

Univerza
v Ljubljani *Medicinska*
fakulteta



Igor Frangež

**VPLIV FOTOBIMODULACIJE S SVETLOBO
EMITIRAJOČIMI DIODAMI NA CELJENJE KRONIČNE
RANE**

Doktorska disertacija

Ljubljana, 2017

Univerza
v Ljubljani *Medicinska*
fakulteta



Igor Frangež

**THE EFFECT OF PHOTOBIMODULATION WITH LIGHT
EMITTING DIODES ON CHRONIC WOUND HEALING**

Doctoral thesis

Ljubljana, 2017

Univerza
v Ljubljani *Medicinska*
fakulteta



Igor Frangež

**VPLIV FOTOBIMODULACIJE S SVETLOBO
EMITIRAJOČIMI DIODAMI NA CELJENJE KRONIČNE
RANE**

Imenovanje mentorja na seji senata dne 14. 11. 2012.

Komisija za oceno in zagovor imenovana na sejah senata dne 19. 3. 2012 in 20. 11. 2017.

Datum zagovora: 20. 12. 2017

Mentor: prof. dr. Dragica Maja Smrke, dr. med.

Predsednik komisije: prof. dr. Kristijan Jezernik, univ. dipl. biol.

Član: prof. dr. Boštjan Luzar, dr. med.

Član: prof. dr. Miran Šebeštjen, dr. med.

IZJAVA O AVTORSTVU

S podpisom potrjujem, da je doktorska disertacija rezultat mojega samostojnega raziskovalnega dela.

as. mag. Igor Frangež, dr. med., dr. dent. med.

ZAHVALA

- Mentorici, prof. dr. Dragici Maji Smrke, dr. med., se zahvaljujem za vso strokovno in organizacijsko pomoč pri izvedbi raziskave, za potrpežljivost in spodbudo v težkih obdobjih.
- Prof. dr. Kseniji Cankar, dr. dent. med., za opravljene meritve mikrocirkulacije in analizo rezultatov.
- Mag. Karin Birk, DMS, za pomoč pri izvedbi raziskave.
- Zdravnikom in medicinskim sestram Kliničnega oddelka za kirurške okužbe za pomoč pri vključevanju pacientov v raziskavo.
- Očetu, prim. mag. Marjanu Zlatku Frangežu, dr. dent. med., za pomoč pri financiranju doktorskega študija.
- Heleni, Asji in Zoe za ljubezen, razumevanje in spodbudo.

KAZALO

1.	UVOD.....	14
1.1	Fiziologija celjenja rane.....	14
1.2	Patofiziologija kronične rane.....	15
1.3	Standardno zdravljenje kronične rane.....	16
1.4	Fotobiomodulacija z LLLT (<i>low level light therapy</i>).....	18
1.5	Fotobiomodulacija in izvori svetlobe.....	25
1.6	Mehanizem delovanja fotobiomodulacije.....	26
1.7	Primarni, sekundarni in terciarni učinki LLLT.....	29
2	NAMEN DELA IN HIPOTEZA.....	32
3	MATERIALI IN METODE.....	33
3.1	Preiskovanci.....	33
3.2	Ocena dna rane po Falangi.....	36
3.3	Merjenje površine rane.....	37
3.4	Ocena mikrocirkulacije na robu rane.....	38
3.5	Ocena bolečine po VAS (vizualna analogna skala).....	38
3.6	Terapija z LED.....	38
3.7	Statistična analiza podatkov.....	40
4	REZULTATI.....	41
4.1	Vpliv fotobiomodulacije z LED na oceno dna rane po Falangi.....	41
4.2	Vpliv fotobiomodulacije z LED na površino rane.....	42

4.3	Vpliv fotobiomodulacije z LED na mikrocirkulacijo na robu rane	44
4.4	Ocena bolečine po VAS (vizualno analogni skali)	44
5	RAZPRAVA	46
6	ZAKLJUČKI	52
7	LITERATURA	53
8	PRILOGA: KLINIČNI PRIMERI	63

SEZNAM UPORABLJENIH OKRAJŠAV

Okrajšava	Pomen
LED	Svetlobo emitirajoče diode (angl. » <i>light emitting diodes</i> «)
LLLT	Terapija z nizkoenergetskimi laserjem (angl. » <i>low level laser therapy</i> «). Enaka okrajšava se uporablja tudi za terapijo z nizkoenergetsko svetlobo (angl. » <i>Low level light therapy</i> «).
ROS	Prosti kisikovi radikali (angl. » <i>Reactive oxygen species</i> «)
VAC	Terapija z negativnim tlakom
NIR	Svetloba blizu infrardeče (angl. » <i>Near infrared light</i> «)
NO	Dušikov oksid
Cco	Multicencimski kompleks Citokrom C oksidaza
ATP	Adenozin trifosfat
DNA	Deoksiribonukleinska kislina
cAMP	Ciklični adenozinmonofosfat
RNA	Ribonukleinska kislina
D-LED	Bolniki s kronično rano in sladkorno boleznijo, obsevani z aktivnimi svetlobo emitirajočimi diodami
D-Ko	Bolniki s kronično rano in sladkorno boleznijo, obsevani s placebo napravo
N-LED	Bolniki s kronično rano, brez sladkorne bolezni, obsevani z aktivnimi svetlobo emitirajočimi diodami
N-Ko	Bolniki s kronično rano, brez sladkorne bolezni, obsevani s placebo napravo

HeNe laser	Helij neonov laser
GaAs laser	Galij arzenov laser
GaAl	Galij aluminijev laser
GaAlAs	Galij aluminijev arzenov laser
Red laser	Laser, ki seva rdečo svetlobo
ITM	Indeks telesne mase
CRP	C reaktivni protein
VAS	Vizualno analogna skala

IZVLEČEK

Izhodišče: Kronične rane so rane, ki se v dveh mesecih ne zacelijo oziroma se ne začnejo celiti in predstavljajo pereč zdravstven problem. Še posebej so h kroničnim ranam nagnjeni pacienti s sladkorno boleznijo. Standardni pristopi k zdravljenju, ki so kirurška odstranitev mrtvin, preveze rane z ustreznimi oblogami in po potrebi antibiotično zdravljenje, pogosto ne privedejo do željenih rezultatov. Prav zato se raziskujejo dodatne metode zdravljenja, ki naj bi pospešile hitrost celjenja rane. Ena od dodatnih metod je fotobiomodulacija, pri kateri obsevanje s svetlobo ob uporabi natančno določenih svetlobnih režimov ugodno vpliva na metabolizem celic. Uporablja se svetloba valovnih dolžin med 650 in 1000 nm, ki jo pridobimo s pomočjo svetlobo emitirajočih diod (LED – *light emitting diodes*) in nizkoenergetskih laserjev (LLL – *low level laser therapy*). Splošni učinki svetlobe so dokazani na molekularnem, celičnem, tkivnem in sistemskem nivoju. Iz *in vitro* kot tudi iz kliničnih raziskav izhajajo rezultati, ki dokazujejo učinke fotobiomodulacije na proliferacijo fibroblastov, sintezo kolagena, celično viabilnost, stimulacijo ravnih dejavnikov, in na številne imunske celice.

Namen raziskave: Namen raziskave je bil preveriti, ali fotobiomodulacija z LED, kot adjuvantna metoda zdravljenja kronične rane, značilno pospeši celjenje rane.

Preiskovanci in metode dela: V prospektivno randomizirano, dvojno slepo raziskavo, smo vključili 40 zaporednih pacientov s sladkorno boleznijo in 39 brez sladkorne bolezni, ki so bili napoteni na zdravljenje kronične rane v Univerzitetni klinični center Ljubljana v obdobju med oktobrom 2012 in junijem 2014. Paciente s sladkorno boleznijo in tiste brez nje smo naključno razporedili v dve skupini, študijsko, ki je poleg standardnega zdravljenja po protokolu za kronične rane prejela še terapijo z LED (z valovnimi dolžinami 625 nm, 660 nm in 850 nm in gostoto moči $2,4 \text{ J/cm}^2$, trikrat tedensko, 8 tednov), in v kontrolno skupino, ki je poleg standardnega zdravljenja prejela dodatno obsevanje s svetlobo širokega spektra in nizke intenzitete (valovne dolžine med 580 in 900 nm ter gostoto moči $0,72 \text{ J/cm}^2$, placebo učinek, prav tako trikrat tedensko, 8 tednov). Pri vseh pacientih smo potek celjenja rane ocenjevali po klasifikaciji po Falangi, z oceno stopnje granulacije in epitelizacije rane, s spremljanjem zmanjševanja površine rane s programom Image J in z ocenjevanjem mikrocirkulacije ter s tem neovaskularizacije rane s pomočjo Laser Dopplerja.

Rezultati: Pri pacientih v študijski skupini, ki so prejeli dodatno terapijo z LED, se je v dnu rane hitreje pojavilo granulacijsko tkivo, in sicer tako v skupini pacientov s sladkorno boleznijo kot tudi pri pacientih brez sladkorne bolezni (značilno večji delež pacientov, pri katerih je prišlo do granulacij dna rane – ocena po Falangi A), sladkorni bolniki (LED) vs. sladkorni bolniki (placebo); $p = 0,0005$, ter brez sladkorne bolezni (LED) vs. brez sladkorne bolezni (placebo); $p = 0,0014$. Fototerapija z LED ni pomembno vplivala na hitrost zmanjševanja površine rane ne pri pacientih s sladkorno boleznijo kot tudi ne pri pacientih brez sladkorne bolezni. Mikrocirkulacija se je v obeh skupinah pacientov, ki so prejemale dodatno terapijo z LED, značilno povečala (sladkorni bolniki; $p = 0,033$, brez sladkorne bolezni; $p = 0,040$), medtem ko je pri skupinah, ki sta prejemale placebo terapijo, ostala nespremenjena.

Zaključki: Uporaba LED kot dodatne terapije je pospešila celjenje kronične rane tako pri pacientih s sladkorno boleznijo kot pri pacientih brez nje. V obeh skupinah smo pri pacientih, ki so prejeli terapijo z LED, ugotovili hitrejšo tvorbo granulacij in povečano mikrocirkulacijo na robu rane.

ABSTRACT

Chronic wounds are wounds that do not heal or they do not start healing in 2 months and represent an important health problem. Patients with diabetes are exceptionally prone to chronic wounds. Standard treatment approach with surgical necrectomy, wound dressing and if needed antibiotic therapy often does not bring satisfactory results. Therefore, additional treatment approaches are investigated that would enhance healing of wounds. One of the additional methods is photobiomodulation where irradiation with determined regimes enhances cell metabolism. Light of wavelengths between 650 and 1000 nm is provided from light emitting diodes (LED) or low power lasers (LPLT – low power laser therapy). General effects of light are proved on molecular, cellular, tissue and systemic level. Results from *in vitro* as well as from clinical researches prove effects of photobiomodulation on proliferation of fibroblasts, collagen synthesis, cell viability, stimulation of growth parameters and on immune cells.

Aim of the study: The aim of the study was to verify if photobiomodulation with LED as an adjuvant therapy improves healing of the chronic wounds.

Materials and methods: Prospective, randomized, double blind research included 40 patients with diabetes and 39 without diabetes that were due to chronic wound referred to University Medical Center Ljubljana between October 2012 and June 2014. Patients with diabetes and those without it were randomized into study group that received besides standard treatment protocol also phototherapy with LED (wavelengths 625 nm, 660 nm and 850 nm and power density 2,4 J/cm², three times weekly for 8 weeks) and into control group that besides standard treatment received placebo therapy (light therapy between 580 and 900 nm and power density 0,72 J/cm²). Effects on healing was evaluated with clinical classification of the wound bed according to Falanga scale, measuring wound surface using computer program Image J and evaluation of the microcirculation with Laser Doppler flow.

Results: Wounds of the patients in the study group were according to Falanga scale healing faster in diabetic and in non-diabetic patients (statistically significant ratio of patients achieved granulation in the wound bed – Falanga stage A), diabetics LED vs. diabetics placebo; $p = 0.0005$ and non-diabetics LED vs. non-diabetics placebo; $p = 0.0014$. Therapy with LED did not significantly influence on wound shrinkage in any of the groups. Microcirculation was

significantly improved in both groups receiving LED therapy (diabetics; $p = 0.033$, non-diabetics; $p = 0.040$), while in control groups remained the same.

Conclusions: Phototherapy with LED as an adjuvant therapy significantly improved healing of chronic wounds in diabetic and in non-diabetic patients. In both groups of patients receiving LED treatment there was faster granulation formation and improved microcirculation at the wound edge.

1. UVOD

Rane, posebej tiste, ki se ne celijo, so velik medicinski in socialno-ekonomski problem (1, 2). S staranjem populacije v zadnjih letih strmo narašča njihovo število. Še posebej so h kroničnim ranam nagnjeni bolniki s sladkorno boleznijo, pri katerih je celjenje upočasnjeno zaradi hiperglikemije, slabše prekrvljenosti tkiv in večje nagnjenosti k infektom (3).

1.1 Fiziologija celjenja rane

Celjenje rane razdelimo v štiri obdobja oziroma faze (3–6):

- Nevrogeno (hemostatsko) obdobje – se začne takoj po poškodbi. Hemostaza je dosežena z vazokonstrikcijo in s formacijo krvnih strdkov, ki preprečujejo nadaljnjo krvavitev ter ustvarijo matriks za migracijo celic pri celjenju rane. Trombociti izločajo rastne faktorje in citokine, ki pritegnejo fibroblaste, endotelijske celice in imunske celice, ki sprožijo procese celjenja rane.
- Vnetno (evtolitično, makrofagno, katabolno, acidno) obdobje – se začne po nevrogenem obdobju in traja do 7 dni. Prevladujoče celice v tem obdobju so fagocitne celice, predvsem nevtrofilci in makrofagi. Nevtrofilci sproščajo reaktivne kisikove spojine (*reactive oxygen species* – ROS) in proteaze, ki preprečujejo okužbo rane z bakterijami in rano očistijo celičnega debrisa. Monociti, ki pridejo do rane po krvi, se diferencirajo v makrofage. Makrofagi očistijo rano bakterij in mrtvega tkiva ter tudi sproščajo različne rastne faktorje in citokine, ki pritegnejo fibroblaste, endotelijske celice ter keratinocite, ki obnovijo poškodovane žile.
- Produktivno (proliferativno, fibroblastno, anabolno, alkalno) – se začne, ko vnetna faza začne pojenjati in se pojavi apoptoza imunskih celic. Za to obdobje je značilno pojav granulacijskega tkiva, tvorba novih žil (angiogeneza) in epitelizacija.
- Obdobje maturacije (obdobje preoblikovanja rane) – se začne po zaprtju rane in lahko traja tudi več let. Za to obdobje je značilno, da se prvotni matriks počasi preoblikuje v urejena kolagenska vlakna.

Za uspešno celjenje je torej potrebno dinamično sosledje navedenih procesov, ki privedejo do regeneracije poškodovanega tkiva in funkcije. V primerih, ko je moten en ali več procesov pri celjenju rane, se rana ne zaceli in preide v kronično rano.

1.2 Patofiziologija kronične rane

O kronični rani govorimo, kadar se rana ne začne celiti v 4 tednih ali se ne zaceli v 8 tednih (3, 4, 5–7). Ne glede na etiologijo ran, imajo kronične rane pogoste skupne značilnosti, ki so povišane količine provnetnih citokinov, proteaz, ROS kot tudi perzistirajoče vnetje (3, 8). Pri okrepljeni vnetni reakciji je povišan nivo proteaz, kar ima za posledico tudi razgradnjo ekstracelularnega matriksa kot tudi razgradnjo rastnih faktorjev in njihovih receptorjev. Razgradnja ekstracelularnega matriksa na eni strani preprečuje rani, da napreduje v produktivno fazo, na drugi strani pa tudi privablja vnetne celice, ki še dodatno okrepijo vnetno fazo in onemogočajo fiziološki potek celjenja rane.

ROS, ki so v nizkih koncentracijah koristne, saj predstavljajo obrambo proti mikroorganizmom, v visokih koncentracijah poškodujejo proteine ekstracelularnega matriksa kot tudi celice, kar dodatno stimulira proteaze in vnetne celice (9).

Zaviralni vplivi na celjenje ran so:

- Okužba rane (najpogostejši vzrok upočasnjene celjenja ran).
- Nezadostna oksigenacija tkiv.
- Hipoproteinemija (zmanjšan vnos ali povečano izločanje albuminov).
- Citotoksična sredstva, obsevanje, stres, glukokortikosteroidi, protivnetna zdravila, zmanjšana koncentracija mikroelementov (Zn, Cu, Fe).
- Sistemski vzroki (sladkorna bolezen, malnutricija, popuščanje imunskega sistema ...).

1.3 Standardno zdravljenje kronične rane

Ob pristopu k zdravljenju je potrebno preveriti in če je mogoče ublažiti (v kolikor ni možno popolnoma odstraniti) vse znane zaviralne dejavnike na celjenje rane.

Standardno zdravljenje kronične rane obsega nekrektomijo, redne preveze rane s sodobnimi oblogami in zdravljenje infekta. Osnovni namen ob pristopu k zdravljenju kronične rane je prekiniti fazo vnetja in omogočiti, da se celjenje nadaljuje v naslednjo fiziološko fazo, torej v produktivno oz. proliferativno fazo.

Nekrektomija – osnovni namen nekrektomije je odstranitev mrtvega tkiva in s tem tudi bakterijskega biofilma, ki vzdržuje vnetno fazo v kronični rani (9, 10). Željeni cilj je, da z nekrektomijo kronične rane ponovno zaženemo mehanizme celjenja kot pri akutni rani, z namenom, da bo celjenje uspešno prešlo iz vnetne v produktivno (proliferativno) fazo (3, 6, 11). Nekrektomijo lahko napravimo kirurško (s skalpelom, kireto in podobno), z ultrazvokom (ultrazvočni debridment), z encimi (proteazami) ali z uporabo ličink (bionekrektomija) (11–14). Nekrektomija je glede na današnjo doktrino bistvena komponenta, ki omogoči celjenje rane (3, 6, 15, 16). Seveda pa nekrektomija ne sme biti ne prepogosta niti ne preobsežna, saj bi v tem primeru onemogočala napredovanje celjenja rane.

Oskrba rane s prevezami in z oblogami – rano je potrebno redno prevezovati na od 2 do 3 dni. Ob prevezah se uporabljajo sodobne obloge. Tržišče ponuja veliko različnih sodobnih oblog (obloge s povidon-jodom, kolagenazami, z antibiotiki, alginatne, hidrokoloidne, z medom, s srebrom ...), med katerimi izbiramo glede na vrsto in lastnostmi rane (17–19).

Zdravljenje infekta – je prav tako bistvena komponenta pri zdravljenju kronične rane. Najučinkoviteje je napraviti bris rane za mikrobiološki pregled in po prejetju izvida ciljano zdraviti z antibiotiki, tako sistemsko kot z uporabo ustreznih oblog (17–19).

Celjenje rane spremljamo in ocenjujemo glede na prisotnost izcedka, nekroz, pojava fibrina in granulacij. Klinično dno rane ocenimo po klasifikaciji po Falangi (5) (Tabela 1).

Falanga razred	granulacija	fibrin	nekroza	izcedek
A	100 %	-	-	brez ali minimalen
B	50–100 %	+	-	zmeren
C	< 50 %	+	-	močan
D	brez	+	+	močan

Tabela 1: Klinična ocena dna rane po Falangi.

Pogosto pa opisan terapevtski pristop ne da željenih rezultatov, zato se poslužujemo tudi dodatnih metod za pospeševanje celjenja ran.

Dodatne, podporne oblike zdravljenja

Vse novejša smernice o zdravljenju kroničnih ran vsebujejo navodila za že opisane standardne postopke zdravljenja (3, 15, 20, 21). V kolikor nam standardna oblika zdravljenja ne da željenih rezultatov, lahko zdravljenje dopolnimo z dodatnimi, s podpornimi oblikami zdravljenja. Pri nas pogosto uporabljane dodatne oblike zdravljenja so:

- Terapija z negativnim tlakom (VAC) – je bila uvedena v 90. letih in je pokazala ugodne učinke na zdravljenje tako travmatskih, akutnih in kroničnih ran kot tudi pri presadkih kože, reznih ter kirurških ranah (22–25). Kot dodatno zdravljenje pri kroničnih ranah se je izkazalo, da terapija z negativnim tlakom drenira izločke rane in omogoča boljšo granulacijo tkiva, pospeši krčenje oz. zmanjševanje površine rane ter s tem prej omogoči primarno zacelitev rane ali vsaj sekundarno zašitje rane ali kritje rane s presadkom delne debeline kože (26).
- Hiperbarično zdravljenje s kisikom – je bilo v različnih raziskavah potrjeno kot učinkovito podporno zdravljenje predvsem pri ulkusih pri diabetičnih pacientih in pri venskih ulkusih na nogah (27–31). Vendar pa so izsledki glede na Cochrane in sod. pregled literature pokazali, da je ta učinek sicer res evidenten po 6 tednih zdravljenja, ni pa več prisoten po 1 letu ali kasneje (32).
- Zdravljenje z larvami (biološka nekrektomija) (11–14).
- Fotobiomodulacija s svetlobo emitirajočimi diodami (LED) (1, 2, 33–36).

1.4 Fotobiomodulacija z LLLT (*low level light therapy*)

Vpliv svetlobe na zdravljenje nekaterih bolezni je odkril že Niels Ryberg Finsen, ki je dosegel ugodne učinke, ko je z močnimi kratkovalovnimi žarki uspel pozdraviti lupus vulgaris in je leta 1903 prejel Nobelovo nagrado za fiziologijo ali medicino (37).

Po iznajdbi LASERja (*light amplification by stimulated emission of radiation*) v 60. letih, so raziskovali možno uporabo svetlobnih žarkov. Za visokoenergetske žarke (kot so gama, X ali ultravijolični žarki) so ugotovili, da so ionizirajoči in poškodujejo DNA. Na drugi strani pa visokoenergetski žarki vidne in infrardeče svetlobe niso ionizirajoči in so koristni za aplikacijo pri kirurgiji. Ponovno je zanimanje za uporabo svetlobe pri zdravljenju obudil Mester, ko je leta 1968 ugotovil, da ima uporaba laserja v nizkih dozah stimulativen učinek na celjenje ran in tudi na rast dlak pri miših (38). Od takrat so številni znanstveniki v svojih raziskavah poskusili opredeliti vpliv obsevanja z laserjem v nizkih dozah (*low level laser therapy* – LLLT, kratica kasneje uporabljana tudi za *low level light therapy*) (39). Peplow je v svojih preglednih člankih povzel večino pomembnih in dobro zasnovanih raziskav o vplivu LLLT na celične kulture, tako živalskih kot humanih celic (39–41).

Raziskave na celičnih kulturah

Dosedanje ugotovitve glede nekaterih vrst celic, ki sodelujejo pri celjenju ran, so (39–47):

- *Endotelijske celice* – endotelijske celice humane umbilikalne vene hitreje proliferirajo ob LLLT (670 nm, gostota energije 2,4–8 J/cm², gostota moči 20–65 mW/cm²). Endotelijske celice iz aorte miši so prav tako hitreje proliferirale ob uporabi katerekoli valovne dolžine med 625 in 675 nm ter gostoti energije 10 J/cm². Podobno so ugotovili pri endotelijskih celicah aorte goveda (42, 43).
- *Endotelijske celice v stresu* – endotelijske celice humane umbilikalne vene, gojene v prehrambeno pomanjkljivem mediju, so hitreje proliferirale že ob bistveno nižji energijski gostoti LLLT (632,5 nm; 0,26 J/cm²). Enako so ugotovili za endotelijske celice aorte goveda v gojiščih z nizko vsebnostjo glukoze – hitrejšo proliferacijo ob LLLT (632,5 nm; 0,54 in 1,08 J/cm²) (42, 43).

- *Celice gladkih mišic v stresu* – celice iz aorte prašičev, kultivirane v prehrabeno pomanjkljivem mediju so hitreje proliferirale ob LLLT (780 nm; 2 J/cm²) (44).
- *Fibroblasti* – humani fibroblasti iz kože so hitreje proliferirali ob LLLT (632,5 nm; gostota energije od 8 do 16 J/cm²), ob večji gostoti energije je bila proliferacija še hitrejša (45). Podobno so fibroblasti iz humanega periodoncija hitreje proliferirali ob LLLT (809 nm; gostota energije 1,96 J/cm² in 3,92 J/cm² ter 7,84 J/cm²) (46). Živalski fibroblasti so v številnih raziskavah pokazali hitrejšo proliferacijo ob uporabi različnih parametrov LLLT (47).
- *Fibroblasti v stresu* – fibroblasti v prehrabeno pomanjkljivem mediju so tako kot endotelijske celice hitreje proliferirali ob LLLT, in sicer ob uporabi nižje gostote energije kot je bila potrebna pri fibroblastih v prehrabeno optimalnem mediju. Npr. na humane fibroblaste iz gingive je ugodno vplivala že LLLT s 660 nm; 2 J/cm² in gostoti moči 143 mW/cm², višje gostote moči so imele manj stimulativen učinek. V drugi raziskavi se je povečana proliferacija humanih fibroblastov pokazala tri dni po LLLT z 2940 nm; gostota energije 1,68, 2,35 in 3,37 J/cm². Fibroblasti iz sinovije zajca v prehrabeno pomanjkljivem mediju so hitreje proliferirali ob LLLT (660 nm; 4,8 in 7,2 J/cm²), medtem ko uporaba nižje gostote energije (1,2 J/cm²) ni imela nobenega učinka. Fibroblasti iz zarodkov miši so v prehrabeno pomanjkljivem mediju hitreje proliferirali ob LLLT (904 nm; 3 ali 4 J/cm²), vendar ob višji gostoti energije (5 J/cm²) tega učinka ni bilo več opaziti (45–47).

Primerjava rezultatov med raziskavami je otežkočena zaradi različnih parametrov LLLT, ki so jih raziskovalci uporabljali (39–47). Obsevanje z laserjem je opredeljeno s številnimi fizikalnimi parametri. Običajno avtorji opišejo uporabljene valovne dolžine, površino obsevane površine, moč, gostoto moči, energijo in gostoto energije ter čas obsevanja. Pomembno je tudi, kolikokrat so obsevali in v kakšnem časovnem razmiku ter čas opazovanja do vrednotenja rezultatov, kar pa v raziskovalnih člankih ni vedno dovolj natančno navedeno.

Raziskave na živalih

Naslednja stopnja v raziskovalnju vpliva LLLT na celjenje ran so bile raziskave na živalih, ki so v veliki večini potrdile ugoden vpliv LLLT na celjenje ran (40, 48–58). Največ raziskav je bilo na miših in podganah, saj so to lahko dostopne in najpogostejše uporabljane laboratorijske

živali, čeprav se zgradba njihove kože precej razlikuje od človeške. Predvsem koža miši in podgan ni adherentna na spodaj ležeče strukture in je dosti bolj elastična od človeške (49). Opisane lastnosti omogočajo hitrejšo krčenje rane, kar je običajno bistveno hitrejši proces od epitelizacije in pomembno skrajša čas celjenja rane. Glede podobnosti s človeško kožo so raziskave na prašičih bolj primerljive, vendar tudi bistveno redkejša zaradi višjih stroškov in težjega rokovanja z živalmi. Raziskave na živalskih modelih omogočajo testiranje vpliva LLLT z različnimi parametri na različne vrste ran. Ob pregledu raziskav iz literature, ugotovimo, da raziskave vztrajno potrjujejo stimulativen vpliv LLLT na celjenje ran, vendar pa so pomembne razlike tako med izbranimi testnimi živalmi kot tudi učinkovitimi parametri LLLT (40, 59, 60). Glede na to, da so razlike v najučinkovitejših parametrih LLLT med linijami laboratorijskih miši in podgan, je razumljivo, da ugotovitev o uporabljenih parametrih LLLT ne moremo prenesti v uporabo pri ljudeh. Zato je nujno, da se izvedejo kontrolirane raziskave na ljudeh, ki bodo preverile učinkovitost LLLT in najučinkovitejših parametrov pri zdravljenju ran pri ljudeh (40).

Klinične raziskave na ljudeh

Raziskave na ljudeh so relativno redke, predvsem pa je težko izvesti randomizirane raziskave primerljivih ran. Metodološko najboljšo raziskavo je leta 2004 objavil Hopkins, ki je dvaindvajsetim mladim zdravim moškim napravil vsakemu po dve enaki abrazijski rani, segajoči v dermis na notranji strani podlahti (61). Preiskovance je randomiziral v dve skupini in vsakemu eno od ran obseval; v študijski skupini z LLLT (820 nm, 8 J/cm²), v kontrolni skupini pa z neučinkovito napravo (placebo učinek). Rane je spremljal in fotografiral vsak drugi dan in ocenjeval površino rane. Ugotovil je, da so se obsevane rane pri osebah, obsevanih z LLLT, celile pomembno hitreje, saj je bilo zmanjševanje površine rane na 6. dan v skupini LLLT za 153 % večje kot v kontrolni skupini, na dan 8 je bila razlika 55 % ter na dan 10 22 %. Druga ugotovitev je bila, da so se tudi neobsevane rane pri osebah, ki so imele drugo rano obsevano z LLLT, celile hitreje kot pri kontrolni skupini. Ugotovitev lahko razložimo s sistemskimi učinki LLLT, ki bodo opisani kasneje (str. 30).

Klinične raziskave pri ljudeh v literaturi zasledimo v povprečju eno na leto (Tabele 2, 3 in 4). Večinoma obravnavajo paciente s trdovratnimi kroničnimi ranami in opaziti je, da je učinkovitost LLLT predvsem odvisna od vrste kronične rane. V večini raziskav, ki so

obravnnavale vlogo LLLT pri zdravljenju venskih ulkusov, so ugotovili, da LLLT nima pričakovanega učinka na celjenje ulkusa (62–66). Podobno neučinkovito se je izkazala LLLT pri zdravljenju preležanin in pri ulkusih pri gobavosti (67–69). Drugačni pa so zaključki pri zdravljenju diabetičnih ulkusov, saj je večina raziskav potrdila, da LLLT pomembno skrajša čas celjenja ulkusov (70–76). Učinkovitost so potrdili tudi pri zdravljenju kroničnih postoperativnih ran (77).

Avtorji (leto)	Število preiskovancev	Parametri LLLT	Režim obsevanja	Zaključki
Santoianini s sod., (1984) (78)	16 pacientov (1 J/cm^2) 17 pacientov (4 J/cm^2) 28 pacientov kontrolna skupina	HeNe laser (632 nm)	6 dni v tednu, vsaj 1 mesec.	Ni statistično značilne razlike med skupinami
Bihari s sod. (1989) (79)	15 pacientov HeNe laser 15 pacientov HeNe laser + IR 15 pacientov placebo 4 pacienti s ponavljajočimi ulkusi HeNe + IR	HeNe laser (632 nm) (4 J/cm^2) ± pulzna dioda (904 nm – 4 J/cm^2)	1-krat na teden.	Kombinacija HeNe + IR je bila značilno bolj učinkovita pri celjenju venskih ulkusov kot samo HeNe laser. Obe vrsti obsevanja sta značilno pospešili celjenje ulkusov v primerjavi s placebo terapijo.
Malm s sod. (1991) (63)	21 pacientov obsevanje z laserjem 21 pacientov placebo terapija	GaAs (904 nm) ($1,96 \text{ J/cm}^2$)	2-krat na teden po 10 minut, 3 mesece oziroma do zacelitve.	Ni statistično značilne razlike v celjenju med skupinama.
Ludenberg s sod. (1991) (64)	23 pacientov HeNe laser 23 pacientov placebo	HeNe laser (632 nm) (4 J/cm^2)	2-krat na teden, 12 tednov oz. do zacelitve.	Ni statistično značilne razlike v celjenju med skupinama.
Gupta s sod. (1998) (65)	9 pacientov: 6 ulkusov obsevanih z laserjem (red in IR) 6 ulkusov placebo terapija	Red (660 nm) in IR (880 nm) (4 J/cm^2)	3-krat na teden, 10 tednov.	Značilno hitrejše celjenje pri obsevanih ulkusi.
Lucas s sod. (2000) (68)	8 pacientov obsevanih z GaAl laserjem 8 pacientov (kontrola)	GaAl (904 nm) (1 J/cm^2)	5-krat na teden, 6 tednov.	Ni statistično značilne razlike v celjenju med skupinama.
Franek s sod. (2002) (80)	21 pacientov z laserjem 22 GaAlAs 22 pacientov placebo 22 pacientov (kontrola)	GaAlAs (810 nm) (4 J/cm^2)	5-krat na teden, 4 in pol tedne.	Ni statistično značilne razlike v celjenju med skupinama.
Lagan s sod. (2002) (81)	8 pacientov z laserjem 7 pacientov placebo	Širokospektralni diodni laser (660-950 nm) (12 J/cm^2)	1-krat na teden, 4 tedne.	Ni statistično značilne razlike v celjenju med skupinama.
Kopera s sod. (2005) (66)	17 pacientov z Red laserjem 17 pacientov placebo 10 pacientov (kontrola)	Red laser (685 nm) (4 J/cm^2)	Vsakodnevno 2 tedna, nato vsak drugi dan še 2 tedna.	Ni statistično značilne razlike v celjenju med skupinama.

Tabela 2: Pregled kliničnih raziskav vpliva LLLT na celjenje venske razjede na goleni.

Avtorji (leto)	Število preiskovancev	Vrsta rane	Parametri LLLT in režim obsevanja	Zaključki
Iusim s sod. (1992) (77)	7 pacientov laser (Red) 7 pacientov laser (IR) 7 pacientov placebo	Postoperativne rane – počasno celjenje.	Red (660 nm), IR (880 nm), Gostota energije ni navedena. 7 minut neprekinjenega in 7 minut pulznega obsevanja dnevno, različno število obsevanj (7–50).	Kaže se trend za hitrejše celjenje pri obeh študijskih skupinah, skupina, obsevana z laserjem (Red), je pokazala statistično hitrejše celjenje od kontrolne skupine.
Nussbaum s sod. (1994) (82)	6 pacientov z Diodnim laserjem in s superluminoznimi diodami 5 pacientov z ultrazvokom in UVC terapijo 9 pacientov (kontrola)	Preležanine	Diode (820 nm) (4 J/cm ²); superluminozne diode (660, 880, 950 nm) Laser 5-krat na teden, trajanje ni navedeno.	Ultrazvok in UVC terapija je skrajšala celjenje v primerjavi z diodnim laserjem in s kontrolno skupino.
Schindl s sod. (1999) (83)	8 pac. z diabetesom 5 pac. z arterijsko insuficienco 4 pac. z rano po obsevanju 3 pac. z avtoimunim vaskulitisom	Primerjava med različnimi vrstami rane.	HeNe laser (632,8 nm, 30 J/cm ²) 3-krat na teden do zacelitve rane.	Razjede po radioterapiji so se celile značilno hitreje od ostalih ran.
Lucas s sod. (2003) (67)	39 pacientov z laserjem GaAs 47 pacientov (kontrola)	Preležanine (stadij III)	GaAs (904 nm) (1 J/cm ²) 5-krat na teden, 6 tednov.	Ni statistično značilne razlike v celjenju med skupinama.
Baretto s sod. (2010) (69)	13 pacientov (17 razjed) laser skupina in 12 pacientov (14 razjed) kontrolna skupina	Razjeda pri gobavosti (<i>Mycobacterium leprae</i>)	InGaAlP laser (660 nm) (2–4 J/cm ²) 3-krat na teden, 12 tednov.	Ni statistično značilne razlike v celjenju med skupinama.

Tabela 3: Pregled kliničnih raziskav vpliva LLLT na celjenje različnih vrst kroničnih ran

Avtorji (leto)	Število preiskovancev	Parametri LLLT	Režim obsevanja	Zaključki
Schindl s sod. (1998) (70)	15 pacientov laser 15 pacientov placebo	HeNe laser (632,8 nm, 30 J/cm ²)	Enkratno obsevanje 50 minut.	Izmerili povišano temperaturo in sklepali, da je povečana mikrocirkulacija.
Saltmarche s sod. (2008) (71)	10 akutnih in 11 kroničnih ran (št. pacientov ni navedeno)	laser (785 nm), 50–80 mW, 1–6 J	Prvi teden 5-krat na teden, nato 3-krat na teden še 8 tednov.	Akutne in kronične rane so se enako hitro celile ob terapiji, v 43 % je prišlo do popolne zacelitve, v 62 % do bistvenega zmanjšanja površine rane. Zaznali niso nobenih stranskih učinkov.
Zhou s sod. (2008) (76)	32 pacientov laser 28 pacientov kontrole	HeNe laser (632,8 nm)	Vsakodnevno do zacelitve.	Razjede, obsevane z laserjem, so se statistično značilno hitreje zacelile. V biopsijskih vzorcih so dokazali značilno večjo ekspresijo HSF1 in HSP70 proteinov kot tudi RNA obeh proteinov.
Minatel s sod. (2009) (72)	23 razjed pri 14 pacientih, razjede razdeljene v dve skupini (10 + 13)	Laser 660 nm in 890 nm, 3 J/cm ²	2-krat na teden do zacelitve oz. največ 90 dni.	V obsevani skupini je bilo statistično značilno hitrejše celjenje in v 58 % popolna zacelitev, v kontrolni pa le v 10 %.
Kaviani s sod. (2011) (73)	13 pacientov LLLT 10 pacientov placebo	Laser (685 nm), 10 J/cm ²	2 tedna po 2-krat na teden, nato vsak drugi dan do zacelitve.	Statistično značilno hitrejše zmanjševanje površine rane. Čas do zacelitve v študijski skupini je bil 11 tednov, v kontrolni pa 14 tednov (statistično neznačilno).
Landau s sod. (2011) (75)	10 pacientov z 19 razjedami (vidna svetloba) 6 pacientov s 6 razjedami (placebo)	Širok spekter vidne svetlobe (400–800 nm), 43,2 J/cm ² , 4 minute	2-krat na dan, 12 tednov.	Značilno hitrejše celjenje v študijski skupini (zacelitev 90 % vs. 33 %, čas do zacelitve v študijski skupini 7,14 tednov vs. 11,5 tednov).
Kajagar s sod. (2012) (74)	34 pacientov LLLT skupina 34 pacientov kontrolna skupina	LLLT (laser), valovne dolžine niso navedene, 60 mW, 5kHz, 2–4 J/cm ²	1-krat na dan, 15 dni.	Statistično značilno zmanjšanje površine razjede v LLLT skupini.

Tabela 4: Pregled kliničnih raziskav vpliva LLLT na celjenje diabetičnih razjed na nogi

1.5 Fotobiomodulacija in izvori svetlobe

Obdobje raziskovanja vpliva LLLT (ki je sprva pomenila »*low level laser therapy*«) se je začelo z naključno ugotovitvijo Mesterja in sodelavcev o ugodnem vplivu LLLT na rast dlak ter celjenje ran pri miših in vse raziskave, vsaj do leta 2000, so kot izvor svetlobe uporabljale različne vrste laserjev (38-41). Tudi vse raziskave navedene v tabelah 2-4, so bile izvedene z laserjem kot izvorom svetlobe. V tistem obdobju je Ameriška vesoljska agencija NASA razvila vzdržljive svetlobo emitirajoče diode (*Light Emitting Diodes* – LED) z namenom omogočanja rasti rastlinam med dolgimi vesoljskimi poleti (57). Naključno so ugotovili, da se astronautom med poleti rane, ki so obsevane z LED, hitreje celijo, kar je bilo kasneje potrjeno tudi pri celjenju ran na Zemlji. Sledile so raziskave, ki so potrdile enak učinek LED tako na celične kulture kot tudi pri živalih in nekaj redkih raziskav pri ljudeh, kot so že bile opisane za laser LLLT (84, 85). Chaves s sod. je leta 2014 primerjala laser in LED ter ugotovila, da imata podobno biološko učinkovitost, kljub nekaterim razlikam v fizikalnih lastnostih (2). Svetloba iz laserja je koherentna, medtem ko svetloba iz LED ni. Vendar pa je po mnenju Karu koherenca lastnost, ki se izgubi ob stiku s tkivom, tako da nima pomena v biološki učinkovitosti (86). Vendar vsi ne soglašajo s to trditvijo in so mnjenja, da se koherenca ne izgubi ob stiku s tkivom in da nekoherentna svetloba ni tako učinkovita kot koherentna (87, 88). Glede na nesoglasja je pomembno, da se v raziskavah jasno navede, ali je uporabljena svetloba koherentna ali ne.

Po potrditvi primerljivosti učinkovitosti svetlobe iz laserja in iz LED, se je kratica LLLT začela uporabljati kot »*low level light therapy*« in vključuje obsevanje tako z laserjem kot z LED (89). LED ima celo nekatere prednosti v primerjavi z laserjem, saj omogoča bistveno večjo površino obsevanja kot pri laserju, kjer je površina preseka laserskega žarka majhna, kar otežkoča obsevanje ran z večjo površino (2). Poleg tega imajo laserji svojo točno določeno valovno dolžino fotonov, medtem ko se LED diode lahko kombinirajo in nudijo možnost hkratnega obsevanja z različnimi valovnimi dolžinami.

1.6 Mehanizem delovanja fotobiomodulacije

Mehanizem delovanja ni v celoti razjasnjen. V tem poglavju je opisana trenutno veljavna hipoteza, ki jo potrjujejo izsledki številnih raziskav.

Svetloba v procesu fotobiomodulacije doseže svoje učinke v celicah in tkivu preko fotonov, ki reagirajo s celičnimi fotoakceptorji oziroma kromoforami. Fotoakceptorji so deli molekul, ki absorbirajo svetlobo. Fotoakceptorji imajo dve možni stanji, oksidirano in reducirano, glede na naboj metalnih kompleksov. Svetloba, ki jo uporabljamo za celjenje ran, ni ionizirajoča, saj so valovne dolžine večje od 600 nm, kar pomeni, da je energija fotonov prenizka za izbitje elektrona (86, 89–96).

Najmočnejši fotoakceptor za rdečo in NIR (*near infra red*) (valovne dolžine med 600 in 1100 nm) svetlobo v celicah sesalcev je po sedanji teoriji Citokrom c oksidaza (Cco) oziroma njena metalna kompleksa Fe in Cu.

Energija, ki jo ima foton, mora ustrezati energiji, ki je potrebna, da fotoakceptor spremeni svoje redoks stanje in preko njegove aktivacije doseže biološki učinek. Fotoni ob LLLT torej dodajajo energijo kromofori (npr. Cco) in pospešijo (katalizirajo) njihove procese (pri Cco pospešijo transport elektronov preko notranje membrane mitohondrija).

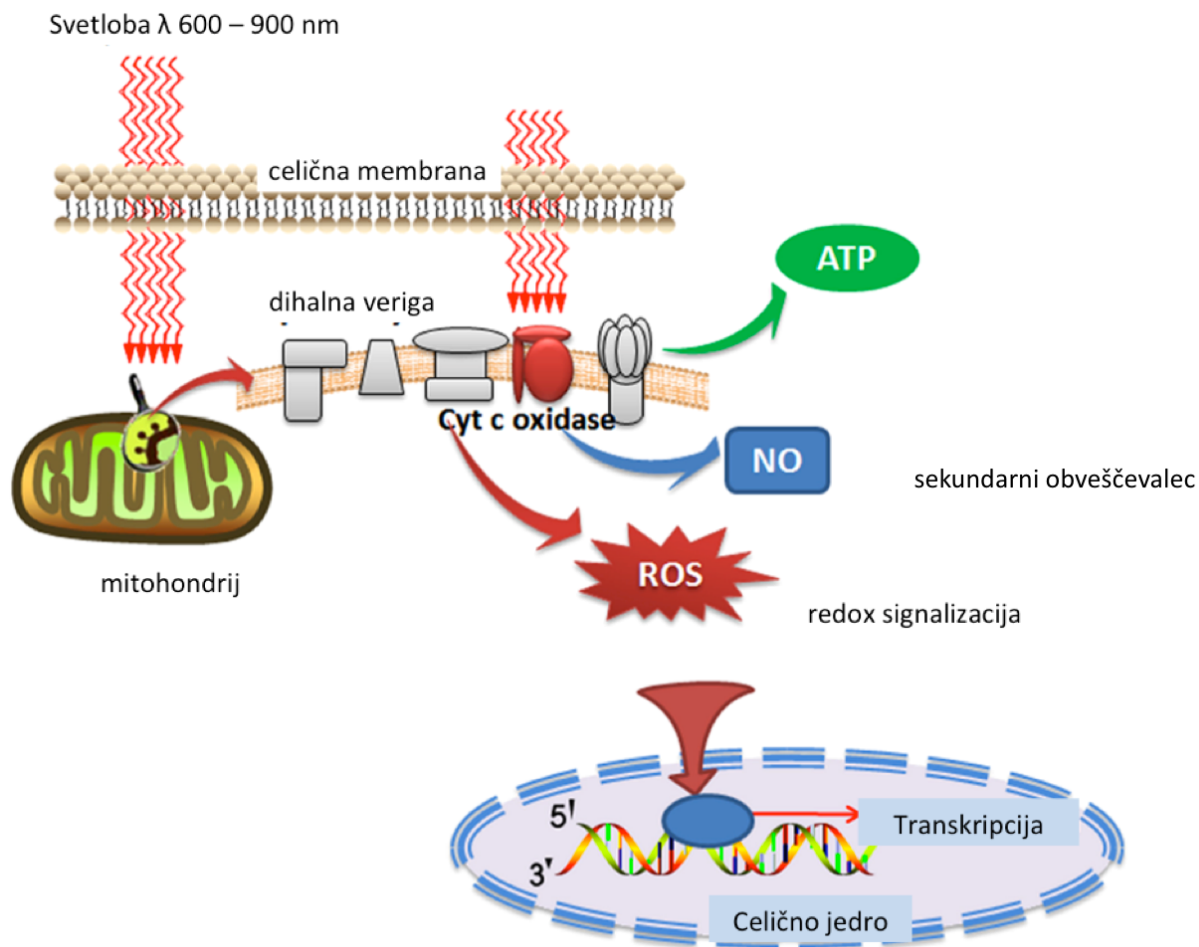
LLLT preko vpliva na Cco poveča mitohondrijski membranski potencial, stimulira procese dihalne verige in pospeši sintezo ATP v mitohondrijih. Opisano je tudi, da se zaradi absorbirane energije kromofore segrejejo (82, 90, 92, 94, 96, 97). Kakšne biološke učinke izzove takšno segrevanje še ni jasno.

Mitohondriji so tudi pomemben vir prostih kisikovih radikalov (ROS). Mitohondrijski ROS so majhne molekule, ki lahko reagirajo s proteini, z nukleinskimi kislinami in nenasičenimi maščobnimi kislinami. Delujejo lahko tudi kot signalne molekule od mitohondrija do celičnega jedra in sprožijo transkripcijo DNA (91, 98).

Raziskave so tudi pokazale, da se v celicah, obsevanih z LLLT, poveča NO, predvidoma zaradi disociacije s celičnih kromofor, kot so hemoglobin, mioglobin in tudi Cca. Druga mehanizma, ki omogočata porast NO, sta aktivacija nitritne reduktaze Citokroma c oksidaze in aktivacija

isoforme encima NO sintaze. Tudi NO deluje kot signalna molekula, ki vpliva na celične procese (99–101).

Pomembno pri delovanju LED je, da oddajajo intermitentno svetlobo – fazi svetlobe sledi faza teme, ki se zelo hitro izmenjujeta. Faza teme je enako pomembna kot faza svetlobe, saj kromofori omogoči, da se vrne v reducirano stanje (prevzame elektron oziroma veže spojino) (86, 90).

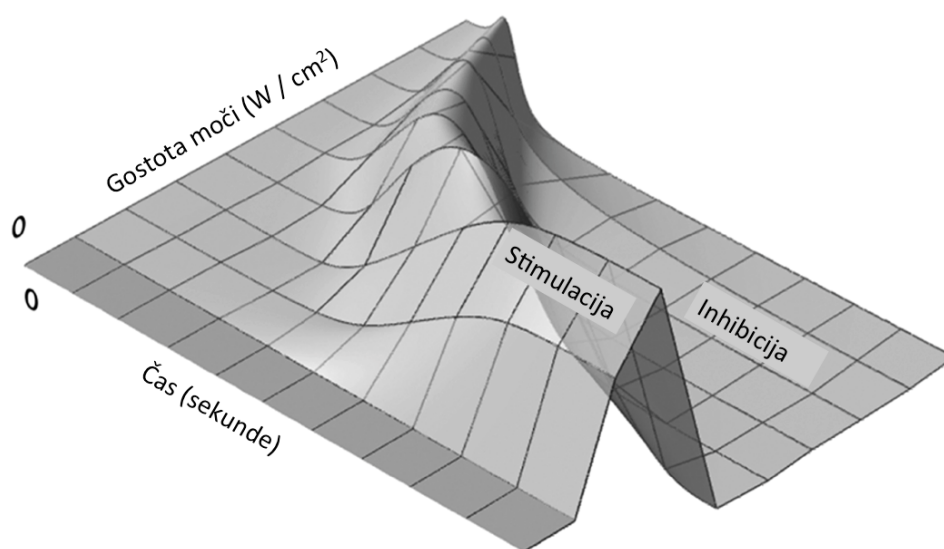


Slika 1: Prikaz učinkov svetlobe na celičnem nivoju (Vir: Huang, 2011 (89)).

Dvofazni odgovor celic na LLLT

Stimulacija celičnih procesov s svetlobo pri LLLT mora biti primerno umerjena, saj so raziskave pokazale, da je stimulativen učinek dosežen ob primernem razmerju gostote moči obsevanja in časa izpostavljenosti. Če je gostota moči prevelika ali čas predolg, dosežemo inhibitorni učinek.

Vpliv pomena gostote moči in časa obsevanja je dobro prikazala Lopes s sod., ki je obsevala ljudi z oralnim mukozitisom (102). Vsi so bili obsevani s 660 nm laserjem, prva skupina z gostoto moči 55 mW/cm^2 , 16 sekund, druga pa 155 mW/cm^2 , 6 sekund. Obe skupini sta prejeli gostoto energije $0,9\text{ J/cm}^2$, vendar je bilo pri prvi skupini opaziti bistveno izboljšanje stanja, ocenjevano 7, 11 in 15 dan po obsevanju, medtem ko pri drugi skupini obsevanje ni imelo učinka. Vpliv gostote moči in časa obsevanja je prikazana z Arndt Shulzovim modelom (Slika 2) (89, 103).



Slika 2: Tridimenzionalni model Arndt-Schulzove krivulje, ki prikazuje dvofazni odgovor celic na fotobiomodulacijo. S povečevanjem gostote moči obsevanja ali podaljšanim časom obsevanja stimulativen učinek preide v inhibitornega (povzeto po Huang, 2011 (89)).

Možno razlago za zakonitosti Arndt Shulzove zakonitosti je podal Huan. Hipoteza je, da obstajata dve vrsti ROS, »dobri« in »slabi«. »Dobri« ROS se sprostijo ob blagi stimulaciji s svetlobo (torej nizki gostoti moči), ki stimulira transport elektronov preko notranje

mitohondrijske membrane, poveča mitohondrijski membranski potencial in stimulira produkcijo ATP. Ti »dobri« ROS nato inicirajo celične procese preko aktivacije redoks senzitivnih transkripcijskih faktorjev (kot je nuklearni faktor κ B) (104–108). Nuklearni faktor κ B aktivira ekspresijo genov, ki sodelujejo pri proliferaciji celic. Pri uporabi visoke gostote moči (ali ob predolgem času obsevanja) se tvorba »dobrih« ROS zmanjša skupaj s padcem mitohondrijskega membranskega potenciala in tvorbo ATP. Ob nadaljevanju obsevanja so zaznali drug vrh sproščanja ROS, tako imenovanih »slabih« ROS, ki lahko poškodujejo notranjo mitohondrijsko membrano s padcem membranskega potenciala pod bazalne vrednosti in, kot so pokazale nekatere raziskave, vodi v iniciacijo apoptoze celice (89, 109). Vprašanje je, ali gre za enake ROS in je razlika samo v koncentraciji, ali gre za različne ROS molekule. Hipoteza je namreč, da so »dobri« ROS predvsem superoksidi, medtem ko so »slabi« ROS večinoma hidroksi radikali in peroksinitriti (89).

1.7 Primarni, sekundarni in terciarni učinki LLLT

Klinične raziskave kažejo, da fotobiomodulacija z LLLT izzove tudi sistemske učinke, npr zmanjša občutek bolečine. V zadnjih dveh desetletjih se odvijajo raziskave, ki poskušajo ugotoviti učinke LLLT na molekularni ravni na nivoju celice, medtem ko mehanizem sistemskih učinkov ostaja še na ravni hipoteze (90, 110). Predvidena kaskada reakcij je povzeta na Sliki 3.

Ob obsevanju z LLLT se fotoni absorbirajo v fotoakceptorskih molekulah celice (kromoforah), kar ima za posledico izbitje elektrona, povečano vibracijsko stanje molekule in že opisane molekularne reakcije znotraj celice (111, 112). Učinki na nivoju celice so tako imenovani ***primarni učinki***, kjer je osrednja reakcija aktivacija dihalne verige na notranji membrani mitohondrijev, kar ima verjetno za posledico tudi prehodno ogretje kromofor. Predvideva se, da vsi navedeni učinki na nivoju celice vodijo do merljivega biološkega učinka (111).

Ko se obsevanje zaključi, primarnim učinkom sledijo ***sekundarni učinki*** (ali *temni učinki*). Aktivaciji dihalne verige sledi aktivacija zapletene verige signalnih molekul, kar privede do

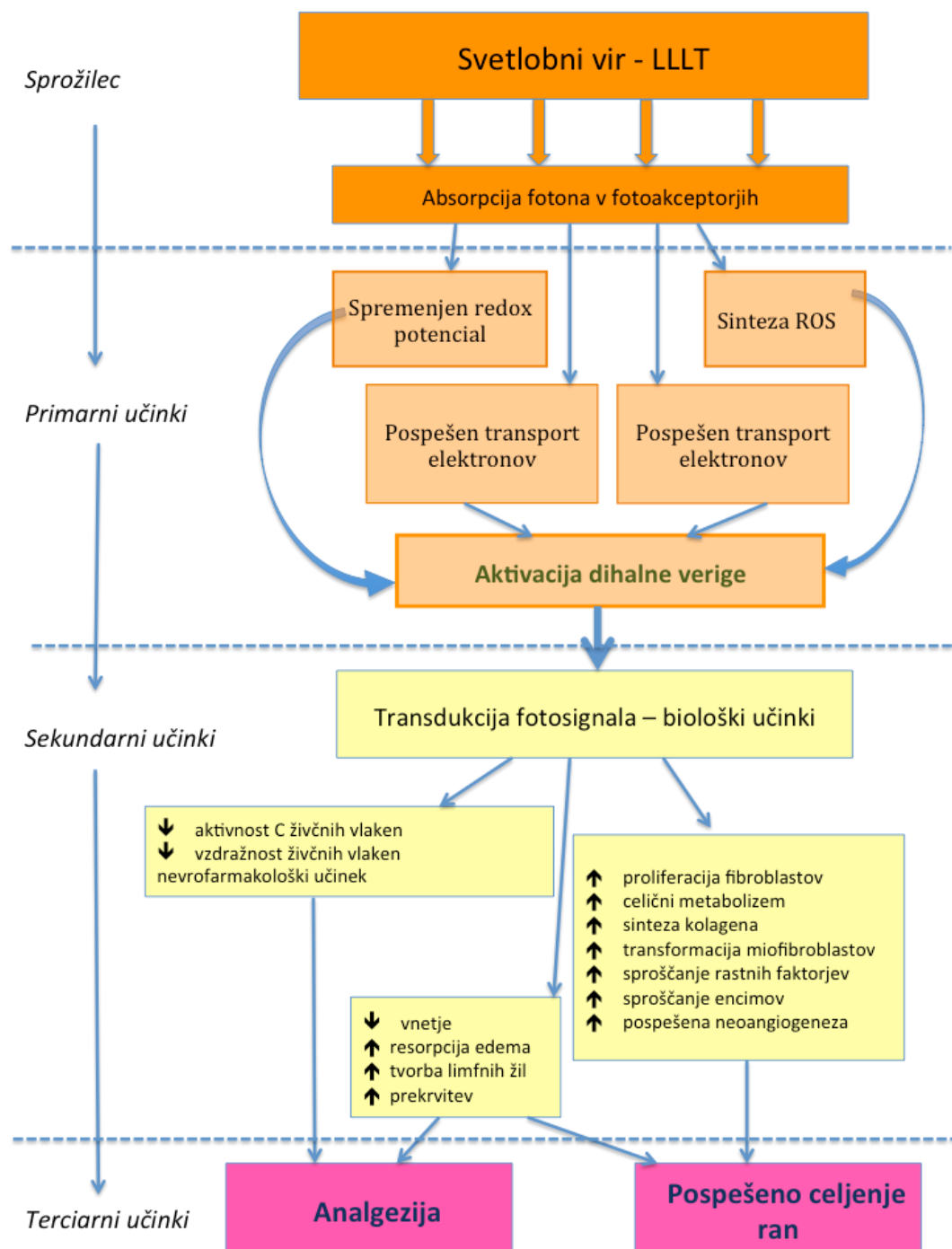
sprememb v celični homeostazi, v koncentraciji ATP in cAMP, modulaciji DNA in RNA sinteze, do sprememb v permeabilnosti celične membrane itd.

Vse opisane spremembe vodijo do **terciarnih učinkov** – fizioloških učinkov, ki stimulirajo celjenje ran, ublažijo bolečino, pospešijo vnetni proces, resorbcijo edema, pospešijo regeneracijo limfnih žil in regeneracijo živčnih vlaken (111, 113).

Fotobiomodulacija pospeši celjenje ran s pospešitvijo proliferacije fibroblastov, pospeši celični metabolizem, pospeši sintezo kolagena in transformacijo fibroblastov v miofibroblaste (96, 112, 114). Raziskave so običajno osredotočene na fibroblaste, vendar so drugi možni mehanizmi tudi povečanje aktivnosti levkocitov, stimulacija neoangiogeneze, povečana produkcija rastnih faktorjev in encimov, stimulacija monocitov in makrofagov, ki sproščajo substance za modulacijo imunskega odgovora pri celjenju rane (115, 116).

Mehanizem vpliva fotobiomodulacije na zmanjšanje bolečine je še manj pojasnjen kot pri celjenju ran. Ugotovili so, da fotobiomodulacija poveča sproščanje številnih molekul, ki zmanjšujejo bolečino, kot so endorfini, NO, serotonin ... (111, 117). V raziskavah so potrdili zmanjšano aktivnost C živčnih vlaken, povečano prekrvitev in zmanjšano vzdražnost živčnega sistema po fotobiomodulaciji (113).

Večina raziskav, ki so poskušale razjasniti mehanizme delovanja fotobiomodulacije, je bila izvedena na celičnih kulturah in vitro. Mehanizmi v telesu so še bolj zapleteni, tako da jih je še težje pojasniti. Prav tako so bile raziskave opravljene z različnimi izvori svetlobe, kar še dodatno oteži pojasnjevanje tako zapletenih mehanizmov delovanja iz različnih ozko usmerjenih raziskav (113–117).



Slika 3: Shema s povzetimi dokazanimi učinki fotobiomodulacije (povzeto po Elke Vinck (111)).

2 NAMEN DELA IN HIPOTEZA

Namen raziskave je ugotoviti, ali fotobiomodulacija z LED kot adjuvantna metoda zdravljenja kronične rane pri diabetikih in nediabetikih značilno pospeši hitrost celjenja rane.

Hipoteza je, da se bodo rane, obsevane z LED, celile hitreje. Pričakovati je:

- hitrejšo zmanjševanje površine rane,
- hitrejšo granulacijo dna rane in zmanjševanje eksudata (ocenjeno po klasifikaciji po Falangi),
- povečano mikrocirkulacijo na robu rane (ocenjeno s pomočjo Laser Dopplerja).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Preiskovanci

V raziskavo smo vključili 80 pacientov s kronično rano pod kolenom (40 pacientov s sladkorno boleznijo in 40 pacientov brez sladkorne bolezni), ki so bili napoteni na zdravljenje v Univerzitetni klinični center Ljubljana v obdobju od 1. oktobra 2012 do 30. junija 2014. Pacientom smo pojasnili namen in potek raziskave ter pridobili njihovo pisno soglasje za sodelovanje. Raziskavo je odobrila Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko (Sklep št: 116/03/11).

Vključitveni kriteriji:

- pacienti s kronično rano na goleni ali stopalu,
- pacienti z nevropatskimi ranami,
- pacienti s kroničnimi postoperativnimi ranami,
- pacienti s kroničnimi ranami po poškodbi,
- pacienti s kronično rano zaradi pritiska.

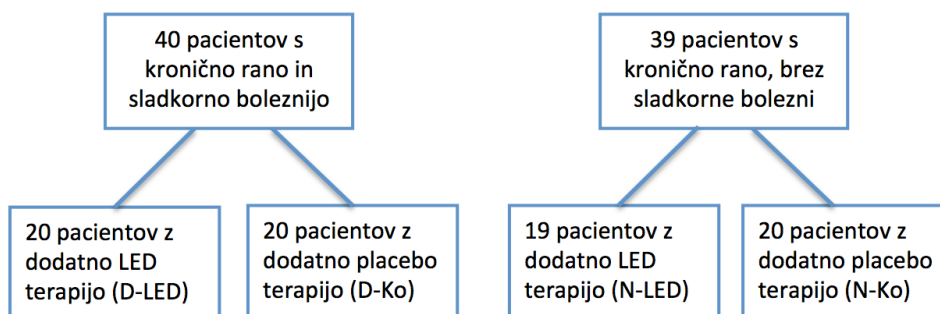
Izključitveni kriteriji:

- pacienti z ranami, ki segajo na več površin goleni ali stopala ali s preveliko rano (večja od 15 x 20 cm) in jih zato ne bo mogoče enakomerno obsevati niti meriti površine rane,
- pacienti z ishemično rano, zaradi periferne žilne okluzijske bolezni,
- pacienti z venskim ulkusom spodnje okončine,
- pacienti s kontraindikacijami za fotobiomodulacijo z LED (malignomi, hipertireoza, epilepsija in nosečnost).

Pacienti so bili razdeljeni v skupino pacientov s sladkorno boleznijo (diabetiki) in v skupino pacientov brez sladkorne bolezni (nediabetiki) (Graf 1). Pacienti v obeh skupinah so bili deležni standardne terapije za zdravljenje kronične rane, ki vključuje nekrektomijo, preveze rane z

ustreznimi oblogami in po potrebi antibiotično terapijo. Obe skupini sta bili nadalje randomizirani v študijsko skupino, kjer so pacientje prejeli poleg standardne terapije še dodatno terapijo z LED (D-LED in N-LED), ter kontrolno skupino, kjer so pacienti poleg standardne terapije prejeli placebo terapijo (D-Ko in N-Ko).

En pacient brez sladkorne bolezni ni dokončal predvidene terapije zaradi osebnih razlogov in je bil izključen iz raziskave, tako da je bila raziskava dokončana na 79 pacientih.



Graf 1: Prikaz razporeditve in naknadne randomizacije pacientov s kronično rano na goleni ali stopalu.

Med skupinami ni bilo razlik v razmerju med spoloma niti v povprečni starosti ali trajanju rane (Tabela 5). Pacienti s sladkorno boleznijo so imeli pričakovano višji indeks telesne mase (ITM) kot pacienti brez sladkorne bolezni.

	Skupina D-LED (n = 20)	Skupina D-Ko (n = 20)	p	Skupina N-LED (n = 19)	Skupina N-Ko (n = 20)	p
Moški/ženske	17/3	14/6	ns ^a	13/6	16/4	ns ^a
Starost (povprečna ± SD)	61.2±8.77	65.5±9.6	ns ^b	63.8±16.3	62.8±11.9	ns ^b
ITM (povprečno ± SD)	30.7±5.5	29.3±4.7	ns ^b	28.2±5.7	26.6±3.7	ns ^b
Trajanje rane v mesecih (povprečno ± SD)	8.1±6.1	9.2±10.7	ns ^b	9.6±16.8	9.4±16.4	ns ^b

Tabela 5: Opis skupin preiskovancev – osnovni podatki.

Legenda: ITM – indeks telesne mase. Statistična analiza: ^a – test hi-kvadrat, ^b – Studentov t-test.

Sladkorni bolniki so imeli pričakovano višje vrednosti glukoze na tešče kot pacienti brez sladkorne bolezni (Tabela 6). Vrednost glukoze na tešče se med skupinama D-LED in D-Ko niti med skupinama N-LED in N-Ko ni razlikovala. Med skupinami ni bilo razlik v deležu pacientov s povišanim C reaktivnim proteinom (CRP).

	Skupina D-LED (n = 20)	Skupina D-Ko (n = 20)	p	Skupina N-LED (n = 19)	Skupina N-Ko (n = 20)	p
Glukoza na tešče (povprečno ± SD)	8.0 ±4.5	8.9±4.1	ns ^b	5.6±0.9	5.6 ±2.1	ns ^b
Povišan CRP (CRP > 5)	13/20	11/20	ns ^a	6/19	9/20	ns ^a
Hemoglobin (povprečno ± SD)	127.1±13.9	126.8±14.9	ns ^b	140.7±16.5	144.3±14.1	ns ^b
Fibrinogen (povprečno ± SD)	4.6±1.0	4.7±1.6	ns ^b	4.0±1.0	4.1±1.1	ns ^b

Tabela 6: Opis skupin preiskovancev – rezultati analize krvi. Legenda: CRP – C reaktivni protein, ^a – test hi-kvadrat, ^b – Studentov t-test

Ob vključitvi v raziskavo smo napravili oceno rane po Falangi, s pomočjo programa Image J ocenili površino rane in z uporabo Laser Dopplerja ocenili mikrocirkulacijo na robu rane. Rane

smo evaluirali na dva tedna z oceno po Falangi, po 8 tednih pa smo ponovno ocenili površino rane s programom Image J in mikrocirkulacijo z uporabo Laser Dopplerja. Pacienti so ob evaluaciji rane po Falangi (na dva tedna) tudi podali oceno o bolečini po VAS (vizualno analogni skali).

3.2 Ocena dna rane po Falangi

Ocena rane po Falangi je klinična ocena dna rane, kjer ocenjujemo prisotnost granulacijskega tkiva, pojav fibrina in izločka rane in določimo razred po Falangi (Tabela 1).

Pred začetkom zdravljenja ni bilo značilnih razlik v oceni dna rane po Falangi med skupinama D-LED in D-Ko, niti med skupinama N-LED in N-Ko (Tabela 7).

	Skupina D-LED (n = 20)	Skupina D-Ko (n = 20)	p	Skupina N-LED (n = 19)	Skupina N-Ko (n = 20)	p
Začetna ocena dna rane po Falangi (število pacientov)	A (0) B (3) C (9) D (8)	A (0) B (7) C (9) D (4)	ns ^a	A (0) B (5) C (8) D (6)	A (0) B (4) C (7) D (9)	ns ^a

Tabela 7: Začetna ocena dna rane po Falangi v posameznih skupinah. ^a – test Mann-Whitney

3.3 Merjenje površine rane

Površino rane smo merili z računalniškim programom Image J (*University of Wisconsin-Madison*). Površino smo izmerili s pomočjo slik, posnetih vsaka 2 tedna.



Slika 4: Primer merjenja površine rane s programom Image J: program omogoča umeritev razdalje in nato izračuna površino ročno označenega omejenega področja.

Rane so se pri preiskovancih med seboj razlikovale v površini, vendar je bila povprečna površina ran preiskovancev med skupinami primerljiva (Tabela 8).

Začetno površino rane smo pri vsakem preiskovancu definirali kot 100 %. Pri vsaki naslednji meritvi smo površino opredelili kot delež začetne površine rane.

	Skupina D-LED (n = 20)	Skupina D-Ko (n = 20)	p	Skupina N-LED (n = 19)	Skupina N-Ko (n = 20)	p
Površina rane v mm ² - mediana (min-max)	393 (89–5386)	479 (132–3514)	ns ^a	310 (112–8998)	569 (107–2325)	ns ^a

Tabela 8: Površina rane v skupinah pred začetkom zdravljenja. ^a – Mann Witney.

3.4 Ocena mikrocirkulacije na robu rane

Mikrocirkulacijo smo ocenjevali pred začetkom terapije in po 8 tednih terapije z uporabo Laser Dopplerja. Obakrat smo merili na istem mestu, na zdravi koži tik ob robu rane. Pretok smo ocenjevali z Laser Doppler (LD) flux senzorji (Angled probe 401, Perimed, Järfälla, Sweden) ob uporabi laserskega izvora svetlobe valovne dolžine 780 nm (PF 4001 in PF 4002 Satellite, Perimed, Järfälla, Sweden).

Ocena mikrocirkulacije z laser Dopplerjem temelji na odboju svetlobe celic v gibanju (krvnih celic) v primerjavi s statičnimi celicami (celice tkiva). Vse meritve je opravila ista raziskovalka, ki ni vedela, kateri skupini pripada preiskovanec.

3.5 Ocena bolečine po VAS (vizualna analogna skala)

Pacienti so ob vsaki prevezi rane ocenili povprečno jakost bolečine v zadnjih dveh tednih s pomočjo vizualne analogne skale (VAS).

	Skupina D-LED (n = 20)	Skupina D-Ko (n = 20)	p	Skupina N-LED (n = 19)	Skupina N-Ko (n = 20)	p
VAS pred začetkom zdravljenja (povprečno ± SD)	1,4 (1,3)	2,3 (2,1)	ns ^a	2,8 (2,1)	3,3 (2,3)	ns ^a
	1,8 (1,5)			3,1 (2,2)		0,020 ^a

Tabela 9: Bolečina, ocenjena po VAS pred začetkom zdravljenja. ^a – Studentov t-test

Pred začetkom zdravljenja med pacienti s sladkorno boleznijo (D-LED vs D-Ko) ni bilo razlik v oceni bolečine po VAS. Prav tako ni bilo razlik v oceni bolečine med pacienti brez sladkorne bolezni (N-LED vs N-Ko) (Tabela 9). Sladkorni bolniki (D-LED in D-Ko) so imeli pred začetkom zdravljenja značilno nižjo oceno bolečine po VAS kot pacienti brez sladkorne bolezni (N-LED in N-Ko).

3.6 Terapija z LED

Izvor svetlobe v naši raziskavi so bile svetlobo emitirajoče diode (LED) in ne laser kot v večini do sedaj objavljenih raziskav. Pacienti, vključeni v študijsko skupino (D-LED in N-LED), so bili obsevani z LED (Ortholumm, Votan Slovenija). Pacienti v kontrolnih skupinah (D-Ko in

N-Ko) so bili obsevani z neaktivno svetlobo, kjer je bila v ohišje naprave Ortholumm vgrajena navadna avtomobilska žarnica, prekrita z rdečim filtrom. Aktivna LED je sestavljena iz treh vrst LED diod z valovnimi dolžinami 625, 660 in 850 nm. Med temi je največ LED z valovno dolžino 660, ki najmočnejše stimulira encim Cco. K skupni energiji sevanja svetlobe prispevajo LED z valovno dolžino 660 nm 71 % energije, LED z valovno dolžino 625 nm 24 % energije in LED z valovno dolžino 850 nm 5 % energije. Valovni dolžini 625 nm in 850 sta bili dodani zaradi bakteriostatskega učinka (114, 117). Kontrolni skupini, ki sta prejemale placebo obsevanje, sta imeli nižjo skupno gostoto energije, ki je bila enakomerno razdeljena med vse valovne dolžine v spektru med 580 in 900 nm. Ob tem je bila v kontrolni skupini najučinkovitejša energija (z valovno dolžino 660 nm, ki stimulira Cco) kar 100-krat nižja od energije v aktivni LED skupini. Svetlobni parametri so podani v Tabeli 10. Pri določanju obsevalnega režima smo upoštevali predhodne ugotovitve kliničnih raziskav o vplivu LLLT na celjenje diabetičnih razjed na nogi (Tabela 4) in zakonitosti Arndt-Schulzove krivulje (Slika 2). Skupno energijo, ki smo jo želeli doseči, smo razdelili na enakomerne tedenske odmerke in nato razdelili na tri odmerke za vsako posamično obsevanje. Vsi pacienti so bili obsevani trikrat tedensko, osem tednov zapored oziroma v primeru hitrega celjenja, do zacelitve.

	LED valovne dolžine (nm) (delež ki ga določena valovna dolžina prispeva k skupni gostoti energije)	Skupna gostota energije (J/cm ²) (za čas enega obsevanja = 5 minut)
Študijski skupini D-LED in N-LED	625 (24 %), 660 (71 %), 850 (5 %)	2.4 J/cm ²
Kontrolni skupini D-Ko and N-Ko	Širok spekter 580–900	0.72 J/cm ²

Tabela 10: Parametri svetlobnega obsevanja v študijski in kontrolni skupini.

Razdalja med izvorom svetlobe (v študijski in v kontrolni skupini) je bila 10 cm (Slika 4).



Slika 5: Izvor LED (Ortholumm) ima sevalno površino cca 88 cm², rane so bile obsevane z razdalje 10 cm, 3-krat tedensko po 5 minut.

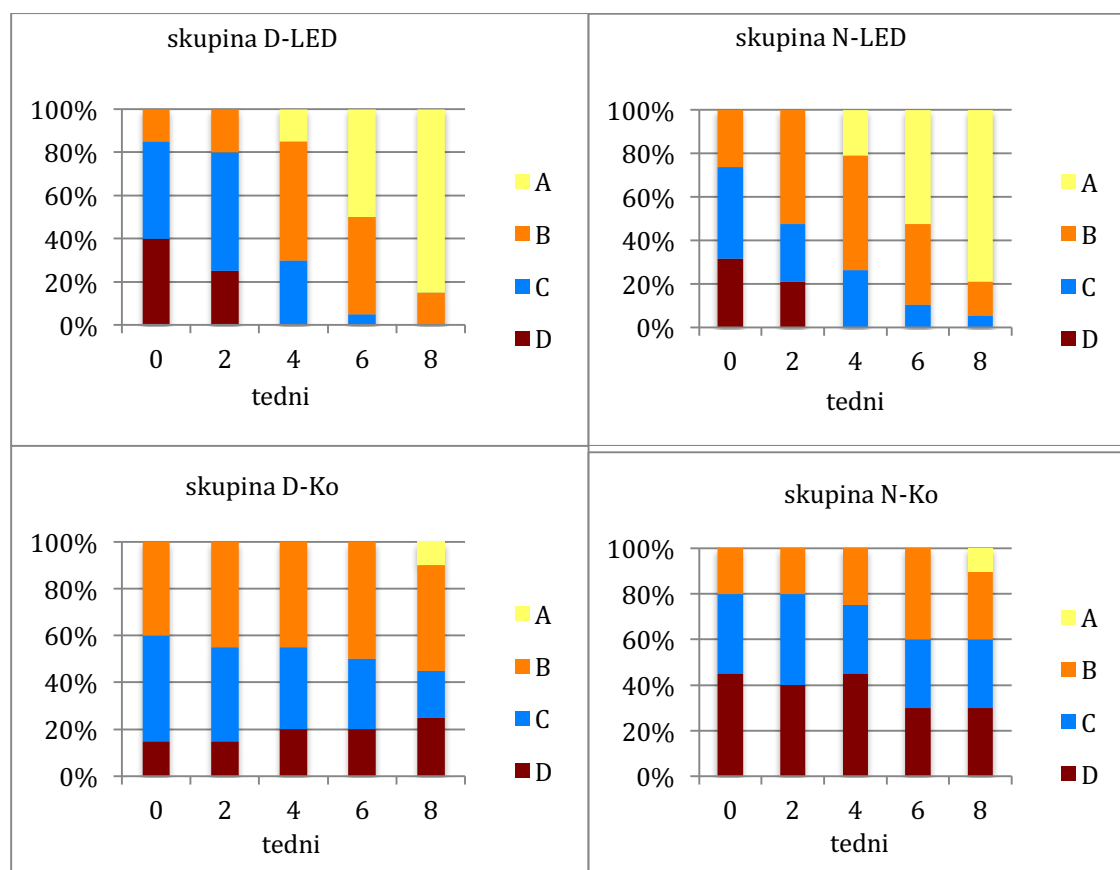
3.7 Statistična analiza podatkov

Podatke smo obdelali na osebnem računalniku s pomočjo programskega paketa IBM SPSS Statistics, v. 19 (IBM Corp, Armonk, NY). Rezultate smo ovrednotili s testom hi-hvadrat, Studentovim t-testom in Mann Whitney testom. Za ponavljajoče meritve smo analizirali varianco ponavljajočih meritev (*Repeated measures ANOVA*). Statistično značilno razliko smo upoštevali v 95 % intervalih zaupanja (95 % CI) pri vrednosti $p < 0,05$.

4 REZULTATI

4.1 Vpliv fotobiomodulacije z LED na oceno dna rane po Falangi

Pred začetkom zdravljenja (teden 0) ni bilo značilnih razlik v oceni dna rane po Falangi med skupinama D-LED in D-Ko, niti med skupinama N-LED in N-Ko. Po 8 tednih zdravljenja je bilo v obeh skupinah, obsevanih z LED, značilno več pojava granulacij na dnu rane (Falanga A) (D-LED vs. D-Ko, $p = 0.0005$; N-LED vs. N-Ko, $p = 0.0014$).



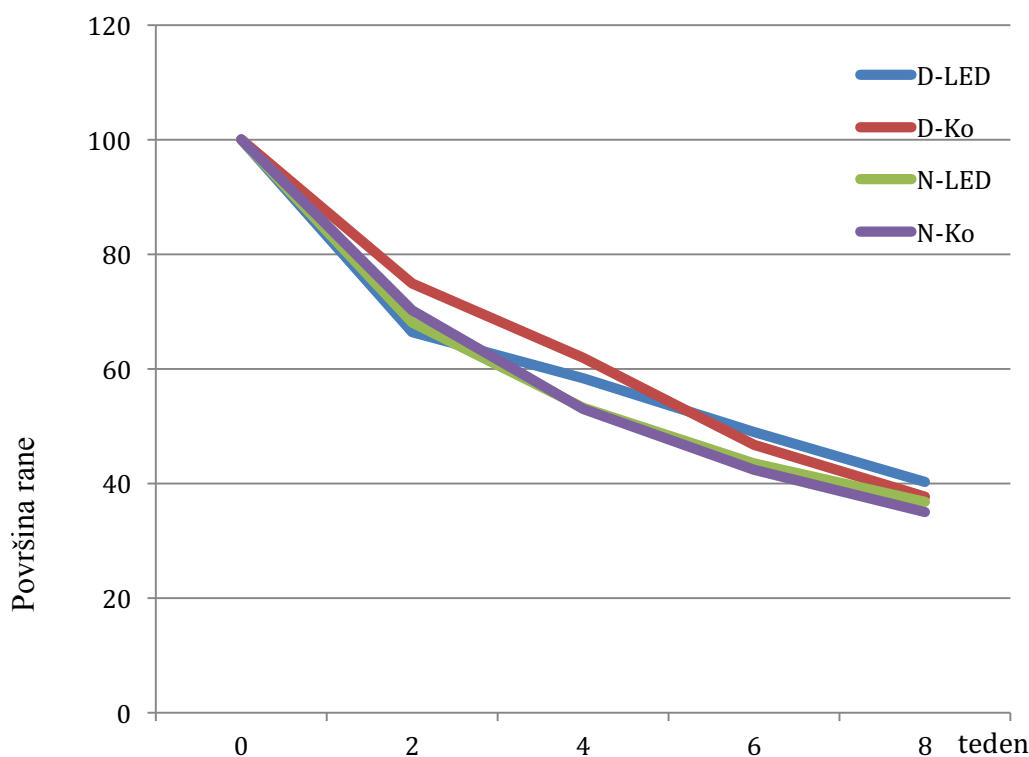
Graf 2: Graf predstavlja oceno dna rane po Falangi, ocenjeno vsaka dva tedna v vseh skupinah. Hi-kvadrat: D-LED vs. D-Ko, $p = 0.0005$; N-LED vs. N-Ko, $p = 0.0014$

Ocena dna rane po Falangi se statistično značilno hitreje izboljšuje v preiskovanih skupinah, tako v skupini D-LED kot tudi pri N-LED; $F(4,73) = 81,8$; $p < 0,001$. Ugoden učinek terapije

z LED je pri sladkornih bolnikih (D-LED) še bolj izrazit kot pri bolnikih brez sladkorne bolezni (N-LED); $F(4,73) = 3,68$; $p = 0,009$.

4.2 Vpliv fotobiomodulacije z LED na površino rane

V začetku raziskave je bila velikost vsake rane opredeljena kot 100 %. Graf kaže zmanjševanje površine rane v razmerju do začetne velikosti rane. Rezultati so pokazali, da fotobiomodulacija z LED ni pomembno vplivala na velikost površine rane. Površina rane se je enakomerno zmanjševala v vseh preiskovanih skupinah. Prav tako se za nobenega od analiziranih parametrov (starost, ITM, prisotnost sladkorne bolezni, vključenost v preiskovano/kontrolno skupino) ni pokazalo, da bi pomembno vplival na hitrost zmanjševanja rane (Tabela 11).



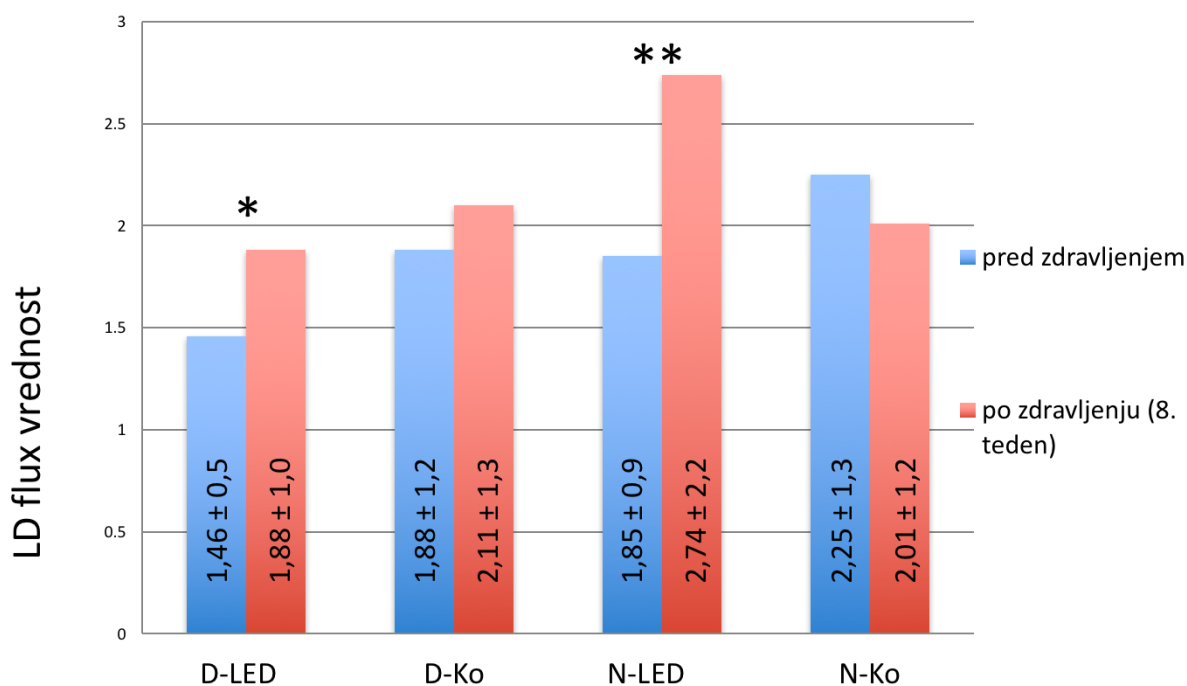
Graf 3: Povprečna površina ran v posamezni skupini, prikazana kot delež od začetne površine rane pred začetkom zdravljenja in na vsaka dva tedna. Med skupinami ob koncu zdravljenja ni bilo razlik v deležu zmanjšanja površine rane.

Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
POVRŠINA RANE	Pillai's Trace	0,031	,556 ^b	4	70	0,695
	Wilks' Lambda	0,969	,556 ^b	4	70	0,695
	Hotelling's Trace	0,032	,556 ^b	4	70	0,695
	Roy's Largest Root	0,032	,556 ^b	4	70	0,695
POVRŠINA RANE x starost	Pillai's Trace	0,048	,881 ^b	4	70	0,48
	Wilks' Lambda	0,952	,881 ^b	4	70	0,48
	Hotelling's Trace	0,05	,881 ^b	4	70	0,48
	Roy's Largest Root	0,05	,881 ^b	4	70	0,48
POVRŠINA RANE x ITM	Pillai's Trace	0,042	,764 ^b	4	70	0,552
	Wilks' Lambda	0,958	,764 ^b	4	70	0,552
	Hotelling's Trace	0,044	,764 ^b	4	70	0,552
	Roy's Largest Root	0,044	,764 ^b	4	70	0,552
POVRŠINA RANE x sladkorna bolezen	Pillai's Trace	0,082	1,571 ^b	4	70	0,192
	Wilks' Lambda	0,918	1,571 ^b	4	70	0,192
	Hotelling's Trace	0,09	1,571 ^b	4	70	0,192
	Roy's Largest Root	0,09	1,571 ^b	4	70	0,192
POVRŠINA RANE x slupina	Pillai's Trace	0,035	,642 ^b	4	70	0,634
	Wilks' Lambda	0,965	,642 ^b	4	70	0,634
	Hotelling's Trace	0,037	,642 ^b	4	70	0,634
	Roy's Largest Root	0,037	,642 ^b	4	70	0,634
POVRŠINA RANE x bolezen x skupina	Pillai's Trace	0,014	,244 ^b	4	70	0,912
	Wilks' Lambda	0,986	,244 ^b	4	70	0,912
	Hotelling's Trace	0,014	,244 ^b	4	70	0,912
	Roy's Largest Root	0,014	,244 ^b	4	70	0,912

Tabela 11: Analiza variance ponavljajočih meritev površine rane (*repeated measures ANOVA*).

4.3 Vpliv fotobiomodulacije z LED na mikrocirkulacijo na robu rane

Mikrocirkulacija se je v skupini sladkornih bolnikov kot tudi v skupini bolnikov brez sladkorne bolezni, obsevanih z LED, statistično pomembno povečala (*p = 0,040 in **p = 0,033) (Graf 4). V obeh kontrolnih skupinah, ki sta prejemale placebo obsevanje, ni bilo zaznati povečanja mikrocirkulacije.



Graf 4: Prikaz izmerjene mikrocirkulacije z Laser Doppler (LD) flux. Student t-test: *p = 0,040 in **p = 0,033.

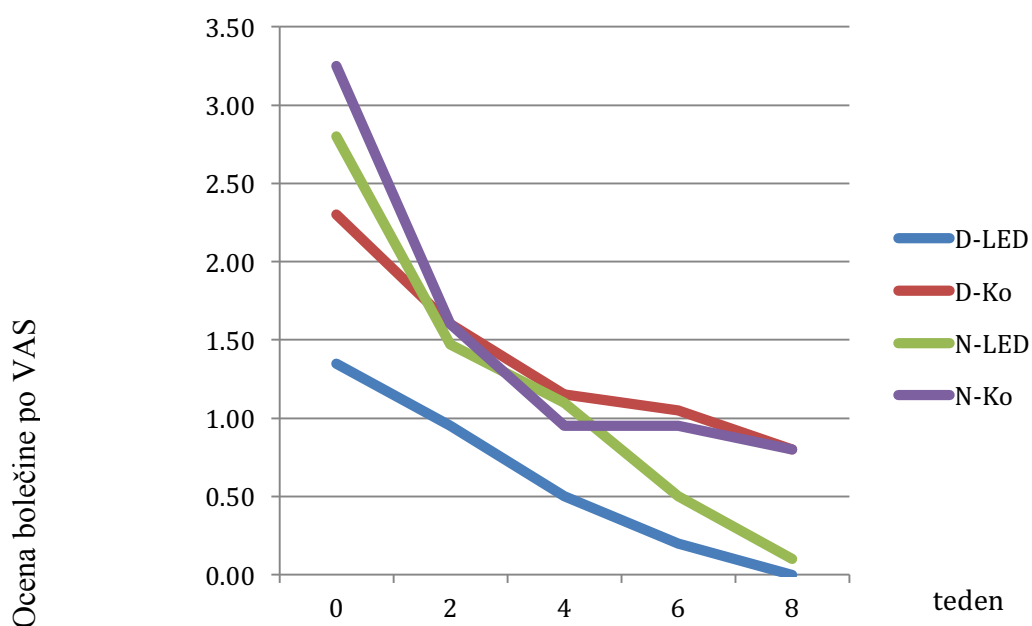
4.4 Ocena bolečine po VAS (vizualno analogni skali)

Ocenjena bolečina po VAS se je v vseh skupinah po osmih tednih zdravljenja statistično značilno zmanjšala.

Iz Tabele 12 in z Grafa 5 je razvidno, da so imeli sladkorni bolniki zaradi pogostejše nevropatije že v začetku zdravljenja manjšo bolečino kot bolniki brez sladkorne bolezni.

	Skupina D-LED (n = 20)	Skupina D-Ko (n = 20)	P ^a	Skupina N-LED (n = 19)	Skupina N-Ko (n = 20)	P ^a
VAS pred začetkom zdravljenja (povprečno ± SD)	1,4 (1,3)	2,3 (2,1)	ns	2,8 (2,1)	3,3 (2,3)	ns
VAS po 8 tednih zdravljenja (povprečno ± SD)	0,1 (0,1)	0,8 (1,6)	0,035	0,2 (0,1)	0,8 (0,8)	0,012
Razlika v VAS pred in po zdravljenju (p ^a)	0,007	0,011		< 0,001	< 0,001	

Tabela 12: Ocena bolečine po VAS pred začetkom zdravljenja in po osmih tednih zdravljenja. ^a – Mann-Whitney test.



Graf 5: Ocena bolečine po VAS v začetku zdravljenja in ocenjena na vsaka 2 tedna. Bolečina se je tekom zdravljenja statistično značilno zmanjšala v vseh skupinah preiskovancev.

Bolečina se je torej tekom zdravljenja zmanjševala v vseh skupinah pacientov, vendar je bilo to zmanjševanje bolečine izraziteje v skupinah, obsevanih z LED (D-LED in N-LED). Med skupinama sladkornih bolnikov (D-LED in D-Ko) pred začetkom zdravljenja ni bilo razlik v oceni bolečine po VAS. Po končanem zdravljenju pa je bila ocena bolečine po VAS v skupini, obsevani z LED (D-LED), značilno nižja kot v kontrolni skupini (D-Ko); $p = 0,035$. Enako se je izkazalo v skupini pacientov brez sladkorne bolezni (N-LED in N-Ko), saj se je v obeh skupinah bolečina, ocenjena po VAS, značilno zmanjšala, vendar izraziteje v skupini, obsevani

z LED, kar se je izkazalo v značilni razliki med skupinama po končanem zdravljenju (N-LED vs N-Ko; $p = 0,012$).

5 RAZPRAVA

Celjenje rane je kompleksen proces, ki poteka preko faz vnetja, proliferacije in maturacije novo nastalega tkiva (33, 118). Rane se običajno zacelijo v 6–8 tednih. Večje ali globlje rane se v tem času vsaj začnejo celiti. V kolikor je proces celjenja prekinjen zaradi okužbe ali drugih vzrokov (slabe prekrvitve tkiva, podhranjenosti, diabetesa), se rana ne zaceli in postane kronična rana (118).

Standardni pristop k zdravljenju kronične rane vključuje nekrektomijo, oskrbo ran z ustreznimi oblogami in zdravljenje okužbe (9, 10). Kronične rane so večinoma okužene. V primerih, kjer kronična rana ni okužena in je dno rane ustrezno, je možno tudi npr. kirurško kritje rane s kožnim presadkom.

Pogoj za uspešno zdravljenje kronične rane je zadovoljiva prekrvavitev v področju rane. Prognoza celjenja kronične rane na spodnjih udih diabetikov kot tudi nediabetikov je sorazmerna s prekrvlenostjo področja okoli rane. Zato je v primerih, kjer je celjenje rane upočasnjeno zaradi slabe prekrvitve, potrebno oceniti, če je možno prekrvavitev povečati s kirurškim posegom npr. z žilnim obvodom ali drugimi žilnimi posegi (119).

Poleg standardnih pristopov so možne tudi dodatne metode, ki pospešujejo zdravljenje kroničnih ran. Uporabimo lahko npr. terapijo z negativnim tlakom ali hiperbarično zdravljenje s kisikom (22–25, 27–31). Ena takih metod je tudi LLLT.

V naši raziskavi smo dokazali stimulativen vpliv na celjenje kronične rane, tako pri sladkornih bolnikih kot tudi pri bolnikih brez sladkorne bolezni.

Ocenjevali smo dno rane po Falangi in površino rane. Rezultati so pokazali značilno hitrejše pojavljanje granulacij na dnu rane v skupinah, obsevanih z LED, tako pri diabetikih kot tudi pri nediabetikih (D-LED vs. D-Ko, $p = 0.0005$; N-LED vs. N-Ko, $p = 0.0014$). Površina rane se je

zmanjševala približno enako hitro v vseh skupinah, pri diabetikih in nediabetikih, obsevanih z LED ali s placebo svetlobo.

Kronične rane se razlikujejo tako po površini kot tudi po globini rane. Hitrost zmanjševanja rane v procesu celjenja je odvisna od globine rane, saj so granulacije, ki se pojavijo na dnu rane, podlaga za kasnejšo epitelizacijo, ki poteka z robov rane (3-7). Ocenjevanje dna rane po Falangi je klinično in zato tudi subjektivno, saj temelji na morfološkem izgledu rane, zato smo iskali klinično pomemben parameter (kot je ocena mikrocirkulacije), ki ga bo mogoče tudi objektivno izmeriti.

Laser Doppler flowmetry (LD flow) predstavlja neinvazivno metodo za ocenjevanje mikrocirkulacije v koži. Objektivnost rezultatov smo optimizirali še z dejstvom, da je obe meritvi (pred začetkom zdravljenja in po 8 tednih obsevanja z LED ali s placebo svetlobo) opravila ista raziskovalka, ki ni vedela, kateri skupini pripada preiskovanec.

Rezultati so pokazali, da se je mikrocirkulacija povečala v obeh skupinah, obsevanih z LED, tako pri diabetikih ($p = 0,040$) kot tudi pri nediabetikih ($p = 0,033$). Poleg povečane mikrocirkulacije tudi hitrejši pojav granulacije na dnu rane (glede na oceno po Falangi) v obeh skupinah, obsevanih z LED, potrjuje ugoden učinek LED na celjenje kroničnih ran.

Randomizirane klinične raziskave v literaturi so redke, a večinoma potrjujejo ugoden učinek LLLT na zdravljenje ran (Tabela 4).

Minatel s sodelavci je v dvojno slepi randomizirani raziskavi ugotavljal učinek zdravljenja z LED (660 in 890 nm, 3 J/cm^2) pri 23 diabetikih s kronično razjedo na nogi (72). Po 30 dneh je v študijski skupini ocenil 56 % boljšo granulacijo in za 79 % hitrejše celjenje razjed kot v kontrolni skupini. Po 90 dneh je bilo 58 % razjed popolnoma zaceljenih oziroma 75 % razjed je bilo zaceljenih za več kot 90 % glede na površino rane. V kontrolni skupini se je zacelila ena razjeda in razen te nobena druga ni dosegla 90 % celjenja oziroma zmanjšanja površine. Minatel je imel podoben režim obsevanja kot v naši raziskavi, vendar je obseval daljše časovno obdobje (do 90 dni, v naši raziskavi največ 8 tednov). Enako kot v naši raziskavi, je tudi Minatel ugotovil boljšo granulacijo v obsevanih ranah, le da v naši raziskavi nismo potrdili hitrejšega zmanjševanja površine rane.

Zhou s sodelavci je analiziral vpliv LLLT (633 nm) kot vsakodnevne dodatne terapije pri 32 pacientih s kronično razjedo na nogi in primerjal z 28 pacienti z razjedo na nogi, ki so prejeli standardno terapijo (76). Po treh tednih je ocenjeval hitrejše zmanjševanje površine razjede in imunohistokemično potrdil večje izražanje *heat shock proteina 70 (HSP70)*, ki stimulatивно vpliva na celjenje kronične rane. Zhou je z vsakodnevnim obsevanjem apliciral višje energije kot so bile aplicirane v naši raziskavi, kar je morda omogočilo hitrejše zmanjševanje površine rane, kar se v naši raziskavi ni izkazalo.

Kaviani s sodelavci je 13 sladkornih bolnikov s kronično rano na nogi dodatno zdravil z LLLT (685 nm, 10J/cm²) in primerjal z 10 sladkornimi bolniki s primerljivo rano, ki so prejeli placebo obsevanje (73). V LLLT skupini se je po 20 tednih osmim pacientom rana popolnoma zacelila (61 %) v kontrolni skupini pa le trem (30 %). Čas do popolne zacelitve je bil v skupini LLLT, sicer statistično neznačilno, krajši (11 tednov vs. 14 tednov). Zaključki Kaviana so primerljivi z našimi, saj so tudi v njegovi raziskavi rane imele večji potencial celjenja, ne toliko z vidika hitrosti (hitrost zmanjševanja površine rane) kot granuliranja z dna rane, kar zanesljiveje privede do popolne zacelitve.

Saltmarche je spremljala učinke LLLT (785 nm, 2–4 J) na zdravljenje kroničnih (12 ran) in akutnih (9 ran) v domu starejših občanov ter ugotovila, da LLLT terapija ugodno in brez stranskih učinkov vpliva na zdravljenje tako kroničnih kot akutnih kroničnih ran (71).

Landau je v dvojno slepi randomizirani raziskavi deset pacientov z diabetičnim ali venskim ulkusom na nogi dodatno zdravil z obsevanjem (širokospektralno: 400–800 nm, 43,2J/cm², dvakrat dnevno) in primerjal z ranami šestih pacientov, ki so prejeli placebo terapijo (75). V 12 tednih so se v preiskovani skupini rane zacelile 9/10 pacientom (90 %), v kontrolni pa le dvema (33 %). Terapija z obsevanjem ni imela nobenih stranskih učinkov. Landau je uporabil širokospektralni laser z veliko višjimi gostotami energije kot smo ga uporabili mi in večina ostalih avtorjev. Glede na to, da ni opazil nobenih stranskih učinkov, bi morda tudi v naši raziskavi z dvigom gostote energije dosegli še boljši učinek. Poleg tega je bil v njegovi raziskavi čas obsevanja za 4 tedne daljši kot v naši raziskavi.

Kajagar, ki je izvedel raziskavo, podobno naši, je prav tako potrdil ugoden učinek dodatnega zdravljenja z LLLT na celjenje kroničnega ulkusa pri diabetikih (74). Raziskava je vključevala 68 pacientov z ulkusom manjšim od 6x6 cm, razdeljenih v preiskovano in kontrolno skupino.

Preiskovana skupina je poleg standardnega zdravljenja prejela tudi LLLT (Thor laser, 2–4 J/cm², 60 mW dnevno, 15 dni zapored). Ocenjevali so zmanjšanje površine ulkusa in v preiskovani skupini se je površina statistično značilno izraziteje zmanjšala kot v kontrolni skupini. Kajagar je apliciral vsakodnevno višje gostote energije kot mi, kar je morda razlog, da se je površina rane hitreje zmanjšala kot v naši raziskavi.

Vse omenjene raziskave potrjujejo ugodne učinke terapije z LLLT na zdravljenje kronične rane pri sladkornih bolnikih. Večina raziskav je analizirala predvsem zmanjševanje površine rane kot kazalec uspešnosti zdravljenja. V naši raziskavi nismo potrdili, da obsevanje z LED pospeši zmanjševanje površine rane. Zmanjševanje površine rane je odvisno tudi od globine rane in stanja dna rane ter hitrosti pojavljanja granulacij. Možno je, da bi se v primeru podaljšanja opazovanja na več kot 8 tednov in nadaljevanju obsevanja z LED kasneje izkazala tudi hitrejša epitelizacija z robov rane in s tem hitrejše zmanjševanje površine rane. Opazovani čas je bil pri navedenih raziskavah namreč pomembno daljši; v raziskavi Minatela 90 dni, Kaviana 20 tednov in Landaua 12 tednov (72, 74, 75). Druga razlika med našo in navedenimi tremi raziskavami, ki so bile naši najbolj podobne, je ta, da so omenjene raziskave obravnavale le kronične diabetične ulkuse. Različna etiologija rane narekuje tudi drugačno dinamiko celjenja. Cilj zdravljenja je sicer vedno doseči zacelitev rane. Za zacelitev so potrebne granulacije, ki potrebujejo zadovoljivo prekrvitev področja. Ko je to doseženo, lahko v primeru, da je ozdravljena okužba v rani, skrajšamo proces celjenja tudi kirurško, s kritjem rane s presadkom delne debeline kože. Vloga obsevanja z LED ali drugimi izvori LLLT je po našem mnenju skrajšati in optimizirati faze celjenja (predvsem vnetno in proliferativno fazo). V kolikor imamo opravka s plitko rano ali z manjšo rano, je smiselno ugodne učinke LED izkoristiti do končne zacelitve. V primerih, ko gre za večje oziroma globlje rane, pa je smiselneje ob dobri prekrivitvi in neokuženi rani pospešiti dokončno zacelitev s kirurškimi metodami.

V naši raziskavi smo potrdili, da obsevanje z LED poveča mikrocirkulacijo na področju rane. Vloga obsevanja z LED torej ni samo v stimulaciji celičnih procesov, temveč tudi v povečani mikrocirkulaciji, ki je na področju kroničnih ran pogosto okrnjena. Stimulacija celičnih procesov je bila dokazana v več *in vitro* raziskavah in sodi med tako imenovane »primarne« učinke obsevanja z LLLT. Povečana mikrocirkulacija pa predstavlja »sekundarni« učinek terapije LLLT (90–94, 111). Na osnovi naše raziskave sicer ne moremo oceniti, kolikšen delež ugodnega učinka je prinesla stimulacija celičnih procesov in kolikšnega povečana

mikrocirkulacija. Na osnovi poznavanja osnovnih fizioloških procesov pa lahko sklepamo, da stimulacija celičnih procesov verjetno ne bi privedla do tako izrazitih pozitivnih učinkov in hitrejšega celjenja, v kolikor temu ne bi sledil povečan dotok kisika in hranil ter odstranjevanje metabolnih produktov preko krvi.

Vpliv LLLT na mikrocirkulacijo so do sedaj obravnavali v le redkih raziskavah.

Schindl s sodelavci je v več raziskavah proučeval vpliv LLLT na mikrocirkulacijo. V nekoliko starejši dvojno slepi raziskavi je randomiziral 30 pacientov z diabetično mikroangiopatijo in ugotovil, da enkratno obsevanje z LLLT (632,8 nm) pomembno izboljša mikrocirkulacijo v koži (70). Temperaturo pred in po obsevanju z LLLT je ocenjeval s pomočjo termo kamere. Svoje ugotovitve je potrdil nekaj let kasneje v podobno zasnovani raziskavi, ki je prav tako ocenjevala povečanje mikrocirkulacije na osnovi povečane temperature kože ocenjene s termalno kamero (120).

Prva raziskava, ki je ocenjevala vpliv LLLT na mikrocirkulacijo v koži s pomočjo laser Dopplerja, je bila opravljena na živalih. Vključevala je 30 zdravih podgan, ki so jih randomizirali v dve skupini in jih v preiskovani skupini 3 minute obsevali z laserjem (632,8 nm, 1 J/cm²) (121). Odločili so se za enak režim obsevanja kot je bil že uporabljen v raziskavi, kjer so potrdili, da obsevanje pospeši celjenje iatrogeno povzročene opekline na koži podgan (122). Pretoke z laser Dopplerjem so merili 1., 2., 3., 7., 14. in 21. dan po povzročeni poškodbi in le 7. dan se je pokazal statistično značilno višji pretok v študijski skupini v primerjavi s kontrolno skupino. Ugotovitev se smiselno dopolnjuje z ugotovitvami Ribeira, ki je na histoloških preparatih iatrogeno povzročenih opeklin pri podganah 7. dan potrdil prisotnost dobro vaskulariziranega novo nastalega granulacijskega tkiva (122).

Pred našo raziskavo je edino klinično raziskavo, ki ocenjuje vpliv LLLT na mikrocirkulacijo s pomočjo Laser Dopplerja, opravil Saied (123). Vključil je 45 diabetikov z znaki slabše prekrvitve kože (suha koža, pruritus, infekti, izpuščaji ipd.) in jih 30 dodatno obseval z LLLT, 15 pa jih je prejelo le standardno terapijo. Pri obsevanih z LLLT (HeNe laser (633 nm) in IR (880 nm), 10 J/cm²) je z Laser Dopplerjem potrdil značilno povišanje mikrocirkulacije.

Glede na dosegljivo literaturo je naša raziskava prva, ki je z Laser Dopplerjem dokazala povečano mikrocirkulacijo pri bolnikih s kronično rano na goleni, gležnju in stopalu. Povečano mikrocirkulacijo po obsevanju z LED smo potrdili tako pri diabetikih kot tudi pri nediabetikih.

V raziskavi smo ocenjevali tudi vpliv LED na bolečino, ocenjeno po VAS. Rezultati so pokazali, da so nediabetiki v obeh skupinah pred zdravljenjem ocenili bolečino kot močnejšo, v primerjavi z diabetiki ($p = 0,020$). Višjo oceno bolečine pri nediabetikih si lahko razložimo z večjo pojavnostjo nevropatije pri diabetikih, zaradi katere se zmanjša senzacija bolečine. Po osmih tednih zdravljenja se je bolečina v vseh skupinah zmanjšala, pri čemer je bilo zmanjšanje bolečine izraziteje v obeh skupinah, zdravljenih z LED (po končanem zdravljenju: D-LED vs D-Ko; $p = 0,035$ in N-LED vs N-Ko; $p = 0,012$).

Zmanjšanje bolečine ob terapiji z LED ali drugimi viri LLLT predstavlja »terciarni« učinek terapije, saj gre za sistemski učinek, ki je posledica povečane sinteze endorfinov in zmanjšane sinteze bradikininov (111, 124).

Naša raziskava je prva, ki je v prospektivni, randomizirani, dvojno slepi raziskavi obravnavala vpliv LLLT z LED na celjenje kronične rane, saj so vse primerljive ostale raziskave za izvor svetlobe uporabljale laser. Dobljeni rezultati so potrdili, da je učinkovitost obsevanja z LED primerljiva z obsevanjem z laserjem. Obsevanje z LED se je torej izkazalo, da si kot adjuvantna metoda, umeščena poleg standardnega zdravljenja kroničnih ran, zasluži mesto v klinični praksi.

6 ZAKLJUČKI

V naši raziskavi smo potrdili, da fotobiomodulacija z LED kot adjuvantna metoda pospeši celjenje rane, in sicer tako pri sladkornih bolnikih kot tudi pri pacientih brez sladkorne bolezni. Pri pacientih, kjer smo rane dodatno obsevali z LED, so rane značilno hitreje granulirale in na robovih rane se je izkazalo statistično značilno povečanje mikrocirkulacije. Obsevanje z LED je statistično značilno zmanjšalo bolečino tako pri sladkornih bolnikih kot tudi pri pacientih brez sladkorne bolezni.

Naša raziskava je prva klinična, randomizirana, dvojno slepa raziskava, v kateri je bila v terapiji kroničnih ran za izvor svetlobe uporabljena LED. V naši raziskavi sicer nismo potrdili hitrejšega zmanjševanja površine rane. Potrdili pa smo delovni hipotezi, da fotobiomodulacija z LED pospeši tvorbo granulacij v rani in s tem celjenje rane. Potrdili smo tudi povečanje mikrocirkulacije na robovih rane.

LITERATURA

1. Kilik R, Lakyová L, Sabo J, Kruzilak P, Lacjaková K, Vasilenko T, Vidová M, Longauer F, Radoňák J. Effect of equal daily doses achieved by different power densities of low-level laser therapy at 635 nm on open skin wound healing in normal and diabetic rats. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 269253.
2. Chaves ME de A, Piancastelli ACC, de Araújo AR, Pinotti M. Effects of low-power light therapy on wound healing: LASER x LED. *An Bras Dermatol* 2014; 89: 616–623.
3. Frykberg RG, Banks J. Challenges in the Treatment of Chronic Wounds. *Adv wound care* 2015; 4: 560–582.
4. Eming SA, Martin P, Tomic-Canic M. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. *Sci Transl Med* 2014; 6: 265sr6.
5. Falanga V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *Lancet* 2005; 366: 1736–1743.
6. Schultz GS, Sibbald RG, Falanga V, Ayello EA, Dowsett C, Harding K, Romanelli M, Stacey MC, Teot L, Vanscheidt W. Wound bed preparation: A systematic approach to wound management. *Wound Repair Regen* 2003; 11 (Suppl 1): S1–28.
7. Lazarus GS, Cooper DM, Knighton DR, Margolis DJ, Pecoraro RE, Rodeheaver G, Robson MC. Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing. *Arch Dermatol* 1994; 130: 489–493.
8. Frykberg RG, Zgonis T, Armstrong DG, Driver VR, Giurini JM, Kravitz SR, Landsman AS, Lavery LA, Moore JC, Schuberth JM, Wukich DK, Andersen C, Vanore JV; American College of Foot and Ankle Surgeons. Diabetic Foot Disorders: A Clinical Practice Guideline (2006 Revision). *J Foot Ankle Surg* 2006; 45: S1–S66.
9. Dhall S, Do DC, Garcia M, Kim J, Mirebrahim SH, Lyubovitsky J, Lonardi S, Nothnagel EA, Schiller N, Martins-Green M. Generating and reversing chronic wounds in diabetic mice by manipulating wound redox parameters. *J Diabetes Res* 2014; 2014: 562625.
10. Lebrun E, Tomic-Canic M, Kirsner RS. The role of surgical debridement in healing of diabetic foot ulcers. *Wound Repair Regen* 2010; 18: 433–438.
11. Granick M, Boykin J, Gamelli R, Schultz G, Tenenhaus M. Toward a common language: Surgical wound bed preparation and debridement. *Wound Repair Regen* 2006; 14 (Suppl 1): S1–10.
12. Panuncialman J, Falanga V. The Science of Wound Bed Preparation. *Surg Clin North Am* 2009; 89: 611–626.
13. Sherman R. Maggot versus conservative debridement therapy for the treatment of pressure ulcers. *Wound Repair Regen* 2002; 10: 208–214.
14. Tian X, Liang XM, Song GM, Zhao Y, Yang XL. Maggot debridement therapy for the

- treatment of diabetic foot ulcers: a meta-analysis. *J Wound Care* 2013; 22: 462–469.
15. Snyder RJ, Kirsner RS, Warriner R, Lavery L, Hanft JR, Sheehan P. Consensus recommendations on advancing the standard of care for treating neuropathic foot ulcers in patients with diabetes. *Ostomy Wound Manage* 2010; 56 (4 Suppl): S1–S24.
 16. Steed DL, Attinger C, Colaizzi T, Crossland M, Franz M, Harkless L, Johnson A, Moosa H, Robson M, Serena T, Sheehan P, Veves A, Wiersma-Bryant L. Guidelines for the treatment of diabetic ulcers. *Wound Repair Regen* 2006; 14: 680–692.
 17. Piaggese A, Goretti C, Mazzurco S, Tascini C, Leonildi A, Rizzo L, Tedeschi A, Gemignani G, Menichetti F, Del Prato S. A randomized controlled trial to examine the efficacy and safety of a new super-oxidized solution for the management of wide postsurgical lesions of the diabetic foot. *Int J Low Extrem Wounds* 2010; 9: 10–15.
 18. Carter MJ, Tingley-Kelley K, Warriner RA. Silver treatments and silver-impregnated dressings for the healing of leg wounds and ulcers: A systematic review and meta-analysis. *J Am Acad Dermatol* 2010; 63: 668–679.
 19. Chambers H, Dumville JC, Cullum N. Silver treatments for leg ulcers: A systematic review. *Wound Repair Regen* 2007; 15: 165–173.
 20. O'Donnell TF Jr, Passman MA, Marston WA, Ennis WJ, Dalsing M, Kistner RL, Lurie F, Henke PK, Gloviczki ML, Eklöf BG, Stoughton J, Raju S, Shortell CK, Raffetto JD, Partsch H, Pounds LC, Cummings ME, Gillespie DL, McLafferty RB, Murad MH, Wakefield TW, Gloviczki P; Society for Vascular Surgery; American Venous Forum. Management of venous leg ulcers: Clinical practice guidelines of the Society for Vascular Surgery® and the American Venous Forum. *J Vasc Surg* 2014; 60:3 S–59S.
 21. Bakker K. Practical guidelines on the management and prevention of the diabetic foot 2011. *Diabetes Metabolism Res Rev* 2012; 28: 225–231.
 22. Banwell PE. Topical negative pressure therapy in wound care. *J Wound Care* 1999; 8: 79–84.
 23. Morykwas MJ, Simpson J, Pungner K, Argenta A, Kremers L, Argenta J. Vacuum-assisted closure: state of basic research and physiologic foundation. *Plast Reconstr Surg* 2006; 117 (7 Suppl):121S–126S.
 24. Anderson C, Hare M, Perdrizet G. Wound Healing Devices Brief Vignettes. *Adv Wound Care* 2015; 5: 185–190.
 25. Petrie N, Potter M, Banwell P. The management of lower extremity wounds using topical negative pressure. *Int J Low Extrem Wounds* 2003; 2: 198–206.
 26. Scherer SS, Pietramaggiori G, Mathews JC, Prsa MJ, Huang S, Orgill DP. The mechanism of action of the vacuum-assisted closure device. *Plast Reconstr Surg* 2008; 122: 786–797.
 27. Fife CE, Buyukcikir C, Otto G, Sheffield P, Love T, Warriner R. Factors influencing the outcome of lower-extremity diabetic ulcers treated with hyperbaric oxygen therapy.

- Wound Repair Regen 2007; 15: 322–331.
28. Löndahl M. Hyperbaric oxygen therapy as adjunctive treatment for diabetic foot ulcers. *Int J Low Extrem Wounds* 2013; 12: 152–157.
 29. Roeckl-Wiedmann I, Bennett M, Kranke P. Systematic review of hyperbaric oxygen in the management of chronic wounds. *Br J Surg* 2005; 92: 24–32.
 30. Stoekenbroek RM, Santema TB, Legemate DA, Ubbink DT, Van Den Brink A, Koelemay MJW. Hyperbaric oxygen for the treatment of diabetic foot ulcers: A systematic review. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2014; 47: 647–655.
 31. Wunderlich RP, Peters EJG, Lavery LA. Systemic hyperbaric oxygen therapy. *Diabetes Care* 2000; 23: 1551–1555.
 32. Kranke P, Bennett MH, Martyn-St James M, Schnabel A, Debus SE, Weibel S. Hyperbaric oxygen therapy for chronic wounds. *Cochrane database Syst Rev* 2015; 6: CD004123.
 33. Medina A, Scott PG, Ghahary A, Tredget EE. Pathophysiology of Chronic Nonhealing Wounds. *J Burn Care Rehabil* 2005; 26: 306–319.
 34. Hawkins D, Abrahamse H. Effect of Multiple Exposures of Low-Level Laser Therapy on the Cellular Responses of Wounded Human Skin Fibroblasts. *Photomed Laser Surg* 2006; 24: 705–714.
 35. Schubert V. Effects of Phototherapy on Pressure Ulcer Healing in Elderly Patients after a Falling Trauma. A Prospective, Randomized, Controlled Study. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2001; 17: 32–8.
 36. Min PK, Goo BL. 830 nm light-emitting diode low level light therapy (LED-LLLT) enhances wound healing: a preliminary study. *Laser Ther* 2013; 22: 43–49.
 37. Grzybowski A, Pietrzak K. From patient to discoverer-Niels Ryberg Finsen (1860-1904)-the founder of phototherapy in dermatology. *Clin Dermatol* 2012; 30: 451–455.
 38. Mester E, Juhász J, Varga P, Karika G. Lasers in clinical practice. *Acta Chir Acad Sci Hung* 1968; 9: 349–357.
 39. Peplow P V, Chung T-Y, Baxter GD. Laser photobiomodulation of proliferation of cells in culture: a review of human and animal studies. *Photomed Laser Surg* 2010; 28 (Suppl 1): S3–S40.
 40. Peplow P V, Chung TY, Baxter GD. Laser photobiomodulation of wound healing: a review of experimental studies in mouse and rat animal models. *PhotomedLaser Surg* 2010; 28: 291–325.
 41. Peplow P V, Chung TY, Baxter GD. Photodynamic Modulation of Wound Healing: A Review of Human and Animal Studies. *Photomed Laser Surg* 2012; 30: 118–148.
 42. Schindl A, Merwald H, Schindl L, Kaun C, Wojta J. Direct stimulatory effect of low-

- intensity 670 nm laser irradiation on human endothelial cell proliferation. *Br J Dermatol* 2003; 148: 334–336.
43. Ghali L, Dyson M. The direct effect of light therapy on endothelial cell proliferation in vitro. *EXS* 1992; 61: 411–414.
 44. Gavish L, Perez L, Gertz SD. Low-level laser irradiation modulates matrix metalloproteinase activity and gene expression in porcine aortic smooth muscle cells. *Lasers Surg Med* 2006; 38: 779–786.
 45. Poon VKM, Huang L, Burd A. Biostimulation of dermal fibroblast by sublethal Q-switched Nd:YAG 532 nm laser: Collagen remodeling and pigmentation. *J Photochem Photobiol B Biol* 2005; 81: 1–8.
 46. Kreisler M, Christoffers AB, Willershausen B, d’Hoedt B. Effect of low-level GaAlAs laser irradiation on the proliferation rate of human periodontal ligament fibroblasts: an in vitro study. *J Clin Periodontol* 2003; 30: 353–358.
 47. Moore P, Ridgway TD, Higbee RG, Howard EW, Lucroy MD. Effect of wavelength on low-intensity laser irradiation-stimulated cell proliferation in vitro. *Lasers Surg Med* 2005; 36: 8–12.
 48. Meirelles GCS, Santos JN, Chagas PO, Moura AP, Pinheiro ALB. A comparative study of the effects of laser photobiomodulation on the healing of third-degree burns: a histological study in rats. *Photomed Laser Surg* 2008; 26: 159–166.
 49. Oliveira PC, Meireles GC, dos Santos NR, de Carvalho CM, de Souza AP, dos Santos JN, Pinheiro AL. The use of light photobiomodulation on the treatment of second-degree burns: a histological study of a rodent model. *Photomed Laser Surg* 2008; 26: 289–299.
 50. Rabelo SB, Villaverde AB, Nicolau R, Salgado MC, Melo MDS, Pacheco MTT. Comparison between wound healing in induced diabetic and nondiabetic rats after low-level laser therapy. *Photomed Laser Surg* 2006; 24: 474–479.
 51. Al-Watban FH, Zhang XY, Andres BL. Low-level laser therapy enhances wound healing in diabetic rats: a comparison of different lasers. *Photomed Laser Surg* 2007; 25: 72–77.
 52. Corazza AV, Jorge J, Kurachi C, Bagnato VS. Photobiomodulation on the angiogenesis of skin wounds in rats using different light sources. *Photomed Laser Surg* 2007; 25: 102–106.
 53. Adamskaya N, Dungal P, Mittermayr R, et al. Light therapy by blue LED improves wound healing in an excision model in rats. *Injury* 2011; 42: 917–921.
 54. Yasukawa A, Hrui H, Koyama Y, Nagai M, Takakuda K. The effect of low reactive-level laser therapy (LLLT) with helium-neon laser on operative wound healing in a rat model. *J Vet Med Sci* 2007; 69: 799–806.
 55. De Araujo CEN, Ribeiro MS, Favaro R, Zezell DM, Zorn TMT. Ultrastructural and autoradiographical analysis show a faster skin repair in He-Ne laser-treated wounds. *J Photochem Photobiol B Biol* 2007; 86: 87–96.

56. Demidova-Rice TN, Salomatina EV, Yaroslavsky AN, Herman IM, Hamblin MR. Low-level light stimulates excisional wound healing in mice. *Lasers Surg Med* 2007; 39: 706–715.
57. Whelan HT, Buchmann EV, Dhokalia A, Kane MP, Whelan NT, Wong-Riley MT, Eells JT, Gould LJ, Hammamieh R, Das R, Jett M. Effect of NASA light-emitting diode irradiation on molecular changes for wound healing in diabetic mice. *J Clin Laser Med Surg* 2003; 21: 67–74.
58. Erdle BJ, Brouxhon S, Kaplan M, Vanbuskirk J, Pentland AP. Effects of continuous-wave (670-nm) red light on wound healing. *Dermatologic Surg* 2008; 34: 320–325.
59. Nogueira VC, Raniero L, Costa GB, de Freitas Coelho NPM, Miranda FC, Arisawa EÂL. Comparative Study of Morphometric and Fourier Transform Infrared Spectroscopy Analyses of the Collagen Fibers in the Repair Process of Cutaneous Lesions. *Adv wound care* 2016; 5: 55–64.
60. da Silva JP, da Silva MA, Almeida APF, Junior IL, Matos AP. Laser therapy in the tissue repair process: a literature review. *Photomed Laser Surg* 2010; 28: 17–21.
61. Hopkins JT, Mcloda TA, Seegmiller JG, Baxter GD. Low-Level Laser Therapy Facilitates 2004; 39: 223–229.
62. Sobanko JF, Alster TS. Efficacy of low-level laser therapy for chronic cutaneous ulceration in humans: a review and discussion. *Dermatol Surg* 2008; 34: 991–1000.
63. Malm M, Lundeberg T. Effect of low power gallium arsenide laser on healing of venous ulcers. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 1991; 25: 249–251.
64. Lundeberg T, Malm M. Low-power HeNe laser treatment of venous leg ulcers. *Ann Plast Surg* 1991; 27: 537–539.
65. Gupta AK, Filonenko N, Salansky N, Sauder DN. The use of low energy photon therapy (LEPT) in venous leg ulcers: a double-blind, placebo-controlled study. *Dermatol Surg* 1998; 24: 1383–1386.
66. Kopera D, Kokol R, Berger C, Haas J. Does the use of low-level laser influence wound healing in chronic venous leg ulcers? *J Wound Care* 2005; 14: 391–394.
67. Lucas C, Van Gemert MJC, De Haan RJ. Efficacy of low-level laser therapy in the management of stage III decubitus ulcers: A prospective, observer-blinded multicentre randomised clinical trial. *Lasers Med Sci* 2003; 18: 72–77.
68. Lucas C, Stanborough RW, Freeman CL, De Haan RJ. Efficacy of Low-Level Laser Therapy on Wound Healing in Human Subjects: A Systematic Review. *Lasers Med Sci* 2000; 15: 84–93.
69. Barreto JG, Salgado CG. Clinic-epidemiological evaluation of ulcers in patients with leprosy sequelae and the effect of low level laser therapy on wound healing: a randomized clinical trial. *BMC Infect Dis* 2010; 10: 237.

70. Schindl A, Schindl M, Schön H, Knobler R, Havelec L, Schindl L. Low-intensity laser irradiation improves skin circulation in patients with diabetic microangiopathy. *Diabetes Care* 1998; 21: 580–584.
71. Saltmarche AE, Saltmarche AE. Low level laser therapy for healing acute and chronic wounds – the extendicare experience. *Int Wound J* 2008; 5: 351–360.
72. Minatel DG, Frade MAC, França SC, Enwemeka CS. Phototherapy promotes healing of chronic diabetic leg ulcers that failed to respond to other therapies. *Lasers Surg Med* 2009; 41: 433–441.
73. Kaviani A, Djavid GE, Ataie-Fashtami L, Fateh M, Ghodsi M, Salami M, Zand N, Kashef N, Larijani B. A randomized clinical trial on the effect of low-level laser therapy on chronic diabetic foot wound healing: a preliminary report. *Photomed Laser Surg* 2011; 29: 109–114.
74. Kajagar BM, Godhi AS, Pandit A, Khatri S. Efficacy of Low Level Laser Therapy on Wound Healing in Patients with Chronic Diabetic Foot Ulcers-A Randomised Control Trial. *Indian J Surg* 2012; 74: 359–363.
75. Landau Z, Migdal M, Lipovsky A, Lubart R. Visible light-induced healing of diabetic or venous foot ulcers: a placebo-controlled double-blind study. *Photomed Laser Surg* 2011; 29: 399–404.
76. Zhou JD, Luo CQ, Xie HQ, Nie XM, Zhao YZ, Wang SH, Xu Y, Pokharel PB XD. Increased expression of heat shock protein 70 and heat shock factor 1 in chronic dermal ulcer tissues treated with laser-aided therapy. *Chin Med J* 2008; 121: 1269–1273.
77. Iusim M, Kimchy J, Pillar T, Mendes DG. Evaluation of the degree of effectiveness of biobeam low level narrow band light on the treatment of skin ulcers and delayed postoperative wound healing. *Orthopedics* 1992; 15: 1023–1026.
78. Santoianni P, Monfrecola G, Martellotta DAF. Inadequate effect of helium-neon laser on venous leg ulcers. *Photodermatol* 1984; 1: 245–249.
79. Bihari I, Mester AR. The biostimulative effect of low level laser therapy of long-standing crural ulcers using helium neon laser, helium neon plus infrared lasers, and noncoherent light: Preliminary report of a randomized double blind comparative study. *Laser Ther* 1989; 1: 97–98.
80. Franek A, Król P, Kucharzewski M. Does low output laser stimulation enhance the healing of crural ulceration? Some critical remarks. *Med Eng Phys* 2002; 24: 607–615.
81. Lagan KM, McKenna T, Witherow A, Johns J, McDonough SM, Baxter GD. Low-Intensity Laser Therapy / Combined Phototherapy in the Management of Chronic Venous Ulceration : A Placebo-Controlled Study. *J Clin Laser Med Surg* 2002; 20: 109–116.
82. Nussbaum EL, Biemann I, Mustard B. Comparison of ultrasound/ultraviolet-C and laser for treatment of pressure ulcers in patients with spinal cord injury. *Phys Ther* 1994; 74:

- 812–815.
83. Schindl M, Kerschman K, Schindl A, Schön H, Heinzl H, Schindl L. Induction of complete wound healing in recalcitrant ulcers by low-intensity laser irradiation depends on ulcer cause and size. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 1999; 15: 18–21.
 84. Whelan HT, Houle JM, Whelan NT, Donohoe DL, Cwiklinski J, Schmidt MH, Gould L, Larson D, Meyer GA, Cevenini V, Stinson H. The NASA Light-Emitting Diode Medical Program – Progress in Space Flight and Terrestrial Applications. *J Neurosurg* 1999: 1995–1999.
 85. Whelan HT, Smits RL, Buchman EV, Whelan NT, Turner SG, Margolis DA, Cevenini V, Stinson H, Ignatius R, Martin T, Cwiklinski J, Philippi AF, Graf WR, Hodgson B, Gould L, Kane M, Chen G, Caviness J. Effect of NASA light-emitting diode irradiation on wound healing. *J Clin Laser Med Surg* 2001; 19: 305–314.
 86. Karu T. Photobiological fundamentals of low-power laser therapy. *IEEE J Quantum Electron* 1987; 23: 1703–1717.
 87. Schmidt MH, Bajic DM, Reichert KW, Martin TS, Meyer GA, Whelan HT. Light-emitting diodes as a light source for intraoperative photodynamic therapy. *Neurosurgery* 1996; 38: 552–557.
 88. Vinck EM, Cagnie BJ, Cornelissen MJ, Declercq HA, Cambier DC. Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation. *Lasers Med Sci* 2003; 18: 95–99.
 89. Huang Y-Y, Sharma SK, Carroll J, Hamblin MR. Biphasic dose response in low level light therapy - an update. *Dose Response* 2011; 9: 602–618.
 90. Karu T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *J Photochem Photobiol B* 1999; 49: 1–17.
 91. Karu T. Mitochondrial mechanisms of photobiomodulation in context of new data about multiple roles of ATP. *Photomed Laser Surg* 2010; 28: 159–160.
 92. Karu TI. Mitochondrial signaling in mammalian cells activated by red and near-IR radiation. *Photochem Photobiol* 2008; 84: 1091–1099.
 93. Karu TI, Pyatibrat LV, Afanasyeva NI. Cellular effects of low power laser therapy can be mediated by nitric oxide. *Lasers Surg Med* 2005; 36: 307–314.
 94. Karu TI, Pyatibrat L V, Kalendo GS. Photobiological modulation of cell attachment via cytochrome c oxidase. *Photochem Photobiol Sci* 2004; 3: 211–216.
 95. Karu TI. How the absorption of monochromatic visible-to-near IR radiation by cells leads to their biological responses? V Musmeci F, Brizhik LS, Ho MW (eds). *Energy and information transfer in biological systems. How physics could enrich biological understanding*. World Scientific Publishing Co, Covent Garden, London 2003, 148–156.
 96. Vinck EM, Cagnie BJ, Cornelissen MJ, Declercq HA, Cambier DC. Green light emitting

- diode irradiation enhances fibroblast growth impaired by high glucose level. *Photomed Laser Surg* 2005; 23: 167–171.
97. Rochkind S, Rouso M, Nissan M, Villarreal M, Barr-Nea L, Rees DG. Systemic effects of low-power laser irradiation on the peripheral and central nervous system, cutaneous wounds, and burns. *Lasers Surg Med* 1989; 9: 174–182.
 98. Lubart R, Eichler M, Lavi R, Friedman H, Shainberg A. Low-energy laser irradiation promotes cellular redox activity. *Photomed Laser Surg* 2005; 23: 3–9.
 99. Lane N. Cell biology: power games. *Nature* 2006; 443: 901–903.
 100. Poyton RO, Ball KA. Therapeutic photobiomodulation: nitric oxide and a novel function of mitochondrial cytochrome c oxidase. *Discov Med* 2011; 11: 154–159.
 101. Ball KA, Castello PR, Poyton RO. Low intensity light stimulates nitrite-dependent nitric oxide synthesis but not oxygen consumption by cytochrome c oxidase: Implications for phototherapy. *J Photochem Photobiol B Biol* 2011; 102: 182–191.
 102. Lopes NNF, Plapler H, Chavantes MC, Lalla R V, Yoshimura EM, Alves MTS. Cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor expression in 5-fluorouracil-induced oral mucositis in hamsters: Evaluation of two low-intensity laser protocols. *Support Care Cancer* 2009; 17: 1409–1415.
 103. Gál P, Mokry M, Vidinsky B, Kilik R, Depta F, Harakalová M, Longauer F, Mozes S, Sabo J. Effect of equal daily doses achieved by different power densities of low-level laser therapy at 635 nm on open skin wound healing in normal and corticosteroid-treated rats. *Lasers Med Sci* 2009; 24: 539–47.
 104. Brea-Calvo G, Siendones E, Sánchez-Alcázar JA, de Cabo R, Navas P. Cell survival from chemotherapy depends on NF-kappaB transcriptional up-regulation of coenzyme Q biosynthesis. *PLoS One* 2009; 4: e5301.
 105. Karin M, Lin A. NF-κB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* 2002; 3: 221–227.
 106. Chandel NS, Trzyna WC, McClintock DS, Schumacker PT. Role of Oxidants in NF- B Activation and TNF- Gene Transcription Induced by Hypoxia and Endotoxin. *J Immunol* 2000; 165: 1013–1021.
 107. Groeger G, Quiney C, Cotter TG. Hydrogen peroxide as a cell-survival signaling molecule. *Antioxid Redox Signal* 2009; 11: 2655–2671.
 108. Wu S, Xing D, Gao X, Chen WR. High fluence low-power laser irradiation induces mitochondrial permeability transition mediated by reactive oxygen species. *J Cell Physiol* 2009; 218: 603–611.
 109. Wu S, Xing D, Wang F, Chen T, Chen WR. Mechanistic study of apoptosis induced by high-fluence low-power laser irradiation using fluorescence imaging techniques. *J Biomed Opt* 2007; 12: 064015.

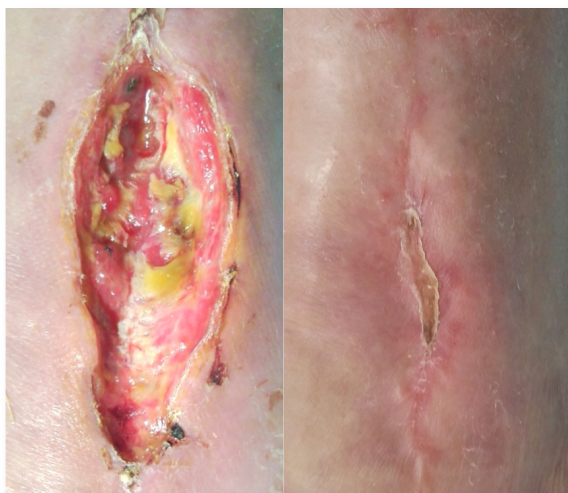
110. Vinck E, Cagnie B, Coorevits P, Vanderstraeten G, Cambier D. Pain reduction by infrared light-emitting diode irradiation: A pilot study on experimentally induced delayed-onset muscle soreness in humans. *Lasers Med Sci* 2006; 21: 11–18.
111. Vinck EM. Applicability of light emitting diode irradiation in physiotherapy. Doktorska disertacija. Ghent: Faculty of Medicine and Health Sciences, 2006.
112. Conlan MJ, Rapley JW, Cobb CM. Biostimulation of wound healing by low-energy laser irradiation. A review. *J Clin Periodontol* 1996; 23: 492–496.
113. Cambier D, Blom K, Witvrouw E, Ollevier G, De Muynck M, Vanderstraeten G. The Influence of Low Intensity Infrared Laser Irradiation on Conduction Characteristics of Peripheral Nerve: A Randomised, Controlled, Double Blind Study on the Sural Nerve. *Lasers Med Sci* 2000; 15: 195–200.
114. Reddy GK. Photobiological basis and clinical role of low-intensity lasers in biology and medicine. *J Clin Laser Med Surg* 2004; 22: 141–150.
115. Lievens PC. The effect of IR laser irradiation on the vasomotricity of the lymphatic system. *Lasers Med Sci* 1991; 6: 189–191.
116. Lievens PC. The effect of a combined HeNe and IR laser treatment on the regeneration of the lymphatic system during the process of wound healing. *Lasers Med Sci* 1991; 6: 193–199.
117. Karu T. Is It Time to Consider Photobiomodulation As a Drug Equivalent? *Photomed Laser Surg* 2013; 31: 189–191.
118. Mustoe TA, O'Shaughnessy K, Kloeters O. Chronic wound pathogenesis and current treatment strategies: a unifying hypothesis. *Plast Reconstr Surg* 2006; 117 (7 Suppl): 35S–41S.
119. Dominguez A, Bahadorani J, Reeves R, Mahmud E, Patel M. Endovascular therapy for critical limb ischemia. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2015; 13: 429–444.
120. Schindl A, Heinze G, Schindl M, Pernerstorfer-Schön H, Schindl L. Systemic effects of low-intensity laser irradiation on skin microcirculation in patients with diabetic microangiopathy. *Microvasc Res* 2002; 64: 240–246.
121. Núñez SC, Nogueira GEC, Ribeiro MS, Garcez AS, Lage-Marques JL. He-Ne laser effects on blood microcirculation during wound healing: A method of in vivo study through laser Doppler flowmetry. *Lasers Surg Med* 2004; 35: 363–368.
122. Ribeiro MS, Da Silva Dde F, De Araújo CE, De Oliveira SF, Pelegrini CM, Zorn TM, Zetzell DM. Effects of low-intensity polarized visible laser radiation on skin burns: a light microscopy study. *J Clin Laser Med Surg* 2004; 22: 59–66.
123. Saied GM, Kamel RM, Labib AM, Said MT, Mohamed AZ. The diabetic foot and leg: combined He-Ne and infrared low-intensity lasers improve skin blood perfusion and prevent potential complications. A prospective study on 30 Egyptian patients. *Lasers Med Sci* 2011; 26: 627–632.

124. Eshghpour M, Ahrari F, Takallu M. Is Low-Level Laser Therapy Effective in the Management of Pain and Swelling After Mandibular Third Molar Surgery? J Oral Maxillofac Surg 2016; 74:1322.e1-8.

7 PRILOGA: KLINIČNI PRIMERI

Primeri celjenja ran

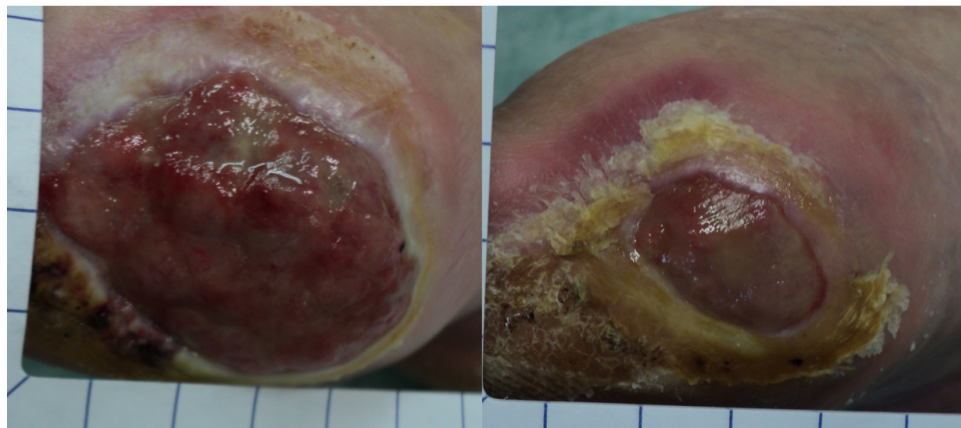
V nadaljevanju so prikazani primeri, kjer je bilo celjenje ran ob uporabi obsevanja z LED zelo uspešno.



Slika 1: Primer rane pri 67-letni ženski s sladkorno boleznijo: pooperativna rana po osteosintezi gležnja se ni zacelila 4 mesece. Osteosintetski material je bil odstranjen, ker je bila kost že zaceljena. Zankov osteomielitisa ni bilo. Rana se je uspešno zacelila po 6 tednih terapije z LED.



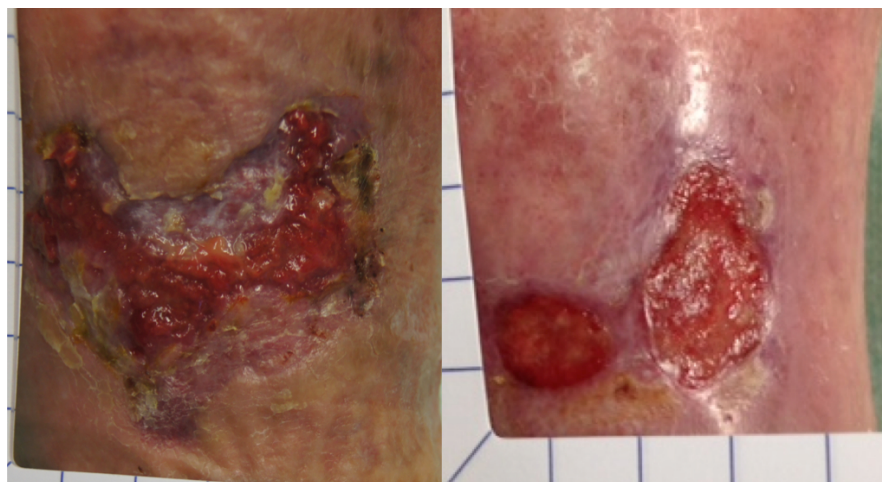
Slika 2: Primer 48-letnega moškega, nediabetika, z dva meseca trajajočo pooperativno rano. V globini rane je viden osteosintetični material, za katerega smo se odločili, da ga pustimo, in situ, ker ni bilo znakov osteomielitisa. Rana se je uspešno zacelila po štirih tednih zdravljenja z LED.



Slika 3: Primer 60-letne ženske z diabetesom in s kronično pooperativno rano. Na desni strani je vidna delno zaceljena rana po osmih tednih zdravljenja z LED.



Slika 4: Primer 58-letnega moškega z diabetesom in s kronično rano, ki je vztrajala 4 mesece po amputaciji na nivoju stopala. Po osmih tednih zdravljenja z LED je bila rana delno zaceljena.



Slika 5: Primer 70-letne ženske brez diabetesa s sedem mesecev trajajočo rano na goleni zaradi periferne okluzivne žilne bolezni: po osmih tednih obsevanja z LED se je rana delno zacelila.



Slika 6: Primer 58-letnega moškega z diabetesom in s kronično rano, ki je vztrajala tri mesece: po petih tednih obsevanja z LED se je rana zacelila.