

Rola laseroterapii biostymulacyjnej we wczesnej rehabilitacji pooperacyjnej i jej wpływ na gojenie się rany

The Role of Laser Biostimulation in Early Post-surgery Rehabilitation and its Effect on Wound Healing

Iga Krynicka^{1(A,B,C,D,E,F,G)}, Roman Rutowski^{2,3(D)}, Jolanta Staniszewska-Kuś^{3(B,C)},
Jarosław Fugiel^{2,4(D,E,G)}, Andrzej Zaleski^{4(D,E)}

¹ SZPL „PROVITA”, Wrocław

² Katedra Biostruktury, Akademia Wychowania Fizycznego, Wrocław

³ Zakład Chirurgii Eksperimentalnej i Badania Biomateriałów Katedry Chirurgii Urazowej i Chirurgii Ręki AM, Wrocław

⁴ Wyższa Szkoła Fizjoterapii, Wrocław

¹ "PROVITA" Specialised Centre for Prevention and Treatment, Wrocław

² Department of Bio-Structure, University School of Physical Education, Wrocław

³ Division of Experimental Surgery and Bio-Material Analysis in Department of Traumatology and Hand Surgery, Medical University in Wrocław

⁴ College of Physiotherapy, Wrocław

STRESZCZENIE

Wstęp. Przedstawiona praca ma na celu ocenę oddziaływanego laseroterapii biostymulacyjnej, stosowanej od pierwszej doby po operacji na splocie ramiennym i nerwach obwodowych, na proces gojenia się ran.

Materiał i metody. Badanie wykonano na 44 szczurach, które podzielono na dwie grupy: I – grupa kontrolna, w której rany goją się samoistnie, II – grupa, w której gojące się rany poddano ekspozycji światła laserowego o parametrach: długość fali 810nm, moc 100mW, energia 15J, powierzchnia naświetlana 3cm², czas pojedynczego zabiegu 2 minuty 30 sekund, praca ciągła. W eksperymencie dokonano oceny obrazu rany pooperacyjnej (obraz makroskopowy, mikroskopia świetlna i elektronowa oraz odporność tkanki na zrywanie) w grupie kontrolnej i stymulowanej promieniowaniem laserowym z zakresu podczerwieni. W analizie statystycznej obliczono średnie arytmetyczne, odchylenie standardowe oraz test t-Studenta dla grup niezależnych.

Wyniki. W wykonanym eksperymencie wykazano, że stymulacja ran promieniowaniem laserowym z zakresu podczerwieni wpływa korzystnie na pokrycie blizny wielowarstwowym nabłoniem płaskim rogowacującym oraz intensyfikuje proces gojenia się rany.

Wnioski. Uzyskany obraz makroskopowy i mikroskopowy wskazuje na korzystny wpływ stymulacji laserowej na proces gojenia się ran. Wynik ten potwierdza słuszność stosowania laserów biostymulacyjnych u pacjentów we wczesnym okresie pooperacyjnym. Badania fizyko-mechaniczne na zrywanie nie wykazały wpływu na wytrzymałość blizny skóry poddanej stymulacji promieniowania laserowego z zakresu podczerwieni.

Słowa kluczowe: laseroterapia biostymulacyjna, gojenie ran, rehabilitacja pooperacyjna

SUMMARY

Background. The aim of this paper is to investigate whether laser biostimulation starting on the first day after surgery of the brachial plexus or peripheral nerves has a positive therapeutic effect on wound healing.

Material and methods. Surgical procedures were carried out on 44 male Wistar rats. The animals were divided into a control group (Group 1), where the surgical wounds were allowed to heal spontaneously, and an experimental Group 2, where the wounds were exposed to laser irradiation with the following parameters: wavelength 810nm, power 100mW, energy 15J, laser exposure surface 3cm², single application time 2 min. 30 sec., continuous mode. The results were assessed with pathomorphological tests (gross appearance of the wound, light and electron microscopy studies) and breaking strength examination. Statistical analysis used arithmetic means, standard deviations and Student's t test for independent samples.

Results. Low energy infrared laser radiation had a beneficial effect on the covering of the scar with stratified squamous cornifying epithelium and intensified wound healing.

Conclusions. The gross and microscopic findings indicated a beneficial effect of laser stimulation on wound healing. These results underscore the utility of biostimulation lasers in the early post-operative period. Physicomechanical investigations did not reveal an effect of infrared laser biostimulation on the breaking strength of the cutaneous scar.

Key words: biostimulation laser, wound healing, post-operative rehabilitation

WSTĘP

Wczesne zastosowanie rehabilitacji po zabiegach operacyjnych na splocie ramiennym i nerwach obwodowych jest niezmiernie ważnym elementem szybkiego powrotu funkcji kończyny górnej. Zastosowanie kinezyterapii (ćwiczenia bierne, bierno-czynne, wspomagane, metoda PNF) umożliwia utrzymanie aktywności receptorów, zmniejsza napięcie lub nie dopuszcza do powstania przykurczu w stawach, a także ogranicza zaniki mięśniowe. W jak najwcześniejszym wprowadzeniu kinezyterapii w okresie pooperacyjnym niezbędne jest opanowanie dolegliwości bólowych, obrzęku operowanej okolicy oraz poprawa jej ukrwienia. Jednym z bardziej skutecznych zabiegów fizykoterapeutycznych stosowanym w tym czasie jest laseroterapia biostymulacyjna. Poza niezaprzecjalnym efektem przeciwbólowym istotna jest także możliwość przyłożkowego stosowania zabiegu z uwagi na niewielki rozmiar urządzenia [1,2,3,4].

Wpływ biostymulacji laserowej na proces gojenia się ran był przedmiotem wielu prac naukowych, które w większości oceniali go jako korzystny [5,6,7,8]. Istnieje jednak grupa autorów, którzy opierając się na własnych obserwacjach zaprzeczą pozytywnemu oddziaływaniu biostymulacji laserowej w tym przypadku [9,10]. Wobec różnych ocen wpływu biostymulacji laserowej na tkanki postanowiliśmy prześledzić proces gojenia się ran poddanych ekspozycji na działanie niskoenergetycznego promieniowania laserowego z zakresu podczerwieni. Wybór typu lasera związany był z częstym jego stosowaniem w przypadku fizykoterapii pooperacyjnej i wpływem na metabolizm fibroblastów tkanki łącznej.

Celem pracy jest ocena wpływu laseroterapii biostymulacyjnej, stosowanej od pierwszej doby po operacji na splocie ramiennym lub nerwie obwodowym, na proces gojenia się rany. Korzystny wpływ zabiegów, poprzez działanie przeciwbólowe i przeciwo-brzękowe, pozwoli na wczesne włączenie kinezyterapii u pacjentów po operacjach.

MATERIAŁ I METODY

Badanie wykonano na szczurach, samcach rasy Wistar. Wszystkie zwierzęta były w tym samym wieku (4 miesiące) i o tej samej masie ciała (200 g). Zwierzęta przebywały w warunkach standardowego chowu laboratoryjnego. Operacje przeprowadzono na 44 szczurach. Grupa doświadczalna została podzielona na dwie grupy (Tab. 1):

I – grupa kontrolna, w której rany goją się samoistnie, II – grupa, w której gojące się rany poddano ekspozycji światła laserowego o parametrach: długość fa-

BACKGROUND

Early rehabilitation after operations on the brachial plexus or peripheral nerves is an contributes immensely to rapid recovery of upper limb function. Kinesiotherapy (passive, passive-active, assisted exercises, PNF method) enables the maintenance of receptor activity, decreases or prevents joint contractures and limits muscular atrophy. Starting the treatment as early as possible in the post-operative period is possible after pain and oedema of the operated area have been reduced and blood flow has improved. One of the most effective physiotherapy treatments applied in such cases is bio-stimulating laser therapy. Apart from the indisputable analgesic effect [1,2, 3,4], the small size of the device enables the therapy to be carried out at the patient's bedside.

The influence of laser bio-stimulation on wound healing has been the subject of numerous scientific studies, which mostly consider it beneficial [5,6,7,8]. However, a group of authors, on the basis of their own observations, deny the positive effect of bio-stimulating laser therapy in this case [9,10]. Considering the different opinions about laser bio-stimulation, we set out to monitor the healing of wounds exposed to low-energy infra-red laser irradiation. The choice of this type of laser was connected with its popularity in post-surgical physiotherapy and its influence on the metabolism of connective tissue fibroblasts.

The aim of this research was to assess the influence of bio-stimulating laser therapy applied from the first day after surgery of the brachial plexus or peripheral nerves, on the process of wound healing. The positive effect of the therapy, because of its oedema- and pain-reducing effect, will enable early kinesiotherapy in patients after surgery.

MATERIAL AND METHODS

The research was conducted on male Wistar rats. All the animals were of the same age (4 months) and of the same body mass (200g). The animals were kept in standard laboratory conditions. 44 rats were surgically operated. The experiment group was divided into two groups (Tab. 1):

I – control group, spontaneous wound healing;
II – group in which the wounds were exposed to laser light of the following parameters: wave length 810nm, energy 15J, laser exposure surface 3 cm²,

Tab. 1. Liczba zwierząt i terminy sekcji

Tab. 1. Number of animals and dissection times

Materiał Material	Lokalizacja eksperymentu Site	Grupa I Group I	Grupa II Group II	I termin Sekcji Time of first dissection	I termin Sekcji Time of second dissection
Szczury Wistar Wistar rats n = 44	Skóra grzbietu Skin of the back	22	22	4 doba po operacji 4th post-operative day	8 doba po operacji 8th post-operative day

li 810nm, moc 100mW, energia 15J, powierzchnia naświetlana 3cm², czas pojedynczego zabiegu 2 minuty 30 sekund, praca ciągła (Ryc. 1).

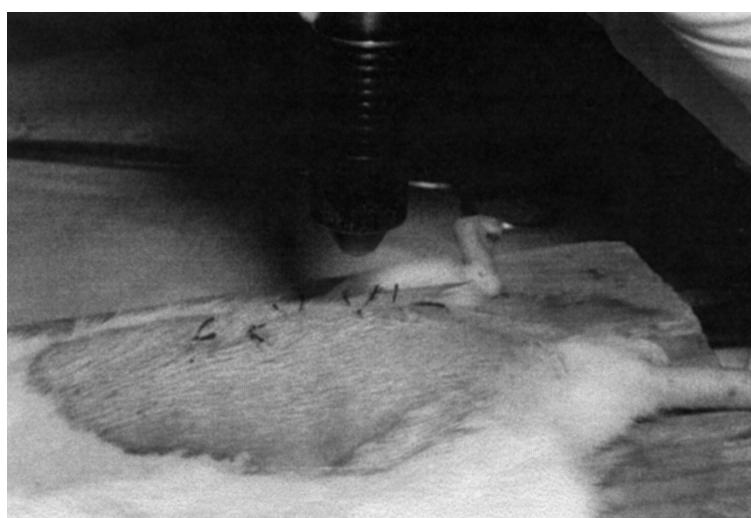
Po przygotowaniu pola operacyjnego w sposób typowy w warunkach aseptyki chirurgicznej wykonano ranę ciętą grzbietu szczurów wzdłuż kręgosłupa o długości 5 cm. Skórę zszyto pojedynczymi, monofilowymi szwami węzelkowymi PDS 2/0, a ranę pooperacyjną dezynfekowano 5% nalewką jodową. Badanie pooperacyjne Grupy I obejmowało obserwację ogólnego stanu zdrowia zwierząt (łaknienie, wygląd, ruchliwość) oraz przebiegu gojenia się ran pooperacyjnych na grzbiecie. W Grupie II obserwowano stan kliniczny zwierząt oraz naświetlano ich rany światłem laserowym o wyżej podanych parametrach.

Do oceny wyników wykorzystano: badania patomorfologiczne (makroskopowe, mikroskopię świetlną i elektronową), badanie wytrzymałości tkanki na zrywanie. Otrzymane wartości punktowe poddano analizie statystycznej obliczając wartości średnie i odpowiadające im odchylenia standardowe. W celu porównania średnich arytmetycznych dwóch podgrup stosowano test t-Studenta. Hipotezy weryfikowano na poziomie istotności $p \leq 0,05$.

single application time 2 min. 30 sec., continuous work (Fig. 1).

After an operation surface had been prepared in a way typical for aseptic surgical conditions, 5 cm incisions along spines were made in rats. The skin was closed with single monofilament knotted sutures PDS 2/0, and an operation wound was disinfected with 5% iodine tincture. Post-operative examination of group I included observation of a general condition of the animals (appetite, appearance, and vividness), as well as the process of post-surgery wound healing on their backs. In group II, clinical condition of animals was observed, and their wounds were exposed to the laser light of the above given parameters.

To assess the results, the following factors were used: pathomorphological tests (macroscopy, and light and electron microscopy) and tensile strength of tissue tests. The received point values underwent statistical analysis by average values and corresponding standard deviations calculations. To compare average arithmetical values of the two subgroups, t-Student test was used. Hypothesis was verified on the level of significance $p \leq 0,05$.



Ryc. 1. Rana na grzbiecie szczura. Widoczna głowica lasera biostymulacyjnego

Fig. 1. Wound on a rat's back. Bio-stimulating laser head visible

Badania patomorfologiczne

Sekcje operowanych szczurów przeprowadzono w 4 i 8 dni po operacji (po 11 zwierząt). Usypano je stosując wziewnie letalne dawki eteru.

Badania makroskopowe

W czasie sekcji poddano szczegółowej ocenie operowaną okolicę i procesy gojenia się rany skóry grzbietu szczura. Następnie pobrano fragmenty skóry do badania w mikroskopie świetlnym oraz elektronowym. Obrazy dokumentowano fotograficznie.

Mikroskopia świetlna

Pobrane wycinki skóry utrwalono w 8% roztworze formaldehydu zbojętnionym węglanem wapnia. Po upływie 2-4 dni preparaty odwodniono w szeregu acetonowym w temperaturze 333°K (60°C) utrzymując je po 90 minut kolejno w 3 kąpielach acetonowych. Następnie poddano je prześwietleniu w temperaturze pokojowej zanurzając na 45 minut kolejno w: karboksylenie i ksylenie. Kolejnym etapem było nasycenie wycinek parafiną w temperaturze 333°K (60°C) przez 12 godzin i zatopienie w bloczki parafinowe. Z bloczków parafinowych na mikrotomie saneczkomu skrawano preparaty o grubości 4-8 mikrometra, które barwiono hematoksyliną i eozyną oraz metodą van Gieson. Ogółem wykonano 200 preparatów do oceny w mikroskopie świetlnym. Charakterystyczne obrazy mikroskopowe udokumentowano fotograficznie.

Mikroskopia elektronowa

Pobrane ze środka rany wycinki utrwalono w 2,5% aldehydzie glutarowym na buforze fosforanowym (czas: 2 godziny). Utrwalony materiał przepłukano w buforze fosforanowym i utrwalono w 2% cztero-tlenku osmu (czas: 1,5 godziny). Po raz drugi płukano w buforze fosforanowym. Kolejnym etapem było odwodnienie w acetonie. Odwodniony materiał zatopiono w eponie. Tak przygotowany materiał krojono na ultramikrotomie Tesla BS 490A. Następnie kontrastowano octanem uranyłu i odczynnikiem Reynolds'a. Badania przeprowadzono za pomocą mikroskopu elektronowego Tesla BS-500. Ogółem wykonano około 300 preparatów do oceny w mikroskopie elektronowym. Charakterystyczne obrazy mikroskopowe udokumentowano fotograficznie.

Badania wytrzymałości tkanki na zrywanie

W czasie sekcji (4 i 8 doba po operacji) pobrano wycinki ze skóry grzbietu szczurów. Za pomocą formy metalowej o wymiarach: szerokość 8 mm i długość 10 cm, na którą działało stałym ciężarem, wycięto jednakowe fragmenty skóry o wymiarach: sze-

Pathomorphological study

Dissections of the operated rats were conducted in the 4th and 8th day after the surgery (11 animals each day). They were sacrificed with lethal doses of ether.

Macroscopic study

During the dissections, the detailed assessment of the operated area and the healing processes of the rats' back wounds were made. Then, fragments of skin were taken to light and electron microscopic studies. A picture documentation was gathered.

Light microscopy

The skin samples were preserved in 8% formaldehyde solution neutralized by calcium carbonate. After 2-4 days, the preparations were dehydrated in acetone series at 333°K (60°C), and put successively in three 90 minutes aceton baths. Then, they were transilluminated at room temperature by washing in sequence in carboxylene and xylene. In the next stage the samples were saturated with paraffin at 333°K (60°C) for 12 hours and embedded in paraffin blocks. A sledge microtome was used to cut paraffin blocks into 4-8 micrometre samples which were coloured with hematoxylin and eosin as well as with Gieson method. In general, 200 samples were made for assessment in a light microscope. Documentary photo evidence of characteristic microscopic pictures was gathered.

Electron microscopy

Samples taken from the inner part of the wound, were preserved in 2,5% glutaraldehyde on a phosphatic buffer (time: 2 hours). The preserved material was washed in a phosphatic buffer and preserved in 2% osmic tetroxide (time: 1,5 hour). Once again, the samples were washed in a phosphatic buffer. Dehydrating in acetone was the next stage. Dehydrated material was embedded in epon. The material prepared in this way was sliced using Tesla BS 490A microtome. Then the samples were subjected to contrast enhancement with uranyl acetate and Reynold's reagent. The studies were carried out with the use of Tesla BS-500 electron microscope. In general, about 300 samples were prepared for the examination in an electron microscope. Photo documentation of the characteristic microscopic images was gathered.

Tensile strength of tissues studies

During the dissection (4th and 8th day after the surgery) skin samples from the backs of rats were taken. Using a metal form, 8mm wide and 10cm long, touched by a constant weight, identical fragments of skin were cut: 8mm wide, 10cm long and 2mm thick.

rokość – 8 mm, długość – 10 cm, grubość – 2 mm. Każdy wycinek zawierał pośrodku bliznę chirurgiczną. Próbę wytrzymałości pobranych fragmentów na zrywanie wykonano w Zakładzie Wytrzymałości Materiałów, Materiałoznawstwa i Mechaniki Technicznej Politechniki Wrocławskiej.

Zrywanie wykonano na maszynie Instron, model 1126 o parametrach:

- prędkość przesuwu belki (v_b) = 2 mm/min.,
- prędkość przesuwu papieru = 60 mm/min.,
- baza pomiarowa (odległość pomiędzy szczękami maszyny) $Lo = 40$ mm,
- zakresy siłomierza = 0-2 [N]; 0-4 [N]; 0-10 [N]; 0-20 [N]; 0-40 [N].

Dokonano pomiarów:

- a) siły zrywu,
- b) naprężenia.

Wartość naprężenia [N/mm^2] wyznaczono ze wzoru:

$$\eta = \frac{F}{a \times b}$$

F – siła maksymalna zrywu,

a – grubość materiału,

b – szerokość materiału.

WYNIKI

Badania pooperacyjne

Przez cały czas trwania eksperymentu żadne ze zwierząt nie padło, wszystkie zwierzęta wykazywały prawidłową ruchliwość, łaknienie i wygląd.

Badania patomorfologiczne

- Badania makroskopowe
 - Ocena makroskopowa w 4 dobie po zabiegu
- Na skórze grzbietu u wszystkich zwierząt widoczna była rana zaopatrzona pojedynczymi szwami węzlikowymi, po ich zdjęciu brzegi rany pozostawały sklejone ze sobą. W obydwu grupach (I i II) dawały się one rozerwać na tępko przy użyciu pęsety. Skóra grzbietu dała się dość łatwo odparować od powięzi.

W obydwu grupach w okolicy rany, w tkance podskórnej widoczna była biało-szarawa tkanka o nieregularnym rysunku. W otoczeniu opisanej biało-szarowej tkanki widoczne były pojedyncze sinoczerwone ogniska i poszerzone ciemnoczerwone naczynia krwionośne, w Grupie II mniej liczne niż w przypadku grupy kontrolnej (Ryc. 2, 3).

- Ocena makroskopowa w 8 dobie po zabiegu

Na skórze grzbietu u wszystkich zwierząt widoczna była linijna blizna, która w obydwu grupach nie dała się rozerwać nawet przy użyciu dużej siły. Po odparowaniu skóry grzbietu w tym miejscu widoczne

There was a surgery scar in the middle of each fragment. Tensile strength test of the fragments was carried out in Department of Strength of Materials, Materials Science and Technical Mechanics at University of Technology in Wrocław.

Breaking was carried out using Instron device, model 1126, of the following parameters:

- beam movement speed (v_b) = 2mm/min.,
- paper movement speed = 60mm/min.,
- measurement basis (a distance between the device clamps) $Lo = 40$ mm,
- dynamometer ranges = 0-2 [N]; 0-4 [N]; 0-10 [N]; 0-20 [N]; 0-40 [N].

The following measurements were made:

- a) breaking strength,
- b) tension.

Tension value [N/mm^2] was calculated from the following formula:

$$\eta = \frac{F}{a \times b}$$

F – maximal breaking strength,

a – material thickness,

b – material width.

RESULTS

Post-operative studies

None of the animals died during the experiment; all the animals demonstrated normal activity, appetite and appearance.

Pathomorphological studies

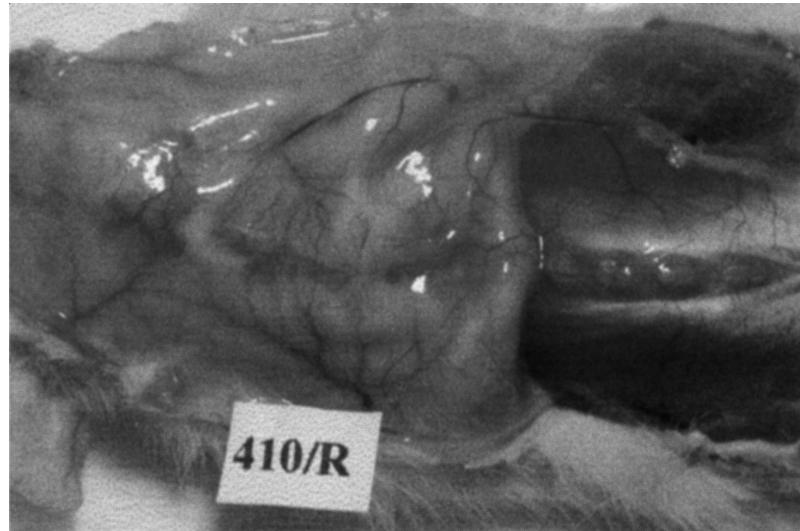
- Gross evaluation.
 - Macroscopic assessment on the 4th post-operative day.

All the animals had scars closed with simple interrupted stitches on the skin of their backs. When the stitches were removed, wound edges did not separate. In both groups (I and II), the scars were easily broken with a blunt pincette. The back skin was easily separated from the fascia.

In both groups, the hypodermis surrounding the wound contained white-greyish tissue with irregular edges. In the vicinity of the white-greyish tissue, single blue-red foci and dilated dark-red blood vessels were observed, being less numerous in Group II than in the control group (Fig. 2, 3).

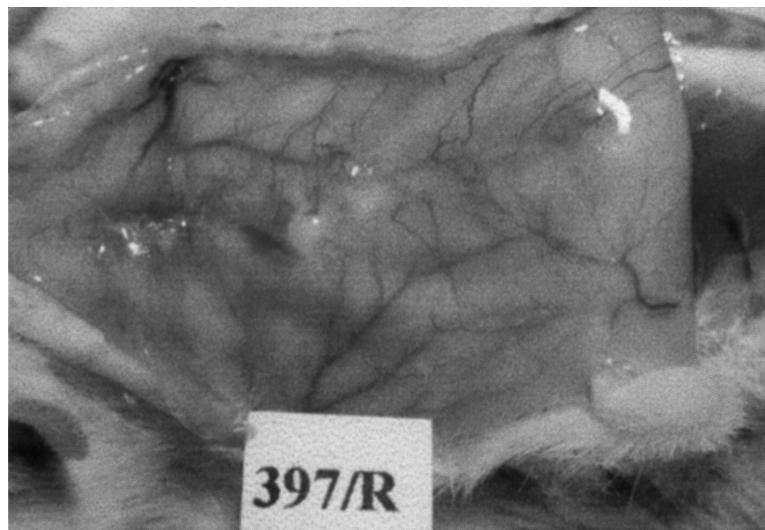
- Macroscopic assessment on the 8th post-operative day.

All the animals had a noticeable linear scar on the skin of their backs which in both groups was not broken, even when a strong force was applied. After the



Ryc. 2. Grupa I, 4 doba po operacji. Odpreparowana skóra grzbietu ze zmleczniem w centrum oraz widoczna w pobliżu ciemnoczerwona poszerzona sieć naczyń krewionośnych

Fig. 2. Group I, 4th post-operative day. Separated samples of back skin with whitening in the centre and a network of dilated blue-red blood vessels visible nearby



Ryc. 3. Grupa II, 4 doba po operacji. Odpreparowana skóra grzbietu ze zmleczniem w centrum oraz poszerzonymi ciemnoczerwonymi naczyniami krewionośnymi w pobliżu

Fig. 3. Group II, 4th day after surgery. Prepared samples of back skin with whitening in the centre and dilated blue-red blood vessels nearby

było zgrubienie i zmlecznie powięzi, od której można było oderwać skórę (Ryc. 4, 5).

W Grupie II w porównaniu z grupą kontrolną w skórze od strony powięzi poza nieznacznym zgrubieniem i szarobiaławym zabarwieniem w bezpośrednim sąsiedztwie blizny zmian patologicznych nie stwierdzono.

– Badania mikroskopowe

skin from the rats' backs was separated, a noticeable thickening and fascia whitening could be seen there, and the skin was easily separated from fascia (Fig. 4, 5).

In Group II, when compared to the control group, the skin surface overlying the fascia did not contain any pathological changes in the area near the scar except slight thickening and grey-whitish colouration.

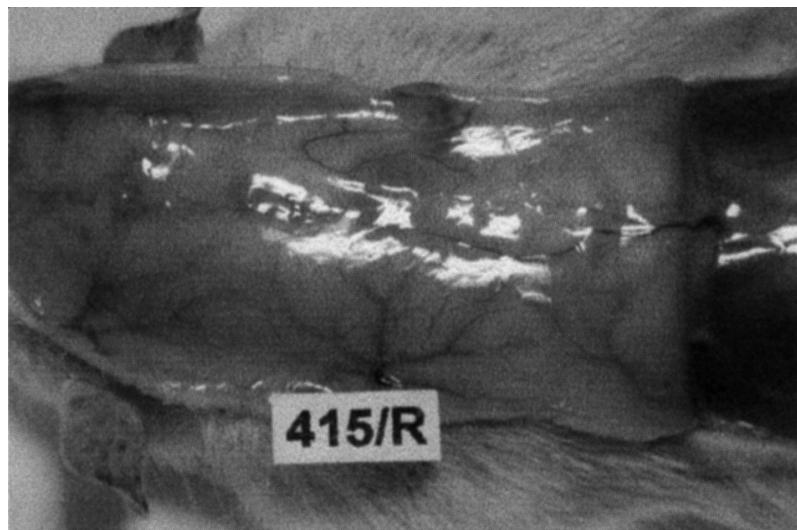
– Microscopic assessment.

Mikroskopia świetlna

W 4 dobie po zabiegu w Grupach I i II w preparatach histologicznych barwionych H. E. stwierdzono

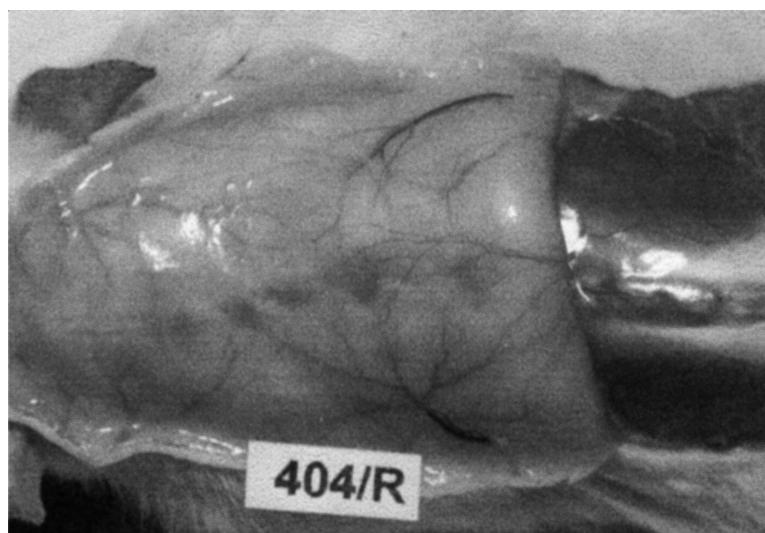
Light microscopy

On the 4th post-operative day, examination of H/E-stained histological specimens showed a well-



Ryc. 4. Grupa I, 8 doba po operacji. Odpreparowana skóra grzbietu, widoczne zmleczanie oraz w jego pobliżu poszerzone, ciemnoczerwone naczynia

Fig. 4. Group I, 8th day after surgery. Prepared samples of back skin, visible whitening and dilated blue-red vessels in the vicinity



Ryc. 5. Grupa II, 8 doba po operacji. Odpreparowana skóra grzbietu, w centrum widoczne nieznaczne przebarwienia. Pojedyncze, poszerzone naczynia krwionośne

Fig. 5. Group II, 8th day after surgery. Prepared samples of back skin, with slight discolourations visible in the centre. Isolated dilated blood vessels

ostro odgraniczoną pasmową przestrzeń wypełnioną włóknikowo-komórkową masą z nagromadzeniem elementów morfotycznych krwi, obejmującą całą grubość skóry. W pobliżu, w tkance widoczne były liczne poszerzone naczynia krwionośne, a także ogniskowe i rozlane nagromadzenia jednojądrzastych komórek typu limfocytu, mniej liczne fibroblasty i listwy śród-błonka, miejscami skanalizowane, świadczące o procesie organizacji łącznotkankowej. Na powierzchni, w okolicy przestrzeni wypełnionej wysiękiem włóknikowo-komórkowym, widoczne były bezpostaciowe, różowe masy nagromadzonych komórek z pyk-

defined streaky space filled with fibrinocellular mass and blood cells across the entire skin thickness. In the nearby tissue, many dilated blood vessels could be seen, as well as focal and diffuse accumulations of lymphocytic mononuclear cells, less numerous fibroblasts and endothelial strips with tubes in some places, which is evidence of connective tissue organization. On the surface, in the area of the space filled with the fibrinous-cellular exudate, one could see amorphous pink accumulations of cells with pyknotic and defragmented nuclei. No differences were noted between the groups. The cellular accumula-

notycznymi i rozfragmentowanymi jądrami komórkowymi. Nie stwierdzono różnic pomiędzy grupami. Opisane masy przylegały do nabłonka wielowarstwowego płaskiego skóry. Nabłonek w sąsiedztwie ubytku wykazywał znaczne poszerzenie warstwy rozrodczej i kolczystokomórkowej.

W 8 dniu od zabiegu w obydwu grupach w preparatach histologicznych barwionych H.E. stwierdzono pasmo bogatokomórkowej tkanki łącznej, dość ostro odgraniczonej, z licznymi komórkami jednojądrzastymi, głównie okrągłymi typu limfocytu, licznymi komórkami o podłużnym kształcie typu fibroblasta i fibrocyta, a także cienkościennymi naczyniami krwionośnymi. Opisane pasmo tkanki łącznej w Grupie II pokryte było prawie całkowicie wielowarstwowym nabłonkiem płaskim rogowacującym, a w Grupie I w centrum pokrywały go bezpłaciowe, różowobarwiące się masy. W Grupie II w większości przypadków stwierdzono całkowite pokrycie nabłonkiem wielowarstwowym płaskim rogowacującym. W Grupie I centrum nie było pokryte nabłonkiem.

Mikroskopia elektronowa

W 4 dniu od wykonanego zabiegu (w Grupie II w porównaniu z Grupą I) stwierdzono istotne pobudzenie populacji fibroblastów. Wyraźne wzbudzenie funkcji fibrogenetycznej fibroblastów dotyczyło strefy tkanki łącznej podnabłonkowej. Zaobserwowano rozbudowę ziarnistej siateczki śródplazmatycznej w postaci rozszerzonych cystern, licznych pęcherzyków i wyraźną rozbudowę frakcji rybosomalnej.

Ponadto obserwowano powierzchniowe zróżnicowanie struktur, co mogło być wyrazem istotnego wzbudzenia funkcjonalnego tych komórek. W pobliżu tych komórek zaobserwowano kształtujące się pojedyncze włókna kolagenowe, a niekiedy skupiające się w pęczki. Niektóre istniejące fibrocyty wykazywały oznaki apoptozy. W pobliżu owych degradujących komórek stwierdzono makrofagi oraz komórki tuczne. Stanowiło to wyraz istotnego wzbudzania mechanizmów immunologicznych związanych z procesem organizowania się nowej tkanki łącznej.

W 8 dniu od przeprowadzonego zabiegu w Grupie II w porównaniu z Grupą I obserwowano jeszcze wyraźniejsze wzbudzenie funkcji fibrogenetycznej fibroblastów. Notowano zorganizowane pokłady włókien kolagenowych. Wyraźna aktywność fibroblastów występowała w całej analizowanej strefie.

Podsumowując obraz tkanki łącznej rany chirurgicznej w mikroskopie elektronowym można stwierdzić, że nastąpił wyraźny postęp w organizacji nowej tkanki łącznej w grupach laserowanych (II), w porównaniu z grupami kontrolnymi (I).

tions were adjacent to squamous epithelium of the skin. The epithelium neighbouring the surgical wound demonstrated a significant widening of the generative and spinocellular layer.

On the 8th post-operative day, in both groups, the H/E-stained specimens contained strips of quite well-defined cell-rich connective tissue, with numerous mononuclear cells, mainly lymphocyte-type and round, numerous fibroblastic and fibrocytic oval cells, as well as thin-walled blood vessels. In Group II, the connective tissue strips were almost completely covered with stratified squamous cornifying epithelium, and in Group I, it was centrally covered with an amorphous pink-staining mass. In Group II, in most cases, complete covering with stratified squamous cornifying epithelium was observed. In Group I, the central part was not covered with epithelium.

Electron microscopy

On the 4th post-operative day, a considerable hyperactivity of the fibroblast population was observed in Group II compared with Group I. This marked induction of the fibrogenetic function of fibroblasts was seen in the subepithelial connective tissue area. The development of a grainy endoplasmic reticulum was noticed in the form of widened cisterns, numerous vesicles and a marked development of the ribosomal fraction.

Surface structural differentiation was also observed, which could be a sign of considerable functional stimulation of those cells. Single, or, occasionally, bundles of, collagen fibres were seen to form near those cells. Some of the existing fibrocytes were showing signs of apoptosis. Near those degrading cells, macrophages and mast cells were found. This was a sign of considerable stimulation of immune mechanisms associated with the organisation of new connective tissue.

On the 8th post-operative day, the induction of fibro-genetic function of fibroblasts was even more marked in Group II compared with Group I. Organized collagen fibres layers were noted. There was clear evidence of fibroblast activity across the whole analyzed area.

In summary, the appearance of connective tissue in the surgery wound under an electron microscope indicated significant progress in the organization of the new connective tissue in the laser treated group (II) compared to the control group (I).

Tab. 2. Średnie wartości wytrzymałości tkanki na zrywanie w Grupach I i II

Tab. 2. Mean tissue breaking strength in Group I and Group II

Termin sekcji Date of dissection	Grupy Groups	\bar{X}	s/sd	p
4 doba po operacji 4 post-operative day	I	0.034	0.022	0.29
	II	0.061	0.058	
8 doba po operacji 8 post-operative day	I	0.159	0.081	0.63
	II	0.147	0.052	

Tab. 3. Średnie wartości wytrzymałości tkanki na zrywanie w 4 i 8 dni po operacji

Tab. 3. Mean tissue breaking strength on fourth and eighth post-operative day

grupy groups	termin sekcji data of section	\bar{X}	s/sd	p
I	4 doba Day 4	0.034	0.022	0.001
	8 doba Day 8	0.159	0.081	
II	4 doba Day 4	0.061	0.058	0.001
	8 doba Day 8	0.147	0.052	

Badania wytrzymałości tkanki na zrywanie

Obserwując wytrzymałość tkanki na zrywanie nie stwierdzono w 4 dniu po operacji różnicy statystycznie istotnej pomiędzy średnimi wartościami wytrzymałości w Grupach I i II (Tab. 2). Również w 8 dniu po operacji nie stwierdzono różnicy statystycznie istotnej pomiędzy średnimi wartościami wytrzymałości w Grupach I i II.

W obu grupach stwierdzono różnice statystycznie istotne pomiędzy średnimi wartościami wytrzymałości otrzymanymi w 4 i 8 dniu po operacji (Tab. 3).

DYSKUSJA

W wykonanym eksperymencie doświadczalnym na zwierzętach wykazano, że stymulacja ran promieniowaniem laserowym z zakresu podczerwieni o pracy ciągłej nie oddziałuje negatywnie na jakość kola-genu w obszarze gojącej się rany, jak również intensyfikuje proces ich gojenia.

W ocenie makroskopowej rany w czwartej dobę po operacji w Grupach I i II zaobserwowano porównywalny zrost brzegów ran. W obydwu grupach dały się one rozerwać przy pomocy pęsety. W ósmej dobę po operacji w Grupach I i II stwierdzono powstanie blizny. Blizna w obydwu grupach nie dawała się rozerwać przy pomocy pęsety.

Zarówno w czwartej jak i w ósmej dobę w Grupie II obserwowano mniejszą liczbę lub brak wybroczyn krwawych. Petrovaw przeprowadzonym przez siebie eksperymencie uzyskała zbliżony obraz makroskopowy stymulowanej promieniowaniem laserowym z zakresu podczerwieni rany na skórze szczura [6]. Korolev i wsp. stymulując ranę skórę szczu-

Studies of tissue breaking strength

A breaking strength examination on the 4th post-operative day revealed no statistically significant differences in mean breaking strength between Groups I and II (Tab. 2). Examination on the 8th day after the surgery also failed to show statistically significant differences in mean breaking strength between Groups I and II.

In both groups, statistically significant differences in mean breaking strength were found between the 4th and 8th post-operative day (Tab. 3).

DISCUSSION

This animal study revealed that stimulating wounds with continuous-mode infra-red laser did not have any negative effect on the quality of the collagen in the area of the healing wound and, what is more, it intensified the healing process.

Gross examination of the wound on the 4th post-operative day revealed comparable adhesion of the wound edges in Group I and II. In both groups the edges could be broken with pincers. On the 8th post-operative day in Group I and II, scars were formed. The scars in both groups could not be broken with pincers.

Both on the 4th and 8th post-operative day, extravasation of blood was less numerous or absent in Group II. Petrova, in her experiment, obtained similar macroscopic appearances of a skin wound in a rat stimulated with infra-red laser light [6]. Korolev et al. stimulated skin wounds in rats with infra-red laser light, obtaining more rapid reduction of the wound surface in comparison with the control group [5]. These data are confirmed by the present study,

rów promieniowaniem laserowym z zakresu podczerwieni uzyskali w porównaniu z grupą kontrolną szybciej przebiegające zmniejszanie się powierzchni rany [5]. Znalazło to potwierdzenie we własnych badaniach, zwłaszcza w ocenie blizny w ósmej dobie po zabiegu. Obraz makroskopowy będący potwierdzeniem badań własnych uzyskali także Conlan i wsp., Simunovic i wsp. i Enwemeka i wsp. [11,12,13].

Inne wyniki opublikowali Smith i wsp. Wykonali eksperyment na szczurach, polegający na chirurgicznym wycięciu fragmentu skóry o znanych wymiarach na grzbicie zwierząt [10]. Prowadzili oni pomiary rozmiarów ubytku w grupie stymulowanej promieniowaniem laserowym z zakresu podczerwieni i w grupie kontrolnej. Autorzy nie stwierdzili różnic w pomiarach w grupie stymulowanej w stosunku do kontrolnej. Również Belkin i wsp. nie potwierdzają różnic opisywanych w badaniach własnych w obrazie makroskopowym [9].

Badania preparatów histologicznych pozwoliły stwierdzić w materiale ocenianym w czwartej dobie po zabiegu porównywalne nagromadzenie, dookoła wykonanego cięcia, komórek jednojądrzastych typu limfocytów, granulocytów i fibroblastów w grupie stymulowanej promieniowaniem laserowym z zakresem podczerwieni w odniesieniu do grupy kontrolnej. Liczebność listw śródblonka i rozwój sieci naczyń krwionośnych włosowatych były nieznacznie większe w Grupie II.

W materiale ocenianym w ósmej dobie po zabiegu wykazano intensywniejsze napełnianie wielowarstwowego, płaskiego nabłonka rogowiejącego i obecność liczniejszych listw śródblonkowych oraz skanalizowanych naczyń krwionośnych, włosowatych w Grupie II.

Preparaty histologiczne barwione metodą van Gieson wykazały w czwartej dobie po zabiegu porównywalną, a w ósmej dobie po zabiegu liczniejszą ilość włókien klejorodnych w materiale Grupy II. Petrova w przeprowadzonej ocenie mikroskopowej zaobserwowała różnice w wytwarzaniu sieci naczyń krwionośnych, włosowatych na korzyć grupy szczurów stymulowanych promieniowaniem laserowym z zakresem podczerwieni, co może świadczyć o intensywniejszym przebiegającym procesie gojenia się rany [6]. Skinner i wsp. stwierdzili wyraźną różnicę w ilości syntetyzowanego przez fibroblasty prokolagenu na korzyć materiału stymulowanego promieniowaniem laserowym z zakresem podczerwieni [14]. Badania prowadzone były metodą monitorowania syntezy znakowanej hydroksyproliny. Obraz ten odpowiada ocenie własnej badań preparatów barwionych metodą van Gieson. Zwiększone wytwarzanie włókien kolagenowych pod wpływem stymulacji światłem lasera z zakresem podczerwieni zaobserwowało niezależnie od

especially by the assessment of the scar on the 8th post-operative day. Macroscopic patterns consistent with the findings of the present study have also been obtained by Conlan et al., Simunovic et al. and Enwemeka et al. [11,12,13].

Contradictory results were published by Smith et al. who surgically resected a skin fragment of set dimensions in the back of rats and measured the size of the skin defect in a group stimulated with laser light and in a control group [10]. The authors did not find differences in measurements between the laser-stimulated group and to the control group. Also Belkin et al. did not confirm the macroscopic differences presented in this study [7].

Histological examinations on the 4th post-operative day revealed similar accumulations of lymphocytic, granulocytic and fibroblastic mononuclear cells around the resection area in the group stimulated with infra-red laser light and the control group. The number of endothelial strips and the development of a capillary network were slightly more marked than in Group II.

On the 8th post-operative day, more intensive penetration of stratified squamous cornifying epithelium and a greater number of endothelium strips and tube capillaries were observed in Group II.

Histological preparations stained with van Gieson's method showed more collagenous fibres in specimens from Group II on the 4th post-operative day. Petrova, in her microscopic assessment, observed differences in the development of capillary networks in favour of the group of rats stimulated with intra-red laser light, which can indicate greater intensity of the wound healing process [6]. Skinner et al. found a clear difference in the amount of pro-collagen synthesised by fibroblasts in favour of specimens stimulated with infra-red laser light [14]. The study was based on monitoring the synthesis of labelled hydroxyproline. Their findings correspond to our assessment of preparations stained with van Gieson's method. Increased production of collagen fibres in response to infrared laser light stimulation has been independently observed by many authors [5,11,13,15,16,17]. Other observed changes have included increased cell metabolism, structural changes within cell membranes and increased enzymatic activity [18,19,20,21].

However, it needs to be stressed that the present results were not confirmed in the study conducted by Smith et al., who did not find any effect of infra-red laser light on the process of wound healing [10]. Belkin et al., following their own observations concerning laser bio-stimulation, point out that the same effect on skin healing can be achieved by using narrow-range non-coherent light [9].

siebie wielu autorów [5,11,13,15,16,17]. Obserwano również zwiększenie metabolizmu komórek, zmiany strukturalne w obrębie błon komórkowych i zwiększenie aktywności enzymów [18,19,20,21].

Należy jednak podkreślić, że wyniki opisane powyżej nie znalazły potwierdzenia w badaniach przeprowadzonych przez Smith'a i wsp. [10]. Nie stwierdzili oni wpływu promieniowaniem laserowym z zakresu podczerwieni na przebieg procesu gojenia się rany. Belkin i wsp. kierując się własnymi obserwacjami dotyczącymi biostymulacji laserowej zwracają uwagę, że ten sam efekt w oddziaływaniu na proces gojenia się skóry możemy uzyskać stosując wąski zakres światła niekoherentnego [7].

Badania preparatów za pomocą mikroskopu elektronowego w czwartej i ósmej dobie po zabiegu wyraźnie przemawiają za stymulującym wpływem oddziaływania promieniowania laserowego z zakresu podczerwieni na proces gojenia się ran. W czwartej dobie po zabiegu, w Grupie II zwracają uwagę dwa procesy: pobudzenie czynności fibrogenetycznej fibroblastów i wzbudzenie mechanizmu immunologicznego. O pobudzeniu czynności fibogenetycznej fibroblastów świadczy rozbudowa ziarnistej siateczki śródplazmatycznej oraz rybosomów, jak również pojedyncze i skupiące się w pęczki włókna kolagenowe. Wzbudzenie mechanizmów immunologicznych związane jest z procesem powstawania nowej tkanki łącznej charakteryzującej się obecnością makrofagów i komórek tucznych w otoczeniu komórek ulegających apoptozie. Materiał stymulowany promieniowaniem laserowym z zakresu podczerwieni w ósmej dobie po zabiegu charakteryzuje się zwiększoną aktywnością fibroblastów i co z tym jest związane bardzo licznymi skupiskami włókien kolagenowych [22].

Mester i wsp. zaobserwowali w obrazie mikroskopii elektronowej w Grupie II zmiany w strukturze wewnętrznej fibroblastów, głównie mitochondriów, świadczące o ich zwiększonej aktywności [16,17]. Benedicenti stwierdził zwiększoną aktywność mitochondrium komórek stymulowanych promieniowaniem laserowym z zakresu podczerwieni w porównaniu z grupą kontrolną. Rezultatem pobudzenia ich aktywności było powstanie zwiększonej ilości ATP. Wyniki te potwierdzają obraz przedstawiony w mikroskopie elektronowym w badaniach własnych [23].

W badaniach własnych przeprowadzono próby wytrzymałości blizny na zrywanie i dokonano ich oceny statystycznej. Uzyskane wartości zarówno w czwartej, jak i ósmej dobie po zabiegu w przypadku Grupy II nie odbiegają od wartości uzyskanych w przypadku Grupy I. Nie stwierdza się różnic statystycznie istotnej pomiędzy grupami w poszczególnych dobach po zabiegu. Porównując wytrzymałość na zrywanie w czwar-

The results of the electron microscopy studies on the 4th and 8th post-operative day clearly support a stimulating effect of infra-red laser light on wound healing. On the 4th post-operative day, two processes in Group II merit attention: stimulation of the fibrogenetic activity of fibroblasts and stimulation of the immune mechanism. The sign of fibrogenetic activity of fibroblasts is the development of a grainy endoplasmic reticulum and ribosomes as well as the presence of single and bundled collagen fibres.

The induction of immune mechanisms is connected with the formation of new connective tissue, characterized by the presence of macrophages and mast cells in the vicinity of apoptotic cells. The samples stimulated with infra-red laser light was characterized by higher fibroblastic activity on the 8th post-operative day, and the associated presence of very numerous clusters of collagen fibres [22].

Mester et al. observed under an electron microscope, in Group II, changes in the internal structure of fibroblasts, mainly mitochondria, indicating their increased activity [16,17]. Benedicenti found increased activity of mitochondrial cells stimulated with infrared laser light in comparison with the control group [23]. Stimulation of their activity resulted in increased formation of ATP. These results support the electron microscopy data of the present study.

The present study involved tests of scar breaking strength and statistical analysis of their results. The data for Group II both on the 4th and 8th post-operative day do not differ from those in Group I. No statistically significant difference was found between the groups at the two time points. A comparison of breaking strength on the 4th and 8th post-operative day within each group revealed a similar, statistically significant difference in favour of the 8th day. The lack of differences suggests that in both groups, the collagen produced in wounds stimulated with infrared laser light is structurally normal.

tej i ósmej dobie w Grupie II oraz odpowiednio w Grupie I zaobserwowano istotną, zbliżoną do siebie statystycznie różnicę w obydwu grupach na korzyść doby ósmej. Brak różnic sugeruje, że w obu grupach powstały pod wpływem stymulowania promieniowaniem laserowym z zakresu podczerwieni kolagen jest ze względu na swoją strukturę pełnowartościowy.

WNIOSKI

1. Niskoenergetyczne promieniowanie laserowe z zakresu podczerwieni wpływa korzystnie na pokrycie blizny wielowarstwowym nabłonkiem płaskim rogowacującym i nie zaburza procesu gojenia się ran skóry.
2. Badania fizykomechaniczne na zrywanie nie wykazały wpływu na wytrzymałość blizny skóry poddanej stymulacji promieniowaniem laserowym z zakresu podczerwieni.
3. Stosowanie laseroterapii biostymulacyjnej we wczesnym okresie pooperacyjnym wpływa korzystnie na proces gojenia się rany, jest więc efektywną metodą ułatwiającą szybkie wprowadzanie fizyterapii. Jest również metodą bezpieczną dla procesu gojenia się ran.

PIŚMIENNICTWO/REFERENCES

1. Mika T, Kuszelewski Z. Ocena wpływu laseroterapii na wyniki usprawniania w chorobie zwyrodnieniowej stawów kolanowych. Post Rehabil 1994;8 (supl.1):255-258, Kongres Naukowy Polskiego Towarzystwa Rehabilitacji pt. „Rehabilitacja w urazach narządów ruchu” Warszawa 20-23.09.1992.
2. Kujawa J, Talar J, Gworys K, et al. Wpływ biostymulacji laserowej skojarzonej z wcierkami diclofenaku na wynik leczenia pacjentów z chorobą zwyrodnieniową stawu kolanowego. Fizjoterapia Polska 2004;3:185-93.
3. Pasek J, Misiak A, Mucha R, Pasek T, Sieroń A. Nowe możliwości w fizykoterapii – magnetolaseroterapia. Fizjoterapia Polska 2008;1:1-10.
4. Ufniaik B, Przybylski L, Śliwiński Z, Zagrobelny Z. Zastosowanie biostymulacji laserowej w leczeniu zatok szczękowych i czołowych. Fizjoterapia Polska 2001;4:346-53.
5. Korolev IN, Zagorskaia NZ. The effect of infrared laser radiation of different frequencies on the healing of skin wounds. Vopr Kurortol Fizjoter Lech Fiz Kult 1996;3:8-10.
6. Petrova MB. The morphofunctional characteristics of the healing of a skin wound in rats by exposure to low-intensity laser radiation. Morfologija 1992;102(6):112-21.
7. Cruz O. Influence of low level laser therapy on wound healing and its biological action upon myofibroblasts. Laser Surg Med 2003;32(3):239-44.
8. Pugliese LS, Medrado AP, Reis SR, Zde Andrade A. The influence of low-level laser therapy on biostimulation of collagen and elastic fibers. Pesqui Odontol Bras 2003;17(4):307-13.
9. Belkin M, Zaturunsky B, Schwartz M. A critical review of low energy laser bioeffects. Lasers and Light in Ophthalmology 1988;2:63-71.
10. Smith RJ, Birndorf M, Gluck G, Hammond D, Moore WD. The effect of low-energy laser on skin-flap survival in the rat and porcine animal models. Plast Reconstr Surg 1992;89(2):306-10.
11. Conlan MJ, Rapley JW, Cobb CM. Biostimulation of wound healing by low-energy laser irradiation. A Review J Clin Periodontol 1996;23(5):492-6.
12. Enwemecka CS, Parker JC, Dowdy DS, Harkness EE, Sanford LE, Woodruff LD. The efficacy of low-power lasers in tissue repair and pain control: a meta-analysis study. Photomed Laser Surg 2004;22(4):323-9.
13. Simunovic Z, Ivankovich AD, Depolo A. Wound healing of animal and human body sport and traffic accident injuries using low-level laser therapy treatment: a randomized clinical study of seventy-four patients with control group. Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery 2004;18(2):67-73.
14. Skinner SM, Gage JP, Wilce PA, Shaw RM. A preliminary study of the effects of laser radiation on collagen metabolism in cell culture. Aust Dent J 1996;41(3):188-92.
15. Bisht D, Gupta SC, Misra V, Mital VP, Sharma P. Effect of low intensity laser radiation on healing of open skin wounds in rats. Indian J Med Res 1994;100:43-6.

CONCLUSION

1. Low energy infra-red laser light irradiation has a positive effect on the covering of a scar with stratified squamous cornifying epithelium, and does not disturb the wound healing process.
2. Physio-mechanical studies of breaking strength showed no effect of skin scar stimulation with infra-red laser light on scar strength.
3. The use of bio-stimulating laser therapy in the early post-surgery period has a positive effect on wound healing, which makes it an effective method facilitating early initiation of kinesiotherapy. It is also a safe method that does not adversely affect wound healing.

16. Mester E. Enzymatic-histochemical study on stimulation of wound healing by laser rays. *Acta Chir Acad Sci Hungr* 1974; 15:203-207.
17. Mester E, Jassagi-Nagy E. The effect of laser radiation on wound healing and collagen synthesis. *Studia Biophys* 1973; 35(3):277-80.
18. Demidaś A, Koziarek A, Boerner E, Ratajczak B, Kochański M. Biostymulacyjne promieniowanie laserowe w regeneracji nerwu trójdzielnego. *Fizjoterapia Polska* 2004;2:129-35.
19. Kujawa J, Pyszczek I, Talar J, Janiszewski M. Porównawcza ocena skuteczności przeciwbólowej wybranych metod fizjoterapeutycznych w zespole bólowym dolnego odcinka kręgosłupa. *Fizjoterapia Polska* 2001;3:271-9.
20. Reddy GK. Biological basis and clinical role of low-intensity lasers In biology and medicine. *J Clin Laser Med Surg* 2004; 22(2):141-50.
21. Schwartz F, Brodie C, Appel E, Kazimirska G, Shainberg A. Effect of helium-neon laser irradiation on nerve growth factor synthesis and secretion in skeletal muscle cultures. *J Photochem Photobiol* 2002;66(3):195-200.
22. Boerner E, Ratajczak B, Królicka M, Jarosz K, Bieć. Terapia światłem laserowym w chorobie zwyrodnieniowej kręgosłupa szyjnego. *Fizjoterapia Polska* 2006;3:212-5.
23. Benedicenti A. La valutazione dell'incremento di ATP in linfociti sottoposti a biostimolazione con luce laser 904nm infrared. *Atlante di Laserterapia*, Ed Langa Grafica, Cuneo, 1982.

Liczba słów/Word count: 6541

Tabele/Tables: 3

Ryciny/Figures: 5

Piśmiennictwo/References: 23

Adres do korespondencji / Address for correspondence

Iga Krynicka

SZPL „PROVITA”

Wrocław, ul. Bierutowska 128, tel./fax: (0-71) 347-33-63, e-mail jaroslaw.fugiel@awf.wroc.pl

Otrzymano / Received

Zaakceptowano / Accepted

xx.xx.200x r.

xx.xx.200x r.