



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för Kliniska Vetenskaper

Vaselin som kontroll vid försök med 1 % väteperoxidkräm i färska hudsår på häst

Tommy Carlsson

Uppsala

2010

Examensarbete inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2010:73*

Vaselin som kontroll vid försök med 1 % väteperoxidkräm i färska hudsår på häst

Tommy Carlsson

Handledare: Hans Broström, Institutionen för Kliniska vetenskaper, SLU
Biträdande handledare: Kerstin Bergvall, Institutionen för Kliniska vetenskaper, SLU
Examinator: Bernt Jones Institutionen för Kliniska vetenskaper, SLU

Examensarbete inom veterinärprogrammet, Uppsala 2010
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för Kliniska vetenskaper
Kurskod: EX0239, Nivå X, 30hp

Nyckelord: häst, sårläkning, väteperoxidkräm, vaselin, hydrogen peroxide cream, wound healing

Online publication of this work: <http://epsilon.slu.se>
ISSN 1652-8697
Examensarbete 2010:73

Innehåll

Summary.....	1
Sammanfattning	2
Inledning	3
Sårbehandlingens utmaning	3
Användning av antibiotika.....	3
Syfte med studien	4
Litteraturoversikt.....	4
Sårläkning per secundam	4
Inflammationsfasen	4
Nybildningsfasen.....	4
Mognadsfasen.....	6
Vaselin som placebo samt salvbas utan väteperoxid.....	6
Väteperoxidkräm.....	8
Material och metoder.....	8
Försökshästar	8
Genomförande.....	8
Gruppering av hästarna.....	9
Placering av sår	9
Avläsning	10
Klinisk bedömning	10
Sårmätning	10
Bakteriologi.....	10
Cytologi.....	11
Statistiska analyser	11
Resultat	11
Diskussion.....	12
Styrkan i studien.....	12
Svagheter i studien.....	12
Betydelse av studien	13
Litteraturförteckning	14
Tack till	15

SUMMARY

Wounds on horses are common and sometimes difficult to treat. The wounds are often big and could be discovered too late for primary sutures, which have to be applied within 8 hours from time of accident, before bacteria has been able to infiltrate the surrounding tissue. The healing is often complicated by delayed healing and wound infection with consequences like phlegmone, fistulation and proud flesh formation.

To avoid these consequences, the traditional practice has been to administer systemic antibiotics alone, systemic antibiotics in combination with topical antibiotics or topical antibiotics alone. Because few antibiotics can be used in horses, is it important to household with the few substances that are available. In veterinary medicine today, the increasing resistance amongst pathogenic microbes such as MRSA presents a growing problem. It is therefore more important than ever to find new strategies for treatment to try to prevent infections.

The objective of this exam work was to focus on Vaseline used as placebo in another study that was to exploring both the antibacterial effect and the influence on wound healing by topical treatment with 1 % hydrogen peroxide cream in fresh skin wounds on horses. Vaseline is a common substance used as placebo in clinical trials, but few have studied its effect on secondary wound healing in horses

The horses in this study consisted of 10 nonpregnant, female standardbred trotting horses kept under identical housing conditions at the Department of clinical sciences, section of reproduction, SLU, Uppsala.

In the clinical trial, three identical wounds were created on each horse. One of the wounds was treated with 1 % hydrogen peroxide cream, one was treated with Vaseline as placebo, and the third wound was left untreated.

The healing process was then assessed by clinical, bacteriological, and cytological examinations and were continually digitally photographed followed by objective measuring via the computer program PictZar® under the whole healing process until the wounds were entirely covered with epithelium.

The results of this study have shown that Vaseline has no inhibitory effects on bacterial growth. It has also shown that Vaseline doesn't delay time of healing compared with untreated controls and doesn't have any other side effects than a slight local hypergranulation.

Vaseline can therefore be considered to be a safe choice of placebo in studies of secondary wound healing in horses.

SAMMANFATTNING

Sårskador på häst är vanligt och ibland svårbehandlade. Skadorna är ofta stora och upptäcks vanligen för sent för att kunna primärsutureras, då detta måste ske inom 8 timmar efter skadetillfället innan bakterier hunnit infiltrera den omgivande vävnaden. Läkningen kompliceras ofta genom fördröjd sårhäkning och sårinfektion med konsekvenser som flegmon, fistulering och svallköttbildning.

För att undvika dessa konsekvenser har man traditionellt använt systemisk antibiotika, systemisk antibiotika i kombination med utvärtes antibiotika eller enbart utvärtes antibiotika. Då få antibiotika kan användas på häst är det viktigt att hushålla med de preparat som finns tillgängliga. Resistensutvecklingen hos de sjukdomsframkallande bakterierna, såsom bl.a. MRSA, utgör ett växande problem inom veterinärmedicinen idag. Det är därför viktigare än någonsin att finna nya behandlingsstrategier som exkluderar/eller minimerar användningen av antibiotika.

Det här examensarbetet har fokuserats på vaselin som placebo i samband med en studie som har undersökt den antibakteriella effekten och påverkan på sårhäkningen hos färskasår på häst genom utvärtes behandling med 1 % väteperoxidkräm. Vaselin är en ofta använd substans som placebo i kliniska studier, men få har undersökt dess effekt på sekundär sårhäkning på häst.

I studien ingick 10 icke dräktiga ston av varmblodig travarras, vilka hölls under identiska förhållanden på Institutionen för kliniska vetenskaper, avd för reproduktion vid SLU i Uppsala.

Vid försöket skapades tre identiska sår på var och en av hästarna. Ett av dem behandlades med 1 % väteperoxidkräm, det andra med vaselinsalvbas som placebo och det tredje såret lämnades obehandlat.

Sårhäkningsförloppet följdes sedan kliniskt, bakteriologiskt, cytologiskt och dokumenterades med digitala fotografier följt av objektiv mätning via dataprogrammet PictZar® under hela läkningsförloppet tills sårytan täckts av epitel.

Resultatet av studien visade att vaselin inte har någon effekt i att hämma bakterietillväxt. Den visade även att vaselin inte förlänger sårhäkningstiden jämfört med obehandlade kontroller samt inte heller ger upphov till några andra biverkningar än lindrig lokal övergranulering.

Vaselin kan därför anses vara ett säkert val av placebo vid studier av sekundär sårhäkning på häst.

INLEDNING

Sårbehandlingsens utmaning

Behandling av sårskador hos häst medför ibland stora utmaningar då det gäller att ge såret rätt miljö för läkning. Komplikationer såsom sårinfektion med fördröjd sårsläkning, hematom/serom, flegmon, fistulering m.m. är inte ovanliga. Sommartid kan även flugburna parasiter som bl.a. *Habronema muscae* ge tumörliknande sårinfektioner. Bandage samt immobilisering av såret är det optimala för att erhålla bästa sårsläkningen. Det är dock svårt att på stora delar av hästkroppen att applicera något bandage över sårskadorna. Det är även svårt att få bandageringen att sitta kvar under läkningen eftersom såret under ett senare skede börjar klia och hästar är otroligt viga när det gäller att komma åt att klia sig. Dessutom är det svårt att suturera sårskador distalt på hästben, då huden helt enkelt inte räcker till för primärsuturering. Wilmink et.al¹ visade 2002 i en större retrospektiv studie med 89 ponnyer och 422 hästar att primärsuturering av sårskador endast skedde hos 24 % av hästarna och 39 % av ponnyer, med mer än hälften av skadorna lokaliserade distalt på benen. Just hästar drabbas ofta av komplikation i samband med sårskador på distala extremiteterna i form av svallköttbildning. Detta fenomen ses sällan då såren är lokaliserade till huvud och bål. Man ser normalt inte samma mönster hos ponnyer hos vilka såren distalt på benen generellt läker fortare och med färre komplikationer. Orsaken till denna skillnad är inte känd, men det har visats att ponnyers granulocyter ger ett kraftigare inflammatoriskt svar². Man har traditionellt behandlat stora hudskador på häst med både utvärtes (topikal) och systemisk antibiotika då hästen har stor risk att drabbas av sårinfektion som t.ex. flegmon dvs. diffus infektion i underhuden, vilket är svårbehandlat. Eftersom antibiotikaresistens hos bakterier är ett växande problem, är det viktigt att hitta nya behandlingsmetoder för att förhindra sårinfektioner. Framförallt då preparat som kan användas utvärtes (topikalt), är lätta att använda och som inte innebär någon risk för vare sig häst, behandlande människa eller är miljöskadligt. Sårslavor som förändrar den lokala miljön i såret kan vara en ett alternativt sätt att minska infektionsrisken, dock får dem inte störa den normala sårsläkningen. Man måste även då ta i beräkningen att det som missgynnar en organism kan gynna en annan.

Användning av antibiotika

Sedan penicillin och sulfa började användas på 1930-talet har enorma mängder antibiotika spritts över världen. I bara Sverige konsumerades under 2009 64,5 ton systemisk antibiotika för humant bruk samt 14,7 ton för djur³. Många antibiotika påverkar floran av ett stort antal mikroorganismer och inte bara patogener i kroppen, många av dem är svårnedbrytbara i naturen vilket medför att mängden bakterier som utsätts för små mängder antibiotika är avsevärd. Redan idag är det stora bekymmer med methicillinresistenta *Stafylococcus aureus* (MRSA) inom humansjukvården samt är ett växande problem även inom djursjukvården, vilket har lett till att den numer är anmälningspliktig eftersom den betraktas som en zoonos. Resistensen mot antibiotika kan uppkomma genom spontan mutation i bakterien, överföring av plasmider från andra resistent bakterier, spontant upptag av DNA från andra döda bakterier eller överfört via bakteriofager, vilka är en typ av virus som infekterar bakterier. Då antalet substanser som kan fungera som traditionell antibiotika snart är förbrukad, krävs utveckling av helt nya sätt att angripa de sjukdomsalstrande bakterierna. Det har blivit viktigare än någonsin att

inte använda antibiotika mer än nödvändigt. Det är alla gånger bättre att förebygga en infektion än att försöka bota en redan manifest.

Syfte med studien

Vaselin är mycket använt som placebo vid försök med olika antibakteriella och antiinflammatoriska substanser för utvärtes behandling. Trots detta finns inte mycket beskrivet hur vaselin kan påverka den sekundära sårhälingen hos häst. Denna utvärdering är därför ämnad att ge mer kunskap om detta.

LITTERATURÖVERSIKT

Sårhäkning per secundam

Sårhäkning per secundam eller sårhäkning av andra ordningen är konsekvensen av att såret antingen inte kunnat rengöras tillräckligt och primärsutureras, blivit förorenat eller där flera timmar (>8 tim) förflutit innan behandling så att bakterier kunnat infiltrera omgivande vävnader eller inte kunnat primärsutureras pga. omfattande vävnadsförluster. Sårhäkningen som biologisk process har som syfte att rena såret från främmande kroppar, föroreningar och skadad vävnad eftersom bara rena sår kan läka. Dessutom måste vävnaden kunna återställas till ett så ursprungligt skick som möjligt för att återfå full funktion. Under sårhäkningen, som indelas i 3 distinkta faser, påverkas såret av inre och yttre faktorer vilka med olika behandling kan påverkas i olika riktningar. I flera läroböcker inom det veterinärkirurgiska området^{4,5,6,7} och Hans Broströms kompendium för Allmän kirurgi⁸ finns följande allmänna kortfattade beskrivning av sårhäkningen.

Inflammationsfasen

Inflammationsfasen kallas den första fasen i sårhäkningen då vävnadsskadan i sig frisätter ämnen som verkar genom att de dels aktiverar kaskadsystemen som stoppar vidare blödning, dels underlättar cellmigration samt verkar kemotaktiska för de celltyper som är nödvändiga för sårhäkningen. Denna fas är i regel avslutad inom 2-3 dagar. Celltyperna som är involverade i inflammationsfasen kommer i stort sett i en bestämd ordning där trombocyterna är först på plats för att initiera hemostas och verka kemotaktiskt, därefter immigrerar granulocyterna, då främst neutrofiler, vilkas huvuduppgift är att fagocytera skadad vävnad, bakterier och främmande ämnen. Efter detta tillkommer sedan monocyter till platsen där de mognar ut till makrofager, vilka har en viktig uppgift att förutom att delta i arbetet med att fagocytera debris och bakterier, även till stor del kommer att fungera som arbetsledare i sårreningsarbetet genom att verka antigenpresenterande, genom frisättande av inflammationsunderhållande faktorer samt verka kemotaktiskt för fibroblaster. Olika lymfocyttyper som bl.a. B och T lymfocyter kommer sedan också till platsen för att dels producera antikroppar, dels mediera en avvägd inflammationsreaktion beroende på art av förorening.

Nybildningsfasen

Nybildnings- eller proliferationsfasen syftar till att om det är möjligt återställa vävnaden till ursprungligt skick (restitutio ad integrum) vilket bara några få vävnadstyper kan hos däggdjur, såsom epitel, endotel, lever och benvävnad. Alla andra vävnader läker genom reparation. Denna fas tar i regel ca.2-3 veckor.

Konsekvensen av reparation blir att den skadade vävnaden under läkningen kommer att ersättas av granulationsvävnad, som senare kan ge upphov till ärrbildning med risk för åtföljande ärretraktion. Man måste alltid ha i åtanke att den fysiologiska funktionen i en reparerad vävnad aldrig kommer att återställas till ursprungsläget. Om sår-läkningen dessutom kompliceras av infektion, främmande kroppar, kronisk retning eller av brist på nödvändiga komponenter kommer såret inte att läka, utan ge upphov till kronisk granulationsvävnad i dagligt tal kallat svallkött, *caro luxurians*, bestående av bindväv med riklig inväxt av blodkärl men få nerver.

Under proliferationsfasen sker en kraftig ökning av den cellulära aktiviteten de första 3-5 dagarna med immigration och proliferation av fibroblaster, endotelceller och epitelceller. Makrofagerna i vävnaden debriderar såret genom dels direkt fagocytisering av skadad vävnad, dels genom frisättning av proteolytiska enzymer samt frisätter kemoattraktanter, cytokiner och tillväxsfaktorer, vilka stimulerar inväxt av fibroblaster och blodkärl. Fibroblasterna banar sin egen väg in i såret med hjälp av proteaser, kollagenaser, gelatinaser och stromelysin. Fibroblasterna bygger sedan upp ett nytt extracellulärt matrix bestående till stor del av cellulärt fibronectin och hyaluronsyra tillsammans med omogot typ III kollagen och så småningom moget typ I kollagen, vilket ersätter fibrin klumpen som skapats vid skadetillfället. Endotelcellerna, vilka redan spelat en nyckelroll vid inflammationsfasen, börjar redan andra dagen efter skadan att växa in i vävnaden pga. stimulering via angiogena substanser samt låg syrespänning i vävnaden. Angiogenesen eller blodkärlsväxten sker genom en komplex process där endotelceller i existerande kapillärer vid skadeområdet reagerar både på de angiogenetiska faktorerna och även på avsaknad av cellkontakt⁴. Endotelcellen frisätter sedan proteiner för att degradera basallamina för att därigenom möjliggöra migrering ut i den interstitiella vävnaden i riktning mot de angiogenetiska faktorerna. Cellmigreringen börjar med att endotelcellen sträcker ut pseudopodier genom det fragmenterade basalmembranet varefter hela cellen migrerar ut i den perivaskulära vävnaden. Kvarvarande cellerna i kärnväggen börjar sedan att proliferera för att fylla tomrummet efter de migrerande cellerna och de nybildade dottercellerna följer efter ut i interstitiet så att en kärlnopp bildas. Kärlnoppen kommer sedan att sammansmälta med en angränsande kärlnopp där endotelcellerna kommer att sammanlänkas med varandra så att ett lumen bildas i vilket erythrocyterna kan passera igenom. Kärnbildningen kommer sedan att fortgå så länge som angiogenetiska faktorer frisätts eller så länge låg syrespänning föreligger i vävnaden. Regenerationen av epitelet tar lång tid eftersom epitelceller kräver en fast förankring i andra viabla epitelceller samt basalmembran för att kunna proliferera. Dessutom är epitelet exponerat för den yttre miljön med risk för uttorkning, föroreningar, skadligt UV ljus och konkurrens om näring med den lokala hudfloran. Basalmembranet som cellerna kräver, byggs upp av epitelet och den underliggande mesenkymala vävnaden gemensamt. För att åstadkomma ett basalmembran krävs ett komplicerat samspel mellan granulationsvävnaden och epitelcellerna där den nyproducerade granulationsvävnaden som består av laminin 5 och kollagen I, vilka inte finns i basalmembranet hos intakt hud, aktiveras och utgör fäste för integriner nödvändiga för migration av epitelceller över sårytan. Regenerationen av epitelet sker genom celledelning i *stratum germinativum* i sårkanterna och i eventuellt kvarvarande celler såsom i hårsäckar eller svett och talgkörtlar. De nybildade

epitelcellerna migrerar ut till sårkanten på ett sätt som brukar liknas vid att hoppa bock, cellerna släpper under migrationen aldrig cellkontakten med kärnförande epitelceller. Epitelcellerna uttrycker sedan bl.a. MMP, matrix metalloproteaser, för att reorganisera basalmembranet under mognadsfasen. Riley och Herman visade denna grupp av enzyms roll i sårhäkning, både in vitro och in vivo-försök gjort på djurslaget gris, genom att tillsätta bakteriellt kollagen utvunnet från klostridier till såret, som signifikant förkortade sårhäkningstiden, både genom stimulering av keratinocyter till proliferation och också förbättrade förmågan till deras migration över sårkanterna⁹.

Mognadsfasen

Mognadsfasen är den avslutande delen av sårhäkning, vilken tar mest tid. Normalt tar denna fas från 2-3 veckor, men kan i vissa fall uppgå till flera år. Under denna fas kommer sårets hållfasthet successivt att öka genom att strukturen och sammansättningen hos de kollagena fibrerna förändras samt att mängden kollagen med tiden minskar i ärrät vilket leder till att ärrät krymper. Fibroblasterna ökar mängden kollagen i såret under de första 7 – 14 dagarna. Därefter minskar fibroblastaktiviteten på grund av minskad rörlighet i såret. Vissa fibroblaster kommer att gå i apoptos och andra kommer att omvandlas till så kallade myofibroblaster vilka organiseras i sårets spänningsriktning med ärrätraktion som resultat. När epitelet nått hela vägen över såret och återfått cellkontakt med mötande epitel så kommer slutligen myofibroblasterna antingen gå i apoptos eller återfå normal cellmorfologi pga. minskad stimulering. Såret kommer också att bli blekare då såret reorganiseras och avvaskulariseras. Ärrätraktionen kan beroende på skadans lokalisering medföra problem till följd av minskad rörlighet, som t.ex. när såret sträcker sig över en led.

Vaselin som placebo samt salvbas utan väteperoxid

Vaselin är egentligen ett varumärkesnamn vilket har blivit en allmän benämning på petroleumgel. Den är vit till gulaktig i färgen, halvfast till konsistensen i rumstemperatur och har en smältpunkt mellan 36°C och 60°C¹⁰. Den består av mättade kolväten dvs. alkaner, vanligtvis med högre nummer än 25 och är helt opolär vilket gör den helt olöslig i vatten. Mättade raka kolväten kallas även paraffiner. Paraffiner är mycket använda i både medicinska sammanhang och inom skönhetsindustrin. Paraffin används särskilt mycket inom veterinärmedicin för att behandla förstoppningar via peroral administrering men även samma användning kan förekomma vid behandling av förstoppning hos barn¹¹. Trots detta finns inte mycket forskning om hur paraffiner kan påverka organismen. Då vissa alifatiska kolväten, dit vaselin hör, är kända tumörpromotorer har man misstänkt att petroleumgel kan penetrera huden, föras med blodet till lever och lungor där de kan metaboliseras till mer lösliga produkter under bildning av fria radikaler via cytochrom p450 isoenzymer. En studie har gjorts där man undersökt ifall olika topikalt administrerade kolväten har kunnat passera hudbarriären, Studien visade att dessa inte kan penetrera djupare än *stratum corneum* trots utspädning med olika lättflytande oljor med eller utan föregående avfettning¹². Eftersom paraffiner är så kemiskt stabila och är helt opolära kan de inte brytas ned av cellerna. Det har även gjort paraffin mycket använt inom skönhetsindustrin bland annat som implantat vid bröstförstoringar, dock finns många rapporter om att injektioner av paraffin kan leda till bildning av lipofila granulom^{13,14} eller myospherulos¹⁵ vilket har lett till att sådana ingrepp numera

inte görs i större delen av världen. Vid en annan studie har man jämfört vaselin med naturliga hudfetter när det gäller att normalisera hudmiljön efter tejpstrippning hos människa¹⁶. Inte heller i denna studie kunde man se någon signifikant skillnad mellan de prövade substanserna i deras påverkan på hudens fuktreglering eller förmåga att ge upphov till någon inflammatorisk reaktion. Vid topikal administrering direkt i sår har ett antal studier gjorts där man använt vaselin som kontroll till olika sårslavor. Vid en pilotstudie där man provade lökextrakt för att minska ärrerythem och använde vaselin som kontroll visade sig andelen erythem vara signifikant lägre vid användning av vaselin jämfört med lökextrakt. Detta antogs bero på vaselinets högre förmåga att hålla såret fuktigt¹⁷. Vid en större dubbelblindad studie gjord på över 900 patienter på hudkirurgisk klinik¹⁸ har man jämfört infektionsrisk, allergiska reaktioner och sårhelningstid mellan användandet av vitt vaselin och en antibiotikasalva innehållande Bacitracin i färska hudsåår. I denna studie fann man att 0,9 % av de patienter som fick Bacitracinsalva fick allergiska reaktioner medan inga av de som fick vaselinsalva fick några allergiska reaktioner. Incidensen av sårinfektioner uppvisade ingen signifikant skillnad mellan de båda studerade substanserna. Däremot i de fall då sårinfektion uppstått kunde man se att det var vanligare med grampositiva bakterier som *Stafylococcus aureus* i sår behandlade med vaselinsalva medan de sår behandlade med Bacitracinsalva koloniserats av gramnegativa bakterier som *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* och *Enterobacter sp.* Här diskuteras skillnaderna mellan sårfloran så att konsekvenserna av en infektion blir allvarigare och mer svårbehandlad om gramnegativa bakterier är orsaken än grampositiva bakterier. Antibiotika mot gramnegativa bakterier är dyrare och har fler biverkningar än de som har ett grampositivt spektrum. Dessutom belyses det faktum att gramnegativa bakterier har större förmåga att ge upphov till nekros av broskvävnad. I denna studie kunde man inte se någon signifikant skillnad i läkningstid mellan preparaten, men då basen i Bacitracinsalvan består till stor del av vitt vaselin i kombination med olika vaxer och oljor tros sårhelningstiden påverkas lika av de båda salvorna. Man refererar här till tidigare studier gjorda på grisar^{19,20} där man sett en förlängd läkningstid av sår behandlade med vaselin jämfört med olja i vatten emulsioner. Detta tros bero på att vaselin har en högre smältpunkt. Det leder då till att sårytan blir tätare och försvårar migration av hudceller över sårytan. Man har även sett att olika fabrikat av vaselin påverkar läkningstiden olika beroende på smältpunkt, dvs. längden på kolkedjorna. I en annan studie gjord på barn där man studerat ärrbildningstendens efter hudoperation där man använt antingen vaselinbaserad salva eller vitamin E salva utan vaselinbas²¹. Här såg man att andelen hypertrofiska ärr var större hos patienter som behandlats med vaselinbaserad salva än de som behandlats med vitamin E salvan utan vaselinbas. Man diskuterar här det faktum att vitamin E salvan har en annan bas än vaselinsalvan och att det troligare påverkar slutresultatet än själva E vitaminet. I en annan studie har man jämfört sårkomplikationer mellan användande av en antibiotikasalva innehållande Gentamicin och vaselin i postoperativa sår efter öronoperationer på människa, där infektionsrisk i brosk är en allvarlig komplikation²². Inte heller i denna studie kunde man se någon signifikant skillnad i postoperativ infektionsrisk mellan de båda preparaten. Man rekommenderar i diskussionen efter denna studie användandet av vaselin i stället för gentamicinsalva då inflammatorisk chondrit uppstod i en signifikant högre grad hos de patienter som använde gentamicinsalva jämfört med dem som använt vaselinsalva.

Väteperoxidkräm

Väteperoxid, med kemisk formel H_2O_2 , är en naturligt förekommande förening som är inblandad i flera biologiska processer. Den frisätts bl.a. av neutrofiler för att oskadliggöra bakterier genom oxidation. Väteperoxid kan dock även sönderfalla till hydroxylradikaler, vilka kan skada cellen. Mot detta skyddar sig cellerna genom enzymen katalas och peroxidase. Det är därför viktigt att koncentrationen av väteperoxid inte blir för hög för att undvika sådana skador. I lösningar avsedda för sårrengöring brukar man använda en koncentration på 3 % vilket anses vara säkert^{23,24}. Väteperoxid sönderfaller spontant till syrgas och vatten varför den har en viss begränsad hållbarhet även om den normalt är stabil. Vid kontakt med kroppsvävnad går processen mycket snabbt vilket medför att verknings tiden är kort. Väteperoxid har visat sig vara verkningsfull mot ett stort spektrum av bakterier, både gramnegativa och grampositiva bakterier, virus och jäst. Effekten anses vara bättre mot grampositiva bakterier än mot gramnegativa. Dock kan låga koncentrationer tålas bättre av vissa grampositiva bakterier beroende av om de har förmåga att producera enzym som katalas eller andra peroxidaser vilka kan katalysera väteperoxiden²⁵. Väteperoxid som naturligt frisätts från aktiverade neutrofiler har visat sig kunna stimulera sår läkningen genom att kärlinväxten ökar, då en högre halt av vaskular endothelial growth factor VEGF-4 frisätts från makrofagerna²⁶. Väteperoxid har också visats kunna inducera frisättning av connective tissue growth factor CTGF vilket stimulerar fibroblasterna och därigenom kan påskynda läkningstiden samt i vissa fall även kunna förklara varför svårläkta sår ofta övergår i svallköttbildning²⁷. Syreradikaler ROS där väteperoxid är en elektrondonator har också visat sig spela en stor roll för att inducera frisättning av hormonet Angiotensin II, vilken är en mycket kraftig konstriktor av glatt muskulatur i blodkärl, vilket kraftigt minskar blödningen i samband med skada²⁸.

MATERIAL OCH METODER

Utvärderingen av vaselin som placebo har gjorts i samband med en studie där syftet var att utvärdera effekten av väteperoxidkräm i färska hudsår på häst.

Försökshästar

Hästarna som ingick i studien fanns på Institutionen för kliniska vetenskaper, avd för reproduktion vid Sveriges Lantbruksuniversitet SLU och bestod av 10 vuxna icke dräktiga ston av varmblodig travarras, ålder 9 – 19 år, med en kroppsvikt mellan 466 – 562 kg. Hästarna genomgick före försökets början en allmän klinisk undersökning av den försöksansvariga veterinären. Hästarna var uppstallade i samma stall under identiska förhållanden och gick tillsammans i samma hage under hela försöksperioden. Hästarna var avmaskade enligt gällande rutiner. Ingen medicinerings av hästarna tilläts från två veckor före och under försöket, förutom eventuella sederingar. Försöket var godkänt av Uppsala Djurförsöksetiska nämnd med godkännandenummer C290/9.

GENOMFÖRANDE

Försöket genomfördes under perioden februari-mars under 2010 då inga flugor var aktiva och kunde påverka resultatet. Alla hästarna undersöktes dagligen beträffande allmäntillstånd, feber, beteende och rörelse. Alla sår inspekterades dagligen. Sår som kunde misstänkas vara infekterade (med kliniska tecken såsom

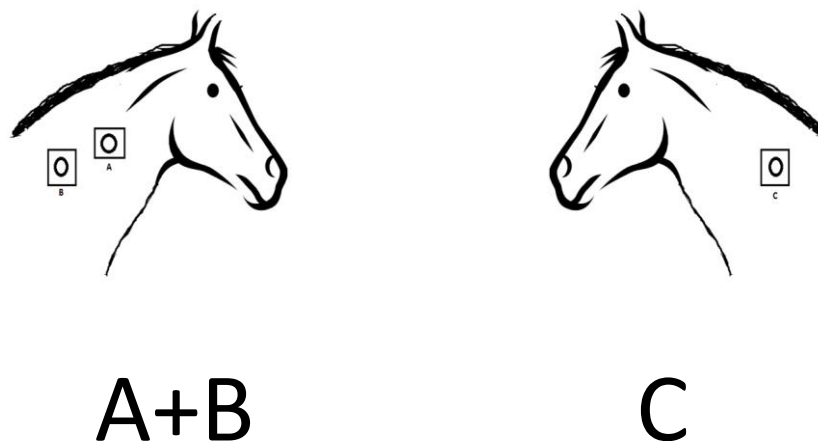
kraftig svullnad, vätskning eller feber) vilka bedömdes kräva antibiotikabehandling skulle behandlas med trimetoprim-sulfadiazin (30 mg/kg, PO, q12h) och sedan exkluderas ur studien. Beteendeförändring indikerande besvär från såret (såsom smärta, bitande eller ömhet vid beröring) skulle behandlas med meloxicam oral suspension (0,6 mg/kg, PO, q24h) och föranleda exklusion från studien.

Gruppering av hästarna

Hästarna numrerades slumpvis 1-10 och delades upp i två slumpvisa halvor där fem av hästarna fick två sår på vänster sida av halsen och ett på höger sida av halsen, de övriga fem hästarna fick två sår på höger sida av halsen samt ett på vänster sida av halsen.

Placering av sår

Vid tillfogande av såren placerades hästarna i tvångsspilta och sederades samt smärtlindrades med en kombination av butorphanol tartrat (0,01-0,02 mg/kg, IV) och detomidin hydroklorid (0,02-0,04 mg/kg, IV). Tre stycken 6 gånger 6 cm stora kvadratiska områden klipptes med klippmaskin på halsen på varje häst. Två områden klipptes på höger sida hos halva gruppen av hästar medan ett område klipptes på vänster sida hos dessa hästar. Hos den andra halvan av hästgruppen klipptes två områden på vänster sida och ett på höger sida. Såren placerades sedan i centrum på de klippta områdena. Såren placerades över den muskulära delen av halsen så att blodförsörjningen och rörelse skulle vara så likvärdig som möjligt. Därefter steriltvättades området med klorhexidin digluconat (40mg/ml) tvål samt tvättades därefter med klorhexidin digluconat (5 mg/ml) sprit enligt Universitetsdjursjukhusets UDS gällande rutiner. Området bedövades sedan genom infiltrationsanestesi med 2 ml mepivacain hydroklorid utan adrenalin, varefter en biopsi som omfattade hela huden togs ut (full thickness biopsy) med hjälp av en specialtillverkad hudstans med en diameter av 2 cm från Ångströmlaboratoriet vid Uppsala Universitet. Samma kirurg gjorde alla såren på alla hästarna. Såren numrerades A, B och C där A och B var placerat på samma sida medan sår C var på den sidan med endast ett sår. Sår A var placerat mest kranialt. Sår A lämnades obehandlat, Sår B behandlades med 1 % väteperoxidkräm och sår C behandlades med vaselinsalva (Fig 1).



Figur 1. Placering av sår.

Före behandling tvättades alla sår med steril koksaltlösning, nya sterila handskar användes för alla sår. Alla sår behandlades senare samma dag och under hela försöket av tekniska assistenter enligt en behandlingslista. Såren behandlades två gånger per dag genom rengöring med steril koksaltlösning följt av applicering av 3 ml väteperoxidkräm i sår B medan sår C behandlades med 3 ml vaselinsalva, sår A tvättades bara och lämnades obehandlat. Alla sår fick läka öppet utan bandage och genomgå sekundärläkning. All teknisk personal var under den första veckan blindade tills de specialtillverkade placeboförpackningarna tagit slut och ersattes med vaselin, de blev då informerade om vilka sår som skulle behandlas med vilket preparat.

Avläsning

Avläsning av sår läkningen gjordes dag 2, 6, 11, 16, 21 och 28 eller fram till när fullständig epitelisering av sårytan bedömdes ha skett.

Klinisk bedömning

Såren bedömdes kliniskt inledningsvis blindat av samma kirurg som skapat såren. Efter att placebo ersatts av vaselin, blev skillnaden i sårutsende och synbara salvrester uppenbara vilket gjorde blindningen för kirurgen omöjlig. Såren bedömdes i ett poängsystem från 0 till 5 beroende på grad av förändring. Helt läkt sår erhöll poängen 0. Parametrar som användes var:

- Svullnad
- Känslighet för beröring
- Mängd och utseende på sårsekret
- Granulation
- Grad av epitelisering

Poängen fördes in i ett speciellt protokoll med hästens specifika nummer, sårbokstav och avläsningsdag för att blinda statistikern.

Sårmätning

Alla sår fotograferades efter sårrengöring och klinisk bedömning där en specialtillverkad måttstock användes och anlades området under sårkanten för att kunna mäta sårytans storlek under läkningen. På måttstocken fästes en lapp med hästnummer, sårbokstav och mättag för att kunna identifiera bilden. Vid fotograferingen användes en digital 10,2 megapixelkamera av märket Nikon D3000 (Nikon Corporation, Tokyo, Japan). Närbildsobjektiv (Tamron AF SP 90/2 Di Macro 1:1) användes tillsammans med ett rundstrålande blixtaggregat (Sigma EM-140 DG Macroblxt(ring) till Nikon i-TTL). För bildlagring användes SDHC minneskort (SanDisk SecureDigital SDHC 4Gb Ultra 15 mb/s class4 och Transcend SecureDigital SDHC 4 Gb High speed class2 14 mb/s). Till bildtolkning användes dataprogrammet PictZar® CDM (BioVisual Technologies L.L.C, New Jersey, USA, www.pictzar.com) för att kunna mäta sårytans storlek exakt med digital fotometri.

Bakteriologi

Prov togs från två ställen vid såret dag 2, 6 och 16 med sterila provtagningspinnar (som fuktats med 3 droppar steril koksaltlösning) före sårrengöring.

Provtagningen utfördes enligt instruktion från sårbedd och området runt såret för att odlas både aerobt och anaerobt. Proverna märktes med hästnummer, sårbokstav, provtagningsdag och sårområde. Prov från sårytan märktes I och från huden runt såret märktes II. Proverna transporterades till laboratoriet i transportmedium och ströks på blodagarplattor samt bromcresol purpur lactose agarplattor inom 6 timmar från provtagningsstillfället. Bakterietillväxt bedömdes efter 24 och 48 timmar efter inkubation i 37°C. Proverna odlades och bedömdes blindat av tekniker på Sveriges veterinärmedicinska anstalt SVA.

Cytologi

Cytologiska prov togs från området i sårbedden och huden runt såret med sterilt bomullstops vilka ströks på objektsglas för cytologisk bedömning enligt standardiserad metod före sårrengöring vid varje sårutvärderingstillfälle. Cytologiska proverna bedömdes blindat av samma tekniker. Objektsglaset färgades med Hemacolor (Merck, Darmstadt, Tyskland) och undersöktes i 1000x förstoring (High power field, HPF). Medelvärde av bakterier (stavar och kocker) beräknades per 10 synfält (HPF) och erhöll en poäng från 0 till 4 beroende på medelantal bakterier per synfält (0= inga, 1=<5, 2=2-5, 3=10-25, 4=>25). Neutrofiler räknades i 10 synfält (HPF) varefter ett medelvärde beräknades och erhöll poäng från 0-4 (0=inga, 1=<1, 2=1-5, 3=5-10, 4=>10). Även dessa data graderades i ett poängsystem och fördes in i kodat protokoll för att kunna vägas samman med övriga parametrar i den statistiska analysen.

Statistiska analyser

Beroende variabler i den statistiska analysen var:

- Antal dagar till avläkning,
- Ytan av såret,
- Subjektiv poäng vid klinisk bedömning
- Cytologisk poäng.

Effekten av väteperoxidkrämen (HP), placebo (P) och obehandlat (U) vid utfallet analyserades med mixad linjär regression metodik, där modellen inkluderade den fastlagda effekten av behandlingen, undersökningsdag, interaktionen av undersökningsdag och behandling, den slumpmässiga effekten hos hästen vid upprepade observationer på djurslaget häst. Modellanpassningen var utvärderad genom restvärdesanalys och alla modeller bedömdes vara acceptabla med restvärdena inom en normalfördelning och ej har visat en konstant relativ varians. Alla sårlokationer, behandlingsprotokoll och behandlingsutfall blev identifierade via en kod och var blindat för statistikern.

RESULTAT

I resultatet av denna studie visade sig vaselinbehandlade sår avläka något snabbare än obehandlade sår. Denna skillnad var dock ej signifikant ($p=0,2719$). Mean time för avläkning av vaselinsår var 41,6 dagar (95 % CI 36,2-47) medan mean time för avläkning av obehandlade kontroller var 44,0 dagar (95 % CI 38,6-49,4). Vaselinbehandlade sår uppvisade en klart högre grad av sårkontraktion jämfört med obehandlade kontroller dag 16 ($p=0,0021$), däremot kunde man dag 28 inte se någon skillnad i storlek på sårytan mellan de vaselinbehandlade sår och de obehandlade kontrollerna. Vaselinbehandlade sår hade lägre kliniska

poäng (svullnad, sekretmängd, känslighet för beröring etc.) än de obehandlade kontrollerna dag 11 och 16 ($p=0,0121$). Däremot erhöll de vaselinbehandlade såren en avsevärt högre klinisk poäng dag 28 ($p=0,0362$). De cytologiska poängen var högre hos de vaselinbehandlade såren jämfört med de obehandlade kontrollerna avseende neutrofiler i och runt såret. Den bakteriologiska odlingen uppvisade vid dag 16 en högre grad av bakteriekolonisation i de vaselinbehandlade såren jämfört med de obehandlade kontrollerna. I både de vaselinbehandlade såren och de obehandlade kontrollerna växte patogena bakterier såsom *S aureus* och *S zooepidemicus*. Ingen av hästarna behövde utgå ur studien på grund av sårinfektion eller annan veterinär behandling.

DISKUSSION

Tendensen i sårhelingsprocessen mellan såren var att under den första tiden efter sårens tillkomst var vaselinsåren mest reaktionslösa, troligtvis på grund av vaselinets ocklusiva effekt med en fuktigare sårmiljö. Det obehandlade såret ömmade mest och torkade ut med en kraftig sårskorpa samt vätskade i en högre utsträckning än de övriga två såren. Såret som behandlats med väteperoxidkräm liknade mer det vaselinbehandlade såret, dock med en torrare yta. Vartefter försöket pågick syntes en större skillnad mellan såren där de vaselinbehandlade såren uppvisade en större tendens till övergranulering, det vill säga att granulationsvävnaden växte över den normala hudnivån. Det stämmer ganska väl överens med tidigare gjorda studier där man sett liknande tendenser, troligtvis beroende på att vita blodkropparna dels inte kan fagocytera och degradera vaselinet utan måste smälta och putta ut vaselinet från såret¹⁸. Här kan ju även den högre graden av bakteriekolonisation i de vaselinbehandlade såren stimulera till en kraftigare inflammatorisk reaktion. I och med att migreringen av epitelet då tar längre tid, och stimulering till bildning av granulationsvävnad fortsätter antar såret mer en karaktär av kroniskt sår. Vad gäller den antibakteriella effekten hos vaselin som setts i tidigare gjorda studier har denna studie inte kunnat visa någon hämning av bakterietillväxten. Tvärtom har de vaselinbehandlade såren haft en ökad grad av bakterieväxt, troligtvis beroende på den fuktigare miljön. Dock blev inget av såren i den här studien infekterat i den grad att det krävde någon annan behandling.

Syftet med denna studie var att undersöka vaselinets påverkan på sårhelningen, den förlängde i varje fall inte sårhelningstiden i någon negativ riktning jämfört med helt obehandlade sår. Tvärtom sågs en något snabbare avläkning med generellt mer reaktionslös sårhelningsprocess.

Styrkan i studien

Styrkan i studien är den stora mängden data som insamlats och att miljön som hästarna vistades i var så likvärdig för alla de studerade hästarna. En annan styrka i studien är att osäkerheten med subjektiva bedömningar kunnat minskas genom att samma person bedömt alla såren under försöket samt den standardiserade metodiken som använts. Fotograferingen med möjliggörande av digital mätning av sårytan är också en styrka.

Svagheter i studien

En svaghet i studien kan vara placeringen av såren då de flesta sårhelningskomplikationerna hos häst uppkommer de i distala extremiteterna.

Betydelse av studien

Studien har visat att vaselin är ett säkert val av placebo då den inte förlängde sårhelningstiden jämfört med obehandlade kontroller vid sekundär sårhelning av sår på hästhals. Vaselinbehandlingen uppvisade inga andra biverkningar än lindrig lokal övergranulering.

LITTERATURFÖRTECKNING

1. Wilmlink JM, van Hertem J, van Weeren PR, Barneveld A: Retrospective study of primary intention healing and sequestrum formation in horses compared to ponies under clinical circumstances, *Equine Vet J* 2002;34:270
2. Wilmlink JM, Veenman JN, van den Boom R, et al: Differences in polymorphonucleocyte function and local inflammatory response between horses and ponies, *Equine Vet J* 2003;35:561
3. SWEDRES 2009, A report on Swedish antimicrobial utilization and resistance in human medicine, www.strama.se/uploads/docs/Swedres%20sammanfattning%202009%20till%20tryck.pdf online: 20101129
4. Auer & Stick. 2006. *Equine surgery*, 3rd ed. Saunders: Elsevier inc. 1390 pp.
5. Knottenbelt D C. 2003. *Handbook of Equine Wound Management*. Saunders; Elsevier Science Ltd.
6. Staschak TS, Theoret CL. 2008. *Equine wound management*. 2nd ed.: Wiley-Blackwell
7. Swaim SF, Krahwinkel DJ: Wound management, *Vet Clin North Am Small Anim Pract*; 2006: 36:667-942
8. Broström H: Kompendium i allmän kirurgi, Veterinärprogrammet år 3 2008 SLU
9. Riley KN, Herman BS and Ira M.: Collagenase promotes the cellular responses to injury and wound healing in vivo, *J Burns Wounds* 2005;4:e8
10. International Chemical Safety Cards (ICSC), Tillgänglig från: <http://www.inchem.org/documents/icsc/icsc/eics1440.htm> online: 20101129
11. Sharif F, Crushell E, Driscoll KO, Bourke B: Liquid paraffin: a reappraisal of its role in the treatment of constipation, *Arch Dis Child* 2001;85:121-124
12. Brown BE, Diembeck W, Hoppe U, Elias PM: Fate of topical hydrocarbons in the skin, *J. Soc. Cosmet.* 1995;46:1-9
13. Gu DH, Yoon DY, Chang SK, et al.: CT features of foreign body granulomas after cosmetic paraffin injection into the cervicofacial area, *Diagn Interv Radiol* 2010;16:125-128
14. Tuschka OJ: Intraperitoneal oil granuloma, *California medicine* 1961;95:118-119
15. Liggett AD, Weiss R, Blue JL: Short communications: Myospherulosis in the subcutis of a pony, *Can J Vet Res* 1987;51:150-151
16. Loden M, Bányai E: Skin-identical lipids versus petrolatum in the treatment of tape-stripped and detergent-perturbed human skin, *Acta Derm Venerol* 2000;80:412-415
17. Jackson BA, Shelton AJ: Pilot study evaluating topical onion extract as treatment of postsurgical scars, *Dermatol Surg* 1999;25:267-269
18. Smack DP, Harrington AC, Dunn C, et al.: Infection and allergy incidence in ambulatory surgery patients using white petrolatum vs Bacitracin ointment. A randomized controlled trial. *JAMA* 1996;276:972-977
19. Mertz PM, Eaglstein WH: The effect of a semi-occlusive dressing on the microbial population in superficial wounds, *Arch Surg* 1984;119:287-289
20. Mertz PM, Marshall DA, Eaglstein WH: Occlusive wound dressings to prevent bacterial invasion and wound infection, *J Am Acad Dermatol* 1985;12:662-668

21. Zampieri N, et al.: A prospective study in children: Pre- and post-surgery use of vitamin E in surgical incisions, *J Plast Reconstr Aesthet Surg* (2009), doi:10.1016/j.bjps.2009.08.018
22. Campbell RM, Perlis CS, Fisher E, et al.: Gentamicin ointment versus petrolatum for management of auricular wounds, *Dermatol Surg* 2005;31:664-669
23. Gruber RP, Vistnes L, Pardoe R: The effect of commonly used antiseptics on wound healing, *Plast Reconstr Surg* 1975;55:472-476
24. Lineaweaver W, Howard R, Soucy D, et al.: Topical antimicrobial toxicity, *Arch Surg*. 1985 mar;120(3):267-270
25. McDonnell G, Russel AD: Antiseptics and disinfectants: Activity, action and resistance, *Clinical microbiology reviews* 1999 jan;12(1):147-179
26. Cho M, Hunt TK, Hussain MZ: Hydrogen peroxide stimulates vascular endothelial growth factor release, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 280; H2357-H2363; 2001
27. Park SK, Kim J, Choi J, et al.: Hydrogen peroxide is a novel inducer of connective tissue growth factor, *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 jun 22;284(4):966-971
28. Torrecillas G, Boyano-Adánez MC, Medina J, et al.: The role of hydrogen peroxide in the contractile response to angiotensin II. *Mol Pharmacol*. 2001jan;59(1):104-112

Tack till

Hans Broström för ditt engagemang och tålamod.

Kerstin Bergvall för din intresseväckande entusiasm inom cytologin.

Tamás Tóth för ditt intresse för forskning och för din förmåga att lära ut fraser på okända språk.

Viveca Båverrud för alla dina värdefulla timmar i mikroskopet.

Ulf Emanuelsson för att du behärskar matematiken.

Och slutligen ett stort tack till personalen på avd. för reproduktion, Inst f kliniska vetenskaper för att ni har tagit så god hand om både hästarna och oss studenter och alltid har haft en positiv syn.