



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin
och husdjursvetenskap**
Institutionen för kliniska vetenskaper

Effekt av utvärtes behandling med pulserande infrarött och rött ljus på sårhäkning hos friska hästar

Peter Michanek

*Uppsala
2018*

Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2018:31*

Effekt av utvärtes behandling med pulserande infrarött och rött ljus på sårhäkning hos friska hästar

Impact of pulsating infrared and red monochromatic light treatment on wound healing in horses.

Peter Michanek

Handledare: Anna Bergh, institutionen för kliniska vetenskaper

Examinator: Marianne Jensen Waern, institutionen för kliniska vetenskaper

Examensarbete i veterinärmedicin

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: Avancerad nivå, A2E

Kurskod: EX0830

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2018

Delnummer i serie: Examensarbete 2018:31

ISSN: 1652-8697

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: LLLT, Low Level Light Therapy, rött ljus, infrarött ljus, pulserande ljus, LED, ljusterapi, sår, sårhäkning, häst, planimetri

Key words: LLLT, Low Level Light Therapy, red light, infrared light, pulsating light, LED, light therapy, wound, wound healing, planimetry

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Institutionen för kliniska vetenskaper

SAMMANFATTNING

Low Level Light Therapy (LLLT) är en behandlingsmetod där rött ljus eller ljus i den nära infraröda (NIR) delen av spektrumet används, bland annat i syfte att förkorta sårhäkningsstider. Sårhäkning på häst kan ta lång tid, särskilt på benens distala delar och ett intresse finns för metoder som kan förkorta läkningstiden. Syftet med denna studie är att undersöka om behandling med pulserande rött synligt ljus ($\lambda \approx 637$ nm) och NIR ljus ($\lambda \approx 956$ nm) påverkar sårhäkningshastigheten hos friska hästar.

Ett cirkulärt sår ($\varnothing=2$ cm) stansades ut på vardera sida av halsen hos friska hästar ($n=8$). Den ena sidans sår ljusbehandlades och den andra sidan lämnades som negativ kontroll. Behandlingen varade i 4 minuter och 40 sekunder (rött ljus 95 sekunder, NIR ljus 185 sekunder) och utfördes en gång dagligen dag 0-4, 7-11, 14-18 och 21-25. Irradiansen för rött ljus mättes till $2,3 \text{ mW/cm}^2$ och för NIR ljus till $6,4 \text{ mW/cm}^2$.

Såren fotograferades och utvärderades med digital planimetri dag 0, 1, 2, 3, 4, 7, 14, 21, 28 och 35. Sårarean skiljde inte mellan behandlings- och kontrollgrupp någon av dagarna. Såren inspekterades visuellt dagligen och tiden till fullständig läkning noterades. Kontrollsåren bedömdes fullständigt läkta efter i genomsnitt 49,0 dagar (95% $Ci=35,4-62,6$) och behandlade sår efter 51,8 dagar (95% $Ci=38,7-64,8$). Tiden till fullständig läkning var signifikant kortare för kontrollsåren ($p=0,026$). Personerna som utvärderade sårhäkningen var blindade för vilka sår som var behandlade.

Ljusbehandling hade ingen påskyndande effekt på läkning av experimentellt framkallade sår hos häst i denna studie.

SUMMARY

Low Level Light Therapy (LLLT) is a treatment method where red light or near infrared (NIR) light is utilised for treating a variety of disorders including wounds. Wound healing in horses may be slow, especially on the distal limb, and there is an interest to shorten healing times. The purpose of the present study was to investigate how treatment with pulsating visible red light ($\lambda \approx 637$ nm) and NIR light ($\lambda \approx 956$ nm) affects wound healing time in healthy horses.

A circular skin wound ($\varnothing=2$ cm) was created on each side of the neck in healthy horses ($n=8$). One of the wounds was treated using light treatment and the other was left untreated, serving as negative control. Treatment duration was 4 minutes and 40 seconds (red light 95 seconds, NIR light 185 seconds) and was performed once daily day 0-4, 7-11, 14-18 and 21-25. The irradiance was measured to 2.3 mW/cm² for red light and 6.4 mW/cm² for NIR light.

The wounds were photographed and evaluated using digital planimetry day 0, 1, 2, 3, 4, 7, 14, 21, 28 and 35. The wound area did not differ between treated and control group on any day. The wounds were visually inspected daily and the time to complete healing was recorded. Control wounds were judged as completely healed after a mean time of 49,0 days (95% Ci=35,4-62,6) and treated wounds after 51,8 days (95% Ci=38,7-64,8). This is a significantly shorter time to complete healing for control wounds ($p=0,026$). The evaluators were blinded in respect to which wound was treated.

The results of this study do not indicate any positive effect of light treatment on healing of experimental skin wounds in horses.

INNEHÅLL

FÖRKORTNINGAR.....	1
INLEDNING.....	2
LITTERATURÖVERSIKT.....	3
Föreslagna verkningsmekanismer LLLT (Low Level Light Therapy).....	3
Parametrar vid LLLT.....	3
Sårläkning.....	3
Inflammationsfas.....	4
Nybildningsfas.....	4
Mognadsfas.....	5
Sårexpansion.....	5
LLLT för sårläkning hos häst.....	5
Studier med rött och infrarött inkoherent pulserat monokromatiskt ljus (Biolight®).....	7
Biverkningar hos gris.....	7
Munhåla hos människa.....	7
Trycksår hos människa.....	8
MATERIAL OCH METODER.....	9
Hästar.....	9
Sårkonstruktion.....	9
Behandling.....	9
Utvärdering.....	10
Tid till fullständig läkning.....	10
Sårarea.....	10
Statistisk dataanalys.....	11
RESULTAT.....	12
DISKUSSION.....	13
TACK TILL.....	14
FINANSIERING OCH INTRESSEKONFLIKTER.....	14
REFERENSER.....	15

FÖRKORTNINGAR

ATP – Adenosintrifosfat

cAMP – Cykliskt adenosinmonofosfat

Cox - Cytokrom C-oxidas

ECM – Extracellulärt matrix

IR – Infraröd

LED – Light Emitting Diode (lysdiod)

LLLT – Low Level Light Therapy

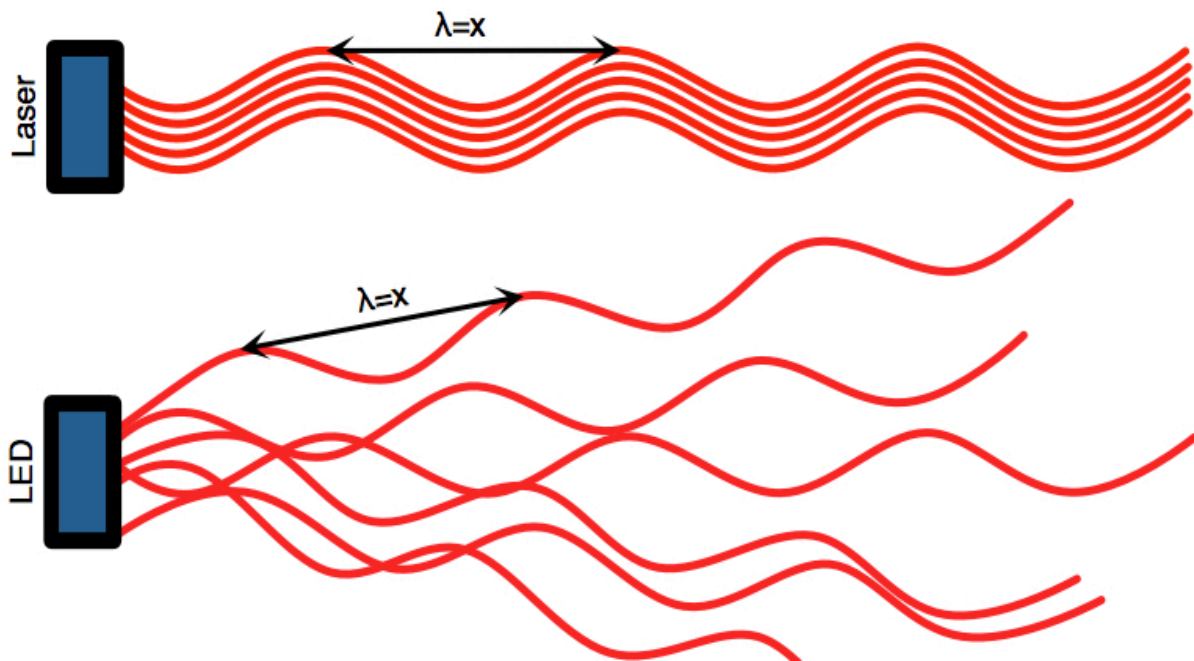
NIR – Nära infraröd

RNA - Ribonukleinsyra

VAS – Visuell analog skala

INLEDNING

Sårskador är vanliga på hästar och behöver ibland läka med hjälp av sekundär sårhäkning. Läkningssprocessen kan ta lång tid, särskilt på benens distala delar. Hästägare kan ha intresse av att förkorta läkningstiden, då oläkta sår ofta hindrar att hästen används, särskilt i tävlingssammanhang. Low Level Light Therapy (LLLT) är en behandlingsmetod där man använder rött ljus eller ljus i den nära infraröda (NIR) delen av spektrumet, bland annat i syfte att förkorta sårhäkningstider (de Freitas & Hamblin, 2016). De två dominerande ljuskällorna för ändamålet är lysdioder (LED) och ljuskällor som utnyttjar laserteknik (Chung *et al.*, 2012). Den stora skillnaden mellan ljuskällorna är att laserljus är koherent (ljusvågor utan fasförskjutning) medan LED sänder ut inkoherent ljus. Laserljus har därtill ofta mer specifik våglängd och högre parallellitet (se figur 1). Huruvida det är viktigt med koherent ljus för att ge effekt är omdebatterat (Chung *et al.*, 2012; de Freitas & Hamblin, 2016). Ibland syftar förkortningen LLLT endast på laserterapi (low level laser therapy) men kommer här användas som ovan och innefatta även inkoherent ljus.



Figur 1. Illustration av typiska skillnader mellan LED och laser-ljus avseende parallellitet och koherens. Våglängderna (λ) är här samma för båda ljuskällorna.

Behandling med LLLT är idag kontroversiellt (Chung *et al.*, 2012) och evidensen inom veterinärmedicinen är sparsam (Zielinska *et al.*, 2017). Syftet med denna studie är att undersöka om behandling med pulserande rött synligt ljus ($\lambda \approx 637$ nm) och NIR ljus ($\lambda \approx 956$ nm) påverkar sårhäkningshastigheten hos friska hästar.

LITTERATURÖVERSIKT

Föreslagna verkningsmekanismer LLLT (Low Level Light Therapy)

LLLT anses fotokemiskt påverka vävnader och effekten är så låg att ingen större värmeutveckling sker (Chung *et al.*, 2012). Enligt fotokemins första lag måste ljus absorberas för att ge upphov till en fotokemisk reaktion (Albini, 2016). För att söka verkningsmekanismen för LLLT är det därför naturligt att leta efter vad i cellen som absorberar ljus och således kan påverkas. Karu (1987) föreslog att komponenter i elektrontransportkedjan absorberade ljus och gav upphov till den stimulerande effekt man sett på *Escherichia coli*, jäst- och HeLa-celler. Senare har forskning pekat på cytokrom C-oxidas (Cox), det sista enzymet i elektrontransportkedjan, som omvandlare av fotosignaler (Karu, 2010). Idag är den ledande hypotesen att fotoner dissocierar inhiberande kväveoxid från Cox och leder till en ökning i elektrontransport, mitokondriens membranpotential samt ATP-produktion (de Freitas & Hamblin, 2016). Andra teorier, som dock inte är lika vetenskapligt utforskade, är att LLLT utövar sin effekt direkt på jonkanaler eller på andra molekyler som t.ex. tillväxtfaktorer (de Freitas & Hamblin, 2016).

Många *in vitro* studier har gjorts där man observerat förändringar i celler som blivit bestrålade med rött och NIR ljus. De förändringar man har sett är bland annat ökade nivåer ATP, cAMP och reaktiva syreradikaler och dessutom ökad RNA- och proteinsyntes, vilka skulle kunna förklaras av påverkan på Cox (Karu, 2010; Chung *et al.*, 2012; de Freitas & Hamblin, 2016).

Parametrar vid LLLT

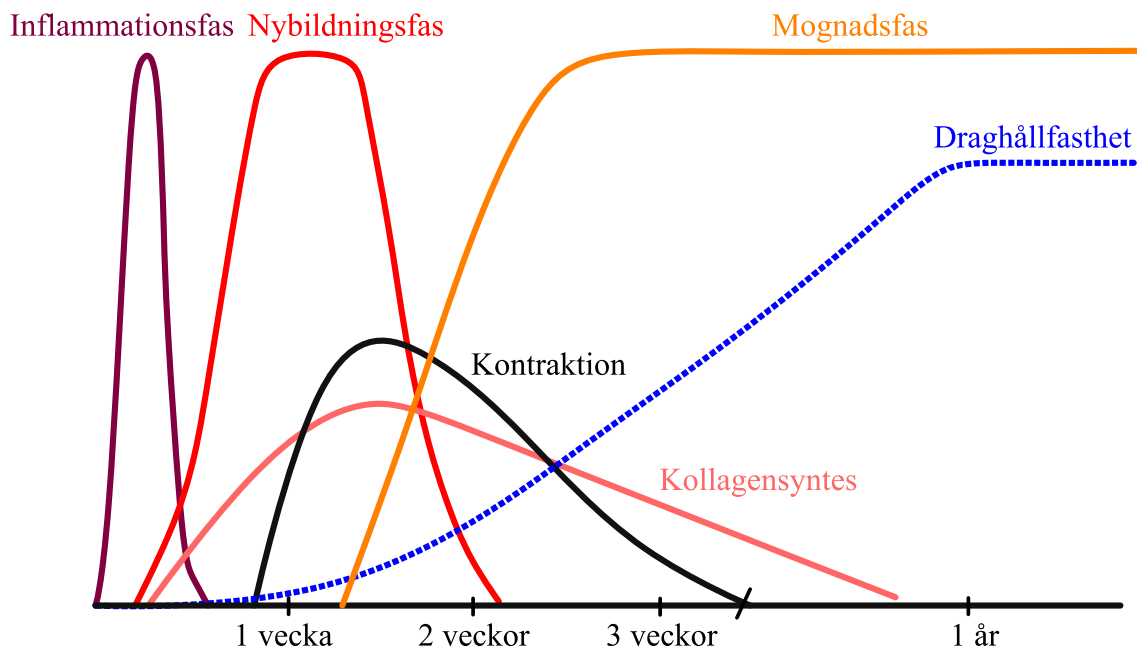
En stor variation av våglängder, behandlingsintervall, irradianser (W/m^2), strålningstid och således också stråldos förekommer i olika studier. Detta anses vara en av anledningarna till att så olika resultat förekommer i olika studier (Chung *et al.*, 2012; Suan *et al.*, 2014; de Freitas & Hamblin, 2016). En så kallad bifasisk dosrespons har observerats i flertalet studier där låg irradians eller behandlingstid stimulerar proliferation och reparation medan en högre har motsatt effekt (Song *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2009; Gagnon *et al.*, 2016).

Ljus kan antingen sändas ut kontinuerligt eller vara pulserande, ibland används båda i kombination inom LLLT. Hashmi *et al.* (2010) gjorde en litteraturgenomgång av studier där man jämfört pulserande och icke pulserande ljus. De säger att det inte finns konsensus och att gjorda studier är svåra att jämföra eftersom parametrar som t.ex. våglängd ofta skiljer mellan de olika grupperna även i dessa studier. Men författarna hävdar också att deras litteraturgenomgång indikerar att pulserat ljus, om andra parametrar är samma, skulle kunna vara mer effektivt än kontinuerligt ljus vid sårhäkning. Potentiella fördelar med pulserande ljus är att man kan få ett större penetrationsdjup med en viss irradians, men utan samma värmeutveckling. Eventuellt kan också olika pulsfrekvenser interagera med olika biologiska system så som jonkanaler på ett bättre sätt (Hashmi *et al.*, 2010).

Sårhäkning

Ett vanligt sätt att dela in sårhäkning är i inflammationsfas, nybildningsfas och mognadsfas (se figur 2), men andra uppdelningar förekommer. Fasuppdelningen ger en överblick över

läkningsprocessens, men faserna går delvis in i varandra och gränserna mellan faserna är diffusa.



Figur 2. Schematisk illustration över sårhelingsfaserna samt andra centrala processer i sårhelningen. Efter Auer & Stick (2006).

Inflammationsfas

Inflammationsfasen inträder omedelbart vid skada mot huden. Genom primär och sekundär hemostas stoppas blödningen och den bildade fibrinpluggen utgör ett provisoriskt sårmatris som neutrofiler, makrofager och fibroblaster kan binda till. Inflammatoriska celler, huvudsakligen neutrofiler och makrofager, tar sig till såret genom kemotaxis. Neutrofilerna är den första celltypen på plats och dödar bakterier, avlägsnar skadad vävnad samt producerar kemokiner som ytterligare ökar den tidiga inflammatoriska responsen. Efter 24 timmar ökar antalet monocyter i såret, där de differentieras till makrofager. Dessa, liksom neutrofilerna, debriderar såret och avdödar bakterier, men anses också vara den huvudsakliga inflammatoriska celltypen som startar nybildningsfasen. Det gör den bland annat genom att initiera angiogenes, fibroplasi och epitelialisering genom frisläppning av olika mediatorer.

Vid ett okomplicerat förlopp är inflammationsfasen över inom 4 dagar men komplicerande faktorer så som infektion och främmande kropp kan kraftigt förlänga fasen.

Nybildningsfas

Nybildningsfasen börjar efter cirka 3 dagar och ger upphov till granulationsvävnad, sårkontraktion och epitelialisering. Fibroblaster kommer till såret genom antingen rekrytering från intilliggande vävnad, lokal proliferation eller genom differentiering av odifferentierade mesenchymalceller. Fibroblaster producerar olika kollagentyper, glukosaminoglykaner och proteoglykaner. Samtidigt som de producerar extracellulär matris (ECM) utsöndrar de proteaser som bryter ner fibrinpluggen och ersätter på så vis långsamt det provisoriska

sårmatriset. Angiogenes är nödvändigt för syreförsörjning till den metaboliskt aktiva vävnaden. Flera olika signalsubstanser från bland annat makrofager, fibroblaster och trombocyter bidrar till att stimulera migration och nybildning av endotelceller som sedan ger upphov till blodkärl i sårbedden. Denna rikligt kärlförsörjda vävnad som till stor del består av fibroblaster och ECM är granulationsvävnad.

Kontraktion av såret börjar oftast efter cirka två veckor då rikligt med fibroblaster kommit till såret. Kontraktionen kan därefter fortsätta i flera veckor och avsevärt reducera ytan som behöver epitelialiseras. Kontraktionen åstadkoms med hjälp av myofibroblaster.

Epitelialisering, förutsatt att det är ett sår genom hudens alla lager, börjar i sårkanterna där keratinocyter prolifererar och växer centripetalt in över sårytan. Processen är beroende av tillväxtfaktorer från flera celltyper och fortsätter tills keratinocyterna på sårets olika sidor möts, då avstannar processen genom kontaktinhibering. Det sker ingen regeneration av svettkörtlar och hårfolliklar varför dessa saknas i det nybildade epitelet.

Mognadsfas

Under en lång tid, upp till 2 år, sker en mognad av vävnaden och ett ärr bildas. Tillväxtsignaler minskar och vävnaden blir mer cellfattig. Kompositionen i ECM förändras och en omstrukturering av ECM sker. Kollagen som tidigare legat arrangerat slumpmässigt arrangeras nu i buntar i riktning med hudens spänning. Denna fas får till följd att ärrret skrumprar något och hållfastheten ökar, dock aldrig till den ursprungliga hållfastheten.

Sårexansion

Under första till andra veckan efter ett hudsår bildas på en häst blir sårarean ofta större på grund av dragningar i den omkringliggande vävnaden. Viss expansion sker oavsett lokalisation men expansion är mest uttalat på extremiteterna (Auer & Stick, 2012). Fretz & Li (1992) såg en sårexansion på cirka 50 % på experimentellt skapade sår över dorsala tarsalleden. Petersen et al. (1999) skapade sår över dorsala kotleden och såg där en successiv sårexansion på nästan 40 % under de 15 första dagarna.

LLLT för sårläkning hos häst

LLLT effekt på sårläkning tillskrivs ofta till en ökad cellproliferation (Hawkins & Abrahamse, 2005). LLLT in vitro har visats stimulera fibroblaster till proliferation (Song *et al.*, 2003; Hawkins & Abrahamse, 2005) och också visats upp- och nedreglera över 100 gener (Song *et al.*, 2003). Monokromatiskt ljus har också in vitro visats stimulera proliferation av endotelceller (Rohringer *et al.*, 2017) och keratinocyter (Gagnon *et al.*, 2016) som också är essentiella för sårläkning. Flera in vivo-studier, främst på råttor och mus, har studerat effekten av LLLT på sårläkning och resultaten är blandade (Suan *et al.*, 2014). Fyra studier där man studerat inverkan av laserljus på sårläkning hos häst finns dock och presenteras nedan.

Kaneps et al. (1984) studerade effekten av laser på kirurgiskt skapade skador i hud och ytliga böjsenan på hästar (n=6). Skadan bestod i ett 1 cm långt och 1 cm djupt sår genom huden över ytliga böjsenan på alla fyra benen. Skadan behandlades med en laser som sveptes över området

15 minuter per tillfälle och avgav ljus av våglängden 904 nm. Lasern hade en pulsduration på 300 nanosekunder och gav en pulsenergi på 57 nJ. Dock saknas uppgift om pulsfrekvensen och därför kan inte den totala tillförda energin beräknas. Första behandlingen var 48 timmar efter sårskapandet och därefter behandlades såren ytterligare 5 gånger med 24 timmars intervall. 48 timmar efter den sista behandlingen avlivades hästarna och såren undersöktes histologiskt med avseende på degeneration, nekros, inflammation, fibroplasi och kapillär proliferation. Inga signifikanta skillnader sågs.

Fretz & Li (1992) gjorde 6 stycken 3 cm x 3 cm kvadratiska sår, genom hudens alla lager, på vissa bestämda platser på benen på 8 hästar. Hästarna delades upp i 3 olika grupper där antingen alla sår laserbehandlades (n=4), inga sår laserbehandlades (n=2) eller där ena sidans sår (n=2) laserbehandlades. Denna uppdelning gjordes för att se om de eventuella effekterna av laserbehandlingen var systemiska eller lokala. Ingen skillnad sågs mellan behandlade och icke behandlade sår. I studien står att laserstrålen har en diameter på 44 mm på 50 cm avstånd vilket är större än hela sårytan. Det står ändå att lasern lystes på 3 punkter: proximolateralt, proximomedialt och centralt i distala delen av såret. Detta framstår som att lasern har en diameter som är mindre, kanske 4,4 mm, eller att laserns kollimering är dålig och att behandlingen skett närmare än 50 cm. Vidare står det att lasern hade en våglängd på 633nm och gav 45.9 J/cm² per sår över 9 minuter dag 1 och därefter 5.1 J/cm² över 60 sekunder dagligen dag 2-11. Det är troligt att det som menas är J och inte J/cm² eftersom sår dosen inte bör vara relaterat till sårets area i och med att samma behandlingstid används varje dag medan såret krymper. Kroppsdosen står också i J/cm² och är summan av de behandlade sårens dos, vilket i så fall skulle betyda att sårytan är större än kroppsytan.

Petersen et al. (1999) gjorde 3 cm x 3 cm kvadratiska sår, genom hudens alla lager, över kotledens dorsalyta på båda frambenen. Hästarna (n=6) behandlades med laser på ena såret medan det andra lämnades som negativ kontroll. Lasern som användes strålade ljus med en våglängd på 830 nm. Såren strålades 66 sekunder per cm² varje dag i 30 dagar, vilket gav en stråldos på 2 J/cm². Såren evaluerades avseende sårarea och epiteliseringsarea. Ingen skillnad sågs mellan behandlade och obehandlade sår. Subjektivt noterades att laserbehandlade sår föreföll mindre smärtsamma och producerade mindre exsudat.

Jann et al. (2012) skapade ett 2,5 cm x 2,5 cm sår mitt på metacarpus på ett ben hos 8 stycken hästar. Såren bestrålades med laserljus av våglängden 635 nm i 5 minuter varannan dag i 80 dagar. Lasern ger två linjära strålar på 4 cm² och består av två dioder med effekten 2 x 17 mW. I och med att inte hela laserstrålen hamnar i såret är det oklart vilken irradians och stråldos såret får. I studien anges att 5,1 J/cm² levereras till såren vid varje behandling, men detta överensstämmer inte med angiven effekt, behandlingstid och sårarea. Lasern pulserade i 4, 12, 16 och 28 Hz och hade en pulskvot på 50 %. Behandlade sår läkte signifikant snabbare och vid dag 80 var samtliga behandlade sår läkta medan obehandlade sår var i genomsnitt 9 % av ursprungsarean. Ingenting nämns om blindning av den som utvärderat såren. Utöver behandling av sårytan så behandlades också associerade nerver proximalt.

Studier med rött och infrarött inkoherent pulserat monokromatiskt ljus (Biolight®)

Inga studier utförda på häst där man använt både rött och infrarött pulserande ljus, likt ljuset i den aktuella studien, har kunnat hittas. Däremot finns sex publicerade studier där man undersökt effekten av sådant ljus på andra djurslag eller människor. En studie är gjord på gris där man undersökt ljuset avseende biverkningar. Två studier är gjorda på människa där man främst studerat den smärtlindrande effekten vid ingrepp i munhålan. Tre studier är gjorda på trycksår hos människa med avseende på sårhäkning. Dessa sex studier presenteras nedan och samtliga har använt en kombination av pulserande rött ljus med våglängden 637 nm och NIR ljus med våglängden 956 nm. Både det röda och det infraröda har varit pulserande med varierande frekvenser mellan 1-9900 Hz. Irradiansen anges vara 55 W/m² (5.5 mW/cm²) för NIR-ljus och 21 W/m² (2.1 mW/cm²) för rött ljus i alla följande studier förutom Takas et al. (2006) där irradiansen inte anges.

Biverkningar hos gris

Jensen-Waern & Ekman (2000) undersökte effekten av Biolight®-behandling på friska grisar (n=18) i en kontrollerad studie. Fyra bestämda hudområden bestrålades och den sammanlagda bestrålade hudarean var 360 cm². Grisarna blev behandlade 5 gånger i veckan, 12 min med infrarött ljus och 18 min med rött ljus, under en tvåveckors period med en total levererad energi på 6,3 J/cm² per behandlingstillfälle. Blodprov togs och undersöktes avseende hematologiska och klinisk kemiska parametrar, utan att finna avvikelser. Vid studiens slut gjordes fullständig obduktion och histologiska prover togs från flertalet vävnader och organ inklusive hud och underliggande vävnader från det bestrålade området. Inga signifikanta skillnader sågs mellan kontrollgrupp och behandlad grupp.

Munhåla hos människa

Takas et al. (2006) tittade på den smärtlindrande effekten av Biolight® efter depuration (tandstensborttagning). Tjugo personer ingick i studien som utfördes enligt "split mouth" design, där patienterna var sina egna kontroller. Vid första besöket utfördes behandling på en kvadrant och patienterna fick placebobehandling och vid nästa behandling fick de Biolight®-behandling. Behandlingen var extraoral mot den behandlade käken och pågick 6 minuter innan ingreppet och 10 minuter efter. Irradiansen är inte angiven. Patienterna smärtupplevelse evaluerades med hjälp av visuell analog skala (VAS) när lokalbedövningen släppt samt dagen efter. Inga signifikanta skillnader sågs. Studien var dubbelblindad och således placebokontrollerad, men en brist är att alla patienter fick placebo först respektive Biolight® nästa besök och inte i randomiserad ordning.

Kashani et al. (2007) genomförde en randomiserad, dubbelblindad, placebokontrollerad studie där man tittade på effekten av Biolight® på smärta och sårhäkning efter kirurgiskt avlägsnande av visdomständer. Extraoral behandling utfördes på patienterna (n=60) 6 minuter preoperativt och 10 minuter postoperativt, enligt instruktioner från tillverkaren. Patienterna undersöktes 3 och 7 dagar efter operationen och ingen signifikant skillnad sågs i VAS-score, hur mycket smärtlindring patienterna tog eller i komplikationsfrekvens.

Trycksår hos människa

Schubert (2001) använde Biolight® på patienter äldre än 65 år som hade trycksår. I studien var det två patientgrupper; kontrollgrupp (n=37) som behandlades med konventionell terapi och en behandlingsgrupp (n=35) som utöver konventionell terapi också behandlades med Biolight®. Såren läkte signifikant snabbare i behandlingsgruppen och 90% av sårytan var läkt inom 5 veckor jämfört med 9 veckor i kontrollgruppen (p=0.01). En brist i artikeln är att inget nämns om blindning eller placebobehandling. Biolight®-lampan testades avseende irradians och gav då 55 W/m² (5.5 mW/cm²) NIR ljus och 21 W/m² (2.1 mW/cm²) rött ljus. Behandlingen pågick i 9 minuter och genomfördes vecka 1: 5 gånger, vecka 2: 4 gånger, vecka 3: 2 gånger, vecka 4 och framåt: 1 gång/vecka.

Dehlin et al. (2003) använde Biolight® i en dubbelblindad, placebokontrollerad studie på patienter (n=164) med trycksår av andra och tredje graden. Behandling utfördes 5 gånger första veckan, 2 gånger vecka 2, 4, 6, 8 och 10 och 3 gånger vecka 3, 5, 7, 9 och 11. Vid de 5 första behandlingstillfällena pågick behandlingen i 9 minuter och därefter 6 minuter per session. Ingen signifikant skillnad kunde ses i läkningshastigheten eller tiden till fullständig läkning. En signifikant sårreduktion observerades vid subanalys av patienter i behandlingsgruppen där BMI <20 (P<0.01) och en tendens till snabbare läkning kunde ses hos behandlade patienter med trycksår av andra graden (P=0.06).

Dehlin et al. (2007) gjorde en uppföljande studie på patienter (n=76) med trycksår av andra graden. Resultaten i denna studie poolades med resultaten för patienterna (n=87) med trycksår av andra graden från Dehlin et al. (2003). Behandlingen var samma i båda studierna. Tendensen att trycksår av andra graden hade en snabbare sårreduktion blev nu signifikant efter 12 veckors behandling, men tiden till fullständig läkning och andelen fullständigt läkta sår skiljde sig inte signifikant mellan grupperna.

Chen et al. (2014) gjorde en litteraturgenomgång med syftet att avgöra effekten av fototerapi på trycksår. I denna genomgång ingår Schubert (2001) och Dehlin et al. (2003) och 5 andra studier där andra former av ljusterapi förekommer. Författarnas slutsats angående fototerapi på trycksår är att effekten är väldigt osäker och att kvaliteten på evidensen är mycket låg eftersom studierna har risk för bias och studiematerialen är små.

En systematisk litteraturöversikt avseende sårbehandling hos äldre gjordes i en rapport av Statens beredning för medicinsk utvärdering (2014). Rapporten inkluderar samma studier som ovan och exkluderar medvetet Dehlin et al. (2007) för att den delvis innehöll samma studiepopulation som Dehlin et al. (2003). I rapporten anser man inte att det finns tillräcklig evidens för att monokromatiskt ljus förbättrar sårhäkningshastigheten av trycksår hos äldre.

MATERIAL OCH METODER

Denna studie är godkänd av Uppsalas djurförsöksetiska nämnd (C67/16).

Hästar

I studien ingick åtta hästar av rasen varmblodig travare (se tabell 1). Samtliga hästar bedömdes som friska vid försökets början. Hästarna tilldelades, genom lottdragning, ett slumpmässigt nummer mellan 1 och 8. Manen knöts upp på samtliga hästar för att denna inte skulle störa sårsläkningen. Hästarna stod ensamma i box på spån och vistades i hagar dagtid. Rektaltemperaturen mättes dagligen.

Tabell 1. Lista över de i försöket ingående hästar samt vilken sidas sår som behandlades

Häst nr.	Ras	Kön	Ålder (år)	Vikt (kg)	Beh. sida
1	Varmblodig Travare	Sto	18	550	Höger
2	Varmblodig Travare	Sto	8	505	Vänster
3	Varmblodig Travare	Sto	13	530	Höger
4	Varmblodig Travare	Valack	17	473	Vänster
5	Varmblodig Travare	Sto	17	574	Vänster
6	Varmblodig Travare	Valack	9	537	Höger
7	Varmblodig Travare	Sto	6	445	Vänster
8	Varmblodig Travare	Sto	7	575	Höger

Sårkonstruktion

Alla hästar sederades med en kombination av 4 mg detomidin (Domosedan 10 mg/ml, Orion Pharma AB Animal Health, Sollentuna) och 4 mg butorfanol (Butomidor 10 mg/ml, Salfarm Scandinavia AB, Helsingborg) intravenöst. På halsens båda sidor, i området för intramuskulär injektion, klipptes med klippmaskin ett 6 cm x 6 cm stort område. Den klippta ytan tvättades med klorhexidintvål och klorhexidinsprit. Lokalanestesi uppnåddes genom att 40 mg mepivakain (Carbocain 20 mg/ml, AstraZeneca, Södertälje) injicerades subkutant centralt i det klippta området. Därefter avlägsnades huden på ett 2 cm i diameter stort cirkulärt område, centralt i det rakade fältet, med hjälp av en biopsipunch.

Behandling

Såren lämnades oskyddade, men samtliga sår bandagerades dag 3, 10 och 11, eftersom underlaget i hagarna då var blött/lerigt och risken för kraftig kontamination av såren ansågs stor. Bandage lades med icke adhesiv steril kompress närmast såren och fästes med självhäftande förband. Bandagen satt ett dygn.

Genom slantsingling bestämdes vilken sida som skulle få ljusbehandling och vilken sida som skulle lämnas som kontroll. Såren som fick ljusbehandling bestrålades med hjälp av en handhållen apparat (Biolight® BCD 650 Animal). Det bestrålade området täckte in hela såret med god marginal. Behandlingen gjordes med ett på apparaten förprogrammerat program namngivet "wound" som varade i 4 minuter och 40 sekunder. Apparaten sände ut rött och

infrarött ljus i varierande pulsfrekvenser mellan 1-10000 Hz. Rött ljus sändes ut i cirka 95 s och IR ljus i 185 s. Våglängderna som sändes ut testades med hjälp av en spektrometer (Thorlabs ccs200) och visade att Biolight® BCD 650 Animal sände ut ljus i det röda ($\lambda \approx 637$ nm) och NIR ($\lambda \approx 956$ nm) delen av spektrumet (se bilaga 1). Irradiansen mättes med hjälp av en effektmätare (Thorlabs PM310D) med detektor (Thorlabs S310C). Biolight®-apparaten hölls på ungefär 1 cm avstånd från effektmätardetektorns mynning. Irradiansen för rött ljus mättes till $2,3 \text{ mW/cm}^2$ och för NIR ljus till $6,4 \text{ mW/cm}^2$. Total utsänd energi över hela programmets längd var således $0,2 \text{ J/cm}^2$ respektive $1,2 \text{ J/cm}^2$ för respektive våglängd.

Såren behandlades en gång dagligen dag 0-4, 7-11, 14-18 och 21-25. Apparaten hölls på ett avstånd av 1 cm från såret med hjälp av distanser. Endast de som behandlade såren visste vilka sidor som var under behandling respektive kontroll. Såren sköljdes med steril fysiologisk koksaltlösning, för att spola bort lösa föroreningar och därmed kunna inspektera såren bättre, en gång dagligen till dag 15, därefter endast vid behov. När sköljning gjordes sköljdes såren med 20-60 ml, med hjälp av 20 ml spruta och 1.2x40 mm kanyl, och med samma mängd på båda sidors sår. Mekanisk rengöring av såren gjordes vid behov av personen som gjorde den subjektiva bedömningen och inte visste vilket sår som var behandlat respektive kontroll. Den mekaniska rengöringen bestod i att en fuktad kompress anlades mot såret och drogs nedåt så att smuts och eventuell sårskorpa avlägsnades. När mekanisk rengöring utfördes gjordes likadant på båda sidornas sår.

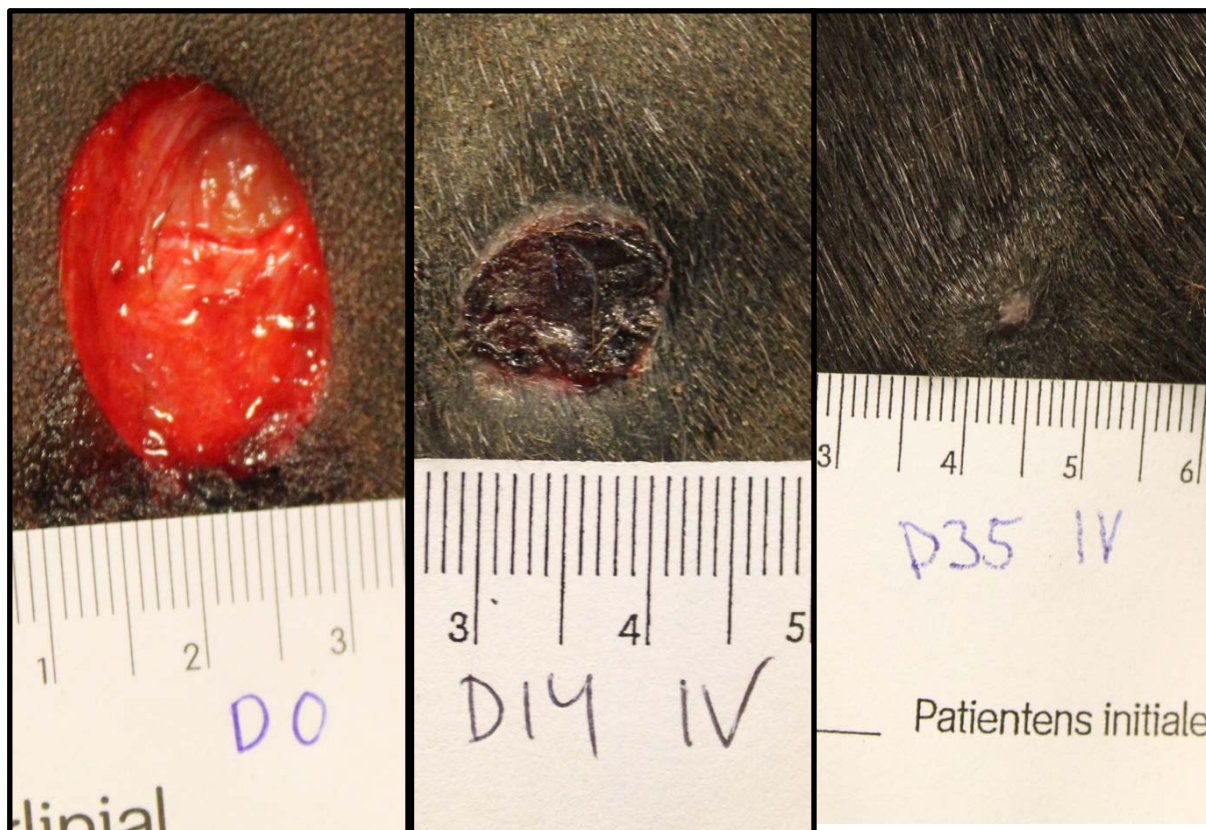
Utvärdering

Tid till fullständig läkning

Såren bedömdes subjektivt dagligen avseende fullständig läkning. Såren definierades som fullständig läkta när ett epitellager täckte hela sårytan. Personen som gjorde bedömningen var blindad.

Sårarea

Fotografier för analys av sårarea togs dag 0, 1, 2, 3, 4, 7, 14, 21, 28 och 35. Alla fotografier togs med samma digitalkamera (Canon EOS 550D). Kameran var vinklad 90 grader mot sårytan. Sårarean beräknades med hjälp av digital planimetri och utfördes manuellt i ImageJ. En linjal användes som referens för längd och märktes med dag och vilket sår, så att såren kunde identifieras korrekt i efterhand. Personen som utförde planimetrin var blindad. Exempel på bilder mätta med digital planimetri visas i figur 3.



Figur 3. Sårområde från en av hästarna dag 0, dag 14 och dag 35. Vid dag 14 har såret en sårskorpa och dag 35 bedömdes såret fullständigt läkt.

Statistisk dataanalys

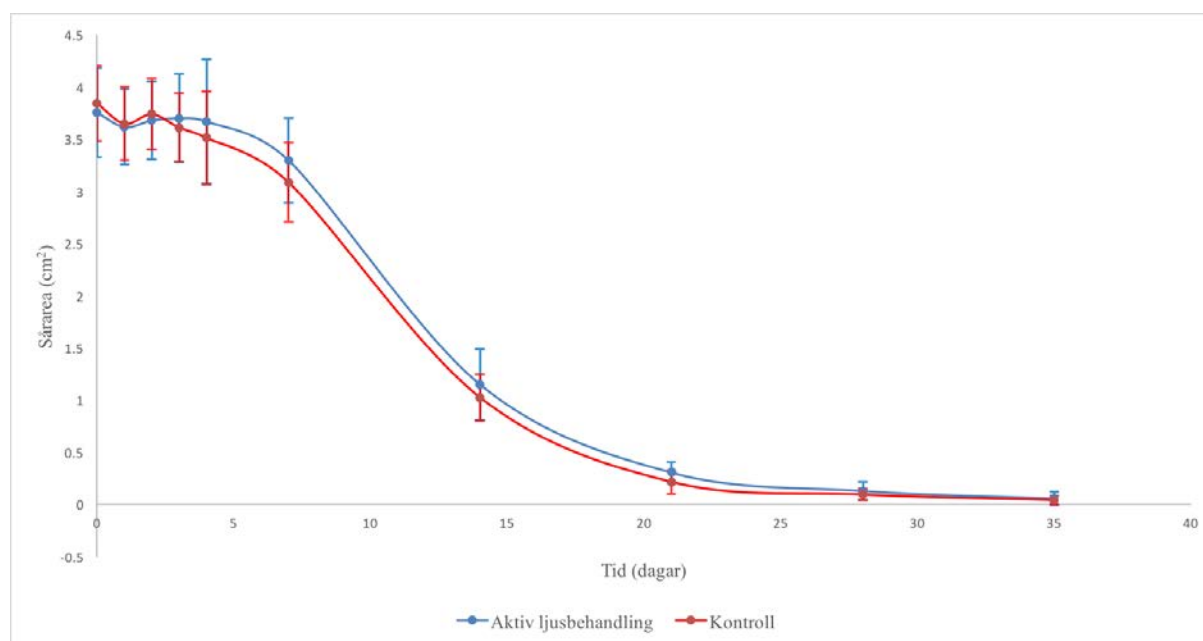
Tid till fullständig sårhäkning samt sårarea från planimetrisk undersökning användes för statistisk analys. Tiden till fullständig läkning utvärderades med parat t-test. Data avseende sårarea analyserades som upprepande mätningar med mixed procedure i SAS. Signifikansnivån sattes till $p < 0,05$.

RESULTAT

Inga avvikelser i rektaltemperatur förekom under försöket. Alla hästar var med från försökets början till såren bedömdes fullständig läkta. Ingen behandling som kunde interferera med resultatet förekom under studietiden. Subjektivt bedömdes kontrollsåren som fullständigt läkta efter i genomsnitt 49,0 dagar (95%Ci=35,4-62,6) och behandlade sår efter 51,8 dagar (95%Ci=38,7-64,8). Detta är en signifikant kortare tid till fullständig läkning för de obehandlade såren ($p=0,026$). Skillnaden i sårnya, mätt med digital planimetri, mellan behandlings- och kontrollgruppen var inte signifikant någon av de mätta dagarna (se tabell 2). Sårnytan över tiden för de båda grupperna illustreras i figur 4.

Tabell 2. Medelvärde (\bar{x}), Standardavvikelse (SD) och medianvärden för sårnya i behandling- och kontrollgrupp. Dessa värden är i cm^2 . P-värde avseende skillnad i sårarea redovisas också i tabellen

Dag	Behandling			Kontroll			P-Värde
	\bar{x}	SD	Median	\bar{x}	SD	Median	
0	3,76	0,43	3,67	3,84	0,36	3,83	0,60
1	3,62	0,36	3,65	3,65	0,35	3,63	0,85
2	3,68	0,37	3,70	3,74	0,34	3,63	0,72
3	3,70	0,42	3,58	3,61	0,33	3,62	0,58
4	3,67	0,60	3,76	3,51	0,45	3,48	0,34
7	3,30	0,41	3,12	3,09	0,38	3,05	0,20
14	1,15	0,34	1,20	1,03	0,22	0,96	0,44
21	0,31	0,10	0,33	0,22	0,11	0,21	0,58
28	0,13	0,09	0,16	0,10	0,05	0,10	0,83
35	0,06	0,06	0,03	0,04	0,04	0,04	0,92



Figur 4. Genomsnittlig sårarea över tiden i behandlings- och kontrollgrupp. Felstaplar markerar \pm en standardavvikelse.

DISKUSSION

Denna studie kunde inte visa någon skillnad i sårarea mellan behandlade och obehandlade sår. Tiden till fullständig läkning var i genomsnitt 49 dagar för kontrollgruppen och 2,8 dagar längre för behandlingsgruppen. Skillnad kan tyckas liten på detta begränsade material men var signifikant till följd av studieupplägget, där data är parade. I de flesta studierna avseende LLLT för sårsläkning häst har det inte varit någon signifikant skillnad mellan kontroll- och behandlingsgrupp (Kaneps *et al.*, 1984; Fretz & Li, 1992; Petersen *et al.*, 1999). Jann *et al.* (2012) såg dock en positiv effekt på sårsläkning. De använde en våglängd ($\lambda=635$ nm) snarlik en av de våglängderna i den aktuella studien ($\lambda=637$ nm). Det är intressant att kontroll och laserbehandlade sår i studien av Jann *et al.* (2012) inte skiljer i area förrän cirka dag 25, då de behandlade såren börjar bli mindre. I denna studie slutade behandlingen dag 25 och kanske är det senare i sårsläkningsprocessen som LLLT kan vara effektivt på sårsläkning hos häst. I de tidigare nämnda studierna utan signifikanta skillnader har inte heller behandling pågått längre än 30 dagar. Det är också värt att notera att Jann *et al.* (2012) inte nämner något om blindning och att jämförande exempelbilder på kontroll och behandling dag 80, då alla laserbehandlade sår ska vara läkta, ser svårbedömda ut. En subjektivitet förekommer också när manuell digital planimetri används för mätning av sårarea. Finns det en sårskorpa på bilderna blir det något av en gissning exakt var sårkanterna befinner sig och är bedömaren då inte blindad finns en risk för bias. Andra skillnader så som koherens, irradians, stråldos, behandlingsintervall och sårens placering skulle också kunna vara bidragande orsaker till skillnaden i resultat.

En förvirring angående ljusparametrar råder i flera av de genomgångna studierna. När vissa angivna värden omöjligt kan stämma tappar studierna trovärdighet och man vet inte vilka värden som är tillförlitliga och det blir svårt att dra slutsatser om hur de olika variablerna kan påverka behandlingsresultatet.

Mätningarna avseende lampans irradians i denna studie är att betrakta som ungefärliga och genomfördes för att få veta storleksordningen på irradians och stråldos. I en tidigare studie med Biolight® mättes irradiansen för rött ljus till $2,1 \text{ mW/cm}^2$ och för IR ljus till $5,5 \text{ mW/cm}^2$ (Schubert, 2001), vilket är i samma storleksordning som resultaten i denna studie ($2,3 \text{ mW/cm}^2$ resp. $6,4 \text{ mW/cm}^2$). Dehlin *et al.* (2007) testade våglängderna och anger topp för NIR ljus och rött ljus till 960 ± 4 nm respektive 636 ± 8 nm, som ser ut att vara överensstämmande med mätningarna i denna studie (se bilaga 1) även om inga exakta mätningar gjorts här. Tyvärr saknas uppgift om exakt vilka pulsfrekvenser som använts i denna studie, men programmet ska enligt uppgift från tillverkaren utnyttja en rad olika frekvenser mellan 1 Hz och 10000 Hz.

Tóth *et al.* (2011) utförde en studie där man på samma sätt som i denna studie gjorde sår av samma storlek på samma lokalisation. Kontrollsåren i studien av Tóth *et al.* (2011) läkte fullständigt på i genomsnitt 44,0 dagar (95% Ci=38,6-49,4). Kontrollsåren i denna studie läkte på i genomsnitt 49,0 dagar (95% Ci=35,4-62,6). Såren läkte lite långsammare i denna studie och konfidensintervallet var bredare, vilket kan förklaras av större spridning samt en mindre urvalsstorlek (8 mot 10). Den större spridningen skulle kunna bero på att hästarna vistades i olika hagar och såren kontaminerades således olika mycket. Skillnaden kan dock ha flera

förklaringar så som att kontrollsåren inte behandlades likadant i de båda studierna och att det var olika subjektiva bedömare som gjorde olika bedömningar.

I denna studie hade varje individ ett sår som behandlades och ett kontrollsår. Varje individ var således sin egen kontroll. Fördelar med att hästarna är sin egen kontroll gör att det är mindre känsligt för variationer mellan individer, vilket också gör att det krävs färre individer för att se statistiska samband. En potentiell nackdel är att man inte ser om behandlingen har systemiska effekter. Föreslagna verkningsmekanismer (de Freitas & Hamblin, 2016) tyder dock inte på att effekten skulle vara systemisk.

Båda sätten att mäta sårhäkning i denna studie har sina begränsningar. Den digitala planimetrin behöver inte interferera alls med sårhäkningen, men då finns en osäkerhet i exakt var sårkanterna går eftersom sårskorporna inte kan avlägsnas. Tiden till fullständig läkning är svårbedömd och när det börjar närma sig fullständig läkning är det svårt att se om det är en liten sårskorpa kvar eller om såret är fullständigt epitelbeklätt. Därför var den blindade bedömaren i denna studie tvungen att försiktigt skrapa på sårområdet. Detta kan tänkas medföra en något fördröjd sårhäkning, särskilt eftersom skört epitel ibland följer med sårskorpan. Man kan också ifrågasätta relevansen av att använda variabeln ”fullständig läkning”. Läkningsgraden av de sista procenten sårarea tar förhållandevis lång tid och är kanske inte kliniskt relevant.

Evidensen för LLLT för sårhäkning hos häst är mycket begränsad. Eventuellt kan en stimulerande effekt ses i ett senare skede i sårhäkningsprocessen (Jann *et al.*, 2012), men detta har man bara sett i en liten studie utan blindning. Mer forskning behövs för att påvisa och säkerställa en effekt av ljusbehandling på sårhäkning och om effekten kan säkerställas finns ett stort forskningsområde för att optimera behandlingsintervall, behandlingstider och ljusparametrar. Resultaten från denna randomiserade och blindade studie indikerar inte någon positiv effekt av ljusbehandling på sårhäkning hos häst.

TACK TILL

Stort tack till professor Greger Thornell vid Uppsala Universitet för konsultation och tillhandahållande av optisk mätutrustning. Jag vill också tacka veterinär Susanne Demmers vid universitetsdjursjukhuset Uppsala för tillhandahållande av Biolight® BCD 650 Animal. Slutligen vill jag också tacka min handledare Anna Bergh.

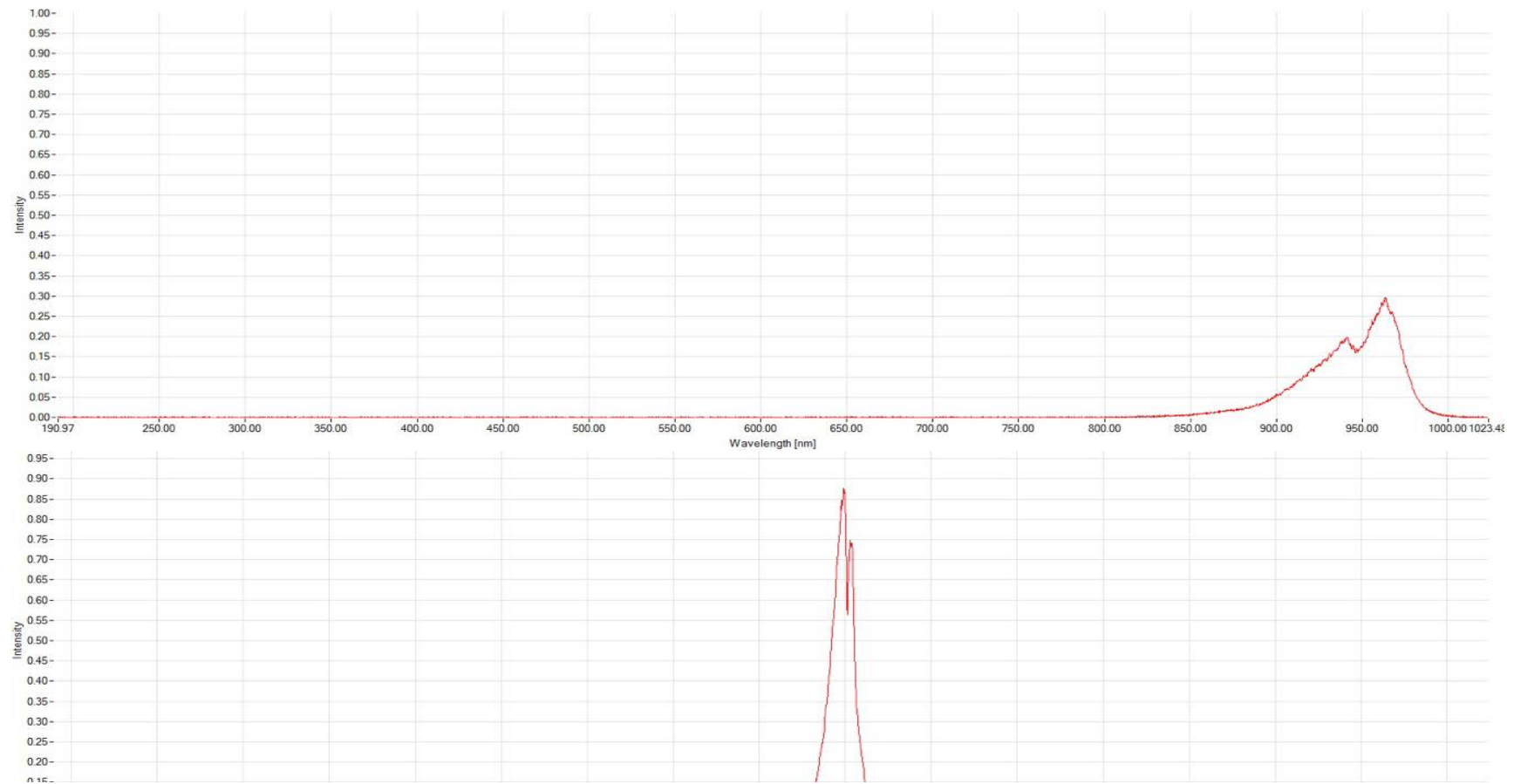
FINANSIERING OCH INTRESSEKONFLIKTER

Ingen extern finansiering har mottagits och de i försöket inblandade har inga kända intressekonflikter.

REFERENSER

- Chen, C., Hou, W.-H., Chan, E. S., Yeh, M.-L. & Lo, H.-L. D. (2014). Phototherapy for treating pressure ulcers. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. John Wiley & Sons, Ltd.
- Chung, H., Dai, T., Sharma, S. K., Huang, Y.-Y., Carroll, J. D. & Hamblin, M. R. (2012). The Nuts and Bolts of Low-level Laser (Light) Therapy. *Annals of Biomedical Engineering*, 40(2), pp 516–533.
- Dehlin, O., Elmståhl, S. & Gottrup, F. (2003). Monochromatic phototherapy in elderly patients: a new way of treating chronic pressure ulcers? *Aging Clinical and Experimental Research*, 15(3), pp 259–263.
- Dehlin, O., Elmståhl, S. & Gottrup, F. (2007). Monochromatic phototherapy: effective treatment for grade II chronic pressure ulcers in elderly patients. *Aging Clinical and Experimental Research*, 19(6), pp 478–483.
- de Freitas, L. F. & Hamblin, M. R. (2016). Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. *IEEE journal of selected topics in quantum electronics: a publication of the IEEE Lasers and Electro-optics Society*, 22(3).
- Fretz, P. B. & Li, Z. (1992). Low energy laser irradiation treatment for second intention wound healing in horses. *The Canadian Veterinary Journal*, 33(10), pp 650–653.
- Gagnon, D., Gibson, T. W. G., Singh, A., zur Linden, A. R., Kazienko, J. E. & LaMarre, J. (2016). An in vitro method to test the safety and efficacy of low-level laser therapy (LLLT) in the healing of a canine skin model. *BMC Veterinary Research* [online], 12. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4825076/>. [Accessed 2017-10-24].
- Hashmi, J. T., Huang, Y.-Y., Sharma, S. K., Kurup, D. B., De Taboada, L., Carroll, J. D. & Hamblin, M. R. (2010). Effect of Pulsing in Low-Level Light Therapy. *Lasers in surgery and medicine*, 42(6), pp 450–466.
- Hawkins, D. & Abrahamse, H. (2005). Biological effects of helium-neon laser irradiation on normal and wounded human skin fibroblasts. *Photomedicine and Laser Surgery*, 23(3), pp 251–259.
- Huang, Y.-Y., Chen, A. C.-H., Carroll, J. D. & Hamblin, M. R. (2009). Biphasic dose response in low level light therapy. *Dose-Response: A Publication of International Hormesis Society*, 7(4), pp 358–383.
- Jann, H. W., Bartels, K., Ritchey, J. W., Payton, M. & Bennett, J. M. (2012). Equine wound healing: influence of low level laser therapy on an equine metacarpal wound healing model. *Photonics & Lasers in Medicine* [online], 1(2). Available from: <https://www.degruyter.com/view/j/plm.2012.1.issue-2/plm-2012-0004/plm-2012-0004.xml>. [Accessed 2017-10-25].
- Jensen-Waern, M. & Ekman, S. (2000). Effects of a 2-week treatment with pulsed monochromatic light in healthy pigs: a clinical and morphological study. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*, 16(4), pp 178–182.
- Kaneps, A. J., Hultgren, B. D., Riebold, T. W. & Shires, G. M. (1984). Laser therapy in the horse: histopathologic response. *American Journal of Veterinary Research*, 45(3), pp 581–582.
- Karu, T. I. (2010). Multiple roles of cytochrome c oxidase in mammalian cells under action of red and IR-A radiation. *IUBMB life*, 62(8), pp 607–610.
- Kashani, H., Kanagaraja, S. & Kahnberg, K.-E. (2007). A randomized double-blind comparative study of Biolight light therapy following surgical extraction of impacted lower third molars. *Swedish Dental Journal*, 31(4), pp 165–170.

- Petersen, S. L., Botes, C., Olivier, A. & Guthrie, A. J. (1999). The effect of low level laser therapy (LLLT) on wound healing in horses. *Equine Veterinary Journal*, 31(3), pp 228–231.
- Rohringer, S., Holnthoner, W., Chaudary, S., Slezak, P., Priglinger, E., Strassl, M., Pill, K., Mühleder, S., Redl, H. & Dungal, P. (2017). The impact of wavelengths of LED light-therapy on endothelial cells. *Scientific Reports*, 7(1), p 10700.
- Schubert, V. (2001). Effects of phototherapy on pressure ulcer healing in elderly patients after a falling trauma. A prospective, randomized, controlled study. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*, 17(1), pp 32–38.
- Song, S., Zhang, Y., Fong, C.-C., Tsang, C.-H., Yang, Z. & Yang, M. (2003). cDNA Microarray Analysis of Gene Expression Profiles in Human Fibroblast Cells Irradiated with Red Light. *Journal of Investigative Dermatology*, 120(5), pp 849–857.
- Statens beredning för medicinsk utvärdering (2014). *Svårläkta sår hos äldre: prevention och behandling : en systematisk litteraturoversikt*. Stockholm: Statens beredning för medicinsk utvärdering (SBU). ISBN 978-91-85413-67-6.
- Suan, L. P., Bidin, N., Cherng, C. J. & Hamid, A. (2014). Light-based therapy on wound healing : a review. *Laser Physics*, 24(8), p 083001.
- Takas, D., Tellefsen, G. & Johannsen, G. (2006). Pain relief after scaling and rootplaning by monochromatic phototherapy (Biolight). *Swedish Dental Journal*, 30(2), pp 69–75.
- Tóth, T., Broström, H., Båverud, V., Emanuelson, U., Bagge, E., Karlsson, T. & Bergvall, K. (2011). Evaluation of LHP® (1% hydrogen peroxide) cream versus petrolatum and untreated controls in open wounds in healthy horses: a randomized, blinded control study. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 53(1), p 45.
- Zielinska, P., Soroko, M., Zwyrzykowska, A., Kielbowicz, Z. & Zwyrzykowska-Wodzińska, A. (2017). The use of laser biostimulation in human and animal physiotherapy – a review. *Acta Veterinaria Brno*, 86.



Bilaga 1. Emissionsspektrum för Biolight® BCD 650 Animal. Övre diagrammet visar när NIR ljus sänds ut och det undre när rött ljus sänds ut.

7
23.4E