

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
“VICTOR BABEȘ” TIMIȘOARA
FACULTATEA DE MEDICINĂ DENTARĂ
DEPARTAMENTUL II**

LUCA RUXANDRA ELENA



TEZĂ DE DOCTORAT

**STUDIUL INFLUENȚEI RADIAȚIEI LASER
CU NIVEL ENERGETIC SCĂZUT
ASUPRA MECANISMULUI BIOLOGIC
AL REGENERĂRII OSOASE GHIDATE**

– R E Z U M A T –

Conducător Științific
PROF. UNIV. DR. CARMEN TODEA

**Timișoara
2020**

CUPRINS

| | |
|----------------------------------|------|
| Lista lucrărilor publicate | VI |
| Lista abrevierilor..... | VII |
| Indexul figurilor..... | X |
| Indexul tabelor..... | XV |
| Dedicație | XVI |
| Mulțumiri | XVII |
| INTRODUCERE..... | XIX |

PARTE GENERALĂ - Stadiul actual al cunoașterii

| | |
|--|----|
| Capitolul 1. Generalități privind fiziologia osoasă și tehnicile de regenerare osoasă ghidată | 1 |
| 1.1. Fiziologia țesutului osos și mecanismul biologic al vindecării osoase | 1 |
| 1.1.1. Generalități referitoare la țesutul osos | 1 |
| 1.1.2. Procesul fiziologic de formare osoasă | 2 |
| 1.1.3. Procesul de vindecare osoasă | 3 |
| 1.1.4. Particularități ale osului alveolar..... | 8 |
| 1.2. Prevenirea resorbției alveolare și conceptul de regenerare osoasă ghidată | 10 |
| 1.3. Materiale de substituție osoasă și membrane utilizate în tehnicile de regenerare osoasă ghidată..... | 12 |
| 1.3.1. Autogrefele osoase | 12 |
| 1.3.2. Xenogrefele osoase | 14 |
| 1.3.3. Alogrefele osoase | 14 |
| 1.3.4. Grefele sintetice/aloplastice | 15 |
| 1.3.5. Rolul membranelor în tehnicile de regenerare osoasă..... | 17 |
| 1.3.6. Vascularizația și angiogeneza în procesele de regenerare osoasă | 20 |
| 1.4. Metode de evaluare a cantității și a calității substratului osos..... | 21 |
| 1.4.1. Osteodensitometria DEXA (Dual-energy x-ray absorptiometry - DXA) | 22 |
| 1.4.2. Tomografie computerizată (CT) | 23 |
| 1.4.3. Tomografie calculată cantitativă periferică de înaltă rezoluție - HR-pQCT | 24 |
| 1.4.4. Microtomografia computerizată - micro-CT sau μ CT | 24 |
| 1.4.5. Tomografie computerizată cu fascicul de con – CBCT | 26 |
| 1.4.6. Tomografia în coerență optică (OCT) | 28 |
| Capitolul 2. Mecanismul, rolul și beneficiile terapiei laser în cadrul procedurilor de augmentare și regenerare osoasă | 29 |
| 2.1. Generalități cu privire la fotobiomodulare în sfera medicinei dentare | 29 |
| 2.2. Doza de radiație laser | 30 |
| 2.3. Mecanismul de acțiune al fotobiomodulării laser | 34 |
| 2.4. Efectele radiației laser la nivelul țesutului osos..... | 39 |

PARTE SPECIALĂ – Contribuții personale

| | |
|--|-----|
| Capitolul 3. Date preliminare necesare realizării cercetării personale și stabilirea modelului experimental | 43 |
| 3.1. Date preliminare necesare realizării cercetării personale și scopul studiului | 43 |
| 3.2. Date preliminare necesare pentru stabilirea modelului experimental | 46 |
| 3.3. Material și metodă | 48 |
| 3.3.1. Stabilirea modelului animal și a grupelor de studiu | 48 |
| 3.3.2. Intervenția chirurgicală pe modelul animal | 49 |
| 3.3.3. Expunerea la radiația laser | 52 |
| 3.3.4. Recoltarea și pregătirea probelor | 53 |
| Capitolul 4. Studiul eșantioanelor prelevate cu ajutorul Master Slave OCT | 55 |
| 4.1. Scanarea eșantioanelor recoltate | 55 |
| 4.2. Evaluarea cantitativă a osului nou format | 57 |
| 4.3. Rezultate | 58 |
| 4.4. Discuții | 67 |
| 4.5 Concluzii | 74 |
| Capitolul 5. Studiul histologic al eșantioanelor prelevate | 75 |
| 5.1. Examinarea histologică a probelor | 75 |
| 5.2. Rezultate | 75 |
| 5.3. Discuții și concluzii | 86 |
| Capitolul 6. Studiul eșantioanelor prelevate cu ajutorul Microtomografiei Synchrotron | 87 |
| 6.1. Scanarea eșantioanelor recoltate | 87 |
| 6.2. Evaluarea cantitativă a osului nou format | 88 |
| 6.3. Rezultate | 89 |
| 6.4. Discuții | 95 |
| 6.5. Concluzii | 98 |
| Capitolul 7. Studiul retrospectiv al tomografiei computerizate cu fascicul conic în cazul pacienților care au urmat tratament de fotobiomodulare | 99 |
| 7.1. Introducere și scopul studiului | 99 |
| 7.2. Material și metodă de lucru | 101 |
| 7.3. Rezultate | 104 |
| 7.4. Discuții | 110 |
| 7.5. Concluzii | 113 |
| CONCLUZII FINALE ȘI CONTRIBUȚII PROPRII | 114 |
| BIBLIOGRAFIE | 119 |
| ANEXE | I |

INTRODUCERE

Resorbția crestei alveolare consecutivă pierderii dinților este un fenomen comun. Ulterior extracției unui dinte, creasta alveolară descrește foarte rapid în lățime și înălțime, cu o pierdere de aproximativ 40-60% în primii 3 ani, după care procentul scade la 0.25-0.5% pierdere anuală ulterioară. Conceptul de regenerare osoasă a apărut ca și o consecință firească a nevoii de reabilitare orală a pacienților parțial sau total edentați, care nu beneficiază de o ofertă osoasă suficientă restaurărilor protetice tradiționale sau a celor pe implanturi dentare. Reabilitarea orală a pacienților parțial sau total edentați cu ajutorul implanturilor dentare a devenit un tratament de rutină în ultimele decade, cu rezultate viabile pe termen lung.

Utilizarea terapiei laser în domeniul implantologiei are o aplicabilitate largă, datorită efectului pozitiv pe care îl exercită radiația laser asupra proceselor de reparație tisulară. Rolul fotobiomodulării în cadrul proceselor de vindecare, reparare și regenerare osoasă au avut la bază studiile anterioare, care au demonstrat faptul că fibroblaștii iradiați prin fotobiomodulare au produs o cantitate mai mare de collagen. Pe același raționament, s-a mers mai departe, considerându-se că osteoblaștii iradiați cu laser vor fi stimulați în vederea formării matricei osteoide. Datorită efectelor pozitive asupra metabolismului osos, observate în special în cazul consolidării fracturilor, utilizarea laserului terapeutic cu nivel energetic scăzut (denumit în continuare LLLT sau fotobiomodulare) a fost încurajată în practica clinică. Efectele legate de biomodulare includ vascularizație crescută, creșterea activității osteoblastice, organizarea de fibre de collagen și schimbări în nivelul mitocondrial și intracelular de adenosin trifosfat. Este o metodă neinvazivă de a stimula osteogeneza și de a accelera vindecarea defectelor osoase¹⁻⁴.

OBIECTIVELE STUDIULUI

Primul obiectiv a constat în realizarea unui model experimental care să permită reproducerea studiului pe un număr suficient de subiecți, astfel încât rezultatele să poată fi evaluate din punct de vedere statistic. Studiul de față își propune să utilizeze defecte create în calvaria animalelor de studiu, acesta fiind un model versatil, care permite evaluarea biomaterialelor și a ingineriei țesutului osos abordate într-un sit ortopedic reproductibil și lipsit de încărcare cu forțe mecanice.

Cel de-al **doilea obiectiv** face referire la cunoașterea rolului și a beneficiilor terapiei laser în cadrul procedurilor de augmentare și regenerare osoasă. Pentru a obține efectele dorite, operatorul trebuie să stăpânească cunoștințe solide legate de utilizarea terapiei laser, care includ: dozele de radiație, punctele de aplicare a acesteia, specificitatea lungimii de undă indicate în tratamentele postchirurgicale, întrucât utilizarea incorectă a radiației laser poate provoca efecte necontrolate la nivelul țesuturilor orale. Efectele biomodulării, în asociere cu biomateriale în procesele de reparare a defectelor osoase, au nevoie de studii suplimentare, întrucât s-au constatat răspunsuri diferite din partea organismului gazdă.

Un **al treilea obiectiv** și aspect particular al acestei cercetări îl constituie stimularea colaborării cu centre internaționale specializate în acest domeniu, care sunt interesate, la rândul lor, să-și aducă contribuțiile în aceste direcții de interes medical. Publicarea studiilor multicenter are un rol determinant în evaluarea și implementarea eficientă a acestor metode de tratament. Obținerea acestui deziderat se intenționează a fi realizată integrând în prezentul studiu mai multe tehnologii cu specificitate și aplicabilitate în domeniul nostru de interes, și anume micro-CT utilizând radiația Synchrotron, tomografia în coerență optică, tomografia computerizată cu fascicul conic și standardul de aur în ceea ce privește evaluarea calitativă a reparării osoase – analiza histologică. În felul acesta, urmărim să evaluăm procesul de reparare osoasă în complexitatea sa, nu doar din punct de vedere cantitativ sau al microarhitecturii osoase, ci și din punct de vedere calitativ, al componenței și al gradului de mineralizare, pentru a obține o vedere de ansamblu asupra rezultatelor obținute prin tehnica propusă.

În prima parte a tezei sunt prezentate o serie de noțiuni din literatura de specialitate, care reprezintă **stadiul actual al cunoașterii** în domeniul de interes și care urmează câteva direcții de cercetare: fiziologia țesutului osos și mecanismul biologic al vindecării osoase, prevenirea

resorbției alveolare și conceptul de regenerare osoasă ghidată, materiale de substituție osoasă și membrane utilizate în tehnicile de regenerare osoasă ghidată, metode de evaluare a cantității și a calității substratului osos, mecanismul, rolul și beneficiile terapiei laser în cadrul procedurilor de augmentare și regenerare osoasă, generalități cu privire la fotobiomodulare în sfera medicinei dentare, doza de radiație laser, mecanismul de acțiune al fotobiomodulării laser, efectele radiației laser la nivelul țesutului osos.

În partea a doua sunt prezentate pe larg materialele, metodele și rezultatele obținute prin cercetările personale.

REZUMATUL CONTRIBUȚIILOR PROPRII

I. STABILIREA MODELULUI ANIMAL, INTERVENȚIA CHIRURGICALĂ ȘI TRATAMENTUL DE FOTOBIMODULARE

În prima parte a studiului, s-a decis utilizarea șobolanului de laborator, rasa Wistar. Am stabilit ca regiunea supusă cercetării să fie calvaria (osul parietal), datorită avantajelor expuse anterior, iar dimensiunea defectului critic a fost stabilită la 5 mm. Studiul a obținut acordul Comisiei de Etică din cadrul Universității de Medicină și Farmacie "Victor Babeș" din Timișoara și a inclus 24 de șobolani Wistar cu o greutate medie de 287 g (interval 247-312 g). Animalele au fost împărțite în 3 grupe de studiu, fiecare dintre acestea având 3 perioade de timp diferite, pe parcursul cărora s-a observat procesul de vindecare osoasă:

- *grupul control negativ (NC)*, la care se vor crea defecte critice de 5 mm în regiunea calvariei, după care animalele vor fi suturate și lăsate să se vindece spontan, pentru o perioadă de 14, 21, respectiv 30 zile
- *grupul de control pozitiv (PC)* la care se vor crea defecte critice de 5 mm în regiunea calvariei, se va realiza adiția defectelor cu xenogrefă și membrană de colagen, după care animalele vor fi suturate și lăsate să se vindece pentru o perioadă de 14, 21, respectiv 30 zile
- *grupul de studiu (+LLLT)*, la care se vor crea defecte critice de 5 mm în regiunea calvariei, se va realiza adiția defectelor cu xenogrefă și membrană de colagen și se va aplica tratament de fotobiomodulare imediat postoperator și ulterior, în zile alternative, pentru o perioadă de 14, 21, respectiv 30 zile.

Grupul de studiu este expus radiației laser cu nivel energetic scăzut, utilizând un echipament Galiiu-Aluminiu-Arseniu (IRRADIA Mid-Laser Stockholm, Suedia), cu lungime de lucru 808 nm, urmând un protocol stabilit de colectivul nostru de cercetare: 2J/cm² în prima, a doua și a treia zi după intervenția chirurgicală, apoi alternativ (1 zi iradiere, 1 zi pauză) în următoarele 14, 21, respectiv 30 zile, în funcție de grupul de studiu din care subiectul animal face parte. Protocolul de biomodulare a presupus utilizarea ghidului de plastic realizat intraoperator, pentru a replica aceeași poziție precisă, în cele 5 puncte de livrare a energiei luminoase : un punct situat central, în mijlocul defectului și patru puncte situate diametral opus, pe marginile defectului de 5 mm.

II. STUDIUL EȘANTIOANELOR PRELEVATE CU AJUTORUL MASTER SLAVE OCT

SCANAREA EȘANTIOANELOR RECOLTATE

Pentru a studia formarea de țesut osos nou în interiorul defectului - cu sau fără materialul de adiție - fiecare dintre cele patru cadrane ale defectelor este imaginat separat, cu ajutorul sistemului dezvoltat intern CMS / SS OCT. Interfața cu marginile defectului, respectiv cu osul nativ, este de interes special, pentru a studia procesul de neoformare osoasă, care, cel mai adesea, este inițiat de la periferia defectului osos.

Pentru a utiliza sistemul multimodal CMS / SS OCT în evaluarea cantitativă a vindecării osoase, diferitele tipuri de țesut osos trebuie să fie percepute distinct pe fiecare imagine *en-face* obținută în timpul procesului imagistic. Pragurile de luminozitate trebuie, prin urmare, să fie alocate fiecărui tip de țesut osos, luând în calcul diferențele de mineralizare dintre acestea. Pentru aceasta, a fost dezvoltat un software care să permită stabilirea pragurilor de luminozitate și să genereze, pe baza acestora, volumele procentuale ale tipurilor de țesuturi investigate.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Software-ul CMS pentru reconstrucția 3D / volumetrică a probei produce 600 de imagini pe un interval axial de 1,6 mm, pentru toate cele patru cadrane. Formarea de țesut osos nou, slab sau în curs de mineralizare, este comparată între cele trei grupuri, efectuate în trei momente ale timpului: (I) $t_1 = 14$ zile, (II) $t_2 = 21$ zile și (III) $t_3 = 30$ zile. Astfel, rezultă afișarea cu 12 imagini obținută de pe suprafața de $2,8 \times 2,8 \text{ mm}^2$ a unui cadran - pentru fiecare dintre probele luate în considerare. Investigațiile, precum și statisticile efectuate asupra datelor obținute au inclus toate cele patru cadrane și, astfel, întreaga zonă de interes, inclusiv periferia defectului, ca o modalitate de a reduce erorile cu privire la întreaga curbă a eșantionului și la cantitatea de os nativ inclus în anumite imagini.

Analiza statistică evidențiază informațiile obținute cu privire la curba de vindecare a țesutului osos: prin efectuarea unei comparații între cele trei grupuri de studiu rezultatele au arătat diferențe semnificative în procesul de vindecare, în funcție de momentul vindecării și de tratamentul aplicat. S-au constatat diferențe cu semnificație statistică între cele două grupuri de control, pozitiv B și negativ A. Procentul osului nou format a fost mai mare pentru perioada de vindecare de 30 de zile decât pentru 21 sau 14 zile, ambele pentru control negativ, Grupul A și pentru controlul pozitiv, Grupul B. Cea mai importantă variație a fost găsită prin efectuarea unei comparații între grupurile B și C, evaluând astfel efectul fotobiomodulării asupra procesului de vindecare a țesutului osos, în cazul aplicării tehnicilor de regenerare tisulară ghidată. Diferențe semnificative au fost constatate de-a lungul analizei statistice pentru perioada de vindecare de 21 de zile, unde s-a observat că radiația laser a avut cel mai mare efect, prin inducerea formării celei mai mari cantități de os nou. Rezultatele obținute cu OCT au fost confirmate la efectuarea examinării histologice a probelor.

Rezultatele obținute în cadrul studiului prezent sugerează că efectele pozitive ale fotobiomodulării asupra proceselor de reparație osoasă depind de timp, având un impact mai mare în timpul fazelor inițiale ale vindecării. Această concluzie este susținută de rezultatele altor grupuri de cercetare, care au utilizat alte metode de investigare decât OCT⁵⁻⁷. Analiza histologică calitativă și analiza histometrică au arătat că fotobiomodularea poate îmbunătăți procesul de formare a osului în defectele osoase umplute sau nu cu grefă osoasă bovină, dar fără a accelera resorbția particulelor din acest material în interiorul defectului osos⁸.

CONCLUZII

O analiză cantitativă a procesului de vindecare a defectelor osoase de la nivelul calvariei rasei Witsar a fost realizată folosind tomografia în coerență optică. Din cunoștințele deținute până în prezent, aceasta este prima dată când OCT a fost folosit ca instrument pentru a evalua efectele fotobiomodulării cu laser asupra regenerării osoase. În ciuda limitărilor inerente ale metodei, rezultatele obținute și statisticile efectuate utilizând OCT au fost în acord cu studiile anterioare care au abordat vindecarea osoasă folosind alte metode, inclusiv standardul de aur al evaluării calitative a țesutului osos, examinarea histologică.

Ca atare, consider că această cercetare reprezintă un progres în ceea ce privește imagistica *en-face* ca metodă de evaluare a regenerării osoase. Avantajul major al metodei este că poate fi aplicată pentru evaluări *in vivo*, folosind probe de mână cu scanare laser în cavitatea orală⁹.

III. STUDIUL HISTOLOGIC AL EȘANTIOANELOR PRELEVATE

EXAMINAREA HISTOLOGICĂ A PROBELOR

Deși invaziv și sensibil ca tehnică de lucru, standardul de aur în ceea ce privește procesele de vindecare tisulară rămâne examinarea histologică, motiv pentru care studiul experimental condus include realizarea și interpretarea secțiunilor histologice. O serie de parametri biologici trebuie să fie evaluați în repararea defectelor osoase, de exemplu, cantitatea de os nou format, resturile de biomateriale, celulele prezente, vascularizația și porozitatea biomaterialului, reacția inflamatorie sau cea de corp străin.

În cazul de față, probele obținute în urma experimentului animal au fost fixate în soluție de formol 10%, urmată de un agent de decalcifiere moderat. Blocurile de parafină rezultate în urma prelucrării au fost folosite pentru a realiza secțiuni suplimentare (grosime de 4 μ m, Thermo Scientific™ HM 355S Automatic Microtome, SUA), care au fost colorate cu hematoxină și eozină (HE) și au fost examinate în continuare la un microscop Leica DM750 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germania).

REZULTATE ANALIZĂ HISTOLOGICĂ

Examenul histologic a evidențiat aspecte interesante, diferite pentru grupele NC (control negativ), PC (control pozitiv) și +LLLT (grup de studiu, care a urmat tratament de fotobiomodulare), în funcție de perioada de vindecare.

Pe fragmentele examinate recoltate în ziua a 14-a, au fost identificate zone extinse de necroză și de extravazat hematic în grupul supus vindecării spontane. Celelalte două grupuri (PC și +LLLT) au arătat un material eozinofil omogen, un „corp străin” cu formare de granulom focal. Fragmentele grupului +LLLT au evidențiat țesut conjunctiv fibros (tânăr) bine reprezentat și infiltrat inflamator scăzut, comparativ cu restul grupelor.

Fragmentele recoltate la 21 de zile după intervenția chirurgicală au arătat o reducere a infiltratului inflamator și a granuloamelor de corp străin. Acestea au fost localizate cu precădere la periferie, țesutul conjunctiv fibros cuprinzând material eozinofil. Grupul NC a dezvăluit țesut conjunctiv fibrotic care a inclus zone opace optice și mai mult infiltrat inflamator. Grupul +LLLT prezintă țesut osos nou format, cu zone bogate în osteoblaste.

După 30 de zile de vindecare, s-a arătat că țesutul conjunctiv fibros încorporează material eozinofil omogen și lamelele osoase nou formate, osteoblastele fiind în număr mare în jurul lamelelor osoase, iar procesul inflamator a fost prezent, după cum a fost evidențiat de celulele multinucleare gigant.

DISCUȚII ȘI CONCLUZII

În cazul studiului nostru experimental animal, examinarea histologică a relevat diferențe semnificative cu privire la prezența infiltratului inflamator în diferite grupuri de studiu: la 14 zile, cantitatea redusă de infiltrat inflamator în grupul +LLLT permite organizarea țesutului conjunctiv tânăr, care acționează ca un precursor al țesutului osos nou format. Atunci când analizăm perioada de vindecare de 21 de zile, reducerea procesului inflamator este mai evidentă în grupele PC și +LLLT. În același timp, pe măsură ce se formează țesutul osos, grupul +LLLT prezintă zone bogate în osteoblaste. Pe măsură ce perioada de vindecare crește, diferențele dintre grupurile analizate în ceea ce privește inflamația sunt reduse, dar celule multinucleare gigant pot fi încă detectate. Într-un studiu similar, evaluarea histologică a arătat o creștere statistică semnificativă a formării osoase în grupul LLLT în raport cu grupul de control ($p < 0,05$). În plus, inflamația a fost redusă semnificativ în grupul LLLT comparativ cu grupul de control¹⁰.

În concluzie, se pare că efectele maxime ale fotobiomodulării apar în stadiile incipiente ale vindecării osoase, atunci când o cantitate mai mică de infiltrat inflamator este asociată cu formarea crescută de țesut osos tânăr. Deși are o importanță semnificativă, evaluarea histologică este invazivă, ceea ce nu permite examinări suplimentare la nivelul aceluiași probe.

IV. STUDIUL EȘANTIOANELOR PRELEVATE CU AJUTORUL MICROTOMOGRAFIEI SYNCHROTRON

SCANAREA EȘANTIOANELOR RECOLTATE ȘI EVALUAREA CANTITATIVĂ A OSULUI NOU FORMAT

Microtomografia cu raze X (micro-CT) a probelor a fost efectuată la SYRMEP, în cadrul bazei de cercetare synchrotron ELETTRA (Basovizza (TS), Italia). Reconstrucția tomografică completă a fost realizată folosind software-ul open source SYRMEP Tomo Project (STP)¹¹. Ulterior, software-ul VG Studio MAX 1.2 (Volume Graphics, Heidelberg, Germania) a fost utilizat pentru a genera imagini 3D, unde nivelurile de gri sunt proporționale cu densitatea de masă ρ . Algoritmul Scatter HQ cu un factor de suprapunere de 5.0 a fost utilizat pentru a imagina secțiunile 2D și reconstrucțiile 3D. Vârfuri diferite în scala nivelurilor de gri reprezintă faze diferite în cadrul eșantioanelor; volumul fiecărei faze este obținut prin înmulțirea volumului unui voxel ($\sim 730 \mu\text{m}^3$) cu numărul de voxelii care stau la baza vârfului asociat cu faza relevantă. O analiză morfometrică a fost realizată pentru a evalua procente de volum (vol.%) din următoarele faze în ceea ce privește volumul total mineralizat: os sub remodelare, os matur și biomaterial. Mai mult, a fost exploatat semnalul de refracție n , proporțional liniar cu densitatea de masă, pentru a calcula distribuția densității de masă osoasă relativă (MDD^r) a fiecărei probe.

Așa cum s-a procedat recent în alte studii¹², parametrii MDD^r au fost calculați cu referire strictă la porțiunea osoasă mineralizată a histogramelor, cu intensitățile normalizate, pentru fiecare eșantion, de zona de sub curbă. Întrucât eșantioanele sunt comparabile din punct de vedere al mărimii și compoziției, diferențele relative în distribuția densității masei dintre ele pot fi evaluate.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Două aspecte sunt evidente în reconstrucțiile 3D ale eșantioanelor reprezentate: în primul rând, osul nou format se formează în principal pe margini și nu în centrul defectului, iar acest lucru apare nu numai în grupul NC, ci și în grupurile PC și +LLLT (adică acolo unde este prezentă xenogrefa); în al doilea rând, cu excepția grupului +LLLT, este evidentă o creștere a volumului osului nou format în perioada cuprinsă între a 14-a și a 21-a zi de la intervenția chirurgicală. Mai mult, chiar dacă prezența masivă a biomaterialului împiedică o evaluare pe deplin fiabilă, se pare că după 14 zile de la operație, grosimea osului nou format pe marginile defectului este mai mare în grupul + LLLT decât în grupul PC. Acest tip de vindecare nu este la fel de evident pentru o perioadă mai lungă de timp.

Prima etapă a studiului a fost concentrată pe investigarea microarhitecturii osoase și pe evaluarea procentelor de volum (vol.%) ale diferitelor faze mineralizate (țesut osos în curs de remodelare, țesut osos matur și biomaterial), în raport cu volumul osos mineralizat total. Procentele de volum ale țesutului osos în curs de remodelare în raport cu cantitatea de țesut osos matur a crescut în timp. Această tendință a fost observată la toate grupurile, cu excepția celei tratate cu laser (+ LLLT), unde s-a constatat că la 14 zile de la intervenția chirurgicală, țesutul osos nou format se găsește deja în cantitate mai mare.

A doua etapă a studiului a fost concentrată pe investigarea distribuției relative a densității minerale osoase (MDD^r), adică asupra evaluării concentrației și distribuției calciului (% în greutate) în diferitele grupuri de studiu. Astfel, aceleași sub-volume investigate anterior pentru calcularea procentelor de volum au fost, de asemenea, investigate pentru cartografierea MDD^r . În grupurile NC și PC, vârful și valorile medii au urmat o tendință similară, care scade în timp, spre deosebire de grupul +LLLT, care nu prezintă o tendință specifică. Comportamentul opus a fost evidențiat luându-se în considerare valorile FWHM: o tendință specifică în timp nu a fost prezentă în grupurile NC și PC, ci în grupul +LLLT, unde a existat o tendință de scădere clară în timp, cu referință specială de la 14 la 21 zile după intervenția chirurgicală. În cele din urmă, valoarea crescută analizată a scăzut, în timp, în toate grupurile analizate. Totuși, după 14 zile, a fost detectată tendința opusă luând în

considerare valorile FWHM, în timp ce vârful, media și valorile mici au fost maxime în grupul NC și minime în grupul +LLLT.

Pentru perioade de timp mai lungi de 14 zile, în comparație cu probele NC (în care defectele au fost lăsate goale pentru vindecare spontană), defecte umplute cu xenografe, adică atât în grupele de control pozitiv PC, cât și în grupele de studiu + LLLT, eșantioanele au prezentat procente de volum mai mici sau similare de os în curs de remodelare (adică os nou format mai puțin). Dovada că defectele lăsate pentru vindecarea spontană au prezentat deja după trei săptămâni de vindecare (grup de 21 de zile) mai mult os nou format decât cavitățile umplute cu xenogrefă ar putea fi cauzate de o anumită întârziere a procesului de vindecare, care are loc în prezența biomaterialelor. Am observat această întârziere în unele studii anterioare; în mod specific, am observat că cinetica regenerativă din culturile *in vitro* pe diferite biomateriale a arătat că bioresorbția grefei este mai accentuată până la a doua săptămână de cultură, în timp ce regenerarea osoasă este întârziată în timp, cel mai probabil deoarece celulele care cresc pe suportul oferit de grefă au nevoie de mai mult timp să adere și apoi să înceapă să prolifereze¹³⁻¹⁵. Mai mult, în studiul de față, biomaterialul ar fi putut exercita o acțiune de limitare în ceea ce privește efectele fotobiomodulării asupra celulelor, inhibând aceeași acțiune regenerativă a tratamentului cu laser.

Cu toate acestea, în acest studiu, analiza volumetrică cantitativă a osului aflat în proces de remodelare la cele trei momente de timp (14, 21 și 30 de zile de la intervenția chirurgicală) a arătat o vindecare mai bună atunci când fotobiomodularea a fost aplicată pe defectul grefat decât în cazurile în care defectul grefat nu a primit tratament cu laser. Acest efect a fost deosebit de evident pentru cea mai scurtă perioadă de timp considerată, adică după 14 zile de la intervenția chirurgicală. Aceste observații obținute folosind protocolul inovativ de analiză descris anterior, evidențiază așadar, efectele pozitive ale fotobiomodulării asupra procesului de regenerare osoasă, cu creșterea consecutivă a cantității de os nou format. De asemenea, sugerează posibile interacțiuni cu biomaterialele utilizate, care ar putea influența viitoarele cercetări experimentale.

CONCLUZII

În studiul pe care l-am efectuat¹⁶, micro-CT a condus la obținerea de informații noi și relevante despre un număr limitat de animale, care au fost incluse în studiu. Relevanța protocolului de evaluare se bazează pe natura 3D a analizei micro-CT, bazată la rândul său, pe stivuirea a 1000 de secțiuni 2D succesive (fiecare cu o grosime de aproximativ 9 μm), mapând întregul eșantion. Aceasta este de o importanță majoră, permițând reducerea la minimum a numărului de animale sacrificate, cu respectarea deplină a normelor etice internaționale. Studiile noastre anterioare folosind aceeași metodă de evaluare au arătat, de asemenea, capacitatea tehnicii micro-CT de a juca un rol fundamental în caracterizarea avansată a siturilor tratate cu laser¹⁷. Mai mult, în studiile efectuate anterior s-a constatat o concordanță între OCT și analizele micro-CT^{18,19}.

V. STUDIUL RETROSPECTIV AL TOMOGRAFIEI COMPUTERIZATE CU FASCICUL CONIC ÎN CAZUL PACIENȚILOR CARE AU URMAT TRATAMENT DE FOTOBIMODULARE

INTRODUCERE ȘI SCOPUL STUDIULUI

Calitatea și cantitatea slabă a țesuturilor osoase sunt raportate ca fiind factori de risc asociați cu resorbția excesivă și afectarea procesului de vindecare după plasarea implantelor²⁰⁻²³. În vederea aprecierii caracteristicilor calitative și volumetrice ale țesuturilor osoase intraorale, s-a propus utilizarea tomografiei computerizate cu fascicul conic (CBCT). CBCT oferă câteva avantaje față de MSCT, cum ar fi accesibilitatea crescută, costuri mai mici, confort mai mare pentru pacienți și o iradiere mai mică. Numeroase studii au arătat o corelație ridicată între valorile CT și CBCT în

ceea ce privește nuanțele de gri; prin urmare, este sugerat că valorile voxel ale CBCT pot fi utilizate, în anumite limite, pentru a estima densitatea minerală osoasă²⁴⁻²⁸.

Scopul studiului este, așadar, de a obține o analiză cantitativă a densității minerale osoase în cazul pacienților care au urmat tratamente de fotobiomodulare, efectuând măsurători specifice tomografiei computerizate cu fascicul conic, înainte și după aplicarea tratamentului laser fiecărui caz. Obiectivele studiului vizează pe de o parte, analiza efectelor tratamentului de fotobiomodulare la nivelul oaselor maxilare și, pe de altă parte, evaluarea aplicabilității și a acurateții tomografiei computerizate cu fascicul conic în aprecierea densității minerale osoase.

MATERIAL ȘI METODĂ DE LUCRU

Studiul a inclus analiza retrospectivă a tomografiei computerizate cu fascicul conic maxilare a 14 pacienți, 8 femei și 6 bărbați, cu vârste cuprinse între 24 și 74 ani, fără patologie asociată cu influență în sfera orală și fără medicație cunoscută a afecta metabolismul osos sau proprietățile calitative și cantitative ale acestuia. Toți pacienții au urmat același protocol de tratament cu laser după finalizarea intervenției: imediat după efectuarea suturii, s-a aplicat proba intraorală a laserului Gallium-Aluminum-Arsenide laser (GaAlAs) (MID-laser; Serial no 8110131-4) de 808nm, 450 mW, în regim pulsant, administrându-se o energie de 2 J în 3 puncte corespunzătoare fiecărui implant dentar inserat: mezial, distal și apical, cumulând 6J / implant. Ședințele de tratament s-au efectuat imediat postoperator și la o distanță ulterioară de 48h, timp de 2 săptămâni (un total de 8 ședințe), cu respectarea tuturor precauțiilor de siguranță laser (atât pacientul, cât și echipa medicală au purtat ochelari de protecție corespunzători lungimii de undă utilizată).

Toate imaginile obținute au fost înregistrate folosind formatul de imagistică digitală și comunicații în medicină (DICOM), folosind aceiași parametri de achiziție a imaginii (tensiune, intensitatea curentului, dimensiunea voxelului și câmpul vizual). În vederea analizei numărului CT, exprimat în HU, a fost utilizat software-ul Romexis 4.5.1.R (Planmeca, Finlanda). Pentru fiecare pacient, s-a analizat densitatea osoasă înainte și după aplicarea tratamentului de fotobiomodulare, în aceleași arii de interes, cu aceeași dimensiune pentru fiecare pacient. Pentru localizarea sit-urilor țintă și înregistrarea numărului CT mediu, precum și a abaterii standard, am folosit software-ul Romexis 4.5.1.R (Planmeca, Finlanda). Fiecare voxel din acest volum este caracterizat printr-un număr CT, exprimat în HU. Software-ul afișează valoarea medie a numerelor CT, abaterea standard a acestora, precum și intervalul de valori HU (cele mai mici și cele mai mari valori HU întâlnite în volumul analizat).

Toate măsurările realizate au fost analizate din punct de vedere statistic, rezultatele fiind prezentate în secțiunea dedicată.

REZULTATE

Evoluția comparativă a densității minerale osoase, cuantificată prin HU, la nivelul corticalei maxilare, precum și a medularei, înainte și după tratament, pentru toți pacienții incluși în studiu, sunt prezentate detaliat. Analiza statistică aplicată valorilor măsurate (test ANOVA) a urmărit câteva comparații:

- Atât la sexul feminin, cât și la cel masculin, diferențele între mediile unităților Hounsfield măsurate la nivelul corticalei vestibulare, înainte și după tratament, comparativ, prezintă diferențe semnificative din punct de vedere statistic (test Anova, test Tukey)
- Mediile unităților Hounsfield măsurate la nivelul osului medular maxilar, înainte și după tratament, comparativ, prezintă diferențe semnificative din punct de vedere statistic, atât pentru femei, cât și pentru bărbați (test Anova, test Tukey)
- Comparația zonelor anterioară și a celei posterioare în ceea ce privește mediile unităților Hounsfield măsurate la nivelul osului cortical, respectiv medular maxilar, nu prezintă diferențe semnificative din punct de vedere statistic

- Independent de sexul pacientului, atât la nivelul corticalei vestibulare, cât și la nivelul osului trabecular maxilar, există diferențe statistic semnificative înainte și după tratamentul efectuat.

DISCUȚII

În studiul prezentat în această teză, rezultatele obținute demonstrează faptul că CBCT este un instrument util și adecvat în vederea măsurării densității minerale osoase la nivelul oaselor maxilare. Mai mult decât atât, în ceea ce privește capacitatea de a detecta diferențe semnificative din punct de vedere statistic, în cazul pacienților care au urmat tratament de fotobiomodulare laser după intervențiile chirurgicale din sfera orală, s-a dovedit că terapia laser a crescut densitatea osoasă, atât la nivelul osului cortical vestibular, cât și la nivelul osului medular, independent de sexul pacientului. Acest efect pozitiv a fost observat și cuantificat atât la nivelul osului maxilar anterior, cât și la nivelul zonelor laterale, linia de demarcație dintre acestea fiind considerată tangenta la fața distală a caninilor de fiecare parte. Cuantificarea, cu ajutorul tomografiei computerizate cu fascicul conic, a efectului radiației laser asupra densității minerale osoase a permis formularea unor concluzii clinice, în acord cu cele experimentale, obținute în studiile pe care le-am efectuat anterior.^{16,18}

CONCLUZII

Conform studiilor disponibile până în prezent, indicația computer tomografiei cu fascicul conic ca examinare de elecție pentru determinarea densității minerale a țesuturilor osoase, în special atunci când valorile obținute sunt comparate cu valorile standard prestabilite, a fost îndelung discutată. Studiul de față, având la bază o comparație între două momente diferite în timp, ale acelorași pacienți, vizează cuantificarea unor modificări ale țesutului osos dependente de timp și de tratamentul efectuat, dar supusă acelorași surse de erori în ceea ce privește echipamentul CBCT utilizat. În acest fel, utilitatea tomografiei computerizate cu fascicul conic este evidentă, demonstrându-se a fi un factor predictiv valoros în aprecierea densității osoase. Studiul realizat a demonstrat rezultate cu semnificație statistică, în ceea ce privește îmbunătățirea densității minerale osoase a pacienților care au urmat tratament de fotobiomodulare laser.

VI. CONCLUZII FINALE ȘI CONTRIBUȚII PROPRII

Pornind de la premisele deja cunoscute și investigate în literatura de specialitate, cercetarea de față și-a propus o analiză calitativă și cantitativă a procesului de vindecare, reparare și regenerare osoasă fotobiomodulată, folosind tomografia în coerență optică, microtomografia computerizată, studiul histologic al eșantioanelor și, nu în ultimul rând, măsurarea densității osoase cu ajutorul tomografiei computerizate cu fascicul conic. Astfel de studii sunt esențiale pentru a evalua eficiența diferitelor tehnici care pot fi utilizate în regenerarea osoasă, luând în considerare în special, complexitatea procesului de vindecare și numărul mare de factori care îl influențează.

Multimodal CMS / SS OCT a fost aplicat pentru a reda imagini și a analiza diferite grupuri luate în considerare în evaluarea procesului de vindecare și regenerare osoasă, rezultatele obținute putând fi sintetizate astfel: cantitatea cea mai mare de țesut osos nou format se regăsește în grupul de studiu C, urmat de grupul B și ulterior, de grupul A. Analizând evoluția cantității de os nou format în timp, cea mai semnificativă diferență a fost evidențiată după 21 de zile, deci după aproximativ două treimi din intervalul de timp total analizat. După mai mult timp luat în considerare, cantitățile de os tind să se apropie, cu tendință de a umple defectul disponibil. Din cunoștințele actuale, aceasta este prima dată când OCT a fost folosit ca instrument pentru a evalua efectele fotobiomodulării cu laser asupra regenerării osoase. Avantajul major al OCT este că poate fi aplicat pentru evaluări *in vivo*, folosind probe de scanare manuale, în cavitatea orală⁹. Ca atare, consider că această

lucrare reprezintă un progres în ceea ce privește imagistica *en-face* ca metodă de evaluare a regenerării osoase.

Microtomografia computerizată a completat cunoștințele dobândite anterior, demonstrând că terapia de fotobiomodulare este eficientă în perioade scurte; dozele de laser administrate mai târziu de 2-3 săptămâni de la intervenția chirurgicală par să nu fie foarte eficiente. În studiul realizat, analiza volumetrică cantitativă a osului aflat în curs de remodelare la cele trei momente de timp a arătat o vindecare mai bună atunci când fotobiomodularea a fost aplicată pe defectul grefat decât în cazurile în care defectul grefat nu a primit tratament cu laser. Acest efect a fost deosebit de evident pentru cea mai scurtă perioadă de timp considerată, adică după 14 zile de la operație. Astfel, aceste observații obținute folosind protocolul inovativ de analiză prezentat anterior, evidențiază efectele pozitive ale fotobiomodulării asupra procesului de regenerare osoasă, cu creșterea consecutivă a cantității de os nou format. De asemenea, sugerează posibile interacțiuni cu biomaterialele utilizate, care ar putea influența viitoarele noastre monitorizări experimentale. Am ipotezat o posibilă acțiune de ecranare a xenografei în ceea ce privește acțiunea laser asupra celulelor și îmi propun să verific această supoziție prin studiile viitoare. Acest efect poate fi combinat cu o întârziere a regenerării osoase în prezența biomaterialelor, așa cum a fost deja documentat în studiile anterioare. În studiul prezentat în teză¹⁸, micro-CT a condus la obținerea de informații noi și relevante despre un număr limitat de animale, care au fost incluse în studiu. Studiile noastre anterioare folosind aceeași metodă de evaluare au arătat, de asemenea, capacitatea tehnicii micro-CT de a juca un rol fundamental în caracterizarea avansată a siturilor tratate cu laser¹⁷. Mai mult, în studiile anterioare, s-a constatat o concordanță între OCT și analizele micro-CT^{18,19, 29,30}.

Conform studiilor disponibile până în prezent, indicația computer tomografiei cu fascicul conic ca examinare de elecție pentru determinarea densității minerale a țesuturilor osoase, în special atunci când valorile obținute sunt comparate cu valorile standard prestabilite, a fost contestată. Studiul de față, având la bază o comparație între două momente diferite în timp, ale acelorași pacienți, vizează cuantificarea unor modificări ale țesutului osos dependente de timp și de tratamentul efectuat, dar supusă acelorași surse de erori în ceea ce privește limitările metodei. Mai mult decât atât, în ceea ce privește capacitatea de a detecta diferențe semnificative din punct de vedere statistic, în cazul pacienților care au urmat tratament de fotobiomodulare laser după intervențiile chirurgicale din sfera orală, s-a dovedit că terapia laser a crescut densitatea osoasă, atât la nivelul osului cortical vestibular, cât și la nivelul osului medular, independent de sexul pacientului. Acest efect pozitiv a fost observat și cuantificat atât la nivelul osului maxilar anterior, cât și la nivelul zonelor laterale. Cuantificarea, cu ajutorul tomografiei computerizate cu fascicul conic, a efectului radiației laser asupra densității minerale osoase a permis formularea unor concluzii clinice, în acord cu cele experimentale, obținute în studiile pe care le-am efectuat anterior^{16,18}. În acest fel, utilitatea tomografiei computerizate cu fascicul conic este evidentă, demonstrându-se a fi un factor predictiv valoros în aprecierea densității osoase.

În general, interacțiunea dintre radiațiile laser și diferitele tipuri de țesuturi *in vivo* rămâne o preocupare majoră atunci când se stabilesc protocoale clinice. Deși au fost efectuate numeroase studii privind efectele fotobiomodulării, compararea acestora este dificilă din cauza diferitelor biomateriale, a variațiilor energiei laser, a dozei și a duratei. Consider că studiul de față, corelând rezultatele experimentale cu cele clinice retrospective, aduce informații valoroase în domenii de interes actual larg, precum sunt regenerarea osoasă și fotobiomodularea în sfera medicinei dentare, clarificând totodată utilitatea diverselor metode de investigare științifică și paraclinică în ceea ce privește procesul de vindecare osoasă.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Oliveira P, Sperandio E, Fernandes KR, Pastor FAC, Nonaka KO, Renno ACM. Comparison of the effects of low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound on the process of bone repair in the rat tibia. *Rev Bras Fisioter* 2011;15(3):200-5.
2. Hamblin M, Sousa M, Arany P, Carroll J, Patthoff D. Low level laser (light) therapy and photobiomodulation: The path forward. *Progress in Biomedical Optics and Imaging - Proceedings of SPIE* 2015, 9309. 10.1117/12.2084049.
3. Renno ACM, McDonnell PA, Parizotto NA, Laakso EL. The effects of laser irradiation on osteoblast and osteosarcoma cell proliferation and differentiation in vitro. *Photomed Laser Surg* 2007;25(4):275-80.
4. Stein A, Benayahu D, Maltz L, Oron U. Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. *Photomed Laser Surg* 2005;23(2):161-6.
5. Brugnera A Jr, dos Santos AECG, Bologna ED, Ladalardo TCCGP. Atlas of laser therapy applied to clinical dentistry, Prospects in the use of therapeutic laser, 2006, ISBN:978-85-87425-69-0, 9788587425690.
6. Pinheiro AL, Gerbi ME. Photoengineering of bone repair processes. *Photomed Laser Surg* 2006;24:169-78.
7. Vladimirov YA, Osipov AN, Klebanov GI. Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. *Biochemistry* 2004;69:81-90.
8. Bosco AF, Faleiros PL, Carmona LR, Garcia VG, Theodoro LH, de Araujo NJ, Nagata MJ, de Almeida JM. Effects of low-level laser therapy on bone healing of critical-size defects treated with bovine bone graft. *J Photochem Photobiol B* 2016;163:303-10.
9. Monroy GL, Won J, Spillman DR, Dsouza R, Boppart SA. Clinical translation of handheld optical coherence tomography: Practical considerations and recent advancements. *J. Biomed. Opt.* 2017, 22, 121715.
10. Fekrazad R, Sadeghi Ghuchani M, Eslaminejad MB, Taghiyar L, Kalhori KAM, Pedram MS, Shayan AM, Aghdami N, Abrahamse H. The effects of combined low level laser therapy and mesenchymal stem cells on bone regeneration in rabbit calvarial defects. *J Photochem Photobiol B* 2015;151:180-5.
11. Brun F, Massimi L, Fratini M et al. SYRMEP Tomo Project: a graphical user interface for customizing CT reconstruction workflows. *Adv Struct Chem Imaging* 2017, 3(1), 4
12. Giuliani A, Iezzi G, Mozzati M, Galesio G, Mazzoni S, Tromba G et al. Bisphosphonate-related Osteonecrosis of the Human Jaw: a combined 3D assessment of Bone Descriptors by Histology and Synchrotron Radiation-based Microtomography. *Oral Oncology* 2018, 82, 200-202. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2018.04.026>
13. Manescu A, Giuliani A, Mazzoni S, Mohammadi S, Tromba G, Diomedede F et al. Osteogenic potential of Dual-blocks cultured with periodontal ligament stem cells: in-vitro and synchrotron microtomography study. *J Periodontal Res.* 2016, 51(1), 112-24.
14. Mazzoni S, Mohammadi S, Tromba G, Diomedede F, Piattelli A, Trubiani O et al. Role of cortico-cancellous heterologous bone in human periodontal ligament stem cell xeno-free culture studied by Synchrotron radiation phase-contrast microtomography. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18(2), 364.
15. Giuliani A, Moroncini F, Mazzoni S, Belicchi ML, Villa C, Erratico S, Colombo E, Calcaterra F, Brambilla L, Torrente Y, Albertini G, Della Bella S. Polyglycolic Acid–Polylactic Acid scaffold response to different progenitor cell in vitro cultures: A demonstrative and comparative X-Ray Synchrotron Radiation Phase-Contrast Microtomography study. *Tissue Eng. Part C: Methods* 2014, 20, 308–316. doi: 10.1089/ten.TEC.2013.0213.)
16. Luca RE, Giuliani A, Mănescu A, Heredea R, Hoinoiu B, Constantin GD, Duma VF, Todea CD. Osteogenic Potential of Bovine Bone Graft in Combination with Laser Photobiomodulation: An Ex Vivo

Demonstrative Study in Wistar Rats by Cross-Linked Studies Based on Synchrotron Microtomography and Histology. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 778.

17. Manescu A, Oancea R, Todea C, Rusu LC, Mazzoni S, Negrutiu ML, Sinescu C, Giuliani A. On Long Term Effects of Low Power Laser Therapy on Bone Repair: A Demonstrative Study by Synchrotron Radiation-based Phase-Contrast Microtomography. *Int. J. Radiol. Imaging Technol.* 2016, 2, 010.
18. Luca R, Todea CD, Duma VF, Bradu A, Podoleanu A. Quantitative assessment of rat bone regeneration using complex master-slave optical coherence tomography, *Quant. Imaging Med. Surg.* 2019, 9, 782–798
19. Rominu M, Manescu A, Sinescu C, Negrutiu ML, Topala F, Rominu RO, Bradu A, Jackson DA, Giuliani A, Podoleanu AG. Zirconia enriched dental adhesive: A solution for OCT contrast enhancement. Demonstrative study by synchrotron radiation microtomography. *Dent. Mater.* 2014, 30, 417–423.
20. Friberg B, Jemt T, Lekholm U. Early failures in 4,641 consecutively placed Branemark dental implants: a study from stage 1 surgery to the connection of completed prostheses. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1991;6:142–146.
21. Jaffin RA, Berman CL. The excessive loss of Branemark fixtures in type IV bone: a 5-year analysis. *J Periodontol* 1991;62:2–4.
22. Tolstunov L. Dental implant success-failure analysis: a concept of implant vulnerability. *Implant Dent* 2006;15:341–346.
23. Linetskiy I, Demenko V, Linetska L, et al. Impact of annual bone loss and different bone quality on dental implant success—A finite element study. *Comput Biol Med* 2017;91:318–325.
24. Aranyarachkul P, Caruso J, Gantes B, Schulz E, Riggs M, Dus I, et al. Bone density assessments of dental implant sites: 2. Quantitative cone-beam computerized tomography. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005; 20: 416-24.
25. Naitoh M, Hirukawa A, Katsumata A, Aiji E. Evaluation of voxel values in mandibular cancellous bone: relationship between cone-beam computed tomography and multislice helical computed tomography. *Clin Oral Implants Res* 2009; 20: 503–6.
26. Naitoh M, Hirukawa A, Katsumata A, Aiji E. Prospective study to estimate mandibular cancellous bone density using large-volume cone-beam computed tomography. *Clin Oral Implants Res* 2010; 21: 1309-13.
27. Nomura Y, Watanabe H, Honda E, Kurabayashi T. Reliability of voxel values from cone-beam computed tomography for dental use in evaluating bone mineral density. *Clin Oral Implants Res* 2010; 21: 558-62
28. Lagravère MO, Fang Y, Carey J, Toogood RW, Packota GV, Major PW. Density conversion factor determined using a cone-beam computed tomography unit NewTom QR-DVT 9000. *Dentomaxillofac Radiol* 2006; 35: 407-9.
29. Huang D, Swanson EA, Lin CP, Schuman JS, Stinson WG, Chang W, Hee MR, Flotte T, Gregory K, Puliafito CA. Optical coherence tomography. *Science* 1991, 254, 1178–1181.
30. Podoleanu AG, Bradu A. Master-slave interferometry for parallel spectral domain interferometry sensing and versatile 3D optical coherence tomography *Opt Express* 2013;21:19324-38.