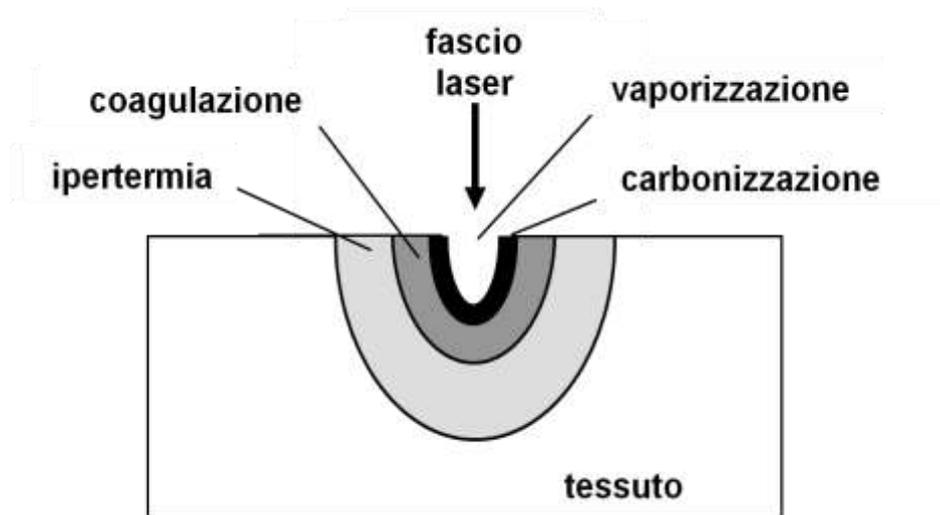


Figura 20 Effetti termici durante l'interazione del fascio laser con i tessuti

Un ruolo importantissimo nello studio dell'interazione termica è rivestito dall'acqua che è presente abbondantemente in quasi tutti i tessuti biologici. Essa ha un picco di assorbimento intorno ai 3000 nm e un ottimo assorbimento in tutto l'infrarosso. Per sfruttare tale assorbimento si utilizzano laser a CO₂ (10600 nm) o Nd:YAG (1064 nm). Il primo è utilizzato per incidere i tessuti con incredibile precisione e minimo danno; infatti l'effetto termico, oltre a permettere l'utilizzo del laser al posto del tradizionale bisturi, possiede un effetto emostaticizzante nei confronti dei piccoli vasi sanguigni che consente di effettuare interventi più puliti e meno invasivi. Il secondo ha una profondità di penetrazione più elevata che va oltre il centinaio di mm (mentre per il CO₂ è di circa 20-30 mm) ed è quindi in grado di agire in profondità nei tessuti connettivi; tale laser viene impiegato per la distruzione tramite vaporizzazione di alcuni tumori (infatti il laser Nd:YAG a questa lunghezza d'onda può sfruttare grosse erogazioni di potenza che vanno fino a 100W). Un altro laser come quello ad argo viene assorbito fortemente dall'emoglobina e viene utilizzato per la coagulazione sottocutanea delle lesioni. Tale schema è anche alla base di molte tecniche terapeutiche utilizzate per la cura dei tumori. Una di

queste è la necrosi selettiva dei tessuti: tramite un laser lanciato in fibra è possibile portare endoscopicamente la radiazione nella massa tumorale.

La lunga durata degli impulsi (che arriva fino a qualche secondo) comporta un danno termico ai tessuti sani dovuto alla diffusione della radiazione nel sito operatorio. A questo scopo è stata determinata una relazione che determina la distanza L alla quale si ha danno del tessuto, è in funzione del tempo di esposizione:

$$L^2 = 4K\tau$$

dove τ è la durata dell'impulso e K un coefficiente che tiene conto delle caratteristiche del tessuto. Ogni componente tissutale è caratterizzato dal *tempo di rilassamento termico*, ossia il tempo necessario affinché venga disperso il 50% del calore accumulato. Un impulso di durata inferiore al tempo di rilassamento termico mantiene l'energia confinata al bersaglio, un impulso più lungo permette la diffusione del calore alle aree circostanti, oltre a quella di irradiazione.

3.3.2 Interazione elettromeccanica

Quando un laser è superpulsato e la durata del singolo impulso è dell'ordine dei nano secondi, si verificano processi legati alla pressione di picco elevato per una propagazione dell'onda supersonica. L'effetto della radiazione è enormemente distruttivo e porta a fenomeni di *ablazione, frammentazione e distruzione cellulare*. Dato che il processo di irraggiamento si conclude in tempi eccezionalmente brevi, il danno termico ai tessuti circostanti è molto vicino allo zero. Nella zona colpita dal fascio si ha quindi un'alta densità di elettroni liberi. Tipico utilizzo di tale fenomeno si ha in campo oftalmico. Infatti si possono effettuare interventi di rimozione tissutale internamente al bulbo oculare senza doverlo incidere (ad esempio per la cura di alcune retinopatie o per la rimozione di tessuti opachi che si formano nella cornea dopo interventi alla cataratta). Più recentemente l'utilizzo di tale tecnica si è

esteso alla cura delle patologie riguardanti la formazione dei calcoli (in pratica si frantumano i calcoli grazie alla pressione generata dall'onda d'urto del plasma) e per alcune patologie cardiovascolari (rimozione di trombi nei piccoli vasi). In questi ultimi casi l'onda d'urto porta alla rapida vaporizzazione dell'acqua contenuta nei calcoli o nei trombi con una successiva esplosione locale di tali materiali.

3.3.3 Interazione chimica

A bassa densità di potenza si possono avere degli effetti validi dal punto di vista terapeutico per quanto riguarda l'interazione del raggio laser con particolari cromofori endogeni (emoglobina e melanina) o esogeni (fotoinduttori realizzati per la cura di malattie come la psoriasi, l'ittero e il cancro). Questo tipo d'interazione è provocato dall'esposizione dei tessuti ad impulsi laser che vanno dai 10 nsec ai 100 µsec. La differenza sostanziale rispetto all'effetto termico e a quello fotomeccanico sta nel fatto che l'interazione fotochimica avviene grazie ai tessuti fotosensibili presenti nell'organismo umano. In altri termini grazie alla presenza nei tessuti di cromofori e pigmenti (o altre sostanze fotosensibili inserite nell'organismo) si ha una selettività del bersaglio che non si osserva negli altri tipi d'interazione. La reazione avviene a livello chimico: l'energia trasmessa dalla radiazione induce un mutamento delle macromolecole biologiche (trasformazione fotochimica) che produce un isomero (stessa molecola con diversa struttura) o una nuova molecola. Esistono due diverse modalità d'interazione fotochimica entrambe molto utilizzate in medicina: la fotosensibilizzazione e la fotoablazione.

La *fotosensibilizzazione* è un processo che sfrutta la fotoattivazione di alcune molecole provocato dalla radiazione luminosa. Tale tecnica viene largamente utilizzata nella cura dei tumori e viene chiamata "terapia fotodinamica" (PDT). Per esempio l'utilizzo delle porfirine, sostanze fotosensibili che assorbono in

varie zone spettrali. Largamente utilizzata è l'ematoporfirina che assorbe intorno ai 400 nm. Tale sostanza viene iniettata nel paziente e si accumula maggiormente nei tessuti tumorali. Tali tessuti vengono dunque irradiati da luce laser, l'ematoporfirina assorbe la radiazione passando ad uno stato eccitato e la riemette quasi istantaneamente; l'energia ritrasmessa viene assorbita dalle molecole di ossigeno che passano ad uno stato molto reattivo: si ha la formazione di radicali liberi che, legandosi alle pareti lipidiche e agli acidi nucleici, aggrediscono e uccidono le cellule tumorali. Questa terapia determina un minimo danno termico ai tessuti sani e un basso rischio di perforazione di organi cavi. L'inconveniente principale sta nel fatto che il paziente sottoposto a sostanze fotosensibilizzanti deve passare lunghi periodi (4-6 settimane) in assenza di luce per evitare la formazione di radicali liberi nell'organismo. Per risolvere questo problema si stanno studiando nuove sostanze fotosensibili che vengano smaltite più rapidamente dall'organismo.

La *fotoablazione* è il secondo tipo d'interazione fotochimica. Molte biomolecole assorbono fortemente nella banda UV (200-320 nm); tali forti assorbimenti (per impulsi di durata di 15 nsec) comportano una dissociazione molecolare localizzata. I laser più utilizzati in questo tipo di terapia sono quelli che emettono principalmente nella banda UV; quindi laser ad eccimeri (ArF: 193nm, KrF: 248 nm) e Nd:YAG quarta armonica (266 nm), quest'ultimo eccellente per i tagli ad alta precisione.

3.4 CLASSIFICAZIONE DEI LASER A USO MEDICO

Laser a diodi

Hanno come mezzo attivo un semiconduttore composto da Gallio, Arseniuro e Alluminio. La lunghezza d'onda varia nell'ambito dell'emissione infrarossa invisibile da 808 nm a 980nm, ciò lo rende estremamente efficace per le molecole di emoglobina e melanina; quindi, ciò significa che nel cavo orale la radiazione a 808-980nm viene ben assorbita dai tessuti essendo la mucosa molto irrorata e ricca di emoglobina. Le potenze usate in odontoiatria vanno da pochi mW fino a 10 W. L'emissione della radiazione può essere continua o pulsata (il time on si esprime in millisecondi). Il laser a diodi si avvale di una fibra di vetro di diametri che vanno da 200 a 600 Micron. E' interessante studiare a fondo la funzione del cromoforo esogeno (sostanze colorate che rendono sensibili i tessuti alla luce dei diodi) sul tessuto molle e duro (dente). A tal fine possono essere usati il liquido di Zill, l'inchiostro indiano, sostanze iodate (betadine) o soluzione antibiotica pigmentata. Il cromoforo agisce da potenziatore, aumenta l'assorbimento e la velocità di azione dando la possibilità di ridurre la potenza.

Il laser ha il pregio della grande precisione, affidabilità e visibilità del campo operatorio poiché il controllo dell'emostasi è decisamente elevato senza che il tessuto subisca un danneggiamento da propagazione incontrollata del calore. La punta del laser deve essere usata sempre in movimento per impedire l'accumulo di energia puntiforme. E' consigliabile usare in prossimità di strutture delicate come quelle parodontali la modalità di emissione pulsata. La guarigione dei tessuti è molto più veloce in regime pulsato. In questo caso l'operatività subisce un leggero rallentamento. Il laser a diodi è indicato per la chirurgia; per rimodellare gengiva ipertrofica (in conservativa) o in protesi, oppure in implantologia. L'emostasi del laser 980 nm è conseguente all'accentuata affinità della radiazione all'emoglobina e non all'azione

cauterizzante tipica dell'elettrobisturi. Ciò significa che l'insulto tissutale è nullo, la guarigione è rapida e priva di inconvenienti per il paziente. Sono altresì indicati interventi chirurgici di incisioni di ascessi, fibromi della guancia e del labbro, emangiomi, frenulectomie. Il laser può essere adottato anche con azione desensibilizzante che vetrifica la dentina, per decontaminare ed eliminare l'epitelio della tasca e con azione biostimolante per favorire la guarigione delle ferite.

Nd:YAG

E' sicuramente il laser più versatile per la gamma di frequenze e per l'utilizzo endoscopico. Frequenze di emissione sono 1064 nm, 532 nm (seconda armonica), 266 nm (quarta armonica), 1320 nm. E' assorbito fortemente dall'acqua (1060 nm e soprattutto 1320 nm), dall'emoglobina (532 nm), dalla cornea (532 e 266 nm). Si utilizza per la coagulazione in profondità, per la distruzione termica di masse tumorali, nella chirurgia vascolare, nella chirurgia generale, nella chirurgia oftalmica (effetto fotomeccanico).

CO2

È uno dei laser più utilizzati grazie al forte assorbimento da parte dell'acqua (processo termico). La frequenza di emissione è di 10600 nm, si usa per la coagulazione superficiale, chirurgia generale (come bisturi), nella terapia termica di alcuni tumori, in ginecologia, per la cura di lesioni virali, in urologia neurochirurgia. Questo laser controlla perfettamente il sanguinamento con diminuzione dell'edema post-chirurgico poiché oblitera i vasi sanguigni con meno di 1 mm di diametro e i capillari linfatici. Ha capacità battericida, fungicida e virucida.

Erbio e Olmio

Frequenze di emissione: 2060 nm (olmio), 2940 nm (erbio). Sono assorbiti fortemente da acqua, sclera dell'occhio. Modalità di utilizzo è pulsata. Il forte

assorbimento da parte dell'acqua li rende importanti per l'effetto termico. Inoltre sono facilmente trasportabili in fibra il che li rende utili per tagli e perforazioni estremamente regolari (fotoablazione). Sono utilizzati per la chirurgia filtrante di alcuni tipi di glaucoma. Il laser erbio interpone delle molecole di acqua tra il raggio e il tessuto; la lunghezza d'onda ha un alto coefficiente di assorbimento anche per l'idrossiapatite e questo permette un effetto ablativo sui tessuti duri (smalto e dentina). L'ablazione deriva dalla microesplosione di molecole d'acqua genera una pressione elevata che rimuove il tessuto duro (capacità ablativa dell'acqua). L'effetto termico altresì provoca una rapida evaporazione dei tessuti ricchi di acqua come quelli cariosi e preserva l'idrossiapatite sana dalla fusione dei tubuli; infatti i tubuli dentinali restano aperti anche in virtù della cinesi idrica dello strumento laser. E' un laser che ha la capacità di taglio di tessuti duri quali dentina, smalto, cemento e osso ricchi di acqua; in aggiunta ha la capacità di taglio anche dei tessuti molli (senza avere la proprietà emostatica di diodi e CO₂).

Argo

Ha una frequenza di emissione da 488nm a 514.5 nm. E' assorbito fortemente dall'emoglobina e viene usato in modalità pulsata (per ottenere effetto termico). Si adotta per la fotocoagulazione e utilizzo oftalmico (patologia della retina nella regione maculare con minimo danno alle strutture sovrastanti la retina).

Laser a eccimeri

Ha una frequenza di emissione nello spettro UV ed è assorbito fortemente dallo stroma corneale e dai polimeri organici. Si usa perlopiù per l'ablazione dello stroma corneale in chirurgia refrattiva e ablazioni tissutali di grande precisione.

3.5 LOW LEVEL LASER THERAPY (LLLT)

I nomi per identificare e differenziare i laser terapeutici da quelli chirurgici sono soft, cold, terapia laser a bassa intensità e LLLT. I laser terapeutici sono classificati come dispositivi medici della classe III, mentre quelli chirurgici sono classificati come classe IV. La low level laser therapy (LLLT) può essere eseguita con varie lunghezze d'onda (600-1100 nm) e unità con diverse potenze, i laser chirurgici possono essere defocalizzati e usati a bassa energia per questa metodica[35]. Il primo laser di questo tipo, presentato in una conferenza stampa organizzata presso la Hughes Aircraft Laboratory di Los Angeles, il 7 luglio 1960, è stato un laser a rubino, con una lunghezza d'onda di 694 nm ed emissione di luce pulsata. Il laser a rubino è stato anche il primo ad essere utilizzato nella ricerca sulla biostimolazione a metà degli anni '60[36]. Successivamente è stato sviluppato il laser He-Ne (Elio e Neon), un laser a gas con una lunghezza d'onda di 632,8 nm e una potenza da 1 a 5 mW. Questo laser è stato utilizzato prevalentemente nell'Europa dell'Est e in Cina nella seconda metà degli anni 1970. Negli anni '80 sono stati creati i laser a diodi come il laser a diodi GaAs (arseniuro di gallio, 904 nm e 1-4 mW); il laser GaAlAs (gallio-alluminio-arseniuro; 780-890 nm) in origine concepito con una potenza da 10 a 30 mW, alla fine degli anni '90 è stato descritto fino a 500 mW. Il laser InGaAlP (indio-gallio-alluminio-fosforo, 630-700 nm e 25-50 mW) offre un'alternativa al laser He-Ne per la guarigione della ferita superficiale.

LLLT utilizza un'onda continua o pulsata con densità di energia relativamente bassa ($0,04-50 \text{ J/cm}^2$), diretta nel tessuto bersaglio o monostrato di cellule con potenze misurate in milliwatt (mW). LLLT non emette calore, suono, o vibrazioni. Non si hanno reazioni termiche perché non vi è alcun aumento immediato della temperatura nel tessuto irradiato, Hrnjak e colleghi [37] hanno dimostrato che l'aumento del calore del tessuto bersaglio dopo LLLT è trascurabile ($\pm 1^\circ \text{ C}$), anche altri ricercatori hanno confermato che la

temperatura è rimasta invariata in sospensioni fibroblasti durante l'irraggiamento LLLT[38][39]. In contrasto, i laser ad alta energia (ad esempio, i laser CO₂ e ND-YAG laser) sono in grado di aumentare la temperatura del tessuto abbastanza da tagliare e vaporizzare gli stessi.

3.5.1 Aspetti Biologici

Il principio dell'uso LLLT è quella di fornire energia biostimolante alle cellule dell'organismo. I fotorecettori cellulari sono in grado di assorbire luce laser a bassa intensità e di trasmetterla ai mitocondri per la produzione di ATP. L'ATP aumenta la concentrazione di calcio intracellulare [40][41], regola la sintesi proteica, la sintesi di DNA, l'attivazione di ERK1/ ERK2, proteine fondamentali nella proliferazione cellulare. È stato riportato che LLLT, infatti, attiva specificamente MAPK / ERK e di conseguenza induce la proliferazione delle cellule satellite [42]. Quest'ultima è un effetto fisiologico molto importante, poiché la proliferazione delle cellule, si svolge attraverso l'attivazione della catena respiratoria mitocondriale e l'avvio dei segnali cellulari con modificazioni delle proprietà redox e l'accelerazione del trasferimento di elettroni, l'ossido nitrico (NO) viene rilasciato dal centro catalitico del citocromo C, si ha la produzione di superossido (Fig.21).

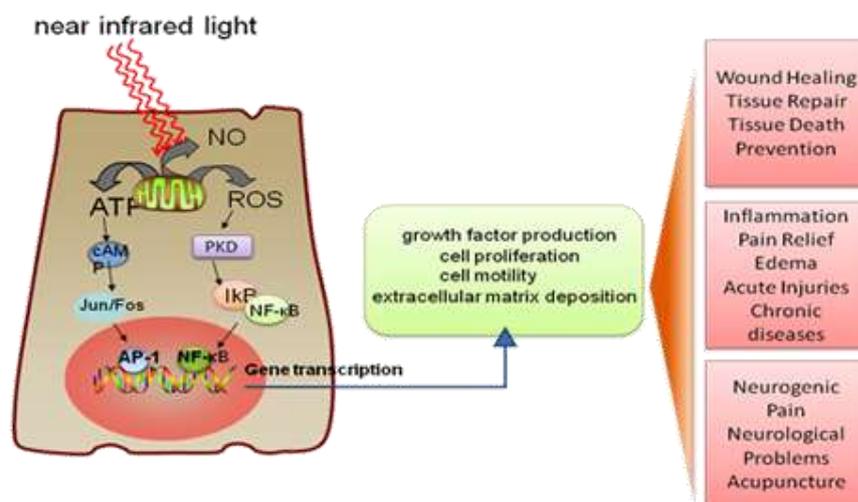


Figura 21 Rappresentazione schematica degli effetti di LLLT

I principali effetti biologici stimati di LLLT sono la guarigione delle ferite, la sintesi del collagene, la rigenerazione nervosa, un miglior rimodellamento e riparazione ossea, l'attenuazione del dolore, la stimolazione del rilascio di endorfine e la modulazione del sistema immunitario [43][44]. Il beneficio del trattamento più comunemente descritto di LLLT è la guarigione delle ferite. Già gli studi di Mester e colleghi [45] mostrarono la presenza di fibrille di collagene accumulate e vescicole dense presenti nel citoplasma nei fibroblasti trattati con il laser rispetto alle zone non trattate. Inoltre, si è notato un aumento della riproduzione cellulare e dei livelli di prostaglandine dopo l'irradiazione. L'influenza sul dolore è stato anche spiegato dall'effetto LLLT sulla sintesi migliorata di endorfine, dalla diminuita soglia del dolore delle fibre C [46]. La teoria più riconosciuta per spiegare gli effetti e i meccanismi dei laser terapeutici è la teoria fotochimica.

La biostimolazione avviene attraverso la catena di trasporto degli elettroni degli enzimi nei mitocondri, inducendo un'elevata respirazione cellulare che induce il metabolismo cellulare. L'effetto biostimolante induce un aumento della microcircolazione, osservata con l'arrossamento intorno alla zona di guarigione; durante la fase di trattamento iniziale, il paziente può sentire un transitorio formicolio. Questa situazione determina maggior sintesi di ATP, RNA e DNA, per cui maggior ossigenazione e nutrizione delle cellule.

Biostimolazione di cellule staminali

Le cellule staminali derivate dal midollo osseo (BMSCs) sono state utilizzate per il trattamento di molte malattie come l'osteogenesi imperfetta, la mucopolisaccaridosi, la graft-versus-hostdisease, e l'infarto del miocardio[47][48][49]. Grazie alla loro disponibilità e alla capacità di espansione, le BMSCs sono diventate una promettente fonte di cellule staminali adulte per la rigenerazione in medicina, Hou e colleghi [34]hanno voluto provare ad applicare la LLLT per migliorare il tasso di proliferazione delle BMSCs e i risultati non hanno mostrato una citotossicità della tecnica, ma

un tasso di proliferazione più alto nel gruppo irradiato rispetto a quello non irradiato. Le BMSCs possono essere differenziate in osteoblasti, condrociti, adipociti, mioblasti, cellule neurali in presenza di un microambiente adatto [50]. È stato anche riportato che LLLT sugli osteoblasti stimola la produzione di matrice, la sintesi del DNA e la formazione di un nodulo osseo [51]. Tuby e colleghi [52] hanno irradiato cellule staminali cardiache e hanno notato un aumento significativo rispetto al controllo. I ricercatori hanno applicato LLLT anche su altre cellule staminali come le cellule staminali della polpa dentale umana (hDPSCs) [33] dimostrando una risposta positiva al tasso di crescita rispetto al controllo. Ci sono studi anche su cellule staminali umane derivate dal tessuto adiposo che riportano aumenti nella proliferazione, in particolare del marker β 1-integrina che era presente in modo significativo nel gruppo irradiato.

3.5.2 Applicazioni Cliniche

LLLT è applicata in ambito dermatologico e medico oltre che odontoiatrico. In quest'ultimo ambito si può utilizzare per:

- Terapia postoperatoria: ridurre il dolore e fornire una guarigione più breve. Può essere applicato a molte procedure dentali quali la chirurgia orale, l'implantologia, la parodontologia non chirurgica e chirurgica, procedure endodontiche, chirurgia endodontica, protesi fissa e ortodonzia. Applicare le dosi di energia che dipendono da ogni laser sulle zone di interesse del cavo orale.
- Disordini temporo-mandibolari: il laser infrarosso sembra essere efficace per ridurre il dolore e la tensione nei muscoli masticatori, soprattutto in caso di trisma [53]. I muscoli sono stati trattati con un'energia da 6 a 10 J, in seguito si è notato un aumento del movimento. Un'interessante applicazione è il trattamento del tinnito, una condizione in cui è tipicamente colpito il muscolo pterigoideo laterale; l'irradiazione laser di questo e di altri muscoli coinvolti può portare ad una più rapida riduzione della tensione e dolore del sistema muscolare.

- Ipersensibilità dentinale: anche se in commercio sono presenti molti agenti desensibilizzanti, il trattamento di questa condizione nei casi più difficili appare importante. Kimura[54] ha dichiarato che se un dente ipersensibile non risponde a 4 a 6 J per radice in due o tre sedute è indicato per il trattamento endodontico. Lo schema occlusale deve essere valutato come parte del protocollo di trattamento.
- Stomatite herpetica: l'infezione da Herpes virus simplex è molto comune tra gli adolescenti e gli adulti. I sintomi possono variare da lievi a disagio dolore estremo. Laser a bassi dosaggi hanno dimostrato di avere un effetto simile all'Acyclovir[55] e di essere efficaci se somministrati nei periodi silenti, se applicato nella fase prodromica, tende a scomparire in 2 o 3 giorni con poco disagio, piuttosto che a 8-14 giorni. LLLT riduce anche la frequenza delle recidive e il tasso di recidiva[56], può essere applicato anche in caso di afte.
- Mucosite: i pazienti sottoposti a radioterapia chemioterapia tendono a sviluppare mucosite. La luce laser rossa ha dimostrato di ridurre la gravità della mucosite e può essere usato per la profilassi prima delle radiazioni. Il laser può anche trattare la dermatite indotta da radioterapia[57][58]
- Nevralgia del trigemino: è stato documentato che LLLT può avere un effetto antidolorifico sulla nevralgia del trigemino. In uno studio in doppio cieco, 16 pazienti sono stati trattati settimanalmente per 5 settimane; dopo questo periodo 10 pazienti erano liberi dal dolore, due con un dolore notevolmente inferiore; mentre quattro pazienti sono rimasti invariati. Ad 1 anno di follow-up, sei pazienti erano liberi dal dolore[59].
- Malattia parodontale: l'uso di LLLT aiuta a controllare i sintomi e la condizione della malattia parodontale. L'effetto anti-infiammatorio rallenta il deterioramento dei tessuti parodontali e riduce il gonfiore, ciò facilita le manovre di igiene orale se associato a scaling e root planning; si hanno risultati positivi anche se applicato a gengivectomia.

➤ Ortodonzia: Oltre a ridurre il dolore iniziale, LLLT può incrementare la velocità dei movimenti dentali agendo sull'attività osteoclastica sul lato ove è applicata la pressione e sull'attività osteoblastica sul lato di tensione. La terapia laser è stata utilizzata anche per il trattamento di ulcerazioni orali indotte dagli apparecchi ortodontici fissi [60]

3.5.3 Aspetti Contraddittori in LLLT

E' stato riportato che gli effetti di LLLT possono essere influenzati variando la potenza e il tempo dell'esposizione, pur mantenendo la densità di energia costante. È necessario determinare tali parametri per ottenere la massima stimolazione del metabolismo cellulare e della proliferazione. Lanzafame e colleghi [61] hanno spiegato che l'identificazione di tali parametri per le diverse linee cellulari o tessuti è fondamentale per conseguire il massimo della biostimolazione, ma questi parametri variano da laser a laser. Per cui va individuato il laser con la lunghezza d'onda, la potenza e la fluenza più idonea a secondo del tipo cellulare. Negli studi in vitro della LLLT sono stati adottati principalmente laser con lunghezze d'onda tra i 600 e 800 nm, riportando effetti contrastanti. L'irradiazione su culture di fibroblasti con laser a 632.8 nm ha determinato effetti proliferativi [22], mentre Almeida e colleghi [17] hanno valutato che il tasso di crescita migliore si ha con laser a 780 nm piuttosto che a 670 nm sempre su fibroblasti, Pogrel e colleghi [62] hanno valutato l'effetto biostimolatorio di un laser Ga-Al-As con lunghezza d'onda di 830 nm e hanno notato che non c'è effetto biostimolatorio sulla proliferazione di fibroblasti e cheratinociti coltivati in vitro. In un altro studio, è stato osservato che lo stesso laser stimola la produzione di ossido nitrico e inibisce le citochine pro infiammatorie nei fibroblasti di pazienti diabetici [18] per cui si ha un effetto positivo. Uno studio con laser a diverse lunghezze d'onda [16] ha riportato che un laser con lunghezza d'onda di 810 nm inibisce la crescita dei fibroblasti, mentre 665 nm e 675 nm determinano un input positivo. Pereira e colleghi [19] hanno utilizzato un laser di 904 nm sempre su fibroblasti avendo crescita

cellulare. Anche i dati sulla fluenza sono differenti, tendenzialmente si individuano valori 0,5 a 5 J/cm² come range con effetto stimolatorio, mentre valori più alti come 15J/cm² sono inibitori [22][52][63][64][20]. L'effetto di LLLT sulla proliferazione cellulare sembra dipendere anche dallo stato fisiologico della cellula al momento dell'irradiazione. È stato riportato che LLLT può stimolare la proliferazione cellulare se le cellule stanno crescendo poco al tempo di irradiazione. Tuttavia, se le cellule crescono in un ambiente ricco di siero (10% FBS) al momento della irradiazione, allora non si ha un'azione stimolante importante e nessun beneficio terapeutico [21].

PARTE SPERIMENTALE

I fibroblasti sono le cellule tipiche e più numerose del tessuto connettivo e sono in grado di produrre le componenti della matrice extracellulare, hanno un citoplasma vacuolizzato che circonda un nucleo ellittico e colorato con uno o due nucleoli. I fibroblasti attivi si riconoscono dall'abbondante reticolo endoplasmatico, quelli inattivi, chiamati anche fibrociti, sono più piccoli ed allungati. Queste cellule producono collagene, glicosaminoglicano, fibre elastiche e reticolari e le glicoproteine che si trovano nella matrice extracellulare. Durante la crescita i fibroblasti si dividono e sintetizzano le sostanze di base. Un danno ai tessuti stimola la loro produzione e ne induce la mitosi che aumenta o diminuisce con l'applicazione di alcuni valori di LLLT. Questo studio prevede l'irradiazione di colture di fibroblasti con differenti valori di densità di energia compresi tra $0,5 \text{ J/cm}^2$ e 50 J/cm^2 con un laser a diodi con una lunghezza d'onda di 980 nm e la successiva valutazione della vitalità cellulare e della proliferazione.

1. OBIETTIVO DELLO STUDIO

Individuare la densità di energia che stimola maggiormente la proliferazione dei fibroblasti con un laser a diodi di 980 nm nell'arco di 7 giorni.

2. MATERIALI E METODI

2.1 COLTURA CELLULARE

➤ Scongela i fibroblasti di derma umano (presentano le medesime caratteristiche dei fibroblasti di origine gengivale) (Matched Set Cryopreserved Dermal Fibroblasts and Keratinocytes, Tebu-bio®) e piastrarli in fiasca da 75 cm² (T-75) con Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Euroclone®) a basso contenuto di glucosio (1g/L di glucosio) integrato con 100 U/ml di penicillina G, 100 µg/ml di streptomicina, 2 mmol/l L-glutamine e 10% di siero fetale di bovino (FBS) scomplementato a 56°C per 30 minuti. Incubare il tutto a 37°C con CO₂ al 5%. Il kit acquistato conteneva due linee cellulari primarie basali i fibroblasti e i cheratinociti contenuti in 2 vial separati. Per la sperimentazione sono stati utilizzati solo i fibroblasti.

➤ Cambiare DMEM delle colture ogni 3 giorni finché non raggiungono il 90% di confluenza (Fig.22)

➤ Aspirare il medium, lavare 2 volte i fibroblasti con PBS (Phosphate buffered saline) per rimuovere le tracce del siero.

➤ Rimuovere PBS e aggiungere alle cellule 2 mL/T-75 0,25% di tripsina e 2,2 mM EDTA soluzione. Incubare per 5 minuti a 37°C.

➤ Neutralizzare la tripsina con 4 ml di DMEM per ogni fiasca T-75.

➤ Contare le cellule e piastrarle 5 x 10² cellule/pozzetto in multiwell da 96, mettere a incubazione a 37°C con CO₂ al 5%.

Sono state eseguite molteplici prove per valutare la concentrazione più idonea di cellule per pozzetto: 5 x 10² cellule/pozzetto, 10³ cellule/pozzetto, 1,5 x 10³ cellule/pozzetto, 2,5 x 10³ cellule/pozzetto e 3,5 x 10³ cellule/pozzetto. La concentrazione minore è risultata la più corretta per le valutazioni della sperimentazione.

- Usare le colture tra il V e il X passaggio, nella sperimentazione i fibroblasti sono stati usati all'VIII passaggio.

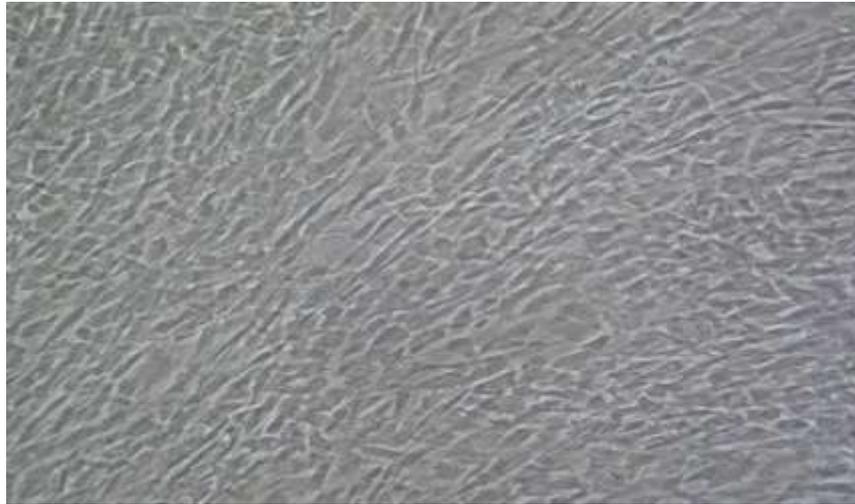


Figura 22 Fotografia 20x di Fibroblasti in coltura prima del posizionamento nella multiwell da 96 pozzetti

2.2 DISEGNO DELLO STUDIO

Le colture di fibroblasti sono state suddivise in 9 gruppi, ognuno dei quali composto da 4 campioni tranne il controllo composto da 8. Ogni piastra da 96 pozzetti è stata suddivisa così: 1) irradiazione con densità di energia 0,5 J/cm²(N=4); 2) irradiazione con densità di energia 1 J/cm²(N=4); 3) irradiazione con densità di energia 2 J/cm²(N=4); 4) irradiazione con densità di energia 4 J/cm²(N=4); 5) irradiazione con densità di energia 5 J/cm²(N=4); 6) irradiazione con densità di energia 7 J/cm²(N=4); 7) irradiazione con densità di energia 15 J/cm²(N=4); 8) irradiazione con densità di energia 50 J/cm²(N=4); 9) controllo (N=8) (Tabella 3).

GRUPPI	DENSITA' DI ENERGIA (J/cm ²)
1	0,5 J/cm ²
2	1 J/cm ²
3	2 J/cm ²
4	4 J/cm ²
5	5 J/cm ²
6	7 J/cm ²
7	15 J/cm ²
8	50 J/cm ²
9	controllo

Tabella 3

Sono state usate piastre con 96 pozzetti schermati in modo che ogni gruppo di campioni di cellule ricevesse la dose prestabilita di densità di energia. Lo studio ha previsto la valutazione dell'andamento della vitalità cellulare e della proliferazione al giorno 0,1,2,4,7 dall'irradiazione iniziale, per cui sono state allestite 8 piastre secondo lo schema descritto precedentemente e 2 solo con i controlli per il giorno 0. Tutte le piastre sono state irradiate in un'unica seduta. Ai giorni stabiliti è stata valutata la vitalità cellulare con il test MTT e la proliferazione con il test SRB (2 piastre per giorno, una per ogni test).

2.3 IRRADIAZIONE LASER

Il laser adottato nella sperimentazione è stato un laser a diodi (Wiser, Doctor Smile®) (Foto 23) con lunghezza d'onda 980 nm, potenza 0,1 a 7W, emissione continua con possibilità anche di emissione pulsata. La potenza applicata è stata di 1W per tutti i gruppi.

VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DI LOW-LEVEL LASER THERAPY SUI FIBROBLASTI: STUDIO IN VITRO



Figura 23

Al fine di ottenere un'irradiazione costante, omogenea e indipendente dalla distanza di irradiazione sulle colture di fibroblasti si è adottato il manipolo a onda piana (Fig. 24).



Figura 24

Questo manipolo emette una quantità di energia costante su una superficie di 1 cm^2 e variando la distanza del manipolo dall'area da trattare non si modifica l'energia (da 1 a 105 cm) (Fig.25).

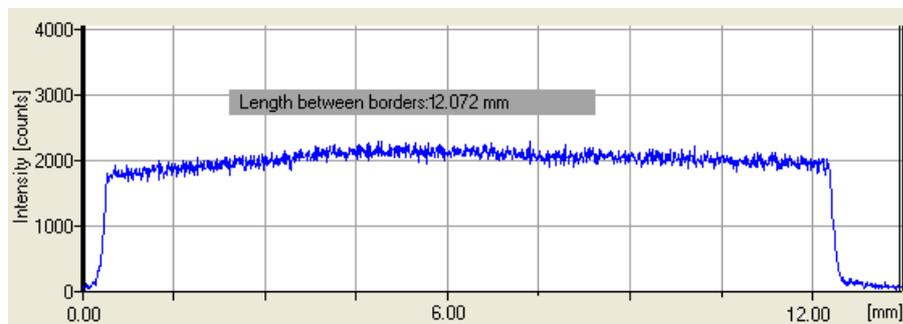


Figura 25 Rappresentazione dell'irradiazione omogenea del manipolo a onda piana in un'area di 1 cm^2

Il fascio del laser, che è di 1 cm^2 , è stato mantenuto stabile per mezzo di un braccio meccanico in modo da irradiare l'area desiderata senza rischio di spostamenti da parte dell'operatore. La densità di energia è stata calcolata con la formula: $W \times t / \text{cm}^2$, ove $W = 1$, $\text{cm}^2 = 1$ (poiché è l'area irradiata dal manipolo a onda piana) e t è variato in base ai differenti valori di densità di energia.

2.4 TEST DI VITALITA' CELLULARE (MTT)

MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) è un saggio colorimetrico che permette di misurare la vitalità cellulare attraverso la valutazione dell'efficienza mitocondriale.

Il bromuro di tetrazolio 3-(4,5-dimetiltiazol-2-fenil)-2,5-difenile è un sale di tetrazolio (di colore giallo) che nelle cellule vitali è ridotto dalle deidrogenasi mitocondriali (Fig. 26).

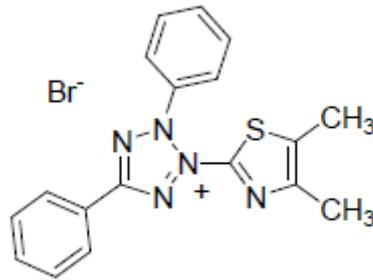


Figura 26 Struttura MTT

Questo composto presenta un anello tetrazolico che può essere facilmente ridotto dalle deidrogenasi mitocondriali o da altri sistemi di trasporto elettronico, formando un composto cromogeno azotato detto formazano, il cui gruppo funzionale caratteristico è $R_1NH-N=CR_2-N=NR_3$ (Fig. 27).

VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DI LOW-LEVEL LASER THERAPY SUI
FIBROBLASTI: STUDIO IN VITRO

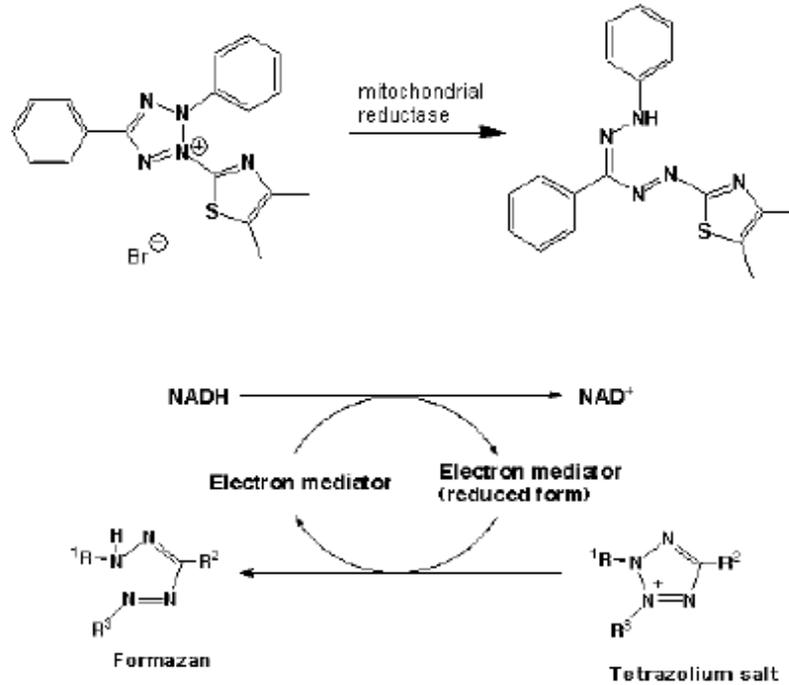


Figura 27 Riduzione di MTT in formazano

La riduzione determina pertanto la formazione di cristalli di formazano, che attribuiscono una caratteristica colorazione violacea ai mitocondri delle cellule vitali. La trasformazione dell'MTT determina, infatti, un viraggio della molecola da giallo a blu-violetto (Fig. 28). Questa reazione avviene solo nelle cellule vive e non in quelle morte o danneggiate, i cristalli di formazano possono essere solubilizzati per aggiunta di un idoneo reagente. Il numero di cellule sopravvissute è direttamente proporzionale ai livelli di formazano prodotti, e l'intensità del colore assunto dalla soluzione è valutata con l'ausilio di uno spettrofotometro. La produzione di formazano nelle cellule trattate viene valutata in confronto al controllo.

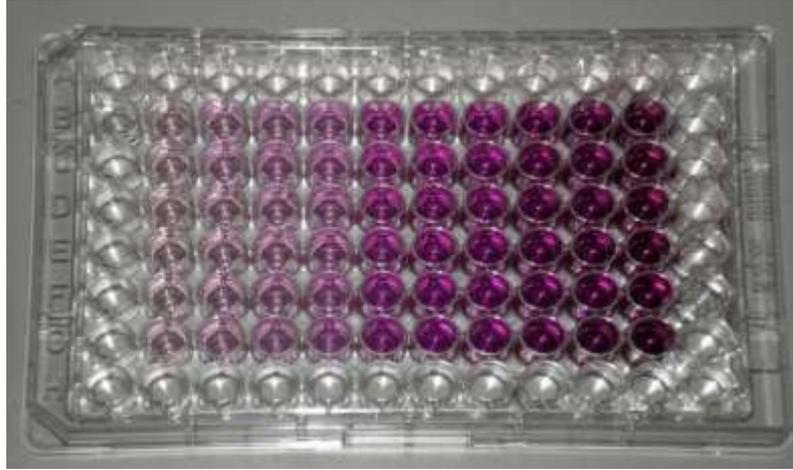


Figura 28 Colorazione violacea conferita dai cristalli di formazano

Fasi operative

- Eliminare il terreno dai pozzetti e lavare 2 volte con PBS e $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$.
- Aggiungere terreno con 10 di MTT e 90 per μl di DMEM per pozzetto.
- Incubare a 37°C per 1 ora al buio.
- Eliminare il terreno, aggiungere 150 μl di etanolo assoluto e lasciare solubilizzare il colorante sull'agitatore.
- Centrifugare la piastra 2000 rpm per 10 minuti.
- Prelevare 100 μl di surnatante e trasferirlo in una nuova piastra.
- Leggere allo spettrofotometro a 570 nm

2.5 TEST DI PROLIFERAZIONE (SRB)

Il test della Sulforodamina B è un test colorimetrico che evidenzia il comportamento proliferativo delle cellule sottoposte all'azione della sostanza che si vuole testare. Poiché la Sulforodamina B è un colorante in grado di legarsi alle proteine cellulari, la quantità del colorante stesso, rivelata dalla lettura con lo spettrofotometro è direttamente proporzionale alla proliferazione cellulare (Fig.29)

Fasi operative

- Seminare le cellule in piastre da 96 pozzetti e posizionarvi 25 μ l TCA (acido tricloroacetico) freddo.
- Fissare per 60 minuti a 4°C.
- Svotare la piastra per rovesciamento, lavarla per 5 volte con acqua del rubinetto e asciugare a temperatura ambiente.
- Aggiungere 50 μ l SRB (soluzione di Sulforodamina), lasciare agire per 15 minuti a temperatura ambiente.
- Svotare la piastra, lavare 4 volte con acido acetico 1% fino alla rimozione del colorante non legato e lasciare asciugare.
- Aggiungere 150 μ l di TRIS 10 mM per solubilizzare il colorante.
- Agitare per 2-3 minuti e leggere allo spettrofotometro a 560 nm



Figura 29 Colorazione del saggio SRB che viene letta con l'ausilio di uno spettrofotometro

2.6 ANALISI STATISTICHE

Le analisi statistiche per il test di vitalità e proliferazione sono state eseguite con l'analisi della varianza. I dati sono stati rappresentati con media e deviazione standard. Valori con $p \leq 0,05$ sono stati considerati statisticamente significativi.

3 RISULTATI

3.1 TEST DI VITALITÀ (MTT)

La vitalità cellulare è stata valutata con il saggio MTT che attraverso un'analisi quantitativa indica il numero di cellule che presentano attività metabolica. I dati prodotti in laboratorio sono presentati in Fig. 30

Giorno 0												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,061	0,038	0,061	0,038	0,041	0,044	0,039	0,061				
B	1	0,047875										
C	0,23056	0,011038										
D												
E												
F												
G												
H												

Giorno 1												
	Formazan 570 [A/1] minus Reference 690 [A/2]											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,068	0,068	1,650131	0,101	0,095	2,046997	0,093	0,093	2,015666	0,084	0,1	1,921671
B	0,09	0,09	0,26531	0,101	0,095	0,072357	0,1	0,1	0,084417	0,084	0,1	0,192953
C												
D	0,09	0,09	1,984334	0,077	0,094	1,86423	0,108	0,108	2,088773	0,105	0,097	2,02611
E	0,1	0,1	0,120595	0,087	0,099	0,199165	0,092	0,092	0,192953	0,082	0,104	0,221712
F												
G									1,637598			
H	0,087	0,065	0,084	0,069	0,087	1,637598	1,637598	1,637598	0,220057			

Giorno 2												
	Formazan 570 [A/1] minus Reference 690 [A/2]											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,118	0,091	2,146214	0,091	0,109	2,120104	0,096	0,085	2,057441	0,098	0,101	2,114883
B	0,095	0,107	0,255466	0,101	0,105	0,161346	0,098	0,115	0,258929	0,112	0,094	0,161233
C												
D	0,083	0,1	2,052219	0,087	0,087	2,015666	0,105	0,104	2,182768	0,105	0,095	2,088773
E	0,112	0,098	0,248541	0,106	0,106	0,229131	0,105	0,104	0,01206	0,1	0,1	0,885274
F												
G									2,255875			
H	0,108	0,113	0,109	0,106	0,097	0,109	0,109	0,113	0,10533			

Giorno 4												
	Formazan 570 [A/1] minus Reference 690 [A/2]											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,15	0,15	2,851175	0,131	0,148	2,840731	0,165	0,16	3,394256	0,155	0,145	3,133159
B	0,123	0,123	0,325607	0,136	0,129	0,178057	0,16	0,165	0,060298	0,155	0,145	0,120595
C												
D	0,16	0,16	3,143603	0,138	0,138	2,976501	0,135	0,125	2,678851	0,137	0,137	3,101828
E	0,141	0,141	0,229131	0,147	0,147	0,108536	0,125	0,128	0,098527	0,16	0,16	0,277368
F												
G									3,023499			
H	0,145	0,15	0,142	0,142	3,023499	0,003	0,006	0,003	0,078849			

VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DI LOW-LEVEL LASER THERAPY SUI FIBROBLASTI: STUDIO IN VITRO

Giorno 7												
Formazan 570 [A/1] minus Reference 690 [A/2]												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,201	0,201	4,480418	0,217	0,25	4,077285	0,249	0,249	5,10705	0,259	0,26	5,420366
B	0,228	0,228	0,325607	0,217	0,25	0,397965	0,24	0,24	0,108536	0,259	0,26	0,01206
C												
D	0,222	0,238	4,778068	0,275	0,187	5,201044	0,255	0,255	5,402141	0,264	0,249	5,336815
E	0,238	0,217	0,227139	0,274	0,26	0,875127	0,268	0,268	0,156774	0,26	0,249	0,160442
F												
G									4,819843			
H	0,223	0,229	0,223	0,248	4,819843	4,819843	4,819843	4,819843	0,247368			

Figura 30 Risultati saggio MTT

Successivamente attraverso le medie (Tabella 4) e le deviazioni standard (Tabella 5), si sono analizzati i dati attraverso l'analisi della varianza (Fig.31).

	Ctrl	0,5 J/cm ²	1 J/cm ²	2 J/cm ²	4 J/cm ²	5 J/cm ²	7 J/cm ²	15 J/cm ²	50 J/cm ²
Giorno 0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Giorno 1	1,637597911	1,650130548	2,046997389	2,015665796	1,921671018	1,984334204	1,864229765	2,088772846	2,026109661
Giorno 2	2,255874674	2,146214099	2,120104439	2,057441253	2,114882507	2,052219321	2,015665796	2,182767624	2,088772846
Giorno 4	3,023498695	2,851174935	2,84073107	3,394255875	3,133159269	3,143603133	2,976501305	2,678851175	3,101827676
Giorno 7	4,819843342	4,480417755	4,877284595	5,107049608	5,420365535	4,778067885	5,201044386	5,462140992	5,336814621

Tabella 4 Medie SRB normalizzate

	Ctrl	0,5 J/cm ²	1 J/cm ²	2 J/cm ²	4 J/cm ²	5 J/cm ²	7 J/cm ²	15 J/cm ²	50 J/cm ²
Giorno 0	0,230560489	0,230560489	0,230560489	0,230560489	0,230560489	0,230560489	0,230560489	0,230560489	0,230560489
Giorno 1	0,220857481	0,265309784	0,072357214	0,08441675	0,19295257	0,120595356	0,199164975	0,19295257	0,221711865
Giorno 2	0,105330027	0,255465828	0,161345591	0,258929211	0,16123288	0,248540564	0,229131177	0,012059536	0,085273794
Giorno 4	0,078849446	0,325607463	0,17805691	0,060297678	0,120595356	0,229131177	0,108535821	0,098527218	0,27736932
Giorno 7	0,247367505	0,325607463	0,397964676	0,108535821	0,012059536	0,227139041	0,875126859	0,156773963	0,160441687

Tabella 5 Deviazioni standard SRB normalizzate

Analisi varianza: ad un fattore Alpha=0,05 - Giorno 1						
RIEPILOGO						
Gruppi	Somma	Varianza				
Ctrl	4	0,305	0,07625	0,00011825		
Laser 0,5	4	0,316	0,079	0,000161333		
Laser 1	4	0,392	0,098	0,000012		
Laser 2	4	0,386	0,0965	1,63333E-05		
Laser 4	4	0,368	0,092	8,53333E-05		
Laser 5	4	0,38	0,095	3,33333E-05		
Laser 7	4	0,357	0,08925	9,09167E-05		
Laser 15	4	0,4	0,1	8,53333E-05		
Laser 50	4	0,388	0,097	0,000112667		
ANALISI VARIANZA Giorno 1						
Origine della variazione	SQ	gdl	MQ	F	Valore di significatività	F crit
Tra gruppi	0,002304389	8	0,000288049	3,62325297	0,005534193	2,305313177
In gruppi	0,0021465	27	0,0000795			
Totale	0,004450889	35				

VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DI LOW-LEVEL LASER THERAPY SUI
FIBROBLASTI: STUDIO IN VITRO

Analisi varianza: ad un fattore Alpha=0,05 - Giorno 2						
RIEPILOGO						
Gruppi	Somma	Varianza				
Ctrl	4 0,436	0,109	8,66667E-06			
Laser 0,5	4 0,411	0,10275	0,000149583			
Laser 1	4 0,406	0,1015	5,96667E-05			
Laser 2	4 0,394	0,0985	0,000153667			
Laser 4	4 0,405	0,10125	5,95833E-05			
Laser 5	4 0,393	0,09825	0,000141583			
Laser 7	4 0,386	0,0965	0,000120333			
Laser 15	4 0,418	0,1045	3,33333E-07			
Laser 50	4 0,4	0,1	1,66667E-05			
ANALISI VARIANZA Giorno 2						
Origine della variazione	SQ	gdl	MQ	F	Valore di significatività	F crit
Tra gruppi	0,000454056	8	5,67569E-05	0,719369792	0,672860628	2,305313177
In gruppi	0,00213025	27	7,88981E-05			
Totale	0,002584306	35				
Analisi varianza: ad un fattore Alpha=0,05 - Giorno 4						
RIEPILOGO						
Gruppi	Somma	Varianza				
Ctrl	4 0,579	0,14475	0,00001425			
Laser 0,5	4 0,546	0,1365	0,000243			
Laser 1	4 0,544	0,136	7,26667E-05			
Laser 2	4 0,65	0,1625	8,33333E-06			
Laser 4	4 0,6	0,15	3,33333E-05			
Laser 5	4 0,602	0,1505	0,000120333			
Laser 7	4 0,57	0,1425	2,7E-05			
Laser 15	4 0,513	0,12825	0,00002225			
Laser 50	4 0,594	0,1485	0,000176333			
ANALISI VARIANZA Giorno 4						
Origine della variazione	SQ	gdl	MQ	F	Valore di significatività	F crit
Tra gruppi	0,003242056	8	0,000405257	5,083362369	0,000633151	2,305313177
In gruppi	0,0021525	27	7,97222E-05			
Totale	0,005394556	35				
Analisi varianza: ad un fattore Alpha=0,05 - Giorno 7						
RIEPILOGO						
Gruppi	Somma	Varianza				
Ctrl	4 0,923	0,23075	0,00014025			
Laser 0,5	4 0,858	0,2145	0,000243			
Laser 1	4 0,934	0,2335	0,000363			
Laser 2	4 0,978	0,2445	0,000027			
Laser 4	4 1,038	0,2595	3,33333E-07			
Laser 5	4 0,915	0,22875	0,00011825			
Laser 7	4 0,996	0,249	0,001755333			
Laser 15	4 1,046	0,2615	5,63333E-05			
Laser 50	4 1,022	0,2555	5,9E-05			
ANALISI VARIANZA Giorno 7						
Origine della variazione	SQ	gdl	MQ	F	Valore di significatività	F crit
Tra gruppi	0,008218389	8	0,001027299	3,346855204	0,008621707	2,305313177
In gruppi	0,0082875	27	0,000306944			
Totale	0,016505889	35				

Figura 31

VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DI LOW-LEVEL LASER THERAPY SUI FIBROBLASTI: STUDIO IN VITRO

La tabella6 mostra se c'è significatività statistica tra ogni gruppo e il controllo e se la significatività è positiva (colore verde), ossia il numero di cellule che presenta attività metabolica nei diversi gruppi è maggiore del numero di cellule che presenta attività metabolica nel controllo o negativa (colore rosso), se il numero di cellule che presenta attività metabolica nei differenti gruppi è inferiore al numero di cellule che presenta attività metabolica nel controllo.

TEST DELLA VARIANZA	0,5 J /cmq Vs CTRL	1 J /cmq Vs CTRL	2 J /cmq Vs CTRL	4 J /cmq Vs CTRL	5 J / cmq Vs CTRL	7 J / cmq Vs CTRL	15 J / cmq Vs CTRL	50 J / cmq Vs CTRL
Giorno 1	0,380410188	0,005099511	0,019434362	0,106865018	0,027070489	0,140097739	0,023103178	0,045490044
Giorno 2	0,225051675	0,059923981	0,129941584	0,060678687	0,080632447	0,074250614	0,031386055	0,034568435
Giorno 4	0,140495633	0,027709358	0,003890095	0,140746504	0,124387013	0,318809046	0,006923416	0,340866575
Giorno 7	0,055956968	0,347523376	0,081811878	0,007537044	0,428638422	0,235073314	0,005215296	0,03657573

TEST DELLA VARIANZA	0,5 J /cmq Vs CTRL	1 J /cmq Vs CTRL	2 J /cmq Vs CTRL	4 J /cmq Vs CTRL	5 J / cmq Vs CTRL	7 J / cmq Vs CTRL	15 J / cmq Vs CTRL	50 J / cmq Vs CTRL
Tempo1		↑	↑		↑		↑	↑
Tempo2							↓	↓
Tempo4		↓	↑				↓	
Tempo7				↑			↑	↑

Tabella 6

Successivamente i dati sono stati elaborati con dei grafici. Il grafico in Fig. 32 mostra a 24 ore dall'irradiazione con il laser un aumento del numero di cellule che presentano vitalità rispetto al controllo tendenzialmente in tutti i laser, per poi stabilizzarsi a 48 ore se confrontate con il controllo e con una ripresa al giorno 4 e 7.

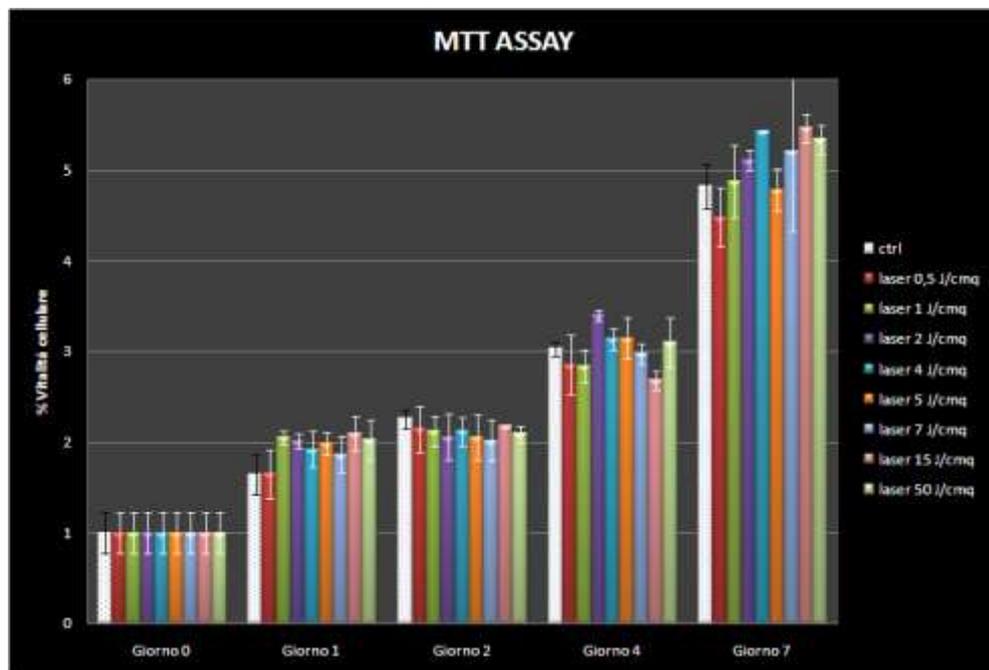


Figura 32

VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DI LOW-LEVEL LASER THERAPY SUI FIBROBLASTI: STUDIO IN VITRO

Valutando nel dettaglio i giorni seguenti all'irradiazione si nota che al giorno 1 (Fig.33) i campioni irradiati con 1 J/cm^2 , 2 J/cm^2 , 5 J/cm^2 , 15 J/cm^2 e 50 J/cm^2 presentano significatività statistica rispetto al controllo ($P \leq 0.05$), mentre i campioni irradiati con $0,5 \text{ J/cm}^2$, 4 J/cm^2 e 7 J/cm^2 non mostrano significatività statistica se confrontati con il gruppo non irradiato ($P > 0.05$).

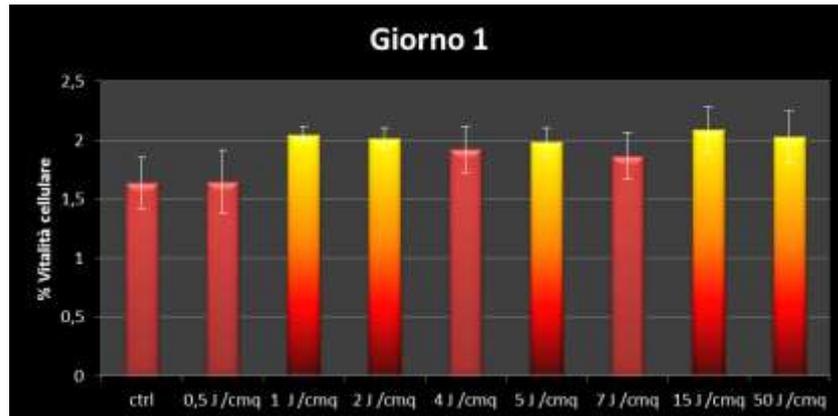


Figura 33

Al giorno 2 (Fig. 34), i gruppi irradiati con una densità di energia di 15 J/cm^2 e 50 J/cm^2 sono significativi ($P \leq 0.05$) se confrontati con il controllo indicando una riduzione del numero di cellule con vitalità cellulare, mentre i gruppi irradiati con $0,5 \text{ J/cm}^2$, 1 J/cm^2 , 2 J/cm^2 , 4 J/cm^2 , 5 J/cm^2 , 7 J/cm^2 non presentano variazioni significative da un punto di vista statistico ($P > 0.05$).

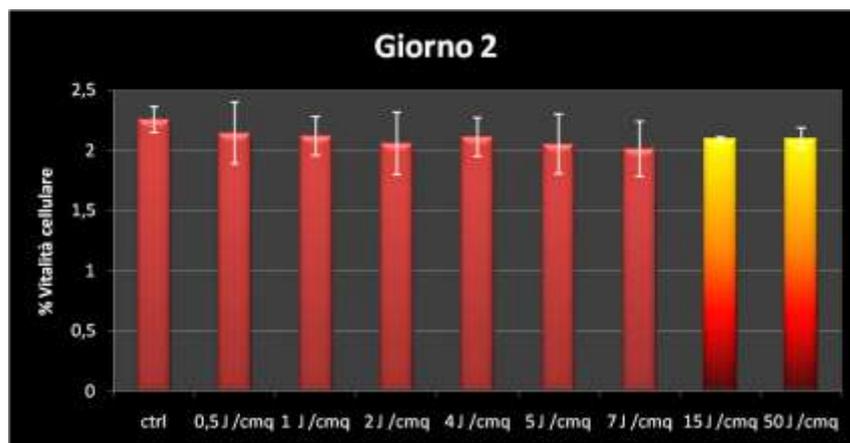


Figura 34

VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DI LOW-LEVEL LASER THERAPY SUI FIBROBLASTI: STUDIO IN VITRO

Al giorno 4 (Fig.35) i gruppi irradiati con 1 J/cm², 2 J/cm² e 15 J/cm² presentano una significatività statistica se paragonati al gruppo non irradiato (P≤0.05), mentre tutti gli altri gruppi non si discostano in modo significativo dal controllo (P>0.05). In particolare il gruppo irradiato con 2 J/cm² si discosta in modo positivo, ossia ha un numero maggiore di cellule che presentano vitalità cellulare se paragonato al controllo, mentre il gruppo irradiato con 1 J/cm² e 15 J/cm² presentano una riduzione del numero di cellule con attività metabolica se paragonati al controllo.



Figura 35

Al giorno 7 (Fig.36), i gruppi irradiati con 4 J/cm², 15 J/cm² e 50 J/cm² si discostano dal controllo in modo significativo (P≤0.05).

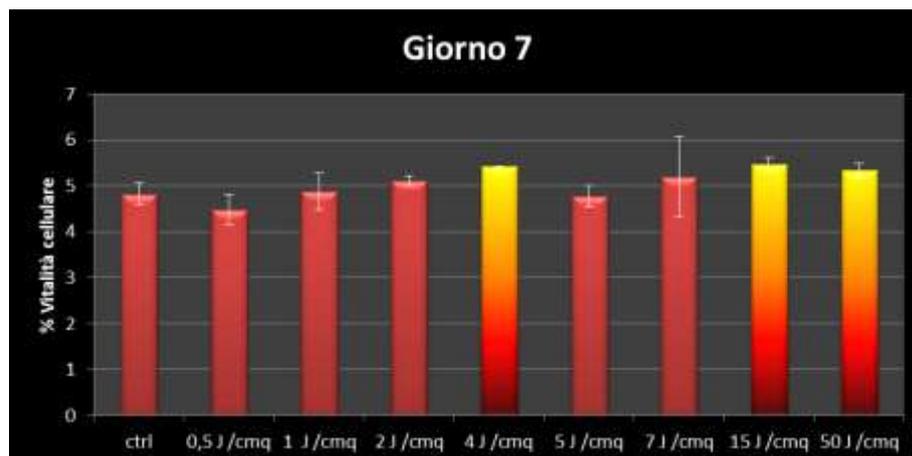


Figura 36

VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DI LOW-LEVEL LASER THERAPY SUI FIBROBLASTI: STUDIO IN VITRO

Per poter analizzare al meglio i risultati ottenuti con il saggio colorimetrico MTT appare interessante valutare l'andamento dei gruppi irradiati che sono risultati significativi in positivo con delle linee di tendenza (Fig.37). Queste ultime sono utilizzate per la visualizzazione grafica delle tendenze dei dati. Questo tipo di analisi è anche noto come analisi di regressione. Nella sperimentazione è interessante studiarle per avere una tendenza dell'andamento dei diversi gruppi irradiati con densità di energia differenti in tutto il periodo considerato con una previsione attendibile anche nei giorni mancanti nella rilevazione, giorno 3, 5 e 6. I laser che non hanno mostrato significatività o hanno mostrato una significatività in negativo rispetto al controllo non sono stati presi in considerazione.

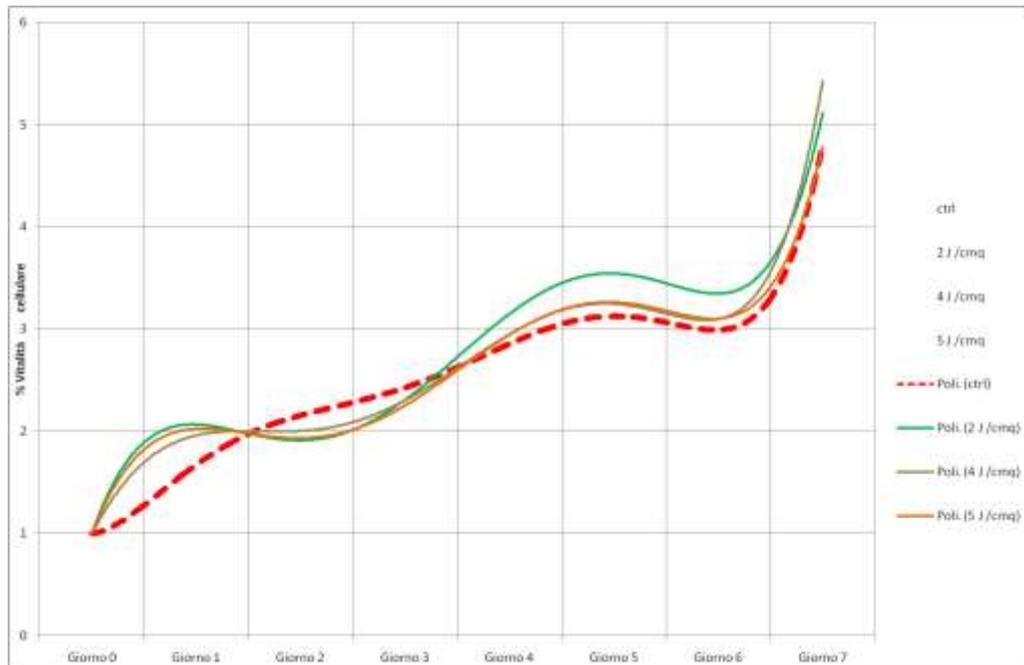


Figura 37

È interessante notare che al giorno 1, si ha un comportamento differente tra i gruppi irradiati con il laser e il controllo, si nota un input nella vitalità cellulare dato dall'irradiazione laser che si discosta leggermente dal controllo al giorno 2, al giorno 4 si nota un andamento estremamente positivo per il gruppo irradiato con 2 J/cm², per poi culminare tutti nel giorno 7. Se si valuta

VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DI LOW-LEVEL LASER THERAPY SUI FIBROBLASTI: STUDIO IN VITRO

l'andamento temporale effettivo di questi gruppi si nota che il gruppo irradiato con 2 J/cm² ha l'andamento medio migliore (Fig.38).

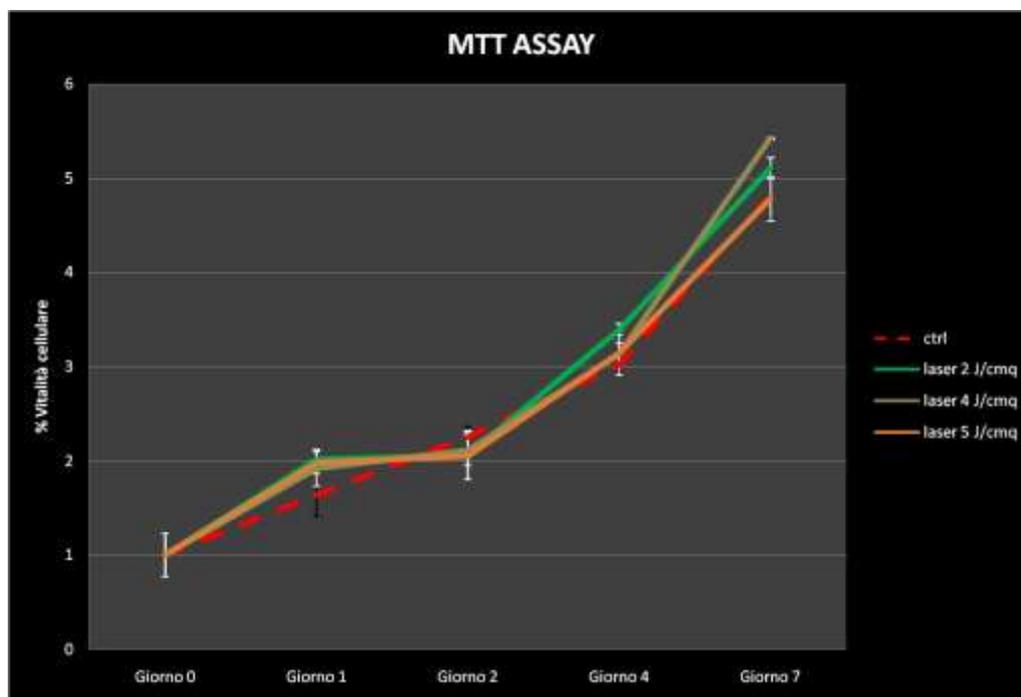


Figura 38

VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DI LOW-LEVEL LASER THERAPY SUI FIBROBLASTI: STUDIO IN VITRO

3.2 TEST DI PROLIFERAZIONE (SRB)

La proliferazione cellulare è stata valutata con il test SRB, ove si è valutata la quantità di proteine cellulari; come il test MTT è una valutazione quantitativa. I dati prodotti in laboratorio sono presentati in figura 39.

Giorno 0												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,209	0,191	0,262	0,202	0,189	0,165	0,206	0,24				
B	1	0,208										
C	0,146277	0,030426										
D												
E												
F												
G												
H												

Giorno 1												
Blank corrected raw data (560 nm)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,309	0,269	1,340144	0,288	0,355	1,489183	0,333	0,352	1,581731	0,324	0,288	1,47476
B	0,298	0,239	0,151035	0,273	0,323	0,176575	0,325	0,306	0,091641	0,304	0,311	0,072102
C												
D	0,298	0,303	1,430288	0,281	0,321	1,438702	0,298	0,276	1,40625	0,326	0,24	1,40024
E	0,284	0,305	0,045525	0,28	0,315	0,104772	0,3	0,296	0,053464	0,304	0,295	0,175788
F												
G									1,379207			
H	0,17	0,28	0,272	0,289	0,305	0,323	0,291	0,365	0,2676			

Giorno 2												
Blank corrected raw data (560 nm)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,511	0,455	2,28726	0,428	0,494	2,199519	0,457	0,457	2,165865	0,496	0,474	2,235577
B	0,522	0,415	0,240429	0,418	0,49	0,192688	0,444	0,444	0,036084	0,428	0,462	0,136547
C												
D	0,503	0,487	2,329327	0,433	0,412	2,084135	0,439	0,435	2,100962	0,375	0,42	2,045673
E	0,428	0,52	0,192328	0,436	0,453	0,080878	0,439	0,435	0,011103	0,44	0,467	0,18647
F												
G									2,475361			
H	0,565	0,47	0,484	0,461	0,473	0,544	0,604	0,518	0,250059			

Giorno 4												
Blank corrected raw data (560 nm)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,894	0,878	4,185096	0,848	0,976	4,191106	0,998	1,131	5,133413	0,919	0,962	5,004808
B	0,869	0,841	0,10682	0,791	0,872	0,371913	1,027	1,115	0,313531	1,081	1,202	0,612209
C												
D	1,068	0,878	4,747596	0,973	0,999	4,632212	0,969	0,973	4,668269	1,066	1,066	4,762019
E	1,002	1,002	0,381508	0,889	0,993	0,244689	0,969	0,973	0,011103	0,915	0,915	0,419134
F												
G									4,769832			
H	0,958	1,01	0,94	1,034	0,974	0,952	1,084	0,985	0,2326			

VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DI LOW-LEVEL LASER THERAPY SUI FIBROBLASTI: STUDIO IN VITRO

Giorno 7												
Blank corrected raw data (560 nm)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,928	0,984	4,71875	1,034	1,098	4,996394	0,941	1,111	4,936298	1,06	0,911	4,769231
B	1,003	1,011	0,179909	1,003	1,022	0,198046	1,004	1,051	0,346207	0,965	1,032	0,322677
C												
D	0,991	0,878	4,764423	0,91	1,031	4,871394	0,967	0,909	4,509615	1,049	1,046	4,782452
E	1,002	1,093	0,423641	1,025	1,087	0,357117	0,967	0,909	0,160992	0,967	0,917	0,308901
F												
G									4,998197			
H	0,966	1,11	1,048	1,031	1,091	1,008	0,977	1,086	0,258455			

Figura 39 Risultati saggio SRB

Successivamente, come per il saggio MTT, attraverso le medie (Tabella 7) e le deviazioni standard (Tabella 8), si sono analizzati i dati attraverso l'analisi varianza (Fig. 40).

	ctrl	0,5 J/cm ²	1 J/cm ²	2 J/cm ²	4 J/cm ²	5 J/cm ²	7 J/cm ²	15 J/cm ²	50 J/cm ²
Giorno 0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Giorno 1	1,379206731	1,340144231	1,489182692	1,581730769	1,474759615	1,430288462	1,438701923	1,40625	1,400240385
Giorno 2	2,475360577	2,287259615	2,199519231	2,165865385	2,235576923	2,329326923	2,084134615	2,100962	2,045673077
Giorno 4	4,769831731	4,185096154	4,191105769	5,133413462	5,004807692	4,747596154	4,632211538	4,668269	4,762019231
Giorno 7	4,998197115	4,71875	4,996394231	4,936298077	4,769230769	4,764423077	4,871394231	4,509615	4,782451923

Tabella 7 Medie SRB normalizzate

	Ctrl	0,5 J/cm ²	1 J/cm ²	2 J/cm ²	4 J/cm ²	5 J/cm ²	7 J/cm ²	15 J/cm ²	50 J/cm ²
Giorno 0	0,146276698	0,146276698	0,146277	0,146276698	0,146276698	0,146276698	0,146276698	0,146276698	0,146276698
Giorno 1	0,267600015	0,151034759	0,176575	0,091640888	0,072102029	0,045525233	0,104772033	0,05346419	0,175787842
Giorno 2	0,250058603	0,240428682	0,192688	0,036084392	0,13654749	0,192327723	0,080877903	0,01110289	0,186469886
Giorno 4	0,232599733	0,106820244	0,371913	0,313530721	0,612208853	0,381507879	0,244689026	0,01110289	0,41913409
Giorno 7	0,258454587	0,179908788	0,198046	0,346206704	0,322676988	0,423641087	0,357117486	0,160991902	0,308901246

Tabella 8 Deviazioni standard SRB normalizzate

Analisi varianza: ad un fattore Alpha=0,05 - Giorno 1

RIEPILOGO

Gruppi	Somma	Varianza
Ctrl	4, 1,011	0,25275 0,003091583
Laser 0,5	4, 1,115	0,27875 0,000986917
Laser 1	4, 1,239	0,30975 0,001348917
Laser 2	4, 1,316	0,329 0,000363333
Laser 4	4, 1,227	0,30675 0,000224917
Laser 5	4, 1,19	0,2975 8,96667E-05
Laser 7	4, 1,197	0,29925 0,000474917
Laser 15	4, 1,17	0,2925 0,000123667
Laser 50	4, 1,165	0,29125 0,001336917

ANALISI VARIANZA Giorno 1

Origine della variazione	SQ	gdl	MQ	F	Valore di significatività	F crit
Tra gruppi	0,014418722	8	0,00180234	2,017335993	0,082718746	2,305313177
In gruppi	0,0241225	27	0,000893426			
Totale	0,038541222	35				

VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DI LOW-LEVEL LASER THERAPY SUI FIBROBLASTI: STUDIO IN VITRO

Analisi varianza: ad un fattore Alpha=0,05 - Giorno 2

RIEPILOGO

Gruppi	Somma	Varianza
Ctrl	4 1,98 0,495	0,002267333
Laser 0,5	4 1,903 0,47575	0,002500917
Laser 1	4 1,83 0,4575	0,001606333
Laser 2	4 1,728 0,432	0,000918
Laser 4	4 1,86 0,465	0,000806667
Laser 5	4 1,938 0,4845	0,001600333
Laser 7	4 1,734 0,4335	0,000283
Laser 15	4 1,748 0,437	5,33333E-06
Laser 50	4 1,702 0,4255	0,001504333

ANALISI VARIANZA Giorno 2

Origine della variazione	SQ	gdl	MQ	F	Valore di significatività	F crit
Tra gruppi	0,020718889	8	0,002589861	2,028214666	0,081156576	2,305313177
In gruppi	0,03447675	27	0,001276917			
Totale	0,055195639	35				

Analisi varianza: ad un fattore Alpha=0,05 - Giorno 4

RIEPILOGO

Gruppi	Somma	Varianza
Ctrl	4 3,942 0,9855	0,001926333
Laser 0,5	4 3,482 0,8705	0,000493667
Laser 1	4 3,487 0,87175	0,00598425
Laser 2	4 4,271 1,06775	0,004252917
Laser 4	4 4,164 1,041	0,016215333
Laser 5	4 3,95 0,9875	0,006297
Laser 7	4 3,854 0,9635	0,002590333
Laser 15	4 3,884 0,971	5,33333E-06
Laser 50	4 3,962 0,9905	0,007600333

ANALISI VARIANZA Giorno 4

Origine della variazione	SQ	gdl	MQ	F	Valore di significatività	F crit
Tra gruppi	0,140477056	8	0,017559632	3,483631559	0,006914199	2,305313177
In gruppi	0,1360965	27	0,005040611			
Totale	0,276573556	35				

Analisi varianza: ad un fattore Alpha=0,05 - Giorno 7

RIEPILOGO

Gruppi	Somma	Varianza
Ctrl	4 4,155 1,03875	0,003504917
Laser 0,5	4 3,926 0,9815	0,001400333
Laser 1	4 4,157 1,03925	0,001696917
Laser 2	4 4,107 1,02675	0,005185583
Laser 4	4 3,968 0,992	0,004504667
Laser 5	4 3,964 0,991	0,007764667
Laser 7	4 4,053 1,01325	0,005517583
Laser 15	4 3,752 0,938	0,001121333
Laser 50	4 3,979 0,99475	0,00412825

ANALISI VARIANZA Giorno 7

Origine della variazione	SQ	gdl	MQ	F	Valore di significatività	F crit
Tra gruppi	0,033064889	8	0,004133111	1,068163708	0,413489362	2,305313177
In gruppi	0,10447275	27	0,003869361			
Totale	0,137537639	35				

Figura 40

VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DI LOW-LEVEL LASER THERAPY SUI FIBROBLASTI: STUDIO IN VITRO

La tabella 9 mostra se c'è significatività statistica tra ogni gruppo e il controllo e se la significatività è positiva (colore verde), ossia il numero di proteine cellulari nei diversi gruppi è maggiore del numero di proteine cellulari nel controllo o negativa (colore rosso), se il numero di proteine cellulari nei differenti gruppi è inferiore al numero di proteine cellulari nel controllo.

TEST DELLA VARIANZA	0,5 J /cmq Vs CTRL	1 J /cmq Vs CTRL	2 J /cmq Vs CTRL	4 J /cmq Vs CTRL	5 J /cmq Vs CTRL	7 J /cmq Vs CTRL	15 J /cmq Vs CTRL	50 J /cmq Vs CTRL
Tempo1	0,284349697	0,055033465	0,045716962	0,103671852	0,103181948	0,065520729	0,139533379	0,212965549
Tempo2	0,212023768	0,207299824	0,06806822	0,105872599	0,371944878	0,048902644	0,043007643	0,098599053
Tempo4	0,015851389	0,014459345	0,00790313	0,202646175	0,486269773	0,119098443	0,268300126	0,463009334
Tempo7	0,046467501	0,492321704	0,228648152	0,253772169	0,259011588	0,225453965	0,048176239	0,193551741
TEST DELLA VARIANZA Alpha=0,05	0,5 J /cmq Vs CTRL	1 J /cmq Vs CTRL	2 J /cmq Vs CTRL	4 J /cmq Vs CTRL	5 J /cmq Vs CTRL	7 J /cmq Vs CTRL	15 J /cmq Vs CTRL	50 J /cmq Vs CTRL
Tempo1			↑					
Tempo2						↓	↓	
Tempo4	↓	↓	↑					
Tempo7	↓						↓	

Tabella 9

I dati sono stati elaborati con dei grafici. Osservando il grafico (Fig.41) si constata un andamento simile al saggio MTT, ossia un aumento della proliferazione al giorno 1 rispetto al gruppo controllo, una diminuzione della proliferazione al giorno 2 e una ripresa al giorno 4 e 7.

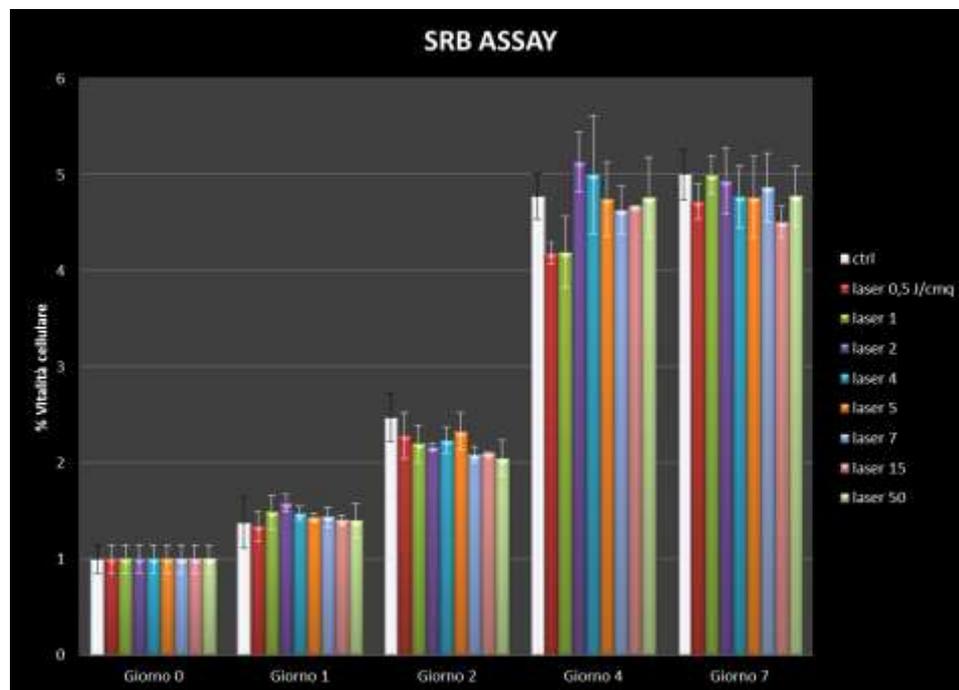


Figura 41

VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DI LOW-LEVEL LASER THERAPY SUI FIBROBLASTI: STUDIO IN VITRO

Valutando nel dettaglio i giorni successivi all'irradiazione laser, come effettuato per il test MTT, si nota che al giorno 1 (Fig.42) l'unico gruppo che mostra una significatività statistica se paragonato al controllo ($P \leq 0.05$) è il gruppo irradiato con 2 J/cm^2 , per cui si ha un numero di proteine cellulari maggiore rispetto al controllo. Tutti gli altri gruppi non si discostano in modo significativo dal controllo ($P > 0.05$).

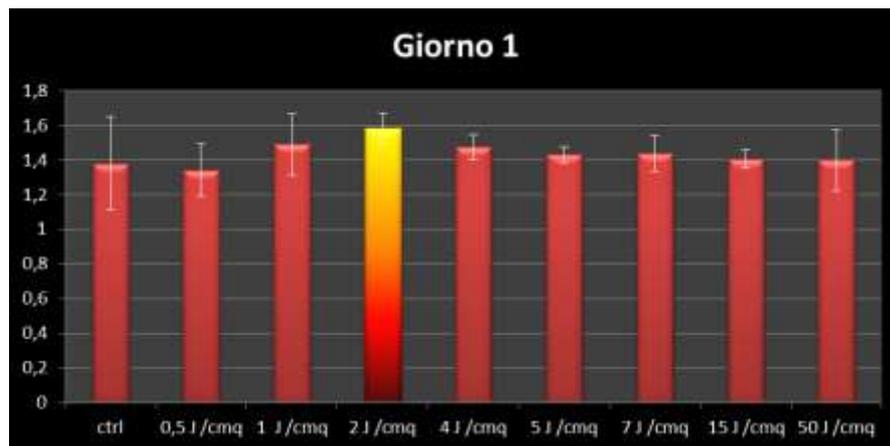


Figura 42

Al giorno 2 (Fig.43), i gruppi irradiati con 7 J/cm^2 e 15 J/cm^2 presentano una significatività se paragonati al controllo ($P \leq 0.05$), in particolare presentano una proliferazione minore sempre rispetto al controllo, anche con il saggio MTT al giorno 2 il gruppo irradiato con 15 J/cm^2 presenta una significatività negativa.



Figura 43

VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DI LOW-LEVEL LASER THERAPY SUI FIBROBLASTI: STUDIO IN VITRO

Al giorno 4 (Fig. 44), i gruppi irradiati con 0,5 J/cm², 1 J/cm² e 2 J/cm² presentano una significatività statistica se paragonati al controllo (P≤0.05), in particolare il gruppo irradiato con 2 J/cm² è l'unico a presentare una proliferazione, mentre gli altri due hanno uno scostamento in negativo dalla media, sempre rispetto al controllo (P>0.05). Il gruppo irradiato con 1 J/cm² presenta un andamento negativo come nel test MTT.

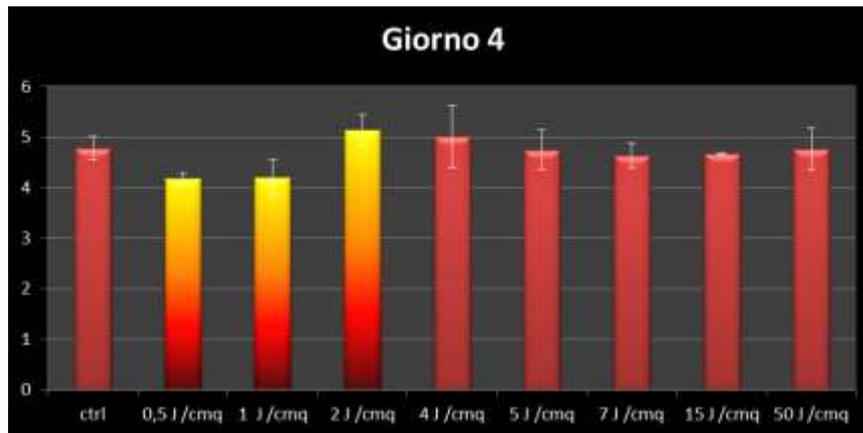


Figura 44

Al giorno 7 (Fig. 45), non si ha significatività statistica per quasi tutti i gruppi che presentano un andamento schiacciato comparabile con quello del controllo (P>0.05); gli unici gruppi che si discostano dal valore del controllo in modo significativo (P≤0.05), ma negativo sono i gruppi irradiati con 0.5 e 15 J/cm².



Figura 45

VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DI LOW-LEVEL LASER THERAPY SUI FIBROBLASTI: STUDIO IN VITRO

Per poter analizzare al meglio i risultati ottenuti con il saggio colorimetrico MTT appare interessante valutare l'andamento dei gruppi irradiati che sono risultati significativi in positivo con delle linee di tendenza (Fig. 46).

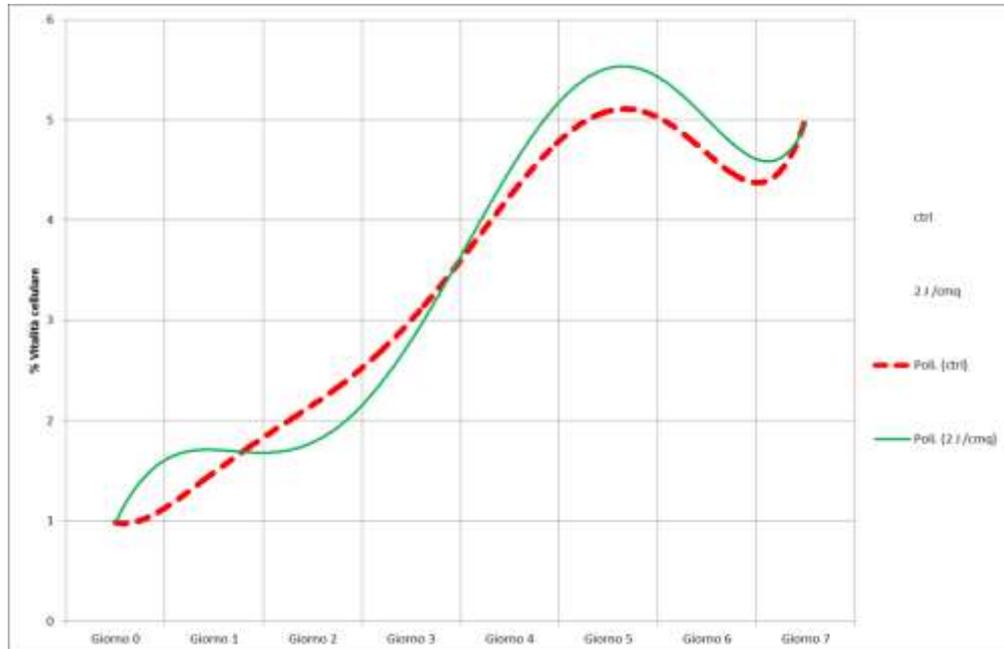


Figura 46

Il grafico mostra un andamento simile a quello del saggio MTT, infatti al giorno 1 il comportamento del laser presenta un input positivo dato dall'irradiazione laser, anche se l'unico gruppo ad avere una significatività statistica è il gruppo irradiato con 2 J/cm^2 . Al giorno 2 si ha una stabilità con dei valori che non si discostano in modo significativo dal controllo, al giorno 4 si ha una proliferazione e poi una stabilità al giorno 7.

VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DI LOW-LEVEL LASER THERAPY SUI FIBROBLASTI: STUDIO IN VITRO

La linea di tendenza rispecchia l'andamento temporale effettivo del gruppo (Fig. 47).

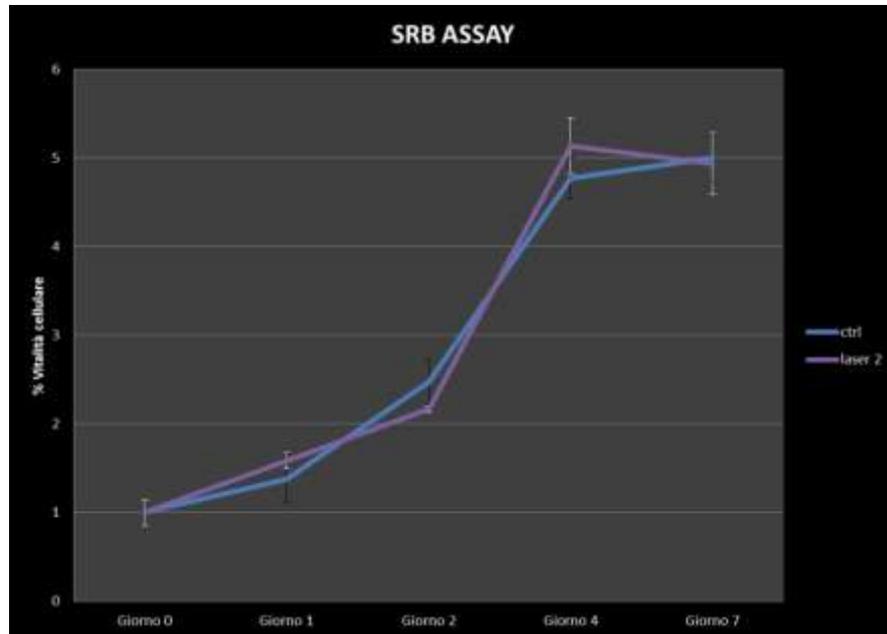


Figura 47

4 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Nella sperimentazione sono stati valutati gli effetti di LLLT con un laser a diodi di 980 nm di lunghezza d'onda con differenti densità di energia su colture di fibroblasti. È interessante notare che il comportamento dei fibroblasti è molto simile sia nel test di vitalità cellulare che di proliferazione, si nota, infatti, un aumento a 24 ore dall'irradiazione dei differenti gruppi irradiati rispetto al controllo, una deflessione a 48 ore e infine una ripresa ai giorni 4 e 7. Il saggio colorimetrico MTT ha presentato differenti valori che hanno mostrato solo un effetto positivo sulla vitalità cellulare se paragonati al controllo. In particolare sono risultati positivi i gruppi irradiati con, 2 J/cm^2 , 4 J/cm^2 , 5 J/cm^2 , ma valutando l'andamento medio di questi gruppi si può affermare che il gruppo irradiato con 2 J/cm^2 è il gruppo con un andamento migliore poiché presenta un aumento della vitalità cellulare al giorno 1 e 4, mentre il gruppo irradiato con 4 J/cm^2 presenta un effetto positivo solo al giorno 7 e il gruppo irradiato con 5 J/cm^2 solo al giorno 1 per poi appiattirsi verso il controllo (Fig.48).

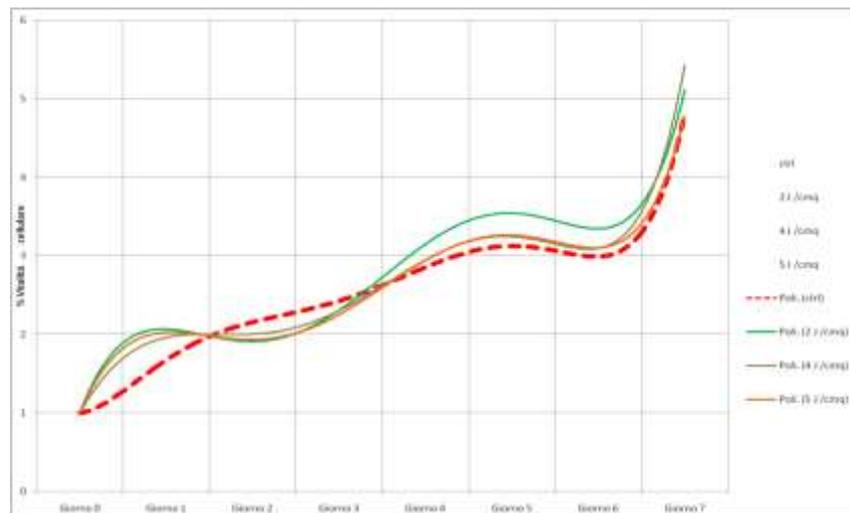


Figura 48

Valutando gli stessi gruppi con il test SRB si constata che non mostrano effetti proliferativi (Fig.49).

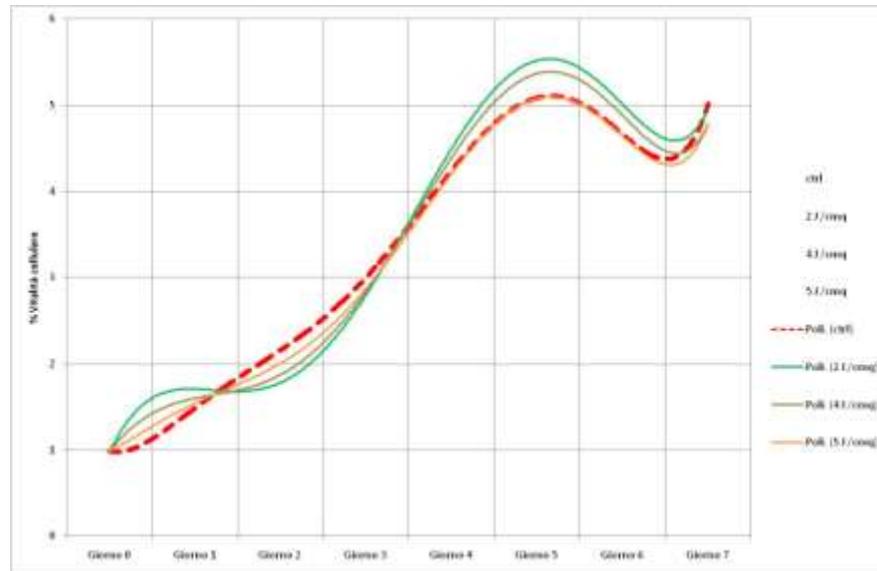


Figura 49

I gruppi irradiati con 4 J/cm^2 non si discostano in modo significativo dal gruppo non irradiato. L'unico gruppo che presenta il medesimo comportamento nei diversi giorni è il gruppo irradiato con 2 J/cm^2 . Questo gruppo nel saggio MTT ha un aumento della vitalità cellulare al giorno 1 e 4, mentre nei giorni 2 e 7 ha un andamento simile al controllo. Questo effetto si traduce nel test SRB con un aumento della proliferazione nei medesimi giorni. Non sempre un effetto positivo nella vitalità cellulare si traduce in un aumento della proliferazione, come mostrano le tabelle. Secondo Karu [65] la luce visibile (in particolare rosso) produce variazioni nei fotorecettori mitocondriali e quindi alla catena respiratoria. Reazioni fotochimiche, polimerizzazione di enzimi e altre risposte porta alla produzione di ATP, che non necessariamente determina un aumento della proliferazione cellulare. Smith [66] suggerisce che la radiazione infrarossa determina una cascata di eventi metabolici attraverso effetti foto fisici sulle membrane (probabilmente nei canali di Ca^{+}) che portano la stessa risposta finale. Tendenzialmente uno stimolo che favorisce un

aumento del metabolismo cellulare favorisce la proliferazione cellulare se adeguatamente forte. I risultati della sperimentazione indicano che l'unica densità di energia che oltre ad avere un effetto sul metabolismo cellulare ha anche una conseguenza sulla proliferazione è 2 J/cm^2 . Molteplici studi hanno mostrato l'effetto proliferativo di questa metodica sui fibroblasti [67][17][68][20], in particolare Saygun e colleghi [64] hanno osservato che una densità di energia di 2 J/cm^2 favorisce la proliferazione di fibroblasti e il rilascio dei fattori di crescita bFGF (basic fibroblast growth factor), IGF-1 (insulin like growth factor-1) e del recettore per IGF-1 (IGFBP3), così come Yu e colleghi [3] hanno individuato in $2,16 \text{ J/cm}^2$ un aumento nella proliferazione di fibroblasti. Ciò che appare interessante è che nonostante una lunghezza d'onda elevata (980 nm) se paragonata ai 2 studi citati in precedenza (685 nm per il gruppo di Saygun [64] e 660 nm Yu [13]) il valore di densità di energia che ha un effetto positivo è il medesimo e soprattutto che anche una lunghezza d'onda di 980 nm può determinare effetti proliferativi. Come riportato in precedenza, la letteratura scientifica presenta risultati discordanti sulla lunghezza d'onda. L'irradiazione su culture di fibroblasti con laser a 632.8 nm ha determinato effetti proliferativi[22], mentre Almeida e colleghi [17] hanno valutato che il tasso di crescita migliore si ha con laser a 780 nm piuttosto che a 670 nm sempre su fibroblasti, Pogrel e colleghi [62] hanno valutato l'effetto biostimolatorio di un laser Ga-Al-As con lunghezza d'onda di 830 nm e hanno notato che non c'è effetto biostimolatorio sulla proliferazione di fibroblasti e cheratinociti coltivati in vitro. In un altro studio, è stato osservato che lo stesso laser stimola la produzione di ossido nitrico e inibisce le citochine pro infiammatorie nei fibroblasti di pazienti diabetici[18] per cui si ha un effetto positivo. Uno studio con laser a diverse lunghezze d'onda[16] ha riportato che un laser con lunghezza d'onda di 810 nm inibisce la crescita dei fibroblasti, mentre 665nm e 675 nm determinano un input positivo. Pereira e colleghi [19] hanno utilizzato un laser di 904 nm sempre su fibroblasti avendo crescita cellulare. Appare interessante valutare se gli effetti a livello cellulare

siano i medesimi oppure potenziati se si applicano più dosi di energia a distanza di 24ore, come fa presupporre l'andamento della crescita cellulare e soprattutto se in condizioni di ipossia si ha una maggiore proliferazione. Karu[65] ha affermato che se le cellule stanno crescendo poco al tempo dell'irradiazione, si ha un andamento migliore rispetto all'irradiazione in condizioni ottimali, poiché nei processi di guarigione delle ferite i fibroblasti non sono presenti in condizioni favorevoli.

BIBLIOGRAFIA

1. **Forney R, Mauro T.** "Using laser in diabetic wound healing". *Diabetes Technol Ther.* 1999, Vol. 1, 189-192.
2. **Ratkay-Traub I, Hopp B, Bor Z, Dux L, Becker DL, Krenacs T.** "Regeneration of rabbit cornea following excimer laser photorefractive keratectomy: a study on gap junctions and epidermal growth factor receptor expression in correlation with cell proliferation". *Exp Eye Res.* 2001, Vol. 73, 291-302.
3. **Yu HS, Chang KL, Yu CL, Chen JW, Chen GS.** "Low- energy helium-neon laser irradiation stimulates interleukin-1 alpha and interleukin-8 release from cultured human keratinocytes". *J Invest Dermatol.* 1996, Vol. 107, 593-596.
4. **Bibikova A, Oron U.** "Promotion of muscle regeneration in the toad (*Bufo viridis*) gastrocnemius muscle by low-energy laser irradiation". *Anat Rec.* 1993, Vol. 235, 374-380.
5. **Conlan MJ, Rapley JW, Cobb CM.** "Biostimulation of wound healing by low-energy laser irradiation. A review". *J Clin Periodontol.* 1996, Vol. 23, 492-496.
6. **Karu T, Pyatibrat L, Kalendo G.** "Irradiation with He-Ne laser increase ATP level on cells cultivated in vitro". *J Photochem Photobiol.* 1995, Vol. 27, 219-223.
7. **Kalthof B, bechem M, Flocke K, Pott L, Schramm M.** "Kinetics of ATP-induced Ca²¹ transients in cultured pig aortic smooth muscle cells depend onn ATP concentration and stored Ca²⁺". *J Physiol (Lond).* 1996, Vol. 466, 245-262.

8. **Malam-Souley R, Seye C, Gadeau AP, et al.** "Nucleotide receptor P2u partially mediates ATP-induced cell cycle progression of aortic smooth muscle cells". *J Cell Physiol.* 66 1996, p. 57-65.
9. **Ohshiro T, Fujino T.** "Laser applications in plastic and reconstructive surgery". *Keio J med.* 42 1993, p. 191-195.
10. **Nanami T, Shiba H, Ikeuchi H, Nagai T, Asanami S, Shibata T.** "Clinical applications and basic studies laser in dentistry and oral surgery". *Keio J Med.* 42 1993, p. 199-201.
11. **Hawkins D, Abrakamse H.** "Biological effects of helium-Neon laser irradiation on normal and wounded human skin fibroblasts". *Photomed Laser Sur.* 23 2005, p. 251-259.
12. **Wilden L, Karthein R.** "Import of radiation phenomena of electrons and therapeutic low-level laser in regard to mitochondrial energy transfer". *J Clin Laser Med Surg.* 16 1998, p. 159-165.
13. **Yu W, Naim JO, Lanzafame RJ.** "The effect of laser irradiation on the release of bFGF from 3T3 fibroblasts". *Photochem Photobiol.* 59 1994, 2, p. 167-170.
14. **Pourreau-Schneider N, Ahmed A, Soudry A et al.** "Helium-Neon laser treatment transforms fibroblast into myofibroblasts". *Am J Pathol.* 137 1990, 1, p. 171-178.
15. **Steinlechner C, Dysonm M.** "The effects of low-level laser therapy on the proliferation of keratinocytes". *Laser Ther.* 5 1993, p. 65-73.
16. **Moore P, Ridgway TD, Higbee RG, Howard EW, Lucroy MD.** "Effect of wavelength on low-intensity laser irradiation stimulated cell proliferation in vitro". *Laser Surg med.* 36 2005, p. 8-12.
17. **Almeida-Lopes L, Rigau J, Zangaro RA, Guiduli-Neto J, Jaeger MMM.** "Comparison of the low level therapy effects on cultured human gingival

fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence".
Lasers Surg Med. 29 2001, p. 179-184.

18. **Hourel NN, Sekhejane PR, Abrahamse H.** "Irradiation at 830° nm stimulates nitric oxide production and inhibits pro-inflammatory cytokines in diabetic wounded fibroblast cells". *Lasers Surg Med.* Aug 2010, p. 494-502.
19. **Pereira AN, Eduardo CP e Matson E, Marques MM.** "Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts". *Lasers Surg med.* 31 2002, p. 263-267.
20. **Kreisler M, Christoffers AB, Al-Haj H, Willershausen B, D'Hoedt.** "Low-level 809 nm diode laser induced in vitro stimulation of the proliferation of human gingival fibroblasts". *Lasers Surg med.* 30 2003, p. 365-369.
21. **Alghamdi KM, Kumar A, Moussa NA.** "Low-level laser therapy. a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells". *Laser med Sci.* Jan 2011, Vol. 28.
22. **Hawkins D, Abrahamse H.** "Effect of multiple exposures of low-level laser therapy on the cellular responses of wounded human skin fibroblast". *Photomed Laser Surg.* 24 2006, p. 705-714.
23. **Donzelli E, salvedè A, Mimo P, Viganò M, Morrone M, Papagna R, Carini F, zaopo A, Miloso M, Baldoni M, Tredici G.** "Mesenchymal stem cells cultured on a collagen scaffold: in vitro osteogenic differentiation". *Arch Or Biology.* 52 2007, p. 64-73.
24. **Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV e Panasyuk AF, keiliss-Borok IV.** "Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation". *Transplantation.* 17 1974, p. 331-340.

25. **Minguel JJ, Erices A, Meng A, Conget P.** "Mesenchymal stem cells". *Exp Biol Med.* 226 2001, p. 507-520.
26. **Bruder SP, Fink DJ, Caplan AL.** "Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair and skeletal regeneration". *J cell Biochem.* 56 1994, p. 283-294.
27. **Mbalaviele G, Jaiswal N, Meng A, Cheng L, van den Bos C, theide M.** "Human mesenchymal stem cells promote human osteoclast differentiation from CD34+ bone marrow hemapoietic progenitors". *Endocrin.* 140 1999, p. 336-343.
28. **Majumdar MK, Theide MA, haynesworth SE, Bruder SP, Gerson SL.** "Human marrow derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hemapoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when diffentiated toward stromal and osteogenic lineages". *J Hematother Stem Cell Res.* 9 2000, p. 841-8.
29. **Reese JS, Koc ON, Gerson SL.** "Human mesenchymal stem cells provide stromal support for efficient CD34+ transduction". *J Hematother.* 8 1999, p. 515-23.
30. **Majumdar M, Theide M, Mosca J, Moorman M, Gerson S.** "Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) ans stromal cells". *J Cell Phys.* 176 1998, p. 57-66.
31. **S, Egginton.** "The role of pericytes in controlling angiogenesis in vivo.". *Adv Exp Med Biol.* 476 2000, p. 81-99.
32. **Eduardo P, Bueno DF, De Freitas PM.** "Stem cell proliferation under low intensity laser irradiation: a preliminary study". *Lasers Surg Med .* 40 2008, 6, p. 433-38.

33. **Mvula B, Mathope T, Moore T, Abrahamse H.** "The effect of low-level laser irradiation on adult human adipose-derived stem cells". *Lasers Med Sci.* 23 2008, 3, p. 277-82.
34. **Hou JF, Zhang H, Yuan X, Li J, Wei YJ, Hu SS.** "In vitro effects of low-level laser irradiation for bone marrow mesenchymal stem cells: proliferation, growth factors and myogenic differentiation". *Lasers Surgs Med.* 40 2008, 10, p. 726-733.
35. **Sobanko JF, Alster T.** "Efficacy of low-level laser therapy for chronic cutaneous ulceration in humans: a review and discussion". *Dermatol Surg.* 34 2008, p. 991-1000.
36. **Mester E, Ludany G, Sellyei M et al.** "Investigation of the inhibitory and stimulating effect of the laser rays". *Arch Klin Chir.* 1968, Vol. 322, p. 1022-5.
37. **Hrnjak M, Kuljic-Kapulica N, Budisin A, Giser A.** "Stimulatory effect of low-power density He-Ne laser radiation on human fibroblasts in vitro". *Vojnosanit Pregl.* 1995, Vol. 52, p. 539-546.
38. **Boulton M, Marshall J.** "He-Ne laser stimulation of human fibroblast proliferation and attachment in vitro". *Lasers Life Sci.* 1986, Vol. 1, 125-134.
39. **Quickenden T, Daniels L.** "Attempted biostimulation of division in *Saccharomyces cerevisiae* using red coherent light". *Photochem Photobiol.* 1993, Vol. 57, p. 272-278.
40. **Corr L, Burnstock G.** "Analysis of P2-purinoceptor subtypes on the smooth muscle and endothelium of rabbit coronary artery". *J Cardiovasc Pharmacol.* 709-715 23 1994.

41. **Kitajima S, Ozaki H, Karaki H.** "Role of different subtypes of P2 perinoreceptor on cytosolic Ca²⁺ levels in rat aortic smooth muscle". *Eur J Pharmacol* . 263-267 266 1994.
42. **Shefer G, Oron U, Irintchev A, Werning A, Halevy O.** "Skeletal muscle cell activation by low-energy laser irradiation: a role for the MAPK/ERK pathway". *J Cell Physiol* . 187 2001, p. 73-80.
43. **Anders JJ, Borke RC, Woolery SK, Merwe WP.** "Low-power laser irradiation alters the rate of regeneration of the rat facial nerve. *Lasers Surg Med*. 72-82 13 1993.
44. **Luger EL, Rochkind S, Wollman Y, Kogan G, Dekel S.** "Effect of low-power laser irradiation on the mechanical properties of bone fracture healing in rats". *Lasers Surg Med*. 22 1998, p. 97-102.
45. **Mester E, Spiry T, Szende B.** "Effect of laser-rays on wound-healing". *Am J Surg*. 1971, Vol. 122, p. 532-5.
46. **Laakso EL, Cramond T, Richardson C, Galligan JP.** "Plasma ACTH and beta endorphin levels in response to low level laser therapy for myofascialtrigger points". *Laser Ther*. 1994, Vol. 3, p. 133-42.
47. **Le Blank K, Rasmusson I, Sundberg B et all.** "Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells". *Lancet*. 363 2004, p. 1439-1441.
48. **Schachinger V, Erbs S, Elsasser A et all.** "Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction". *N Engl J Med*. 355 12 2006, p. 1210-1221.
49. **Prockop DJ, Olson SD.** "Clinical trials with adult stem/progenitor cells for tissue repair:let's not overlook some essential precautions". *Blood*. 8 2007, p. 3147-3151.

50. **Dennis JE, Charbord P.** "Origin and differentiation of human and murine stroma". *Stem Cells*. 20 2002, p. 205-214.
51. **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*. 22 1998, p. 347-354.
52. **Tuby H, Maltz L, Oron U.** "Low-level laser irradiation (LLLI) promotes proliferation of mesenchymal and cardiac stem cells in culture". *Lasers Surg Med*. 39 2007, p. 373-378.
53. **Bjorne A, Agerberg G.** "Symptom relief after treatment of temporomandibular and cervical spine disorders in patients with Meniere's disease: a 3-year follow up". *J Crandomandib Pract* . 21 2003, p. 50-60.
54. **Kimura Y, Wilder-Smith P, Yonaga K, Matsumoto K.** "Treatment of dentine hypersensitivity by laser: a review". *J Clin Periodontol*. 27 2000, p. 715-21.
55. **Vèlez-González M, Urrea-Arbalàes A, Serra-Baldrich E, Pavesi M, Camarasa JM, Trelles MA.** "Treatment of relapse in herpes simplex on labial and facial areas and of primary herpes simplex on genital areas and "Area pudenda" with low power HeNe-laser or acyclovir administered orally. *Proc SPIE*. 2630 1995, p. 43-50.
56. **Schindl A, Neuman R.** "Low-intensity laser therapy is an effective treatment for recurrent herpes simplex infection: results from a randomized double-blind placebo controlled study". *J Invest Dermatol*. 113 1999, p. 221-3.
57. **Wong SF, Wilder-Smith P.** "Pilot study on laser effects on oral mucositis in patients receiving chemotherapy". *Cancer J*. 8 2002, p. 247-54.
58. **Kuhn A, Porto FA, Miraglia P, Brunetto AL.** "Low-level infrared laser therapy in chemotherapy-induced oral mucositis: a randomized placebo-

controlled trial in children". *J Pediatr Hematol Oncol.* 31 Jan 2009, p. 33-7.

59. **Eckerdal A, Lehmann Bastian H.** "can low reative-level laser therapybe used in the treatment of neurologic facial pain?A double blind, placebo controlled investigation of patients with trigeminal neuralgia". *Laser Ther.* 8 1996, p. 274-52.
60. **Rodrigues MTJ, Ribeiro MS, Groth EB.** "Evaluation of effects of laser therapy on oral ulceration induced by fixed orthodontic applinces". *Am Soc Laser Med Surg.* 2002.
61. **Lanzafame RJ, Stadler I, Kurtz AF, Connelly R, Peter TA, Brondon P, Olson D.** "Reciprocity of enposure time and irradiance on energy density during photoradiation on wound healing in a murine pressure ulcer model". *Lasers Surg Med.* 39 2007, p. 534-542.
62. **Pogrel MA, Chen JW, Zhang K.** "Effects of low-energy gallium-aluminum-arsenide laser irradiation on cultured fibroblasts and keratinocytes". *Laser Surg Med.* 20 1997, p. 426-32.
63. **Schindl A, Merwald H, Schindl L, Kaun C, Wojta J.** "Direct stymulatory effect of low-intensity 670 nm laser irradiation on human endothelial cell proliferation". *Br J Dermatol.* 148 2003, p. 334-336.
64. **Saygun I, Karacay S, Serdar M, Ural AU, Sencimen M, Kurtis B.** "Effects of laser irradiation on the release of basic fibroblast growth factor (bFGF), insulin like growth factor-1 (IGF-1) and receptor of IGF-1 (IGFBP3) from gingival fibroblasts". *Laser Med Sci.* 23 2008, p. 211-215.
65. **T, Karu.** "Photobiological fundamentals of low power thrapy". *J Quantum Electron.* 23 1987, p. 1710-1719.

66. **K, Smith.** "The photobiological basis of low level laser radiation therapy".
Laser Ther. 1991, p. 19-24.
67. **Basso FG, Pansani TN, Turrioni AP, Bagnato V, Hebling J, De Souza Costa C.** "In vitro wound healing improvement by low level laser therapy application in cultured gingival fibroblasts". *International J Dentistry.* 2012, p. 1-6.
68. **Damante AC, De Micheli G, Miyagi SPH, Feist IS, Marques MM.** "Effect of laser phototherapy on the release of fibroblast growth factors by human gingival fibroblasts". *Lasers in Medical Science.* 2009, p. 885-891.
69. **Hawkins D, Houreld N, Abrahamse H.** "Low level laser therapy (LLLT) as an effective therapeutic modality for delayed wound healing". *Ann N.Y. Acad Sci.* 1056 2005, p. 486-493.
70. **K, Smith.** "The photobiological basis of low level laser radiation therapy".
Laser Ther. 1991, p. 19-24.