



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
WIEN
Vienna | Austria



Ludwig Boltzmann Institut
Experimentelle und Klinische Traumatologie

DIPLOMARBEIT

Untersuchungen zur Wirkung von Photobiomodulation mit unterschiedlichen Wellenlängen in einem diabetischen Mausmodell

Ausgeführt zum Zweck der Erlangung des akademischen Grades einer
Diplom-Ingenieurin unter der Leitung von

Univ.Doz. Univ.Prof. Dipl.-Ing. Dr.techn. Heinz Redl

E166

Institut für Verfahrenstechnik, Umwelttechnik und Technische
Biowissenschaften

Eingereicht an der Technischen Universität Wien
Fakultät für Technische Chemie

von

Dr. med. vet. Sanja Šutalo
Matrikelnummer: 0545094

Wien, April 2020

.....
Sanja Šutalo



Die approbierte gedruckte Originalversion dieser Diplomarbeit ist an der TU Wien Bibliothek verfügbar.
The approved original version of this thesis is available in print at TU Wien Bibliothek.

Kurzfassung

Diabetes stellt in den Industrienationen eine bedeutende Bedrohung dar. In Europa leiden etwa 60 Millionen Menschen an Diabetes und weltweit sterben jährlich etwa 3.4 Millionen Menschen an den Folgen dieser Krankheit.¹ Eine der größten Gefahren von Diabetes liegt in der dramatisch verschlechterten Wundheilung. 25% der Patienten entwickeln im Laufe ihres Lebens ein diabetisches Druckulcera.² Bis heute mangelt es jedoch an adäquaten Therapieoptionen. Aktuelle Literatur zeigt die positive Beeinflussung der Wundheilung von chronischen, diabetischen Ulcera durch die Behandlung mit Lasertherapie.³ Therapiegeräte auf Basis von LED-Technologie stellen jedoch vorteilhafte Alternativen dar.

In der vorliegenden Diplomarbeit wurde Lichttherapie mit unterschiedlicher Wellenlänge in einem diabetischen Wundheilungsmodell eingesetzt und die stimulierende Wirkung auf die Wundheilung untersucht. Photobiomodulation, auch als Low Level Licht-Therapie (LLLT) bekannt, ist eine medizinische Technik, bei der die Einwirkung von Low-Level Laserlicht oder Licht emittierende Dioden (LED) die Zellfunktion stimulieren soll, welche zu vorteilhaften klinischen Effekten führen kann. In der vorliegenden Studie wurde grünes (520 nm), blaues (470 nm) und rotes Licht (630 nm) pulsierendes LED-Licht angewandt. Die Wunden wurden planimetrisch erfasst, es erfolgte eine Auswertung mit dem Laser Doppler Imaging und eine histologische Aufarbeitung.

Es zeigte sich, dass durch Lichttherapie sowohl das Wundvolumen als auch die Wundgröße positiv beeinflusst werden konnte. Bei der Reduktion der Wundgröße konnte bei der Verwendung von Rotlicht der größte Effekt festgestellt werden, gefolgt vom grünen und blauen Licht. Um den besten Effekt der Photobiomodulation zu definieren, müssen einheitliche Behandlungsmethoden betreffend der Energiedichte, Dauer und Periode erstellt werden.



Die approbierte gedruckte Originalversion dieser Diplomarbeit ist an der TU Wien Bibliothek verfügbar.
The approved original version of this thesis is available in print at TU Wien Bibliothek.

Abstract

Incidence of diabetes has risen to an alarming rate. In the European region about 60 Million people are affected from diabetes and about 3.4 million people worldwide die annually from the consequences of enhance blood sugar levels.¹ Among patients diagnosed with diabetes the prevalence for diabetic foot ulcer is estimated to be 25%.² Those numbers emphasize the huge burden of impaired diabetic wound healing. However, to date no sufficient therapeutic options exist. Current literature shows the positive influence on wound healing of chronic, diabetic ulcers by treatment with laser therapy.³ However, therapy devices based on LED technology represent advantageous alternatives.

In the present diploma thesis, light therapy with different wavelengths was applied using a diabetic wound healing model and the stimulating effect on wound healing was analyzed. Photobiomodulation, also known as low level light therapy (LLLT), is a medical technique in which exposure to low-level laser light or light emitting diodes (LED) is intended to stimulate cell function, which may result in beneficial clinical effects. Green (520 nm), blue (470 nm) and red light (630 nm) were used, the laser was replaced by easier-to-use LEDs. The wounds were recorded planimetrically, they were evaluated with laser Doppler imaging and histological examination. It was shown that both, the wound volume and the wound size could be positively influenced by light therapy. When reducing the wound size, the greatest effect was found when using the red light, followed by the green and blue light. To get the best effect of photobiomodulation, uniform treatment methods regarding energy density, duration and period have to be created.



Die approbierte gedruckte Originalversion dieser Diplomarbeit ist an der TU Wien Bibliothek verfügbar.
The approved original version of this thesis is available in print at TU Wien Bibliothek.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Grundlagen	2
2.1.	Hautanatomie und Wundheilungsphasen.....	2
2.2.	Einteilung der Wunden nach Wundheilung	3
2.3.	Diabetes mellitus und Wundheilung	4
2.4.	Photobiomodulation und die ersten Anfänge	5
2.5.	Wirkmechanismus der Photobiomodulation	6
2.6.	Laser und Leuchtdioden (LEDs) in der Photobiomodulation	7
2.7.	Licht und Gewebeinteraktion... ..	12
3.	Material und Methoden	14
3.1.	Modelletablierung, Lepr db/db Mäuse	14
3.2.	Behandlung/Gruppen	14
3.3.	Humane Endpoints	16
3.4.	Auswertung.....	17
4.	Resultate	18
5.	Diskussion	23
6.	Referenzen	26

1. Einleitung

Im vorliegenden Projekt wird eine Therapie mit Licht unterschiedlicher Wellenlänge in einem diabetischen Wundheilungsmodell eingesetzt und die stimulierende Wirkung auf die Wundheilung untersucht. Es wird grünes (520 nm), blaues (470 nm) und rotes Licht (630 nm) verwendet.

Licht unterschiedlicher Wellenlänge wird seit über 50 Jahren in klinischen Ansätzen angewandt. Photobiomodulation, auch als Low Level Laser-Therapie (LLLT) bekannt, ist eine medizinische Technik, bei der die Einwirkung von Low-Level-Laserlicht oder Licht emittierender Dioden (LED) die Zellfunktion stimulieren soll, welche zu vorteilhaften klinischen Effekten führen kann. Eine stetig steigende Zahl von Arbeiten zeigt die positive Wirkung von Licht sowohl in vitro als auch in vivo. Die Photobiomodulation hängt neben der Wellenlänge und Leistung des Lichtes ebenfalls von verschiedenen Faktoren, wie z.B. Lage und Art der Wunde und dem physiologischen Zustand des Patienten ab. Photobiomodulation beschleunigt die Wundheilung und verbessert die Durchblutung.⁴ Dies ist insbesondere bei Erkrankungen, bei denen die Wundheilung durch mangelhafte Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff verschlechtert ist, von Bedeutung. Diabetes spielt hier als verbreitete Zivilisationskrankheit eine bedeutende Rolle. Schlechte Wundheilung ist eine der bedeutendsten chronischen Komplikationen bei Diabetes Mellitus und stellt das Resultat verschiedener Faktoren da: verminderte Kollagenproduktion und eingeschränkte Funktionalität von Fibroblasten, Leukozyten und Endothelzellen. Bereits durchgeführte Studien haben gezeigt, dass die Lasertherapie Schmerzen, Entzündungen und Schwellungen reduzieren, sowie die Wundheilung fördern kann.^{5 6} In Modellen diabetes-gestörter Wundheilung zeigte Lichttherapie eindrucksvolle Wirkung.^{7 8} Zudem zeigten Studien mit Photobiomodulation eine Freisetzung von Singulett-Sauerstoff, welcher für die effektive Reduzierung der mikrobiellen Last in den Wunden verantwortlich ist.⁹

Bislang wurden jedoch als Lichtquellen fast ausnahmslos Laser im roten und infraroten Spektralbereich in der Wundheilung eingesetzt. In der jetzigen Studie wurde der Laser durch leichter zu handhabende LEDs ersetzt. Mit LED lassen sich kleine, robuste Geräte bauen, die eine vernachlässigbare Temperaturerhöhung im Gewebe zeigen, dabei jedoch nahezu monochromatisch sind. In bereits durchgeführten Studien am Ludwig Boltzmann Institut konnte bereits gezeigt werden, dass Leuchtdioden (LED) eine wirksame Alternative zu Lasern darstellen können und kürzere Wellenlängen biologisch wirksam sein können. Die Daten zeigten, dass Behandlung mit LED-Licht zu vermehrtem Zellwachstum, verbesserter Wundheilung, zu verringerten Nekrosen und einer verbesserten Durchblutung der Wundareale führen.^{10 11 12} Der Einsatz von Licht-Therapie mittels LED zur Behandlung von Wunden in einem diabetischen in vivo Modell wurde bislang nur in wenigen Publikation mit polychromatischem Licht durchgeführt.¹³ Lichttherapie mittels LED wäre eine leicht zu applizierende, nicht invasive und kosteneffektive Alternative in der Wundheilung. So könnte zum Beispiel die Therapie mit niederenergetischem Licht eine effektive Variante als adjuvante Behandlungsform bei Problemwunden sein. Für die breite klinische Anwendung ist die Erforschung der zugrundeliegenden Mechanismen notwendig. Außerdem bedarf es noch einer Optimierung der klinisch angewandten Lichttherapien hinsichtlich Energie, Frequenz und Impulsdauer.

2. Grundlagen

2.1. Hautanatomie und Wundheilungsphasen

Die Haut besteht aus Epidermis, Dermis und den Hautanhangsorganen. Als äußerste Schicht wirkt die Epidermis (Oberhaut), trotz ihres geringen Durchmessers, wie ein Schutzschild. Die Epidermis ist nicht vaskularisiert, sie wird über Nährflüssigkeit, die aus tieferen Hautschichten stammt sowie über Hautkapillaren ernährt. Die dickere, vaskularisierte Dermis (Lederhaut) liegt unter der Epidermis und dient ihrer Versorgung und Unterstützung. Die Dermis besteht aus kollagenen, retikulären und elastischen Fasern, die in eine Grundsubstanz aus Mukopolysacchariden eingebettet sind. Fibroblasten, Makrophagen, Plasmazellen und Mastzellen sind in der Dermis weit verbreitet. Darüber hinaus enthält die Dermis Blut- und Lymphgefäße, Nerven, Haarfollikel, Drüsen, Drüsenausführungsgänge und glatte Muskelfasern. Unterhalb der Dermis liegt die Subkutis (Unterhaut). Die Subcutis besteht aus lockerem Binde- und Fettgewebe, in dem Nerven und Blutgefäße verlaufen. Die Aufgaben der Subkutis besteht darin, die Haut mit darunter liegenden Strukturen zu verbinden und eine gewisse Verschiebbarkeit zu gewährleisten. Sie dient der Energiespeicherung und der Wärmeisolation.^{14 15}

Unter einer Wunde versteht man einen pathologischen Zustand, bei dem Gewebe mit mehr oder minder ausgeprägtem Substanzverlust und entsprechender Funktionseinschränkung voneinander getrennt oder zerstört ist.

Die Wundheilung ist ein wichtiger biologischer Vorgang zur Wiederherstellung der Integrität der Haut nach Verletzungen. Die Wundheilung verläuft in Phasen, wobei je nach Literaturquelle 3 bis 4 Phasen mit unterschiedlicher Dauer angegeben werden. Die Wundheilung beginnt unmittelbar nach der Verletzung und besteht aus der: (1) Exsudationsphase, (2) Proliferationsphase, (3) Reparationsphase und (4) Maturationsphase. Die Phasen können dabei überlappend auftreten.¹⁶

Exsudationsphase, Reinigungsphase oder inflammatorische Phase (1. - 4. Tag): Blutstillung und Wundreinigung

Entzündungsvorgänge sind eine Schutzreaktion, die durch eine Schädigung des Gewebes ausgelöst wird. Die Phase macht sich äußerlich durch die Exsudation von Wundsekret bemerkbar, das austretende Blut und Gewebewasser füllen die Wundlücke auf. Nach einer Verletzung haften sich Thrombozyten an die geschädigten Stellen der Blut- und Lymphgefäße und aggregieren zu einem Thrombus. Aus diesem Thrombus werden vasokonstriktive Substanzen (Katecholamine, Serotonin, Bradykinin und Histamin) freigesetzt, die zusammen mit dem Thrombus die Blutstillung bewirken. Die Thrombozyten setzen zudem Gerinnungs- und Wachstumsfaktoren frei, die das intrinsische Gerinnungssystem aktivieren und die Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin bewirken. Das Netz aus Fibrinfasern wandelt das Thrombozytenaggregat in einen stabilen Thrombus um und ermöglicht so die Einwanderung von Zellen. Entzündungszellen (Lymphozyten, Neutrophile Granulozyten, Makrophagen) dienen der Abwehr von Keimen und der Entfernung abgestorbenen Gewebes. Sie setzen chemotaktische Stoffe und Wachstumsfaktoren frei. Bei chronischen Wunden ist diese Phase oft verlängert, weil bakterielle Entzündungsreaktionen die Wundheilung verlangsamen.

Proliferationsphase oder Granulationsphase (5. - 10. Tag): Bildung von Granulationsgewebe und Wundkontraktion

Die Phase ist geprägt durch die Neubildung von Gewebe (Angiogenese). Aus dem Wundrand sprießen Kapillaren in das Wundbett ein. Ortsständige Fibroblasten proliferieren und produzieren Proteoglykane und wasserunlösliche Kollagenfasern, wodurch ein gefäßreiches Bindegewebe, das Granulationsgewebe, entsteht. Ein Teil der Fibroblasten wandelt sich in Myofibroblasten um, diese enthalten kontraktile Elemente, welche die Kontraktion der Wundränder bewirken. Durch diese kann sich der Wunddurchmesser täglich bis zu 2 mm verkleinern. Das Granulationsgewebe ist an seiner roten körnigen Struktur erkennbar und bildet die Grundlage für die spätere Epithelisierung der Wunde.

Reparationsphase oder Epithelisierungsphase (11. - 21. Tag): Epithelisierung und Narbenbildung

Die Kollagenfasern werden vernetzt und stabilisiert. Das Granulationsgewebe wird wasser – und gefäßärmer. Keratinozyten wandern vom Wundrand auf den Granulationsrasen und bilden neues Epithel. Dadurch wird die offene granulierende Wunde in eine geschlossene epithelisierte Wunde überführt. In der Reparationsphase wird das Granulationsgewebe in Narbengewebe, wo die Hautanhangsgebilde fehlen, umgewandelt.

Maturationsphase (3 Wochen bis 2 Jahre): Narbenreifung

Diese Phase zählt mitunter auch zur Reparationsphase. In dieser Phase wird das unreife, mechanisch instabile Narbengewebe in ein reifes, widerstandsfähiges Narbengewebe umgewandelt. Nach etwa 3 Wochen hat das Narbengewebe ungefähr 20% der endgültigen Festigkeit erreicht, die maximale Belastbarkeit einer Narbe ist nach ca. 3 Monaten erreicht. Narbengewebe erreicht nie mehr die ursprüngliche Gewebefestigkeit, sondern nur etwa 80% davon. Die Rötung und Schwellung der Narbe nimmt ab und es entwickelt sich im Idealfall eine schmale, blasse Narbenlinie.^{17 18 19 20}

2.2. Einteilung der Wunden nach Wundheilung

Primäre Wundheilung

Bei der primären Wundheilung (Sanatio per primam intentionem) liegen die Wundränder einander an, die verschiedenen Gewebeschichten befinden sich auf beiden Seiten der Wunde auf gleicher Höhe und stehen in direktem Kontakt zueinander. Die typischen Beispiele einer primären Heilung sind zu finden bei chirurgischen Wunden, welche während des operativen Eingriffs gesetzt werden, sauberen Wunden ohne Fremdkörper, Keime oder Nekrosen und generell bei Wunden die durch saubere, scharfkantige Gegenstände verursacht werden. Der Heilungsverlauf ist kurz und das Resultat nach Abheilung ist eine strichförmige Narbe.

Verzögerte Primäre Wundheilung

Besteht ein Verdacht auf Wundkontamination (z.B. nach Trauma oder bei mit Fremdkörpern) wird die Haut nicht sofort verschlossen. Die Wunde wird offen mit feuchter Gaze behandelt und wenn sich in der Folge kein Wundinfekt ausbildet, kann die Wunde nach 4 – 7 Tagen sekundär

verschlossen werden. Dann verläuft die Wundheilung per primam intentionem. Bei Ausbildung eines offensichtlichen Wundinfektes wird die Wunde offen ausbehandelt und die Heilung erfolgt per secundam intentionem.

Sekundäre Wundheilung

Bei der sekundären Wundheilung (Sanatio per secundam intentionem) besteht ein großer Gewebedefekt, wo ein mechanischer Verschluss nicht möglich ist. Meistens sind es zerfetzte, klaffende Wunden, trophische Störungen, stark eiternde Wunden, Verschmutzung mit Fremdkörpern oder primär verschlossene, infizierte Wunden. Die Wunde heilt aus der Tiefe durch Granulation, Kontraktion und anschließender Epithelisierung. Das Granulationsgewebe wandelt sich später in Narbengewebe um und führt zu großflächigen, breiten Narben.^{21 22}

2.3. Diabetes mellitus und Wundheilung

Diabetes mellitus ist die häufigste Stoffwechselerkrankung in den westlichen Industrienationen, 2019 waren weltweit etwa 463 Millionen Menschen an Diabetes erkrankt. Mehr als 90 Prozent aller Menschen mit Diabetes leiden an Typ-2-Diabetes, der früher als Altersdiabetes bezeichnet wurde, wohingegen Typ-1-Diabetes die häufigste Stoffwechselerkrankung im Kindesalter ist.²³ Bei Typ-2-Diabetes sprechen die Körperzellen immer schlechter auf die Wirkung des Hormons Insulin an, sie werden gegen Insulin mehr und mehr resistent (Insulinresistenz).²⁴ Wie schon in der Einleitung erwähnt stellt die schlechte Wundheilung (Tabelle 1.) eine der bedeutendsten chronischen Komplikationen dar. Bei einer chronischen Wunde handelt es sich um eine Wunde, die trotz kausaler und sachgerechter lokaler Behandlung innerhalb von 8 bis 12 Wochen keine eindeutigen Heilungstendenzen zeigt. Unspezifische Hautveränderungen werden bei Diabetes mellitus meist durch nervale und subtile immunologische Störungen infolge der Mikro- und Makroangiopathie verursacht, sowie durch chronische Entzündungen, Hypoxie, einen gebremsten Insulinstoffwechsel an der Wundstelle oder einer Störung der Neuropeptidsignalübertragung. Die Makroangiopathie umfasst Erkrankungen der großen Arterien im Gehirn, am Herzen (Herzkrankarterien) und an den Beinen. Bei der Mikroangiopathie sind kleiner Blutgefäße mit möglichen Schäden an Nieren (Nephropathie), den Netzhäuten der Augen (Retinopathie), den Nerven (Neuropathie), dem Gehirn und dem Herzmuskel betroffen. Bei Diabetikern entwickeln sich arteriosklerotische Ablagerungen in den Blutgefäßen schneller als bei Gesunden. In der Folge entstehen im Laufe der Jahre Verengungen an arteriosklerotisch veränderten Stellen, das Risiko für Durchblutungsstörungen nimmt zu. Die Arteriosklerose tritt bei Diabetikern in einem früheren Alter als bei Nicht-Diabetikern auf, zeigt eine rasche Progredienz und führt häufig zu so schweren und fatalen Komplikationen wie Herzinfarkt, Schlaganfall und Fußgangrän (Gewebsbrand, Gewebsnekrose). Eine wichtige klinische Rolle spielt die funktionelle diabetische Mikroangiopathie an den Füßen, sie wird als wichtiger Faktor beim diabetischen Fußsyndrom (chronische Wunden an den Füßen) diskutiert. Periphere Neuropathie, Durchblutungsstörungen des Fußes und bakterielle Infektionen sind die drei wesentlichen Faktoren, die zum diabetischen Fußsyndrom beitragen, welcher bei 19–34% der Menschen mit Diabetes auftreten kann. 30-40% der Patienten haben eine Polyneuropathie, die Schmerzen an den Füßen werden gar nicht oder nur eingeschränkt wahrgenommen. Wunden, die dauerhaft bestehen und nicht heilen, können

langfristig eine Fuß- oder Beinamputation nötig werden lassen.^{25 26 27} 70% aller Amputationen weltweit werden auf Grund des Diabetischen Fußsyndroms durchgeführt, in Österreich sind es rund 3.000 Amputationen pro Jahr.²⁸

Ein weiterer Grund warum Wunden bei Menschen mit Diabetes schlechter heilen, könnte ein gebremster Insulinstoffwechsel an der Wundstelle sein. In einer Studie wurde die Haut von gentechnisch veränderten Fruchtfliegen untersucht, deren Insulinstoffwechsel dem des Menschen sehr ähnlich ist. Mit einem punktgenauen Laser wurden die Zellen der obersten Hautschicht entfernt und untersuchten diese. Direkt nach der Verletzung reagierten bei gesunden Fliegen die umliegenden Zellen mit der Bildung einer ringähnlichen Struktur aus Proteinen, welche sich zusammenziehen und so die entstandene Lücke schließen können. Dieser Proteinring wurde bei gestörtem Insulinstoffwechsel nur schwach und viel später ausgebildet. Dadurch war die Wundheilung unvollständig oder verlangsamt.²⁹

Angiopathisch/neuropathisch <ul style="list-style-type: none"> ▪ Diabetische Gangrän, neurotrophe Ulzera, Malum perforans ▪ Diabetische Dermopathie: braunrote Maculae besonders an den Unterschenkeln ▪ Rubeosis faciei: fleckige oder flächige, persistierende Gesichtsrötung 	Infektiös <ul style="list-style-type: none"> ▪ Neigung zu bakteriellen Infekten (z. B. Follikulitis, Furunkulose, Impetigo, Erysipel) ▪ Neigung zu mykotischen Infektionen (z. B. Candida-Mykosen, Tinea, Pityriasis versicolor)
Granulomatös <ul style="list-style-type: none"> ▪ Necrobiosis lipoidica: rotbräunliche Plaques, heilen zentral mit gelblicher (Lipideinlagerungen) Atrophie und Teleangiectasien, meist an Unterschenkelstreckseiten, meist Frauen ▪ Granuloma anulare disseminatum: disseminierte, livide, asymptomatische, teils randbetonte Infiltrate 	Sonstige <ul style="list-style-type: none"> ▪ Bullosis diabetica: große, straffe Blasen auf normaler Haut, besonders der Unterschenkel, spontan oder nach geringen Traumen entstehend ▪ Purpura: wegen erhöhter Gefäßfragilität Einblutungen nach geringen Traumen ▪ Acanthosis nigricans benigna: schmutzig graue Papeln axillär, submammär, inguinal ▪ Pruritus, Prurigo simplex subacuta, Verstärkung einer Psoriasis

Tabelle 1. Hautveränderungen bei Diabetes mellitus

Referenz: D. Terhorst-Molawi, "Basics Dermatologie", Elsevier, 5. Auflage, 2019.

2.4. Photobiomodulation und die ersten Anfänge

Die Photobiomodulation (PBM) ist eine Behandlungsmethode, bei der durch Bestrahlung mit bestimmten Wellenlängen im roten oder nahen Infrarotlicht bestimmte physiologische Wirkungen in Zellen, Geweben von Tieren und Menschen erzeugt werden.

Seit mehr als dreitausend Jahren wurde Sonnenlicht von den alten Ägyptern und Indern als medizinische Behandlung (Heliotherapie) für eine Vielzahl von Krankheiten verwendet.³⁰

Der therapeutische Einsatz von Lichtenergie wurde im späten 19. Jahrhundert mehr geschätzt, damals hat der dänische Arzt Niels Ryberg Finsen die Vorteile von rotem und blauem Licht in der Behandlung von Lupus vulgaris demonstriert und erhielt dafür 1903 den Nobelpreis für Medizin und Physiologie.³¹ Im Jahre 1967 berichtete der ungarischer Mediziner Endre Mester, dass niedrig dosierte Laserbehandlungen die Wundheilung und das Haarwachstums bei Mäusen fördert.^{32 33}

Er nannte dieses Phänomen Photostimulation und zeigte die Wirksamkeit dieser Behandlung bei Patienten mit Ulzera.³⁴

Diese Behandlung wird heutzutage als "Photobiomodulation" (PBM) bezeichnet und seit 2014 vom Nordamerikanischen Verband für Lichttherapie und dem Weltverband für Lasertherapie gefördert. In der Literatur sind weit mehr als 60 Bezeichnungen zu finden, "Low-Level-Lasertherapie" (LLLT) war der am häufigsten verwendete Begriff, gefolgt von "Kaltlicht-Lasertherapie". Die Verwendung von "Photobiomodulation" wird bevorzugt. Erstens impliziert PBM nicht, dass ein Laser für den Therapieerfolg erforderlich ist. Zweitens impliziert PBM, dass die therapeutischen Wirkungen in einigen Fällen sowohl auf Hemmeffekte als auch auf die üblicheren Stimulationseffekte zurückzuführen sind.

2.5. Wirkmechanismus der Photobiomodulation

Die vier wichtigsten biologischen Reaktionen, die durch PBM hervorgerufen werden, umfassen die Verminderung von Schmerzen und Entzündungen, eine modulierte Immunantwort sowie die Heilung und Regeneration des Gewebes.³⁵ Die Photobiomodulationstherapie ist definiert als die Nutzung nichtionisierender elektromagnetischer Energie zur Auslösung photochemischer Veränderungen in zellulären Strukturen, die für Photonen empfänglich sind. Es existieren verschiedene Hypothesen zum Wirkungsmechanismus der Photobiomodulation, eine zentrale Bedeutung nimmt der Einfluss des Lichts auf die Mitochondrien (Abbildung 1.) an. Die Energie des sichtbaren roten und nahen Infrarotlichts (NIR) wird von den Mitochondrien absorbiert, es kommt zu einer direkten Aktivierung von Cytochrom C, ein Chromophor, welches ein Schlüsselenzym der mitochondrialen Atmungskette darstellt und Photonenenergie bestimmter Wellenlängen akzeptiert.^{36 37} Das Wirkungsspektrum liegt im Bereich zwischen 580 und 700 nm, mit diskreten Spitzen bei 635 und 730 nm.^{38 39} Der so gesteigerte zelluläre Metabolismus führt zu einer erhöhten Produktion von ATP (Adenosin-Triphosphat), Radiokalfängern wie ROS (Reactive Oxygen Species) und Transkriptionsfaktoren wie AP-1 und NF-kP, die zur Gen-Transkription und dann zur Zellreparatur und Heilung führen.^{40 41} Der Prozess löst auch die Kette, die durch Stickoxid (NO) besetzt ist. Das Stickoxid wird dann wieder in das System abgegeben. Stickoxid ist ein Molekül, das unser Körper produziert, um seinen Zellen zu helfen, miteinander zu kommunizieren. Diese Kommunikation erfolgt durch die Übertragung von Signalen im gesamten Körper. Darüber hinaus hilft Stickoxid, die Blutgefäße zu erweitern und die Durchblutung zu verbessern.⁴² Die erhöhte Proteinsynthese triggert weitere zelluläre Down-Stream Effekte wie erhöhte Zellmigration und Proliferation, beeinflusst die Ausschüttung verschiedenster Zytokine und Wachstumsfaktoren.⁴³

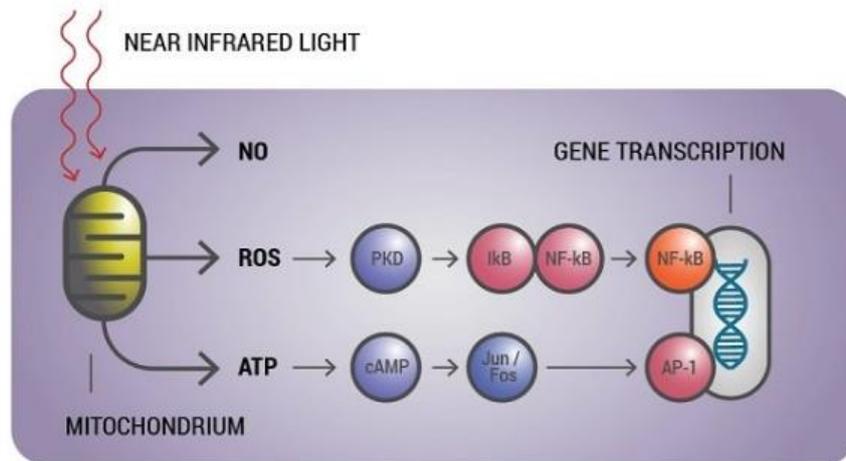


Abbildung 1. Molekularer Wirkmechanismus der Photobiomodulation.
Referenz: Huang et al. „Basic Photomedicine“, Harvard Medical School.

Ein weiterer entscheidender extrazellulärer Mechanismus ist die Aktivierung eines Wachstumshormons TGF- β . Das PBM-induzierte ROS wird von einem redoxsensitiven Methionin erfasst, welches zu einer Änderung ins TGF- β 1 führt.⁴⁴ Dessen Aktivierung stellt eine zentrale Rolle in der Wundheilung dar, da es eine große Anzahl von Zellen im Wundmilieu beeinflusst, einschließlich der Blutstillung (platelet-derived TGF- β), Entzündungszellen (macrophage-derived TGF- β) und der Einfluss auf die extrazelluläre Matrix (latentes TGF- β bindendes Protein assoziiert TGF- β 1-Sequestrierung in der Matrix).

Eine direkte Wirkung von PBM auf Schmerz- und Entzündungsmediatoren wie Histamin, Serotonin, Bradykinin und Prostaglandine wurde dokumentiert.⁴⁵ PBM-Behandlungen können die Epithelmigration und -proliferation, die Endothelmigration und -organisation für die Angiogenese, entzündliche Infiltration, Makrophagenphagozytose, Immunüberwachung, Fibroblastenmatrixsynthese und Wundkontraktion fördern.⁴⁶

2.6. Laser und Leuchtdioden (LEDs) in der Photobiomodulation

Die Abkürzung Laser steht für Light amplification by stimulated emission of radiation. Laser sind Lichtquellen, die das physikalische Phänomen der stimulierten Emission nutzen, um einen monochromen und kohärenten Lichtstrahl mit geringer Divergenz zu erzeugen. Der erste Laser wurde 1960 von Theodore Maiman erfunden.⁴⁷ Laserstrahlung (Abbildung 2.) wird erzeugt, indem man Atome durch das Einstrahlen von Licht in einem Glasrohr in einen metastabilen, angeregten Zustand überführt. Dabei kreisen die Elektronen auf Orbitalen eines höheren Energieniveaus. Durch ein Lichtquant (Photon) einer bestimmten Frequenz werden alle Atome gleichzeitig zur Emission von Licht stimuliert (Populationsinversion). Dabei fallen die angeregten Atome wieder in ihren Grundzustand zurück und senden dabei ein Photon der identischen Energie (also identischer Wellenlänge und Frequenz) wie das stimulierende Photon aus. Dabei entsteht Licht von großer Lichtstärke, welches sich extrem gut parallelisieren lässt.⁴⁸ An beiden Enden angebrachte Spiegel des Laserresonators lassen das Licht hin und her springen, während die Pumpleistung weiterhin zu einer signifikanten Verstärkung führt. Einer der Spiegel ist nur teilweise reflektierend, damit der Laserstrahl aus dem Hohlraum austreten kann.

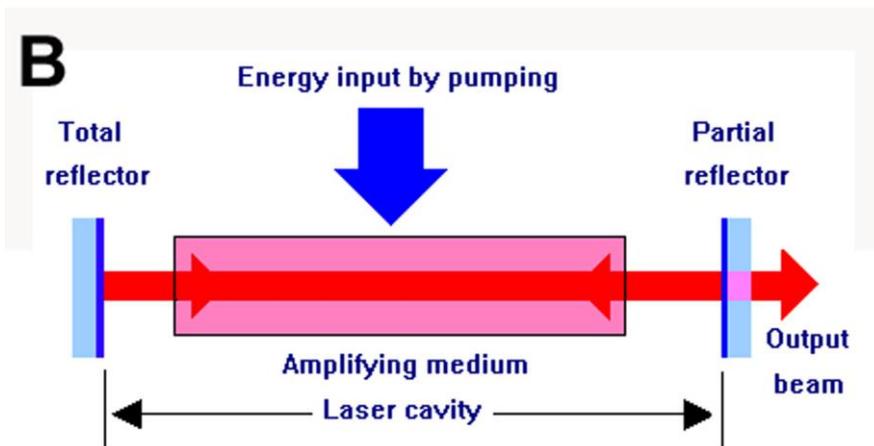
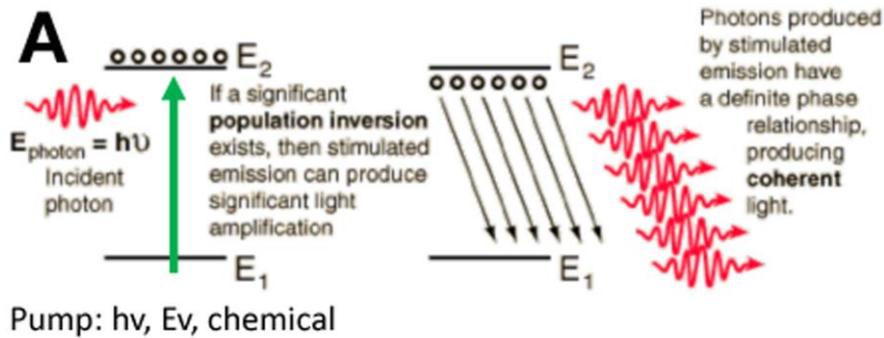


Abbildung 2. Grundlegende Funktionsweise eines Lasers.

Referenz: Heiskanen et Hamblin „Photobiomodulation: Lasers vs Light Emitting Diodes?“
Photochemical & Photobiological Sciences, 2018.

Bis heute wurden mehr als 3500 wissenschaftliche Artikel zur Photobiomodulation veröffentlicht. Praktisch die gesamte Photobiomodulationsforschung vor dem 21. Jahrhundert beruhte auf Laser, in ca. 85–90% der ursprünglichen Forschung wurde Laser als Lichtquellen verwendet. Diese laserfokussierte Verwendung in der Photobiomodulation war der Grund für die Annahme, dass die positiven physiologischen Wirkungen von rotem und nahem Infrarotlicht irgendwie im Zusammenhang stehen mit den Lasereigenschaften, wie Monochromatizität, Kohärenz, Kollimation oder Polarisierung. Dies ist nach heutigem Kenntnisstand durchaus umstritten und wird kritisch diskutiert.

Leuchtdioden (LEDs) sind Lichtquellen, die auf dem Phänomen von Elektrolumineszenz von Halbleitermaterialien basieren, meist InGaN (60%) und AlInGaP (38%).⁴⁹ Die ersten historischen Berichte über LEDs stammen von Henry Joseph Round und Oleg Vladimirovich Losev in den Jahren 1907 und 1927. Diese Wissenschaftler zeigten, dass die Kristalle von Siliziumkarbid (SiC), beim Durchgang eines elektrischen Stroms durch das Halbleitermaterial, glühten. Nick Holonyak Jr. erfand 1962 als beratender Wissenschaftler in New York die erste sichtbare LED Diode.⁵⁰ LED-PBM erscheint erst seit 2001 regelmäßig in der Literatur auf. Damals wurden sie noch als NASA-LEDs bezeichnet, denn die Entwicklung dieser LEDs wurde der US NASA finanziert, als Lichtquelle für Pflanzen-Wachstumsexperimente im Weltraum.⁵¹ Heutzutage werden LEDs in der Photobiomodulation und anderen Gesundheitsbereichen eingesetzt und ihre Wirksamkeit wurde in vielen Berichten nachgewiesen.⁵²

Das Grundprinzip (Abbildung 3.) der Funktionsweise bei LEDs und Diodenlasern ist das gleiche, es wird als PIN-Halbleiterdiode bezeichnet. Wirkt ein elektrisches Potential auf den Halbleiter ein, kommt es zur Trennung in Elektronen im N(negativen)-Abschnitt und Löcher im P(positiven)-Abschnitt. Wenn sich die Elektronen und Löcher im I(intrinsischen)-Abschnitt wiedervereinen, entsteht Licht, dessen Wellenlänge von der Elektronenenergie abhängt. Zur Herstellung einer Laserdiode wird außen an der PIN-Diode ein Wellenleiter angelegt, der die gleiche Wirkweise hat wie die Spiegel in der traditionellen Laserkavität. LED-Lichtemission basiert auf nicht-thermischer Lichtemission.

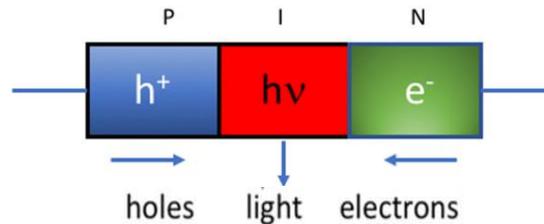


Abbildung 3. Grundstruktur einer LED.

Referenz: Heiskanen et Hamblin „Photobiomodulation: Lasers vs Light Emitting Diodes?“
Photochemical & Photobiological Sciences, 2018.

Ein wichtiger Unterschied zwischen Laser- und LED-Licht ist die Bandbreite. Laser können eine sehr schmale Bandbreite haben, in Gaslasern z.B. kann es ein Bruchteil eines Nanometers sein, während in Diodenlasern die Bandbreite typischerweise bei 1–2 nm liegt. LEDs sind im Durchschnitt viel günstiger als Lasergeräte. Als Faustregel gilt, dass die Kosten pro mW optischer Leistung für LEDs im Vergleich zu Lasern ungefähr hundertmal niedriger sind. Des Weiteren können mehrere LEDs ebenflächig angeordnet werden, dies vergrößert die Strahlfläche erheblich und erleichtert die Behandlung großer Körperbereiche. Dies ist bei Lasern mit Punktgrößen und kleinen Flächen beschränkt.

Die einzige Begrenzung für die Ausgangsleistung einer LED Anordnung ist die Notwendigkeit Wärme von den eigentlichen Dioden zu entfernen. Da die typische LED bei der Umwandlung von elektrischer Energie in Lichtenergie nur einen Wirkungsgrad von 20–30% aufweist, wird Wärme erzeugt und übermäßige Wärme kann zu einer Verschlechterung des Halbleitermaterials und einer Verkürzung seiner Lebensdauer führen. Die Wärmeabfuhr erfolgt über Kühlkörper (wärmeleitende Metallsubstrate) oder in einigen Fällen durch Einbau eines kleinen Lüfters zur Kühlung der Dioden.

Es gibt mehrere Eigenschaften von Lasern, von denen Befürworter behaupten, dass sie Gründe dafür sind, warum Laserlicht gegenüber dem LED-Licht für PBM überlegen ist. Die am häufigsten diskutierte Eigenschaft ist die Kohärenz. Laservorrichtungen erzeugen kohärentes Licht mit verschiedenen Kohärenzlängen in Abhängigkeit von der Bandbreite des spezifischen Lasers. Wenn kohärentes Laserlicht mit Gewebe interagiert, führen kleine Unebenheiten in der Gewebestruktur zu unterschiedlichen Phasen in den einzelnen Wellenfronten, die zu gegenseitigen Interferenzmustern führen. Diese Interferenzmuster werden als "Laser-Speckle" bezeichnet und die Größe der Speckle hängt von der Wellenlänge des Lichts ab. Im sichtbaren Bereich haben Speckle einen Durchmesser von weniger als 1 Mikron. Subzelluläre Organellen, wie

Mitochondrien, haben Dimensionen dieser Größenordnung und eine Theorie besagt, dass diese Laser Flecken die Mitochondrien besser stimulieren können als nicht kohärentes LED-Licht.^{53 54 55} Eine verbreitete Behauptung besagt, dass Laser tiefer als LEDs eindringen. Die Gewebetiefe bei der eine Schwellenleistungsdichte erhalten wird, steht in direktem Zusammenhang mit der Leistungsdichte auf der Oberfläche. Die tatsächliche Energiemenge, die bis in die Tiefe vordringt, ist nur ein Bruchteil, da die Impulse nur einen kleinen Bruchteil der Zeit "an" sind. Eine andere Möglichkeit, gepulstes Licht (Abbildung 4.) zu erzeugen, besteht einfach darin, den Strahl zu "hacken", das Gerät ein- und auszuschalten. In einem Reviewsartikel wurde der Effekt des Pulses in der PBM untersucht und festgestellt, dass gepulstes Licht andere Effekte hat als Dauerlicht. Es sind jedoch weitere Untersuchungen erforderlich, um diese Effekte für verschiedene Krankheitszustände und Pulsstrukturen zu definieren.⁵⁶

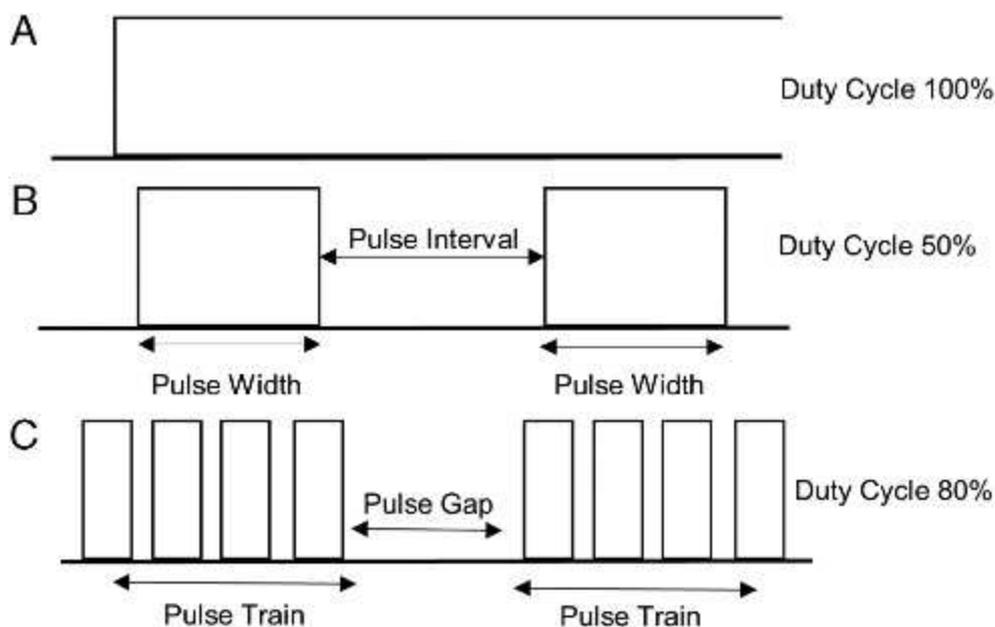


Abbildung 4. Die Betriebsarten der Lichtquelle können kontinuierlich oder gepulst sein.
Referenz: Mosca et al. „Photobiomodulation Therapy for Wound Care: A Potent, Noninvasive, Photochemical Approach.“, *Advances in Skin & Wound Care*, 2019.

In einigen veröffentlichten Studien und Übersichtsartikeln wurde betont, dass die Photobiomodulation ein „photobiologisches Phänomen“ ist und Kohärenz nicht unbedingt erforderlich ist.^{57 58 59} Einige In-Vitro-Studien mit Zellkulturen haben ergeben, dass Kohärenz für photobiologische Wirkungen von rotem Licht nicht erforderlich ist.^{60 61}

Die meisten Vergleiche (Abbildung 5.) zwischen den LED- und Laserstudien weisen ein sehr hohes Verzerrungsrisiko auf, da sich die Schlüsselparameter unterscheiden. In fast jeder Studie sind die Wellenlängen, Ausgangsleistungen und Punktgrößen zwischen den Gruppen unterschiedlich, was es unmöglich macht, verlässliche Vergleiche zu machen. Trotz dieser bemerkenswerten Mängel deuten die meisten dieser Vergleiche darauf hin, dass Laser tatsächlich durch LEDs ersetzt werden könnten, ohne die Ergebnisse wesentlich zu verschlechtern.

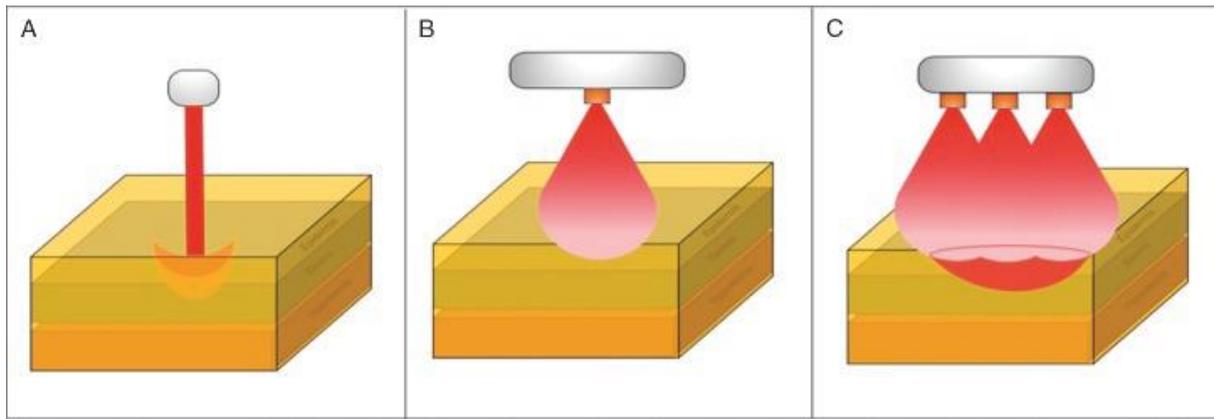


Abbildung 5. Beleuchtung von Gewebe: Laser(A), Single-LED (B), Mehrfach-LED-Anordnung (C).
 Referenz: Mosca et al. „Photobiomodulation Therapy for Wound Care: A Potent, Noninvasive, Photoceutical Approach“, Advances in Skin & Wound Care, 2019.

Zu den Eigenschaften der Geräte zählt eine Ausgangsleistung von 0.001 bis 0.1 Watt, die Wellenlänge befindet sich im Bereich zwischen 300 und 10600 nm, einer Pulsfrequenz von 0 bis zu 5000 Hertz (Zyklen pro Sekunde), einer Intensität von 0.01-10 W/cm² und der Dosis von 0.01 bis 100 J/cm².⁶²

Das Gerät muss das Licht mit einer bestimmten Leistungsdichte (Lichtintensität) emittieren, die richtige Wellenlänge und den idealen Abstand zum Körper aufweisen.

Die Dosis (Expositionsdauer) wird berechnet durch:

$$\text{Leistungsdichte (mW/cm}^2\text{)} \times \text{time (in seconds)} \times 0.001 = \text{Dosis (J/cm}^2\text{)}$$

Die Dosis, die wir anstreben, liegt zwischen 2 J/cm² und 25 J/cm².⁶³ Je nachdem, ob oberflächliche Bereiche wie Haut- oder Oberflächenwunden oder tiefere Gewebe wie Muskeln/Organe behandelt werden, sind unterschiedliche Dosen erforderlich.

Bei Hautproblemen wollen wir eine relativ niedrige Gesamtdosis von ungefähr 3-15 J. Es gibt auch Hinweise darauf, dass niedrigere Leistungsdichten (unter 50 mW/cm²) für die Behandlung der Haut optimaler sind als sehr hohe Leistungsdichten. Zur Behandlung tiefer Gewebe benötigt man höhere Dosen und eine höhere Leistungsdichte (Lichtintensität) für optimale Effekte. Eine Dosis von 10-40 J wird angestrebt.

Die richtige Dosis zu verwenden ist entscheidend, da mit einer zu niedrigen Lichttherapie zu wenig oder kein Nutzen geben ist, aber auf der anderen Seite mit zu viel kann der Nutzen zunichte gemacht werden. Dieses kann man am besten mit der zweiphasigen Dosis-Wirkung Kurve veranschaulichen (Abbildung 6. und 7.).

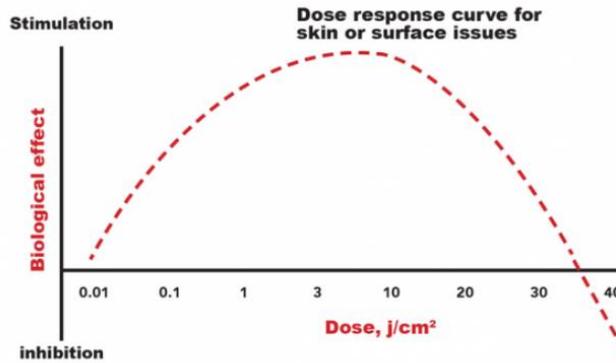


Abbildung 6. Allgemeiner optimaler Dosisbereich für Hautbehandlungen mit rotem Licht.

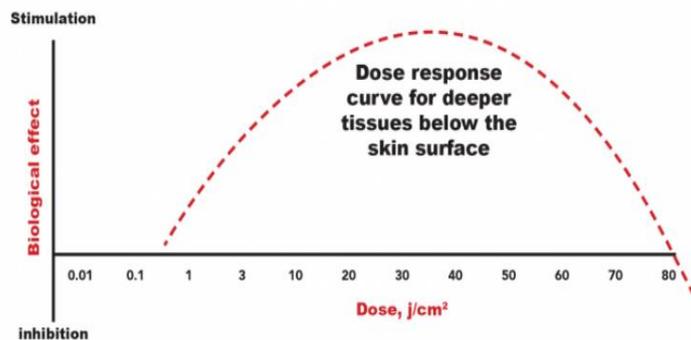


Abbildung 7. Allgemeiner optimaler Dosisbereich für tiefer liegende Gewebe mit rotem Licht.
Referenz: Whitten "The Ultimate Guide To Red Light Therapy And Near-Infrared Light Therapy", 2018.

2.7. Licht und Gewebeinteraktion

Licht-Gewebe-Wechselwirkungen lassen sich grob in vier Prozesse einteilen: Absorption, Reflexion, Streuung und Transmission. Zur Klassifizierung des therapeutischen Nutzens können diese Wechselwirkungen grob in produktive (Absorption und Streuung) oder nicht produktive (Reflexion und Transmission) unterteilt werden.⁶⁴ Transmission ist der nicht interaktive Durchgang eines Photons durch das biologische Gewebe. Dies wird normalerweise bei energiereichen Photonen beobachtet und wird nicht direkt für die PBM verwendet. Die Reflexion variiert mit dem Einfallswinkel des Lichtstrahls, die geringste Reflexion tritt auf wenn der Behandlungsstrahl senkrecht zum Gewebe ist.⁶⁵ Streuung ist das Ergebnis der Gewebheterogenität. Dieser Prozess tritt auf, wenn das einfallende Photon seine Ausbreitungsrichtung, aufgrund von Unterschieden des Brechungsindizes, ändert. Durch die Streuung kann sich das einfallende Licht ausbreiten, die Penetration wird jedoch zunehmend verringert, wodurch die Tiefe der Behandlung begrenzt wird. Unter den Molekülen hat man Kollagen vorwiegend für die Lichtstreuung verantwortlich gemacht. Die Fähigkeit der Dermis, als Trübungsmatrix zu wirken, führt zu einer Streuung, die in einer inversen Funktion der Wellenlänge resultiert. Dies impliziert, dass kürzere Wellenlängen die größte Streuung aufweisen, die Eindringtiefe begrenzen und die Möglichkeit der Absorption erhöhen.

Die Wirksamkeit der Licht-Gewebe Penetration (Abbildung 8.) ist vorwiegend mit den Absorptionsspektren von drei biologischen Chromophoren assoziiert: Melanin in der Epidermis, Hämoglobin (Oxyhämoglobin und Desoxyhämoglobin) in den Blutgefäßen der Dermis und Wasser im gesamten Gewebe. Blaue Wellenlängen (435–500 nm) werden von Melanin, Blut und Porphyrinen absorbiert. Rote Wellenlängen (620–750 nm) dringen tiefer ein, da sie weniger von Blut und Melanin absorbiert werden. Diese Hauptchromophore haben die geringste Auswirkung (Absorption) im nahen Infrarot (750–950 nm), wo Wasser an Bedeutung gewinnt. Wenn im Gewebe keine wellenlängenspezifischen Chromophore vorhanden sind, durchlaufen die Photonen das Gewebe als Gesamttransmission, ohne dass biologische Effekte auftreten. Die Eindringtiefe einer gegebenen Lichtquelle ist das Ergebnis von seiner inhärenten wellenlängenabhängigen Photonenenergie und dem Vorhandensein von relevanten biologischen Chromophoren.^{66 67} Die effektive Lichtpenetration ist gleich dem Inversen des wellenlängenspezifischen Gewebeabsorptionskoeffizienten. Bevorzugt werden rote und blaue Wellenlängen (geringe Penetration, hohe Absorption) zur Behandlung von oberflächlichen Geweben verwendet, während NIR (geringe Absorption, hohe Penetration) zur tieferen Behandlung bevorzugt wird.⁶⁸

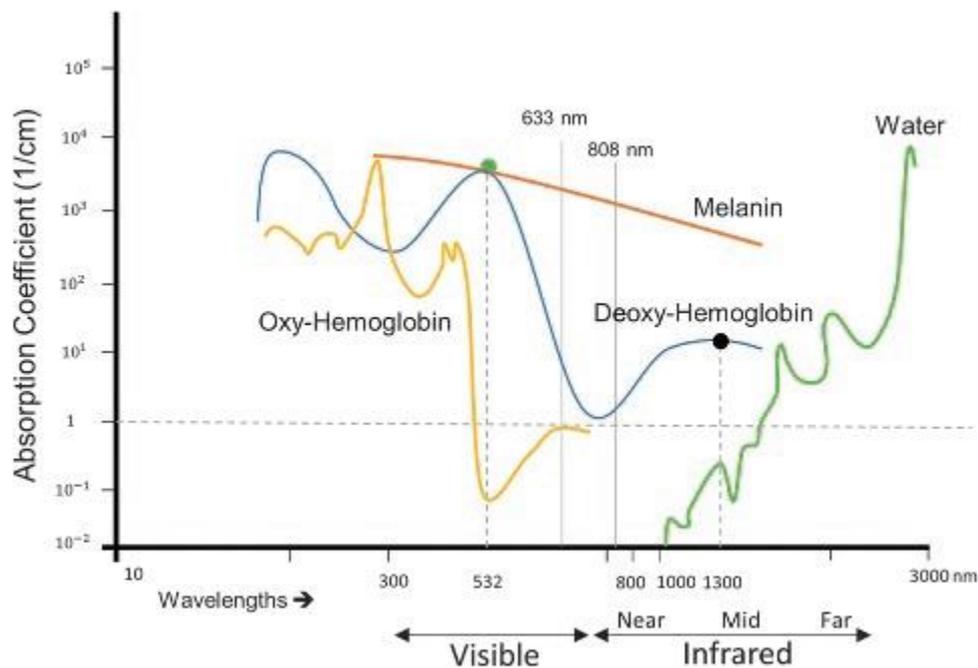


Abbildung 8. Absorptionsspektrum für verschiedene Chromophore.

Referenz: Mosca et al. „Photobiomodulation Therapy for Wound Care: A Potent, Noninvasive, Photochemical Approach“, *Advances in Skin & Wound Care*, 2019.

3. Material und Methoden

Die Versuche wurden an insgesamt 87 db/db (diabetischen) Mäusen durchgeführt. Nach einer Eingewöhnungszeit von 14 Tagen wurde der unten angeführte chirurgische Eingriff (dorsale Exzision) durchgeführt. Der Beobachtungszeitraum post operationem betrug 28 Tage.

3.1. Modelletablierung, Lepr db/db Mäuse

Im Tierversuch wurden Mäuse mit einer spontanen Mutation des Leptin Rezeptors (lepr db/db) in homozygoter Ausprägung verwendet. Lepr db/db Mäuse werden kurz nach der Geburt fettleibig und entwickeln nach wenigen Wochen eine Insulinresistenz sowie Hyperglykämie. Da sie von ihrer Pathologie am ehesten dem humanen Typ 2 Diabetes entsprechen und daher ebenfalls eine gestörte Wundheilung aufweisen, wird dieser Mausstamm häufig in Tierversuchen zur Untersuchung von Effekten auf chronische, diabetische Wunden verwendet.⁶⁹

In der Literatur werden noch zwei weitere Dosierungsmodelle mit Streptozotozin zur Diabetesinduzierung verwendet: das Hoch-Dosis (HD)- und das Mehrfach-Niedrigdosis (MLD)-STZ Modell. Das MLD-STZ-Modell weist eine β -Zell-Zerstörung unter Beteiligung von Immunmechanismen auf und gilt als Modell für den Typ 1 Diabetes. Da ein schwerwiegender Grad entsteht, hatten wir Bedenken wie lange die Tiere grundlegend überleben. Gegenüber dem Streptozotozin bestehen außerdem geschlechtsspezifische Suszeptibilitätsunterschiede, männliche Mäuse sind aufgrund eines höheren Androgen- und niedrigeren Östrogenspiegels empfänglicher als weibliche Mäuse.^{70 71}

14 Tage vor Versuchsbeginn wurden die weiblichen, ca. 11 Wochen alten Tiere, von Charles River oder Janvier Labs in die Tierversuchseinrichtung geliefert. Die Haltung erfolgte nach einer internen Richtlinie: Käfige Typ III hoch, 3 Tiere pro Käfig mit einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Zyklus, Standardlaborfutter (Fa. Ssniff) und Wasser ad libitum. Enrichment: Einstreu, Nistmaterial, Liegebrett, Nagehölzer, Haselnüsse, Nestlets.

Täglich erfolgte die Kontrolle (Futter, Wasser, Gesundheitszustand) der Tiere durch die Tierärztinnen und Tierpflegerinnen, das Gewicht wurde mehrmals wöchentlich protokolliert und mehrmals wöchentlich erfolgte die komplette Käfigreinigung.

3.2. Behandlung/Gruppen

Der operative Eingriff wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Vor dem operativen Eingriff wurden die Tiere gewogen und in tiefer 3% Isofluran-Inhalationsnarkose (Abbott GmbH, Wien, Österreich) wurde aus der Schwanzvene ein Blutstropfen entnommen und die Blutglukose-Konzentration mittels eines handelsüblichen Gerätes (Roche Diagnostics, Deutschland) bestimmt und protokolliert. Alle Tiere wiesen einen stark erhöhten Glukosespiegel ≥ 300 mg/dl auf. Nach Anlegen eines Augensalbenverbandes, Epilieren (Enthaarungscreme) des Fells im geplanten Wundgebiet (dorsal) und steriler Abdeckung des Operationsgebietes wurde der Wunddefekt in Inhalationsnarkose gesetzt: dorsal, median jeweils zirkulär, mit einem Durchmesser von 1.4 cm, eine Exzision pro Tier (full thickness) durch die gesamte Haut bis zur darunterliegenden Muskelfaszie. Dieses Wundheilungsmodell an der diabetischen Maus ist etabliert und wurde in

dieser Form bereits publiziert.⁷² Die Tiere erhielten eine adäquate Schmerzbehandlung von 0.05 mg/kg Buprenorphin s.c. (Buprenorphin, Richter Pharma, Österreich) 2x täglich im Abstand von 6 bis 12 Stunden nach der Operation für 2 Tage nach dem Eingriff, sowie 0.15 mg/kg Meloxicam (Meloxicam, Boehringer, Österreich) 1x täglich für 4 Tage.

Die direkt post-operative Behandlung umfasste u. A. das Warmhalten der Tiere bis zum Ende der Narkose und ein subkutanes Ringerlaktatinfusionsdepot. Es erfolgte die erste Applikation (d0) der Therapie, entsprechend der Gruppeneinteilung und das Anlegen eines Wundverbandes (vor der Lichttherapie). 200 µl einer Hydrogelmatrix (NU-Gel, KCI Medizinprodukte GmbH, Deutschland) wurde ab dem 2. Durchgang topisch appliziert und die Wunde wurde mit einer Wundaufgabe abgedeckt. Die Mäuse saßen während der Licht-Therapie in einem speziell vorbereiteten Behälter und bekamen zur Beschäftigung Haselnüsse. Es erfolgte eine erneute Applikation der Therapie an den Tagen: d2, d4, d6, d8, d10, d12, d14, d16, d18, d21 und d24 ohne Anästhesie.

Foto-Dokumentation und Vermessung der Wunde erfolgten an den Tagen d0, d4, d8, d12, d16, d20, d24 und d28, an diesen Tagen wurde die Erneuerung des Wundverbandes vorgenommen.

Nach Beendigung der Versuchsreihe erfolgt die Tötung (d28) der Tiere in tiefer Isofluran-Inhalationsnarkose mittels cardialer Injektion. Anschließend fand die Entnahme des Wundgebiets statt. Die Beobachtungsdauer betrug 28 Tage post operationem.

Die Bestrahlungszeit betrug 6 Minuten (durch die Membran), alle LEDs hatten eine Pulsfrequenz von 2.5 Hz, eine Pulsrate von 50% und waren auf die gleiche Leistung von 40 mW/cm² normiert. Die Gesamtdosis jeder Behandlung betrug 14.4 J/cm². Der Abstand zur Maus betrug 10 cm.

Um die Methode zu optimieren erfolgten drei Durchgänge:

1. Experimentallrunde

- o (1) Kontrollgruppe
- o (2) Grünes Licht pulsierend (520 nm)
- o (3) Blaues Licht pulsierend (470 nm)
- o (4) Rotes Licht pulsierend (630 nm)

Am Tag der Wundsetzung und am letzten Beobachtungstag (Tag 28) wurde ein LDI (Laser Doppler Imaging) zur Perfusionsdarstellung durchgeführt. Während der Belichtung wurde die Pre-, Post- und 5 Minuten Posttemperatur der Haut gemessen, dieses erfolgte mit Hilfe eines kontaktlosen IR-Thermometers. Die Wunden wurden direkt mit Tegaderm™ Folie (3M, USA) als primäre Schicht abgedeckt und durch den oft durchgeführten Verbandswechsel (alle 4 Tage), wurde die Wunde trotz vorsichtiger Manipulation immer wieder beschädigt. Es kann zur Verklebung mit der Wundoberfläche kommen, der Verbandswechsel kann schmerzhaft sein und Blutungen auslösen, lebensfähige Zellen können mit dem nekrotischen Gewebe entfernt werden und die Wunde schneller austrocknen. Es wurden 8 Mäuse pro Gruppe behandelt. Die Gesamtdosis jeder Behandlung betrug 14.4 J/cm².

2. Experimentalrunde

- o (1) Kontrollgruppe
- o (2) Grünes Licht pulsierend (520 nm)
- o (3) Blaues Licht pulsierend (470 nm)
- o (4) Rotes Licht pulsierend (630 nm)

Im 2. Durchgang wurde als Kontaktschicht NU-Gel (KCI Medizinprodukte GmbH, Deutschland) verwendet: ein transparentes, hydroaktives, amorphes Hydrogel mit Natriumalginat, das sanft und effektiv nekrotisches Gewebe und fibrinös belegte Wunden rehydriert und ein für die Granulation und Epithelisierung von Wunden förderliches feuchtes Wundheilungsmilieu schafft. Die erste Wundfolie wurde durch Suprasorb F (Lohmann & Rauscher, Österreich) ausgewechselt. Obwohl die Tegaderm™ Folie transparent und wasserabweisend war, kam es zu keinem Luftaustausch und dadurch zur Bildung von blauen Flecken. Bei Suprasorb F handelt es sich um eine transparente, atmungsaktive und flexible Polyurethanfolie, welche ein wundheilungsförderndes feuchtes Wundmilieu durch Gas- und Wärmeaustausch ermöglicht. Da der erste Durchgang eine erhebliche Streuung in den Ergebnissen gezeigt hat, wurden in der 2. Runde Mäuse beim anderen Lieferanten bestellt und die Anzahl der Tiere auf 3 pro Gruppe reduziert. LDI wurde wie gewohnt durchgeführt. Neben der oberflächlichen Temperatur, welche zu Beginn und am Ende der Studie gemessen wurde, erfolgten auch zwei Messungen mit einer Infrarotkamera. Damit konnte der gesamte Temperaturverlauf während der Lichttherapie aufgezeichnet werden. Die Gesamtdosis jeder Behandlung betrug 14.4 J/cm^2 .

3. Experimentalrunde

- o (1) Kontrollgruppe
- o (2) Grünes Licht pulsierend (520 nm)
- o (3) Blaues Licht pulsierend (470 nm)
- o (4) Rotes Licht pulsierend (630 nm)

Im dritten Durchgang wurden pro Gruppe 8 Mäuse therapiert. Das LDI wurde nur zur Beginn der Studie durchgeführt. Neben der eingespielten Temperaturmessung, haben wir zusätzlich noch vor und nach der Belichtung die innere Körpertemperatur gemessen. Die Wunde wurde mit Suprasorb F-Folie (Lohmann & Rauscher, Österreich) abgedeckt. Die Mäuse der letzten beiden Experimentalrunden stammen vom selben Lieferanten.

3.3. Humane Endpoints

Aufgrund metabolischer Veränderungen in den diabetischen Mäusen wurde mit einer Mortalität von rund 10% gerechnet. Mit zwei Ausfällen in der gesamten Studie, lagen wir bei 2.3%. 5 Tiere bekamen aufgrund von ggr. Inflammation und ggr. purulentem Exsudat für 4 Tage NSAID (Meloxicam 0.15 mg/kg s.c.) und Antibiose (Enrofloxacin 7.5 mg/kg s.c.). Antiinflammatorische Medikamente unterdrücken zwar die Entzündungsphase, haben aber wenig Einfluss auf die endgültige Wundstabilität. Sie zeigten kein reduziertes Allgemeinverhalten und kein Gewichtsverlust.

3.4. Auswertung

Wundanalyse

Die Wundgröße wurde am Tag d0, d4, d8, d12, d16, d20, d24 und d28 durch Abzeichnen der Wunde auf einer Acrylfolie für Planimetrie und unter Verwendung einer stereoskopischen Kamera (LifeViz micro, Quantificare, Frankreich) zur 3D-Wundmessung (Umfang, Oberfläche, durchschnittliche Tiefe) bewertet. Die stereoskopischen Wundanalyseparameter wurden mit DermaPix Pro 2.28.5 ausgewertet.

LDI (Laser Doppler Imaging): Als Ausgangswert werden die Tiere in Isofluran-Inhalationsnarkose nach der Operation (d0) mittels eines Laser Doppler Systems (Moor Instruments, England) zur Perfusionsdarstellung gescannt. Kontrollaufnahmen erfolgen am 24. Tag (d24).

Histologie und Immunhistochemie

Genügend große Querschnitte wurden samt Muskelschicht entnommen. 5 µm Schnitte wurden post mortem aus der Mitte der Wunde mit Antikörpern gegen CD31 (1:100, M-20, sc-1506-G, Santa Cruz Biotechnology, USA) immunhistochemisch gefärbt, unter dem Mikroskop (Olympus BX61VS, Olympus Austria GmbH, Österreich) digital fotografiert und ausgewertet.

Statistische Auswertung

Die statistischen Unterschiede wurden unter Verwendung von One-Way ANOVA mit Dunnett-Tests zur Bewertung der Signifikanz verwendet, zuvor wurde das Vorhandensein der Gaußschen Verteilungen bewertet. Alle Datensätze wurden als Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt. P-Werte von weniger als 0.05 wurden als signifikant angesehen. Alle statistischen Analysen wurden mit der Software GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc., USA) durchgeführt.

4. Resultate

Die Tiere wiesen Blutzuckerwerte ≥ 300 mg/dl auf, was im Allgemeinen als diabetischer Phänotyp angesehen wird, und ein Durchschnittsgewicht von 54 g.

Die Photobiomodulation stimulierte den Haarwuchs, sie führte dazu dass mehr Haarfollikel von der Telogen- in die Anagenphase übergehen. Das neugebildete Fell der Mäuse war dicker und auch pigmentierter.

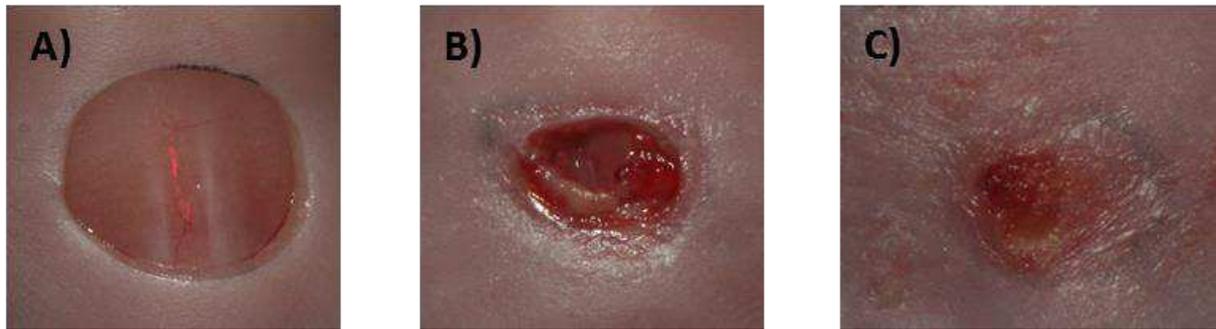


Abbildung 9. repräsentative Wundbilder

Die Abbildung 9. veranschaulicht das Fortschreiten der Wundheilung. Auf Bild 9A sieht man die kreisförmige Wunde direkt nach der Exzision. 9B zeigt das typische Fortschreiten der Wunde am Tag 16 nach der Operation bei einem unbehandelten Kontrolltier. Am Wundrand kann eine Geweberegeneration beobachtet werden. Im Vergleich dazu zeigt 9C den Wundheilungsverlauf nach Behandlung mit rotem gepulstem Licht zum gleichen Zeitpunkt. Die Wundheilung ist weiter fortgeschritten, da kein offener Wundbereich mehr vorhanden ist und an den Wundrändern ein Umbau des Gewebes beobachtet werden kann.

Lichttherapie mittels leistungsstarkem Repuls Strahler (Abbildung 10.) führte in der Maus zu einem signifikanten Anstieg der Oberflächentemperatur. Dieser erfolgte wellenlängenabhängig, wobei grün und blau zur stärksten Erwärmung führten. In der grünen Lichtgruppe stieg die Temperatur um signifikante 2.2°C und bei der blauen Lichtgruppe um 3°C . Die Temperaturerhöhung war in der roten Lichtgruppe mit 0.1°C vernachlässigbar. Da die Strahler jedoch auf gleiche Leistung normiert sind, weist dies auf unterschiedliche Absorption im Gewebe und damit auf unterschiedliche Wirkungsweisen hin.

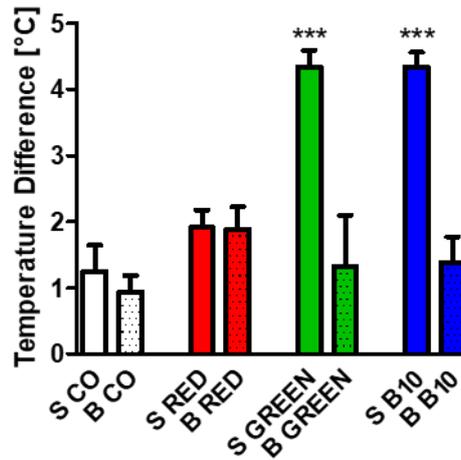


Abbildung 10. Effekte von LED-Therapie mittels Repuls bei unterschiedlichen Wellenlängen auf die Hautoberflächen- und die Kerntemperatur der behandelten Mäuse. *P<0.05, *** P<0.001 im Vergleich zur Oberflächentemperatur in Kontrolltieren (S CO).

Ein Parameter zur Bewertung des Fortschreitens der Wundheilung war die Analyse des Bereichs der Wundoberfläche. Die Wunden wurden herausgeschnitten und 28 Tage lang jeden zweiten Tag 6 Minuten lang mit verschiedenen Wellenlängen behandelt. Die Wundoberfläche wurde jeden vierten Tag mit der Software von DermaPix Pro 2.28.5 fotografiert und analysiert.

Die Wundfläche (Abbildung 11.) stieg in den ersten 4 Tagen und begann ab Tag 8 kleiner zu werden. Es kam zu einer teilweisen Verkleinerung der Wundgröße in der roten und grünen Lichtgruppe, aber nicht in der blauen Lichtgruppe. Diese Abnahme der Wundoberfläche erreichte am Tag 12 in der mit Rotlicht behandelten Gruppe eine Signifikanz, die relative Wundgröße bezogen auf die Grundgröße am Tag 0 war in der Kontrollgruppe $72.74\% \pm 29.64$, während sie in der roten Lichtgruppe bereits auf $49.95\% \pm 20.59$ abgenommen hatte. Ein deutlicher Abfall war in der grünen Lichtgruppe ($55.20\% \pm 20.15$) zu entdecken, was jedoch nicht signifikant war. In der blauen Lichtgruppe ($68.64\% \pm 11.87$) kam es zu keiner signifikanten Reduzierung. Dieser Trend das rotes und grünes Licht besser war hielt bis zum Tag 28 an, war aber nicht weiter signifikant.

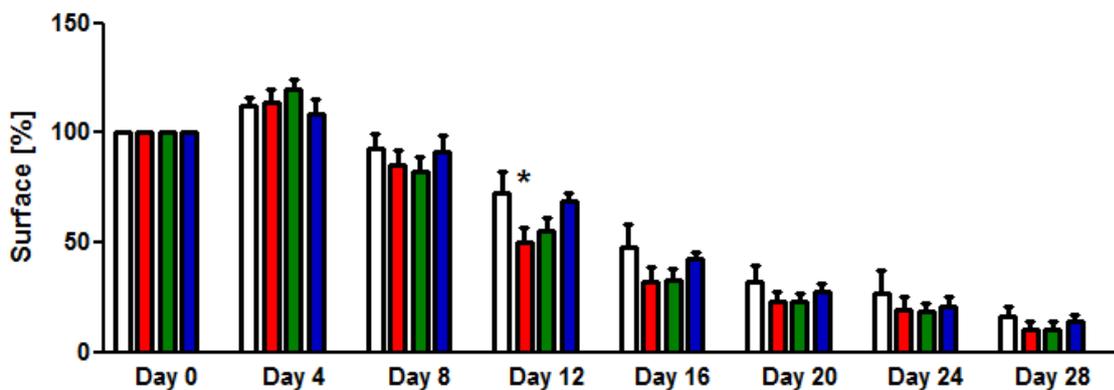


Abbildung 11. Wirkung der pulsierenden LED-Lichttherapie auf die Wundheilung in einem diabetischen Wundheilungsmodell in der Maus. * p < 0.05 im Vergleich zur nicht beleuchteten Kontrollgruppe.

Diese Ergebnisse deckten sich mit der Bestimmung der Wundheilungsrate, die ab Tag 4 jeden 8. Tag analysiert wurde. Die Heilungsrate wurde mit den Daten von Wundoberfläche (A) und Wundumfang (P) unter Verwendung der DermaPix Pro 2.28.5 Software für jeden Zeitpunkt (T) berechnet. Aufgrund der Zunahme der Wundgröße in den ersten Tagen, ist die Wundheilungsrate (Abbildung 12.) zwischen OP-Tag und 4. Tag post-OP negativ. Ein signifikanter Anstieg der Wundheilungsrate wurde zwischen Tag 4 und Tag 12 in den Gruppen mit rotem, von $-0.03\% \pm 0.05$ auf $0.17\% \pm 0.08$, und grünem Licht, von $-0.05\% \pm 0.03$ auf $0.18\% \pm 0.08$, beobachtet.

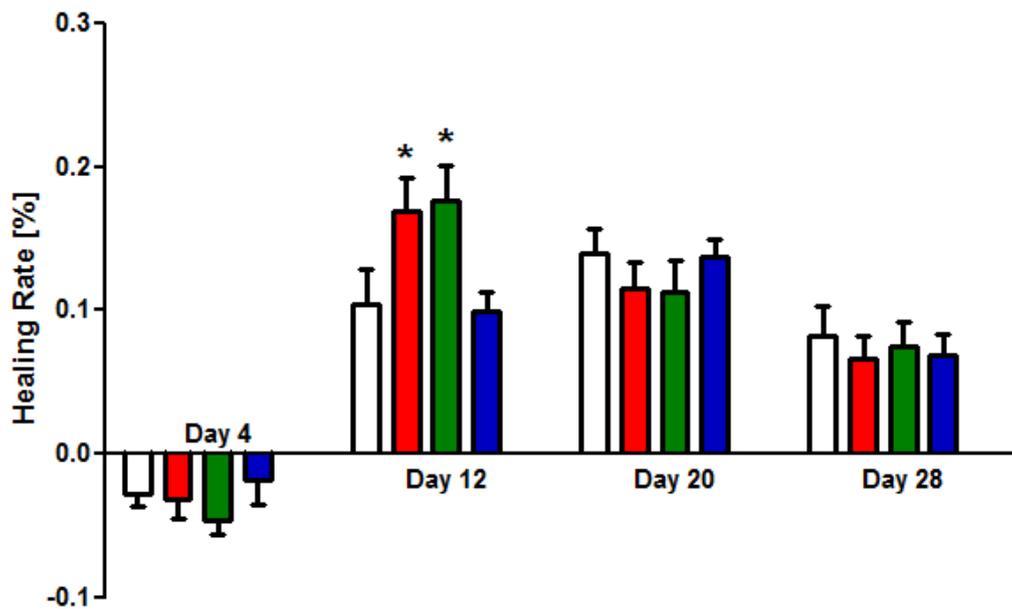


Abbildung 12. Auswirkungen der pulsierenden LED-Lichttherapie auf die Wundheilungsrate in einem diabetischen Wundheilungsmodell bei Mäusen. * $p < 0.05$ im Vergleich zur nicht beleuchteten Kontrollgruppe.

Um den oberflächlichen Blutfluss im Wundbereich zu analysieren, wurde am Tag 0 und am Tag 28 unmittelbar nach der Beleuchtung ein LDI (Laser-Doppler-Bildgebung) durchgeführt. Die Wirkung auf die Gewebepfusion war wellenlängenabhängig. Ein signifikanter Anstieg des Blutflusses (Abbildung 13.) nach Behandlung mit rotem ($544.05 \text{ m}^3/(\text{s}\cdot\text{kg}) \pm 142.48$) und grünem Licht ($495.14 \text{ m}^3/(\text{s}\cdot\text{kg}) \pm 88.52$), sowie ein Trendanstieg nach Behandlung mit blauem Licht ($419.64 \text{ m}^3/(\text{s}\cdot\text{kg}) \pm 66.49$) wurden am Tag 0 beobachtet. Am Tag 28 wurden keine signifikanten Unterschiede im Blutfluss von rotem ($502.39 \text{ m}^3/(\text{s}\cdot\text{kg}) \pm 105.55$), grünem ($459.61 \text{ m}^3/(\text{s}\cdot\text{kg}) \pm 112.71$) und blauem Licht ($412.68 \text{ m}^3/(\text{s}\cdot\text{kg}) \pm 138.21$) beobachtet, obwohl ein ähnlicher Trendanstieg wie am Tag 0 in allen Gruppen anhaltend war.

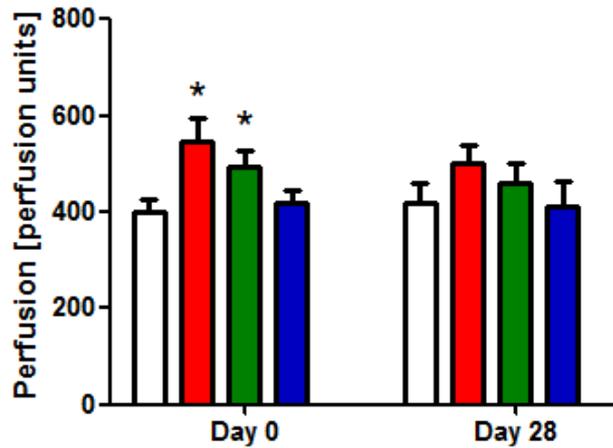


Abbildung 13. Auswirkungen der pulsierenden LED-Lichttherapie durch unterschiedliche Wellenlängen auf die Wundperfusion. * $p < 0.05$ im Vergleich zur nicht beleuchteten Kontrollgruppe.

Um die Blutgefäßbildung zu analysieren, wurde am Tag 28 nach der Euthanasie der Tiere eine immunhistochemische CD31-Färbung durchgeführt. Die Blutgefäße wurden im interessierenden Bereich (RIO) 2×2 mm in der Mitte der Wundoberfläche gezählt. Die Anzahl der Blutgefäße (Abbildung 14. und 15.) war bei den mit rotem (115 ± 35.76) und grünem Licht (108.86 ± 52.14) behandelten Wunden signifikant erhöht. Mit blauem Licht (73.33 ± 27.29) behandelte Wunden zeigten einen positiven, aber nicht signifikanten Anstieg der Blutgefäßbildung.

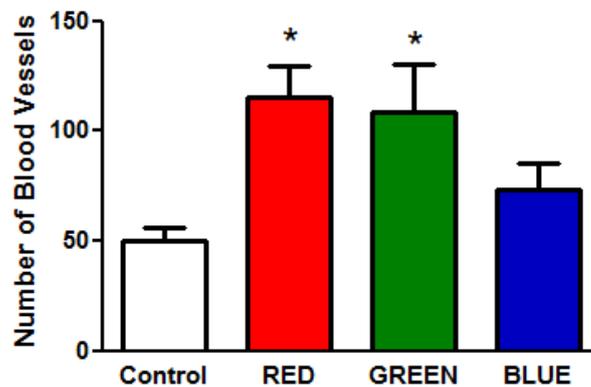


Abbildung 14. Auswirkungen der pulsierenden LED-Lichttherapie auf die Bildung neuer Blutgefäße im Wundbereich nach einer Behandlungsdauer von 28 Tagen. * $p < 0.05$ im Vergleich zur nicht beleuchteten Kontrollgruppe.

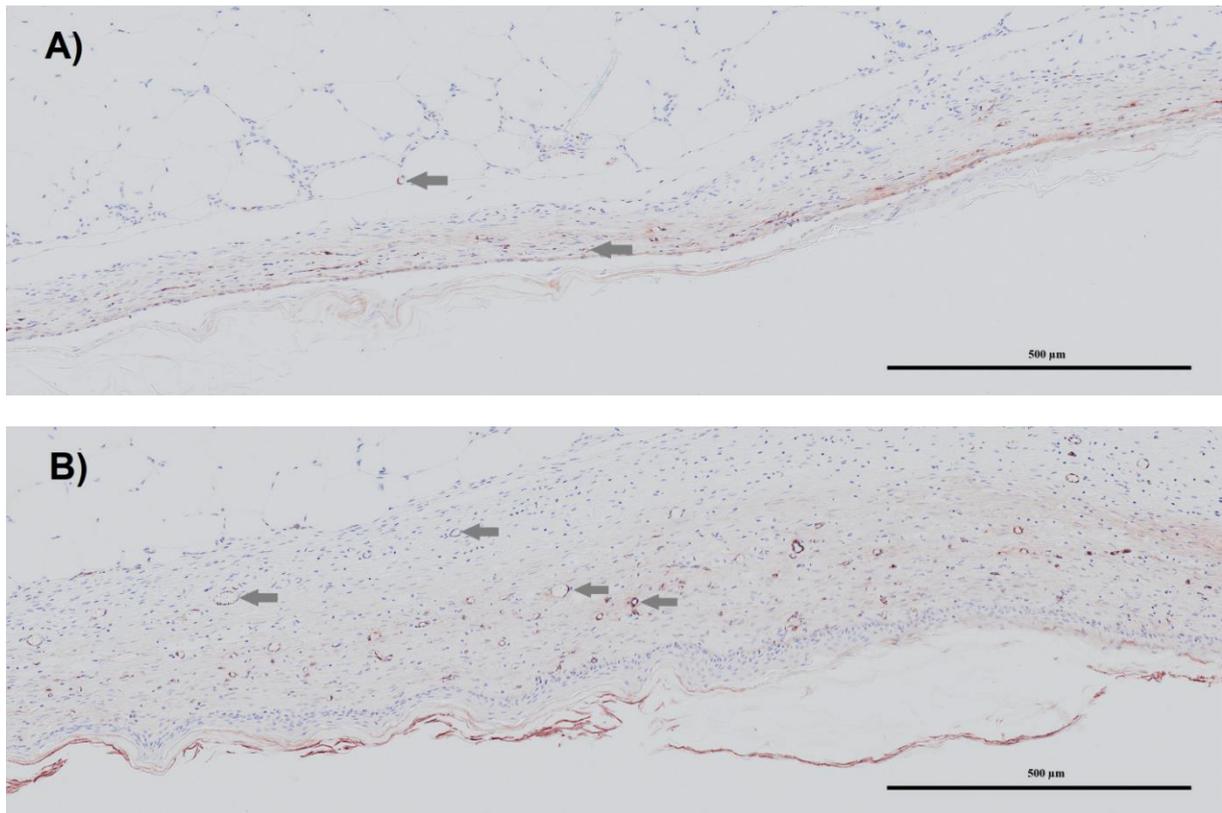


Abbildung 15. Beispielbilder der Auswirkungen einer pulsierenden Repuls-LED-Lichttherapie auf die Bildung neuer Blutgefäße im Wundbereich nach einer Behandlungsdauer von 28 Tagen. Blutgefäßbildung in der nicht beleuchteten Kontrollgruppe (A) und in der mit rotem Licht behandelten Gruppe (B). Graue Pfeile zeigen exemplarisch auf Blutgefäße.

5. Diskussion

Weltweit wurde Ende 2019 bei über 463 Millionen Menschen Diabetes diagnostiziert, bis 2030 werden 578 Millionen Menschen an Diabetes leiden und bis 2045 prognostiziert man 700 Millionen (10.9% der Bevölkerung) Erkrankte.²³ Die Wahrscheinlichkeit, ein diabetisches Ulkus zu entwickeln, beträgt für die gesamte Lebensdauer eines Diabetikers 19–34%. Zwei Drittel aller Amputationen weltweit werden auf Grund des Diabetischen Fußsyndroms durchgeführt und stellen die teuerste Folgeerkrankung des Diabetes dar.²⁷ Ein amputierter Patient kostet das Gesundheitswesen wesentlich mehr als eine Behandlung, durch entsprechende Wundbehandlung oder eine gefäßchirurgische oder orthopädische Interventionen, zur Erhaltung der Gliedmaßen. Allein in Österreich könnte man jährlich 50 bis 70 Millionen Euro durch eine Senkung der Amputationszahlen ersparen.⁷³ Die IWGDF (International Working Group on the Diabetic Foot) erstellt jährlich Richtlinien für Wundheilungsmaßnahmen, die Anwendung von Unterdruck-Wundtherapie, Elektrizität, Magnetismus, Ultraschall und Stoßwellen wird bei diabetischen Wunden nicht empfohlen.⁷⁴ Verschiedene Forschungsgruppen suchen nach Alternativen, eine davon ist die Photobiomodulation.

Die Verwendung von Photobiomodulation zur Linderung von Schmerzen, Entzündungen, Ödemen, zur Förderung der Wundheilung, der Heilung von tieferen Gewebstrukturen und Nerven, sowie zur Vorbeugung von Gewebeschäden ist seit fünfzig Jahren bekannt, dennoch ist die Wirksamkeit nicht eindeutig geklärt und Gegenstand vieler Studien.

Das breitgefächerte Einsatzgebiet der Photobiomodulation basiert höchstwahrscheinlich auf dem Wirkmechanismus der ATP Produktion in den Mitochondrien, diese können bei Patienten mit Diabetes verändert sein und scheinen die Insulinresistenz zu begünstigen. Als ein Erklärungsmodell für die Insulinresistenz werden Betazell-Fehlfunktionen und Betazell-Apoptose seit einigen Jahren als Veränderungen in den Mitochondrien diskutiert.⁷⁵ Untersuchungen an menschlichen Betazellen ergaben, dass erhöhte Blutfett- und Blutzuckerwerte in den Mitochondrien zum Untergang von Betazellen führen.⁷⁶ Weitere Studien zeigten, dass es bei insulinresistenten Personen zu einer deutlichen Verringerung der Mitochondrien-eigenen Erbsubstanz kommt, was negative Folgen für die Bildung von Molekülen für den Zuckertransport in die Zellen hat⁷⁷, aber auch das Ansprechen der Photobiomodulation in der Wundheilung bei Diabetikern.

Eine wesentliche Einschränkung, mit der wir uns während der Studie auseinandergesetzt haben, war das breite Spektrum von klinischen Protokollen in Bezug auf die Wellenlänge, Dosis und Applikation der PBM, die auch eine übereinstimmende Meinung erschwert. Das Verständnis der photobiologischen Mechanismen unter Verwendung der richtigen Wellenlängen ist entscheidend für optimale klinische Lichtbehandlungsparameter um die gewünschten therapeutischen und biologischen Ergebnisse zu erreichen.

Während unserer Versuche wurde jeder Parameter auf mögliche Fehlerquellen hinterfragt, mit dem Ziel ein ideales In-Vivo-Model zu etablieren.

Eine einheitliche Wundsetzung ist in der Literatur nicht gegeben, zum Teil wurden die Wunden in der Flankenregion, dorsal am Rücken oder an mehreren Körperregionen gleichzeitig gesetzt. Verbände mit adhäsiven Kontaktschichten, die sich mit der Wundoberfläche verkleben, können wir nicht empfehlen, da das Debridement nicht selektiv ist und das normal heilende Gewebe wieder geschädigt wird, sobald der Verband entfernt wird. Zudem ist das Entfernen solcher

Verbände schmerzhaft und löst Blutungen aus. Gemäß dem heute üblichen Wundmanagement werden für alle Wunden hydrophile, nicht-adhäsive Wundaufgaben empfohlen. Diese Produkte verfügen über eine hohe Saugfähigkeit, halten die Wunde feucht und fördern dadurch die Wundheilung.

Die Wunde wurde mit einer Wundfolie abgedeckt und durch diese erfolgte auch die Belichtung. In vielen Studien wurden die Wunden nicht abgedeckt und die Wunden heilten hauptsächlich durch Kontraktion.⁷⁸ Bei unserer Studie waren die Wunden immer mit einer Schutzfolie versehen, es erfolgte nach dem ersten Durchlauf ein Folienwechsel. In weiteren Folgestudien könnte eine Verschiebung der Wunden in Betracht gezogen werden. In dem Fall wird die Folie mit einem zusätzlichen Haftmittel an der losehäutigen Mäusehaut befestigt, damit ahmt man die Wundheileigenschaften beim Menschen genauer nach. Durch die Verschiebung wird eine Verzögerung der Kontraktion verursacht, so dass die Heilung bei der Photobiomodulation hauptsächlich durch Reepithelisierung und Granulationsgewebekonstruktion erfolgt. Die Fibroblasten werden an den Wundrändern beeinflusst und dazu veranlasst, sich zu vermehren, zu migrieren und einen Myofibroblasten-Phänotyp anzunehmen.^{79 80}

Die meisten in der Vergangenheit gemeldeten Studien wurden mit Laserlicht durchgeführt. Nicht kohärentes LED-Licht ist aufgrund seiner Vorteile, einschließlich einfacherer Handhabung und geringerer Kosten, eine Alternative. Daher werden heute immer mehr Behandlungen mit LED-Licht durchgeführt. Vergleichsstudien haben gezeigt, dass Therapien mit Laser und LED ähnliche Auswirkungen auf die Geweberegeneration und Angiogenese *in vivo* haben.^{81 82}

Die Lichttherapie im Mausmodell führte zu einem signifikanten Anstieg der Oberflächentemperatur in der grünen und blauen Lichtgruppe, diese war aber im empfohlenen Rahmen. Es ist bekannt, dass bei einer Wundtemperatur von unter 28 °C keine Wundheilung stattfindet, da die Zellaktivität herabgesetzt wird und es zu einer Verringerung der Aktivitäten von Neutrophilen, Fibroblasten und Epithelzellen kommt.⁸³ Wärme, ab 30 °C, lässt Wunden schneller heilen. Am effektivsten ist die Wundheilung, wenn die Temperatur in der Wunde zwischen 36° und 38°C liegt. Bei über 42°C wird die Heilung wieder verlängert.^{84 85}

Alle genannten Studien und die meisten in der Literatur gefundenen Studien zur Untersuchung der Wundheilung bei diabetischen Fußgeschwüren verwendeten Licht im Rot- und Infrarotlichtspektrum, was als Goldstandard in der Photobiomodulation angesehen wird.⁸⁶

Eine verzögerte Wundheilung beeinflusst die Wundgröße und ihren Verschluss, darum war die Wundoberfläche der untersuchte Hauptparameter in dieser Studie. Wie in der Abbildung 9. zu sehen ist, klaffen alle Wunden zwischen der Exzision am Tag 0 und am Tag 4, was ein typisches Verhalten von Wunden vor dem Heilungsprozess ist.⁸⁷ Ab dem 4. Tag beginnen Wunden in allen Gruppen zu schrumpfen. Mit rotem und grünem Licht behandelte Wunden schrumpfen tendenziell schneller als in der Kontrollgruppe und der Blaulichtgruppe mit 14.4 J/cm². Dieser Trend hält bis zum Ende der Studie an und ist am Tag 12 in der mit Rotlicht behandelten Gruppen signifikant. Solche vergleichbaren Effekte von rotem (700 nm) und grünem (530 nm) LED-Licht wurden auch in einem *In-vitro*-Proliferationsassay mit Rattenfibroblasten gesehen.⁸⁸ Positive Effekte von grünem Licht wurden in einem Wundheilungsmodell bei Mäusen und gleichzeitig in einem *In-vitro*-Modell zur Untersuchung der mRNA- und dem Proteinspiegel von Zytokinen, die von menschlichen Fibroblasten während der Wundheilung sekretiert werden beobachtet.⁸⁹ In früher durchgeführten Studien zeigte blaues Licht eine signifikant verringerte Wundgröße in einem Exzisionswundmodell bei Ratten.⁹⁰ Bei Energiedichten über 7 J/cm² induziert blaues Licht

die Produktion einer schädlichen Konzentration mitochondrialer reaktiver Sauerstoffspezies (ROS).^{91 92} Unsere gewählte Energiedichte betrug 14.4 J/cm^2 , in Folgestudien sollten niedrigere Energiedichten getestet werden um den Effekt zu bestätigen.

Neben dem Wundverschluss ist die Angiogenese ein weiterer wesentlicher Parameter für die Wundheilung, da sie eine ordnungsgemäße Durchblutung, Vaskularisierung und Gewebeintegrität gewährleistet.⁹³ Um die Wundheilung auf einer tieferen Ebene zu untersuchen, wurde die Angiogenese durch Zählen neu gebildeter Blutgefäße im verletzten Wundbereich bestimmt. Behandlungen mit rotem, grünem und auch blauem Licht mit 14.4 J/cm^2 führten zu einer erhöhten Blutgefäßbildung. Eine ähnliche angiogene Wirkungen wurden zuvor in einem Hautlappen-Rattenmodell unter Verwendung von 660 nm und 780 nm Lasern gezeigt.⁹⁴ In einem ischämischen Mausmodell für Hinterbeine kam es zu einer erhöhte Blutgefäßbildung nach Rotlichtbehandlung.⁹⁵ In bereits durchgeführten Studien wurde gezeigt, dass die Angiogenese und Gewebepfusion in einem Lappenmodell bei Ratten durch rotes und blaues Licht signifikant verbessert werden können, was unsere Beobachtungen in der jüngsten Studie bestätigt.⁹⁶ Daten zur Blutgefäßbildung nach Behandlungen mit grünem Licht wurden noch nicht veröffentlicht, aber nach unseren Untersuchungen legen wir nahe, dass die Angiogenese nicht nur durch rotes Licht stimuliert werden kann, sondern auch durch grünes und blaues Licht. Eine erhöhte Angiogenese führt zu einer erhöhten Blutperfusion, die mit Laser Doppler Imaging (LDI) untersucht werden kann. Interessanterweise wurden am Tag 0 signifikante Unterschiede in der roten und grünen Lichtgruppe und ein Trend in der blauen Lichtgruppe festgestellt. Am Tag 28 ist nach Rot- und Grünlichtbehandlung nur ein Trendanstieg und ein kleiner Trend in der Blaulichtgruppe zu beobachten, obwohl in diesen Gruppen signifikant mehr Blutgefäße im Wundbereich gezählt wurden. Wir vermuten, dass die LDI-Messungen eher unempfindlich sind und nur größere Unterschiede der Perfusion registrieren. Die signifikanten Anstiege am Tag 0 können offensichtlich nicht mit der Angiogenese in Verbindung gebracht werden, sondern eher mit der Temperaturerhöhung durch das Licht, obwohl in dieser Studie kaltes Licht verwendet wurde um Temperatureffekte zu verhindern.

Zusammenfassend schließen wir, dass Photobiomodulation den Wundverschluss bei diabetischen Mäusen beschleunigt und die Angiogenese im Wundareal erhöht, welche einen entscheidenden Faktor in der Wundheilung darstellt. Rotes Licht als Gold Standard bei der Photobiomodulation hatte erwartungsgemäß positive Auswirkungen auf die Wundheilung, aber auch kürzere Wellenlängen im grünem Lichtspektrum führten zu signifikanten Verbesserungen. Photobiomodulation bietet eine wirksame, nichtinvasive und komfortable Behandlung für chronische Wunden wie diabetische Fußgeschwüre. Um Patienten die effektivste Behandlung anbieten zu können, müssen in Zukunft Energiedichten, Dauer und Perioden der Photobiomodulation sowie mögliche Kombinationen von rotem und blauem oder grünem Licht verglichen werden.

6. Referenzen

-
- ¹ WHO. Diabetes. Data and statistics, <<http://www.euro.who.int/en/health-topics/noncommunicable-diseases/diabetes/data-and-statistics>> (2020).
- ² N. Singh, D.G. Armstrong and B.A. Lipsky, "Preventing foot ulcers in patients with diabetes." *JAMA* 293, 217-228 (2005).
- ³ C.N. Tchanque-Fossuo, D. Ho, S.E. Dahle, E. Koo, R.R. Isseroff and J. Jagdeo, "Low-level Light Therapy for Treatment of Diabetic Foot Ulcer: A Review of Clinical Experiences." *J Drugs Dermatol.* 2016 Jul 1;15(7):843-8.
- ⁴ P. Avci, A. Gupta, M. Sadasivam, D. Vecchio, Z. Pam, N. Pam and M. R. Hamblin, "Low-level laser (light) therapy (LLLT) in skin: stimulating, healing, restoring." *Semin. Cutan. Med. Surg.*, vol. 32, no. 1, pp. 41–52, Mar. 2013.
- ⁵ H. Chung, T. Dai, S.K. Sharma, Y.Y. Huang, J.D. Carroll and M.R. Hamblin, "The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy." *Ann Biomed Eng.* 2012 Feb;40(2):516-33.
- ⁶ W. Posten, D. A. Wrone, J. S. Dover, K. A. Arndt, S. Silapunt and M. Alam, "Low-level laser therapy for wound healing: mechanism and efficiency." *Dermatol. Surg.* 31:334–340, 2005.
- ⁷ L. Dancáková, T. Vasilenko, I. Kováč, K. Jakubčová, M. Hollý, V. Revajová, F. Sabol, Z. Tomori, M. Iversen, P. Gál and J. M. Bjordal, "Low-level laser therapy with 810 nm wavelength improves skin wound healing in rats with streptozotocin-induced diabetes." *Photomed. Laser Surg.*, vol. 32, no. 4, pp. 198–204, Apr. 2014.
- ⁸ R. Fekrazad, A. Mirmoezzi, K. A. Kalhori and P. Arany, "The Effect of Red, Green and Blue Lasers on Healing of Oral Wounds in Diabetic Rats." *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, vol. 148, pp. 242–245, May 2015.
- ⁹ S. Farivar, T. Malekshahi and R. Shiari, "Biological effects of low level laser therapy." *J Lasers Med Sci.* 2014 Spring;5(2):58-62.
- ¹⁰ N. Adamskaya, P. Dungal, R. Mittermayr, J. Hartinger, G. Feichtinger, K. Wassermann, H. Redl and M. Van Griensven, "Light therapy by blue LED improves wound healing in an excision model in rats." *Injury*, vol. 41, no. 7, pp. 1038–1042, 2010.
- ¹¹ P. Dungal, J. Hartinger, S. Chaudary, P. Slezak, A. Hofmann, T. Hausner, M. Strassl, E. Wintner, H. Redl and R. Mittermayr, "Low level light therapy by LED of different wavelength induces angiogenesis and improves ischemic wound healing." *Lasers Surg. Med.*, vol. 46, no. 10, pp. 773–80, Dec. 2014.
- ¹² A. Teuschl, E. R. Balmayor, H. Redl, M. van Griensven and P. Dungal, "Phototherapy with LED light modulates healing processes in an in vitro scratch-wound model using 3 different cell types." *Dermatol. Surg.*, vol. 41, no. 2, pp. 261–8, Feb. 2015.

-
- ¹³ F. A. H. Al-Watban, "Laser therapy converts diabetic wound healing to normal healing." *Photomed. Laser Surg.*, vol. 27, no. 1, pp. 127–35, Feb. 2009.
- ¹⁴ G. Plewig, T. Ruzicka, R. Kaufmann und M. Hertl, "Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie und Allergologie", Springer Verlag, 7. Auflage, 2018.
- ¹⁵ J. Kirsch, C.A. May, D. Lorke, A. Winkelmann, W. Schwab, G. Herrmann und R. Funk, "Taschenlehrbuch Anatomie", Thieme Verlag, 1. Auflage, 2010.
- ¹⁶ D. Henne-Bruns, "Duale Reihe Chirurgie", Thieme Verlag, 4. Auflage, 2012.
- ¹⁷ D. Terhorst-Molawi, "Basics Dermatologie", Elsevier, 5. Auflage, 2019.
- ¹⁸ T. Brinkmeier, "Springer Kompendium Dermatologie", Springer Verlag, 1. Auflage, 2006.
- ¹⁹ C. Settelen, D. Stebler-Schärz und B. Egger, "Leitlinie Wundmanagement", Universitätsspital Basel, Ressort Pflege/MTT, 2011.
- ²⁰ T. W. Fossum, "Small Animal Surgery", Elsevier, 9th edition, 2018.
- ²¹ G. Voggenreiter und C. Dold, "Wundtherapie. Wunden professionell beurteilen und erfolgreich behandeln", Thieme Verlag, 2. Auflage, 2009.
- ²² G. Kammerlander und B. Söllner, "Die Prinzipien der Wundheilung: Wundtypen, Wundheilungsvorgänge und Wundheilungsstörungen", CM Medienverlag, 2010.
- ²³ International Diabetes Federation, "DIABETES ATLAS", 9th edition, 2019.
- ²⁴ K.G. Alberti and P.Z. Zimmet, "Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation." *Diabet Med.* 1998 Jul;15(7):539–53.
- ²⁵ M. Berger, "Diabetes mellitus", Elsevier, 2. Auflage, 2000.
- ²⁶ M. Davies, S. Brophy, R. Williams and A. Taylor, "The prevalence, severity, and impact of painful diabetic peripheral neuropathy in type 2 diabetes." *Diabetes Care.* 2006 Jul;29(7):1518–22; DOI:10.2337/dc05-2228.
- ²⁷ S. Morbach, E. Müller, H. Reike, A. Risse, G. Rümenapf und M. Spraul, "Diabetologie und Stoffwechsel. Diabetisches Fußsyndrom", Thieme Verlag, 14. Auflage, 2019.
- ²⁸ Österreichische Diabetes Gesellschaft, "Aktivitätsbericht 2019", MedMedia Verlag und Mediaservice GmbH, 2019.
- ²⁹ P. Kakanj, B. Moussian, S. Grönke, V. Bustos, S. A. Eming, L. Partridge and M. Leptinb, "Insulin and TOR signal in parallel through FOXO and S6K to promote epithelial wound healing." *Nat. Commun.* 7, 12972, 2016.

-
- ³⁰ A. Grzybowski, J. Sak and J. Pawlikowski, "A brief report on the history of phototherapy." *Clin Dermatol* 2016;34(5):532-7.
- ³¹ A. Grzybowski and K. Pietrzak, "From patient to discoverer--Niels Ryberg Finsen (1860-1904)—the founder of phototherapy in dermatology." *Clin Dermatol* 2012;30(4):451-5.
- ³² E. Mester, T. Spiry, B. Szende and J.G. Tota, "Effect of laser rays on wound healing." *Am J Surg* 1971;122(4):532-5.
- ³³ E. Mester, B. Szende and P. Gartner, "The effect of laser beams on the growth of hair in mice." *Radiobiol Radiother (Berl)* 1968;9(5):621-6.
- ³⁴ E. Mester, B. Szende, T. Spiry and A. Scher, "Stimulation of wound healing by laser rays." *Acta Chir Acad Sci Hung* 1972;13(3):315-24.
- ³⁵ P. R. Arany, "Craniofacial wound healing with photobiomodulation therapy: new insights and current challenges." *J Dent Res* 2016;95(9):977-84.
- ³⁶ D. Pastore, M. Greco, V.A. Petragallo and S. Passarella, "Increase in H^+/e^- ratio of the cytochrome c oxidase reaction in mitochondria irradiated with helium-neon laser." *Biochem Mol Biol Int* 1994; 34(4): 817-26.
- ³⁷ J.C. Sutherland, "Biological effects of polychromatic light." *Photochem Photobiol* 2002; 76(2): 164-70.
- ³⁸ T.I. Karu, L.V. Pyatibrat, S.F. Kolyakov and N.I. Afanasyeva, "Absorption measurements of a cell monolayer relevant to phototherapy: reduction of cytochrome C oxidase under near IR radiation." *J Photochem Photobiol B* 2005;81(2):98-106.
- ³⁹ M.T. Wong-Riley, H.L. Liang and J.T. Eells, "Photobiomodulation directly benefits primary neurons functionally inactivated by toxins: role of cytochrome C oxidase." *J Biol Chem* 2005;280(6):4761-71.
- ⁴⁰ T. Karu, "Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells." *J Photochem Photobiol B* 1999; 49(1): 1-17.
- ⁴¹ A.C. Chen, P.R. Arany, Y.Y. Huang, E.M. Tomkinson, S.K. Sharma, G.B. Kharkwal, T. Saleem, D. Mooney, F.E. Yull, T.S. Blackwell and M.R. Hamblin, "Low-level laser therapy activates NF- κ B via generation of reactive oxygen species in mouse embryonic fibroblasts." *PLoS One* 2011; 6(7): e22453.
- ⁴² S. K. Sharma, Y.Y. Huang, J. Carroll and M. R. Hamblin, "Biphasic Dose Response in Low Level Light Therapy - an update." *Dose Response*. 2011;9(4):602-18.
- ⁴³ T.I. Karu and S.F. Kolyakov, "Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy." *Photomed Laser Surg* 2005; 23(4): 355-61.

⁴⁴ P.R. Arany, A. Cho and T.D. Hunt, "Photoactivation of endogenous latent transforming growth factor-beta1 directs dental stem cell differentiation for regeneration." *Sci TranslMed* 2014;6(238):238ra69.

⁴⁵ S. Rohringer, W. Holnthoner and S. Chaudary, "The impact of wavelengths of LED lighttherapy on endothelial cells." *Sci Rep* 2017;7(1):10700.

⁴⁶ P.R. Arany, "Craniofacial wound healing with photobiomodulation therapy: new insights and current challenges." *J Dent Res* 2016;95(9):977-84.

⁴⁷ T.H. Maiman, "Stimulated optical radiation in ruby." *Nature*, 1960 187: p. 493–494.

⁴⁸ J.P. Farkas, J.E. Hoopman and J.M. Kenkel, "Five parameters you must understand to master control of your laser/light-based devices." *Aesthet Surg J* 2013: 33(7): 1059-64.

⁴⁹ K.F. Renk, "Basics of laser physics." Springer, 2nd edition, 2012.

⁵⁰ R. Courtland, "No Nobel for the Father of the LED." *IEEE Spectrum*, 2014 8 10.

⁵¹ H.T. Whelan, R.L. Smits, E.V. Buchman, N.T. Whelan, S.G. Turner, D.A. Margolis, V. Cevenini, H. Stinson, R. Ignatius, T. Martin, J. Cwiklinski, A.F. Philippi, W.R. Graf, B. Hodgson, L. Gould, M. Kane, G. Chen and J. Caviness, "Effect of NASA light-emitting diode irradiation on wound healing." *J Clin Laser Med Surg*, 2001 19(6): p. 305–14.11776448.

⁵² W.S. Kim and R.G. Calderhead, "Is light-emitting diode phototherapy (LED-LLLT) really effective?" *Laser Ther*, 2011 20(3): p. 205–15.24155530

⁵³ Z. Zalevsky and M. Belkin, "Coherence and speckle in photomedicine and photobiology." *Photomed Laser Surg*, 2011 29(10): p. 655–6.21749264

⁵⁴ L. Hode, "The importance of the coherency." *Photomed Laser Surg*, 2005 23(4): p. 431–4.16144489

⁵⁵ K.C. Smith, "Laser (and LED) therapy is phototherapy." *Photomed Laser Surg*, 2005 23(1): p. 78–80.15782040

⁵⁶ J.T. Hashmi, Y.Y. Huang, B.Z. Osmani, S.K. Sharma, M.A. Naeser and M.R. Hamblin, "Role of low-level laser therapy in neurorehabilitation." *Pm r*, 2010 2(12 Suppl 2): p. S292–305.21172691

⁵⁷ K.C. Smith, "Laser (and LED) therapy is phototherapy." *Photomed Laser Surg*, 2005 23(1): p. 78–80.15782040

⁵⁸ C.S. Enwemeka, "The place of coherence in light induced tissue repair and pain modulation." *Photomed Laser Surg*, 2006 24(4): p. 457.16942424

⁵⁹ L. Laakso, C. Richardson and T. Cramond, "Quality of light - is laser necessary for effective photobiostimulation?" *Aust J Physiother*, 1993 39(2): p. 87–92.25026133

⁶⁰ R.A. Vacca, E. Marra, S. Passarella, V.A. Petragallo and M. Greco, "Increase in cytosolic and mitochondrial protein synthesis in rat hepatocytes irradiated in vitro by He-Ne laser." *J Photochem Photobiol B*, 1996 34(2-3): p. 197-202.8810537

⁶¹ R. Lubart, H. Friedmann, I. Peled and N. Grosman, "Light effect on fibroblast proliferation." *Laser Therapy*, 1993 5(2): p. 55-57.

⁶² W. Posten, D.A. Wrone, J.S. Dover, K.A. Arndt, S. Silapunt and M. Alam, "Low-level laser therapy for wound healing: mechanism and efficacy." *Dermatol Surg* 2005; 31(3):334-40.

⁶³ T.N. Demidova, I.M. Herman, E.V. Salomatina, A.N. Yaroslavsky and M.R. Hamblin, "Wound healing stimulation in mice by low-level light." *Prog Biomed Opt Imaging* 2006;7(26):61400C.1-61400C.9.

⁶⁴ Y. Zhu, G. Xu and J. Yuan, "Light emitting diodes based photoacoustic imaging and potential clinical applications." *Sci Rep* 2018;8(1):9885.

⁶⁵ L. Carroll and T.R. Humphreys, "LASER-tissue interactions." *Clin Dermatol* 2006;24(1):2-7.

⁶⁶ H. Chung, T. Dai, S.K. Sharma, Y.Y. Huang, J.D. Carroll and Hamblin, "The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy." *Ann Biomed Eng* 2012;40(2):516-33.

⁶⁷ U.A. Patil and L.D. Dhimi, "Overview of lasers." *Indian J Plast Surg* 2008;41(Suppl):S101-13.

⁶⁸ J.J. Anders, R.J. Lanzafame, P.R. Arany, "Low-level light/laser therapy versus photobiomodulation therapy." *Photomed Laser Surg* 2015;33(4):183-4.

⁶⁹ S. Chesnoy, P.Y. Lee, L. Huang, "Intradermal injection of transforming growth factor-beta1 gene enhances wound healing in genetically diabetic mice." *Pharm Res.* 2003 Mar;20(3):345-50.

⁷⁰ M. Flodstrom, B. Tyrberg, D.L. Eizirik and S. Sandler, "Reduced sensitivity of inducible nitric oxide synthase-deficient mice to multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes." *Diabetes* 48, 706-13, 1999.

⁷¹ G. Papaccio G., F. A. P Pisanti, M. V. Latronico, E. Ammendola and M. Galdieri, "Multiple low-dose and single high-dose treatments with streptozotocin do not generate nitric oxide." 2000, *J. Cell. Biochem.* 77, 82-91.

⁷² K. E. Rodgers, T. Espinoza, J. Felix, N. Roda, S. Maldonado, G. diZerega, "Acceleration of healing, reduction of fibrotic scar, and normalization of tissue architecture by an angiotensin analog. NorLeu3-A (1-7)." *Plast Reconstr Surg* 2003 Mar;111(3):1195-206.

⁷³ <https://www.diepresse.com/690896/verstummelung-viel-zu-viele-unnotige-amputationen>

⁷⁴ The International Working Group on the Diabetic Foot, "Guideline on interventions to enhance healing of foot ulcers in persons with diabetes", 2019.

⁷⁵ H. Mulder and C. Ling, "Mitochondrial dysfunction in pancreatic β -cells in Typ-2-Diabetes." *Molecular and cellular endocrinology*, 2009, 297: 34-40.

⁷⁶ J. Kim, Y. Wei, J.R. Sowers, "Role of Mitochondrial Dysfunction in insulin resistance." *Circulation Research*, 2008, 102: 401-414.

⁷⁷ K.F. Petersen, D. Befroy, S. Dufour, J. Dziura "Mitochondrial Dysfunction in the Elderly: Possible Role in Insulin Resistance." In: *Science*, 2003, 300: 1140-1142.

⁷⁸ P.V. Peplow, T.Y. Chung and G.D. Baxter, "Laser photobiomodulation of wound healing: A review of experimental studies in mouse and rat animal models." *Photomed Laser Surg* 2010; 28(3):291–325.

⁷⁹ T.Y. Chung, P.V. Peplow and G.D. Baxter, "Laser photobiomodulation of wound healing in diabetic and non-diabetic mice: Effects in splinted and unsplinted wounds." *Photomed Laser Surg* 2010;28(2):251–261.

⁸⁰ H.P. Ehrlich and B.M. Freedman, "Topical platelet-derived growth factor in patients enhances wound closure in the absence of wound contraction." *Cytokines Cell Mol Ther* 2002;7(3):85–90.

⁸¹ M. A. Nishioka, C. E. Pinfieldi, T. R. Sheliga, V. E. Arias, H. C. Gomes, and L. M. Ferreira, "LED (660 nm) and laser (670 nm) use on skin flap viability: angiogenesis and mast cells on transition line." *Lasers Med. Sci.*, vol. 27, no. 5, pp. 1045–1050, Dec. 2011.

⁸² M. A. D. Agnol, R. A. Nicolau, C. J. de Lima, and E. Munin, "Comparative analysis of coherent light action (laser) versus non-coherent light (light-emitting diode) for tissue repair in diabetic rats." *Lasers Med. Sci.*, vol. 24, no. 6, pp. 909–916, Feb. 2009.

⁸³ S. Hellmann und R. Rößlein, "Pflegetechnischer Umgang mit Dekubitus. Leitfaden und Formulierungshilfen", Schlütersche, 2007.

⁸⁴ L. Dittrich, "Thermographische Verlaufsbeobachtung der Wundheilung nach Operationen an der Brust- und Lendenwirbelsäule", Medizinischen Fakultät der Universität zu Rostock, 2011.

⁸⁵ S. Šutalo, D. Marder, C. Rohrer Bley, S. Bodis and G. Lutters, "Assessment of implantable temperature transponders for hyperthermia." Poster presentation at the Annual Meeting of European Society for Hyperthermic Oncology (ESHO) 2013.

⁸⁶ Y.-Y. Huang, "Low-level laser therapy: an emerging clinical paradigm." *SPIE Newsroom*, 2009.

⁸⁷ P. Martin and R. Nunan, "Cellular and molecular mechanisms of repair in acute and chronic wound healing." *Br. J. Dermatol.*, vol. 173, no. 2, pp. 370–378, Aug. 2015.

⁸⁸ A. P. C. de Sousa, J. N. Santos, J. A. dos Reis, T. A. Ramos, J. de Souza, M. C. T. Cangussú, and A. L. B. Pinheiro, "Effect of LED Phototherapy of Three Distinct Wavelengths on Fibroblasts on Wound Healing: A Histological Study in a Rodent Model." *Photomed. Laser Surg.*, vol. 28, no. 4, pp. 547–552, Dec. 2009.

⁸⁹ T. Fushimi, S. Inui, T. Nakajima, M. Ogasawara, K. Hosokawa, and S. Itami, "Green light emitting diodes accelerate wound healing: Characterization of the effect and its molecular basis in vitro and in vivo." *Wound Repair Regen.*, vol. 20, no. 2, pp. 226–235, Mar. 2012.

⁹⁰ N. Adamskaya, P. Dungal, R. Mittermayr, J. Hartinger, G. Feichtinger, K. Wassermann, H. Redl, and M. van Griensven, "Light therapy by blue LED improves wound healing in an excision model in rats." *Injury*, vol. 42, no. 9, pp. 917–921, Sep. 2011.

⁹¹ A. King, E. Gottlieb, D. G. Brooks, M. P. Murphy, and J. L. Dunaief, "Mitochondria-derived Reactive Oxygen Species Mediate Blue Light-induced Death of Retinal Pigment Epithelial Cells." *Photochem. Photobiol.*, vol. 79, no. 5, pp. 470–475, May 2004.

⁹² Y. Kuse, K. Ogawa, K. Tsuruma, M. Shimazawa, and H. Hara, "Damage of photoreceptor-derived cells in culture induced by light emitting diode-derived blue light." *Sci. Rep.*, vol. 4, p. srep05223, Jun. 2014.

⁹³ H. Y. Chang, J. B. Sneddon, A. A. Alizadeh, R. Sood, R. B. West, K. Montgomery, J.-T. Chi, M. van de Rijn, D. Botstein, and P. O. Brown, "Gene Expression Signature of Fibroblast Serum Response Predicts Human Cancer Progression: Similarities between Tumors and Wounds." *PLoS Biol.*, vol. 2, no. 2, Feb. 2004.

⁹⁴ V. Cury, A. I. S. Moretti, L. Assis, P. Bossini, J. de Souza Crusca, C. B. Neto, R. Fangel, H. P. de Souza, M. R. Hamblin, and N. A. Parizotto, "Low level laser therapy increases angiogenesis in a model of ischemic skin flap in rats mediated by VEGF, HIF-1 α and MMP-2." *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, vol. 125, pp. 164–170, Aug. 2013.

⁹⁵ M. Zaidi, J. G. Krolikowki, D. W. Jones, K. A. Pritchard, J. Struve, S. D. Nandedkar, N. L. Lohr, P. S. Pagel, and D. Weihrauch, "Transient Repetitive Exposure to Low Level Light Therapy Enhances Collateral Blood Vessel Growth in The Ischemic Hindlimb of The Tight Skin Mouse." *Photochem. Photobiol.*, vol. 89, no. 3, pp. 709–713, May 2013.

⁹⁶ P. Dungal, J. Hartinger, S. Chaudary, P. Slezak, A. Hofmann, T. Hausner, M. Strassl, E. Wintner, H. Redl, and R. Mittermayr, "Low level light therapy by LED of different wavelength induces angiogenesis and improves ischemic wound healing." *Lasers Surg. Med.*, vol. 46, no. 10, pp. 773–780, Dec. 2014.