

Effect of pulsed infrared low- level laser irradiation on open skin wound healing of healthy and streptozotocin induced diabetic rats by a biomechanical evaluating method

***Sharifian Z., M.Sc., Bayat M., Ph.D.* , Alidoust M., M.Sc.,
Gazour R., Ph.D., Dadpay M., M.D., Masteri Farahani R., Ph.D., Babaei S., M.Sc.,
Salilmi M., M.Sc. Student***

** P.O.Box: 19395-4719, Biology and Anatomical Sciences Department, Medical Faculty, Shahid Beheshti University MC, Tehran, Iran*

Received: Jul 2011 Accepted: Nov 2011

Abstract

Purpose: The aim of present study is to evaluate the effect of a pulsed infrared low- level laser on wound healing in an experimental induced diabetic rat model.

Materials and Methods: 18 adult rats were divided into 2 healthy and 1 diabetic groups. Diabetes was induced by intraperitoneal administration of streptozotocin in diabetic group. Two full - thickness skin incisions were made on the dorsum of rats. The wounds were divided into laser-treated and sham wounds (groups). Laser-treated wounds of healthy animals were submitted to a pulsed- infra red 890 nm laser with 80 H z frequency and 0.2 J/cm² (200 s) energy densities for each point of wounds of the first and second experimental groups respectively. Laser-treated wounds of diabetic animals were submitted to the same laser with 0.2 J/cm² (200 s) energy densities for each point of laser-treated wounds. On day 15 a sample of each wound were extracted and were submitted into tensiometerical test. Maximal force(MF,N) of samples was calculated.

Results: Laser irradiation with 0.2 J/cm² significantly increased maximum force of healthy (p=0.021) and diabetic (p=0.000) laser-treated wounds. Moreover p values of statistical analysis of laser-treated wounds of diabetic rats were better than those of healthy rats.

Conclusion: Laser treatments with a pulsed infrared laser with 0.2 J/cm² energy densities significantly accelerated wound healing in both healthy and diabetic rats. However, its positive effect was significantly better in diabetic rats.

Key words: Infra-red low-level laser therapy, Diabetes, Skin, Wound healing process, Biomechanical examination

بررسی اثرباش لیزر کم توان فروسرخ با حالت منقطع بر التیام زخم باز پوستی درموش‌های سالم و دیابتی شده به وسیله استرپتوزوتوسین با استفاده از یک روش ارزیابی بیومکانیکی

زین العابدین شریفیان *M.Sc.، محمد بیات *Ph.D.، مرتضی علیدوست *M.Sc.، روح‌ا... گازر *Ph.D.، معصومه دادپی *M.D.، رضا ماستری فراهانی *Ph.D.، سعید بابایی *M.Sc.، مریم سلیمی *M.Sc. Student
*گروه اناتومی و بیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
**گروه پاتولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ارتش، تهران، ایران
تاریخ دریافت: مرداد ماه ۹۰ تاریخ پذیرش: آبان ماه ۹۰

چکیده

هدف: بررسی تاثیر لیزر کم توان فروسرخ با حالت منقطع بر التیام زخم‌های با ضخامت کامل پوستی در موش‌های صحرائی دیابتی
مواد و روش‌ها: ۱۸ سر موش صحرائی بالغ به دو گروه سالم و یک گروه دیابتی تقسیم شدند. دیابت در موش‌ها با تجویز داخل صفاقی استرپتوزوتوسین القا شد. در همه موش‌ها دوز زخم برشی با ضخامت کامل پوست در ناحیه پشت ایجاد شد. ۲ زخم به دو گروه شم (sham) و لیزر تقسیم شد. به زخم‌های لیزر موش‌های سالم لیزر فرو سرخ با طول موج ۸۹۰ نانومتر و فرکانس ۸۰ هرتز به مدت ۲۰۰ ثانیه با دوز ۰/۲ ژول بر سانتی‌متر مربع برای هر نقطه تابش شد. به زخم‌های لیزر گروه موش‌های تجربی دیابتی، همان لیزر به مدت ۲۰۰ ثانیه با دوز ۰/۲ ژول بر سانتی‌متر مربع برای هر نقطه تابش شد. تابش روزی ۱ بار و ۶ روز در هفته انجام شد. ۱۵ روز بعد از ایجاد زخم، از زخم‌ها نمونه‌برداری شد و آزمایش بیومکانیکی از نوع کشش پذیری (tensiometry) روی آن‌ها انجام و نیروی حداکثر (N) آن‌ها محاسبه شد.

یافته‌ها: آزمایش‌های تنسیومتری نشان داد که تابش لیزر فروسرخ با دوز ۰/۲ ژول بر سانتی‌متر مربع برای هر نقطه، موجب افزایش معنی‌دار نیروی حداکثر زخم‌های لیزر گروه‌های تجربی سالم ($p=0.021$) و دیابتی ($p=0.000$) در مقایسه با زخم‌های گروه شم سالم و دیابتی شد.

نتیجه‌گیری: تابش لیزر فروسرخ منقطع با دوز ۰/۲ ژول بر سانتی‌متر مربع علاوه بر تسریع بهبود زخم در هر دو گروه سالم و دیابتی بر زخم‌های دیابتی نیز مؤثرتر است.

کلیدواژه‌ها: لیزر کم توان فروسرخ، دیابت، پوست، فرآیند التیام زخم، آزمایش بیومکانیکی

آدرس مکاتبه: تهران، اوین، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی،

گروه اناتومی و بیولوژی، صندوق پستی: ۱۹۳۹۵-۴۷۱۹

Email: bayat_m@yahoo.com

مقدمه

و خاموش (دوره منقطع خاموش) دارند که متعاقب زمان‌های روشن و فعال موج ضربانی رخ می‌دهد. این لیزرها گرمای کمتری تولید می‌کند و در مواردی کاربرد دارد که می‌خواهیم نور به بافت‌های عمقی‌تر نفوذ کند و بنابراین توان را باید افزایش داد تا انرژی کافی برای رسوخ به درون بافت فراهم شود. این افزایش توان در شرایط موج پیوسته باعث گرم شدن بافتی در لایه‌های سطحی می‌شود و در این شرایط نور منقطع (که گرمای کمتر تولید می‌کند) مؤثر واقع می‌شود. از طرفی نور منقطع واقعا ممکن است مؤثرتر از نور پیوسته باشد: در دوره‌هایی که موج منقطع در وضعیت خاموش است گرمادهی به بافت کاهش می‌یابد بنابراین در موج منقطع اجازه کاربرد حداکثر (peak) تراکم توان بیشتر نسبت به موج پیوسته به صورت ایمن و بالقوه وجود دارد [۱۱]. مروری بر منابع و تحقیقات انجام شده نشان داد که لیزرهای دیود از نوع منقطع (pulsed) باعث بروز تأثیرهای زیر می‌شود: افزایش تعداد فیبروبلاست‌ها در محیط کشت در مقایسه با گروه شاهد [۱۴-۱۲]، افزایش رسوب کالژن و تکثیر بیشتر میوفیبروبلاست‌ها [۱۵]، افزایش روند انقباض زخم (wound closure) در یک مدل تجربی زخم افراد سالم [۱۶]، شتاب بخشی التیام زخم ساق بیماران [۱۷] و زخم‌های سطحی گروهی از داوطلبان [۱۸]، بهبود تورکولوزیزیس ریوی مقاوم به درمان [۱۹]، کاهش درد در بیماران مبتلا به اختلال‌های عضلانی اسکلتی [۲۰-۲۳]، افزایش رشد و تکامل اندام‌های حرکتی جنین ۱۴ روزه موش در محیط کشت ارگان [۲۴] (Organ culture)، عدم آسیب به مغز سالم موش [۲۵]، ترمیم جراحات‌های دستگانه عصبی مرکزی [۲۶-۲۹] و بهبودی نقایص دستگانه عصبی محیطی [۲۹]، تکثیر استئوبلاست‌ها در محیط کشت [۳۱-۳۳]، افزایش چسبندگی بین استخوان و ایمپلنت [۳۴] و بالاخره شتاب بخشی ترمیم لیگامان [۳۵ و ۳۶] و تاندون و کاهش درد و التهاب در یک مدل حیوانی التهاب تاندون [۳۷]. اما در خصوص مزایای مثبت کاربرد لیزرهای دیود پیوسته بر فرآیند التیام زخم بین محققان اختلاف نظر وجود دارد [۲۵ و ۳۸-۳۷]. هر چند در

متأسفانه آمارهای پزشکی جدید و کاملی در خصوص شیوع و بروز مبتلایان به دیابت در کشور ما در دسترس نیست. البته دکتر عزیزی و همکاران در سال ۲۰۰۳ میلادی میزان مبتلایان به دیابت را ۱/۵۱ میلیون نفر بر آورد کردند [۱] از این رو مجبور هستیم به آمار دیگر کشورها استناد کنیم. تقریباً سالیانه حدود ۵۰ میلیون عمل جراحی در کشور آمریکا رخ می‌دهد [۲]. به علاوه ۵۰ میلیون زخم ضربه‌ای (Traumatic wounds) دیگر نیز به موارد فوق اضافه می‌شود [۳]. برای بهبودی این جراحات تقریباً حدود ۲۵۰ میلیون بیمار - روز و میلیون‌ها دلار هزینه صرف می‌شود. وقتی که عوارض زخم‌های حاد را هم در نظر بگیریم، هزینه‌ها بیشتر هم می‌شود. همچنین با وجود پیشرفت‌های تکنیکی میزان بالایی از باز شدن برش‌های جراحی لاپاراتومی، تشکیل فتق‌های برشی، نشست آناستوموزهای معده‌ای روده‌ای، فیستول‌های لوزالمعده، آنوريسم‌های کاذب عروقی، رد و شکست پیوندهای پوستی، استامپ (Stump) قطع عضوهای سخت و جوش نخوردن استخوان رخ می‌دهد [۴]. از طرفی دیابت یکی از مهمترین عواملی است که موجب بروز اختلال در فرآیند التیام زخم می‌شود. التیام زخم بیمارهای دیابتی فرآیند پیچیده‌ای است که مدت زمان لازم برای التیام آن از زخم‌های معمولی بیشتر طول می‌کشد و هزینه آن در کشور آمریکا سالیانه بیش از یک بلیون دلار است و درمان این زخم‌ها یکی از چالش‌های پزشکی در آن کشور محسوب می‌شود [۵ و ۶]. در بیماران دیابتی یک زخم کوچک اغلب تبدیل به زخمی مزمن و غیرقابل التیام می‌شود و این زخم‌ها اغلب عفونی شده و حتی ممکن است دچار گانگرن و حتی قطع عضو شود [۷ و ۸].

لیزرهای کم توان به وسیله تحقیقات پرفسور میستر (Mester) و همکارانش از کشور مجارستان به عنوان یک وسیله درمانی برای التیام زخم مطرح شد [۹ و ۱۰]. در این خصوص هاشمی (Hashemi) و همکاران گزارش کردند نور لیزر با حالت منقطع مزایای بالقوه فراوانی دارد: به دلیل این که آن‌ها دوره‌های روشن

التیام سریع‌تر زخم شده و از درد بیماران بکاهد و موجب صرفه‌جویی در هزینه‌های درمانی شود.

مواد و روش‌ها

حیوان مورد بررسی

۱۸ سر موش صحرایی (Rat) نر بالغ نژاد Wistar با وزن ۲۰۰ الی ۲۳۰ گرم از انستیتو پاستور ایران تهیه شدند. موش‌ها به صورت تصادفی به دو دسته سالم و دیابتی تقسیم شدند. دسته سالم دارای ۱۲ سر موش صحرایی بود که به ۲ زیر گروه مساوی برای تابش دو دوز مختلف لیزر تقسیم شدند. دسته دیابتی هم دارای ۶ سر موش صحرایی بود که در یک گروه و تحت تابش لیزر قرار گرفتند.

نحوه القای دیابت

از طریق ایجاد زخم کوچکی در انتهای دم از موش‌های گروه دیابتی خون ناشتا گرفته و قند خون آن‌ها به وسیله دستگاه پرتابل اندازه‌گیری قند خون (Biomine, Rightsttm GM300, Biomine Corporation, Switzerland) ثبت شد. استرپتوزوتوسین (streptozotocin, STZ) با نام تجاری Zanosar محصول شرکت (Enzo Life Sciences, USA) در آب مقطر استریل حل و به صورت تازه و به نسبت وزن هر موش (۵۵mg/kg) به صورت داخل صفاقی و طی یک بار به موش‌های گروه دیابتی تزریق شد. بعد از گذشت یک هفته، دوباره از آن‌ها خون گرفته شد و قند خون آن‌ها ثبت و در صورتی که بالای ۲۵۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر بود، دیابتی محسوب شدند. سپس از زمان تزریق به مدت یک ماه تامل شد تا شرایط هیپرگلیسمی در آن‌ها تثبیت شود. در زمان‌های جراحی و نمونه‌برداری مجدداً وزن و قند خون آن‌ها ثبت شد در صورتی که قند خون آن‌ها کمتر از ۲۵۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر بود، از برنامه تحقیق حذف شدند [۵۳] و در صورتی که موش‌ها دیابتی نشده بودند تجویز استرپتوزوتوسین یک‌بار دیگر تکرار شد و در غیر این صورت از

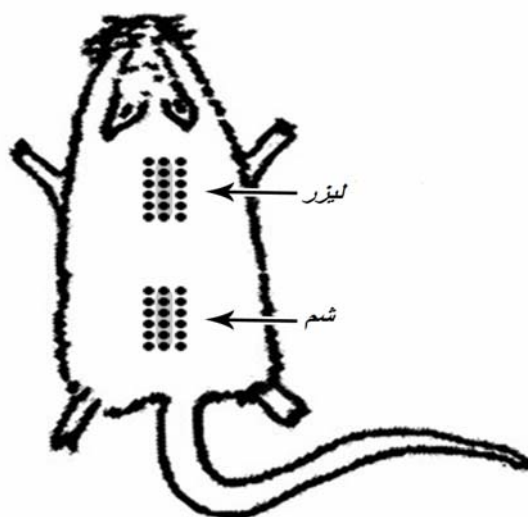
تحقیقاتی آثار مثبت این لیزرها بر فرآیند التیام زخم گزارش شده است [۲۵ و ۴۷-۳۱]، اما بررسی‌های دیگر از اثر مثبت لیزر روی فرآیند التیام زخم حمایت نکرده‌اند [۴۷-۴۲]. به همین دلیل هنوز محققان در خصوص کاربرد این لیزر روی تسریع بخشی فرآیند التیام زخم اختلاف نظر دارند. در تحقیقاتی که اخیراً انجام شده است از انواع مختلف لیزر دیود با طول موج‌ها، قدرت‌ها و دوزهای تحریکی مختلف استفاده شده است اما همچنان پیشنهاد مشخصی در این خصوص ارایه نشده است. از طرف دیگر تاکنون تاثیر لیزر فرو سرخ با طول موج ۸۹۰ نانومتر و فرکانس ۸۰ هرتز روی التیام زخم پوستی بررسی نشده است و در تنها تحقیقی که توسط ماتیس (Matic) و همکاران انجام شد تاثیر لیزر با طول موج ۸۹۰ نانومتر و فرکانس ۱۵۰۰ هرتز ارایه شده است. روند التیام زخم موش‌های سالم به وسیله معیار بسته شدن زخم ارزیابی شد و تاثیر مثبت آن گزارش شد [۱۶]. لازم به ذکر است راجع به آثار لیزرهای کم توان از نوع پیوسته بر زخم‌های حیوانات دیابتی و محیط کشت حاوی غلظت زیاد گلوکز تحقیقات مختلفی انجام شده است که نتایج آن‌ها نشان دهنده تاثیر مثبت این لیزرها بر افزایش درصد کلاژن [۴۸]، افزایش پارامترهای بافت شناسی (سلول‌های التهابی، عروق و فیبروبلاست‌ها) [۴۹] و افزایش پارامترهای بیوشیمیایی و بیومکانیکی زخم‌های پوستی [۵۰] در حیوانات آزمایشگاهی دیابتی است. همچنین نتایج تحقیقات درون محیط کشت راجع به تاثیر لیزرها بر سلول‌های فیبروبلاست پوست انسان که شرایط دیابتی [۵۱] و زخمی شدن آن‌ها شبیه سازی شده بود [۵۲] نشان‌گر اثر مثبت آن‌ها بر تکثیر و همچنین پارامترهای مورفولوژیکی و سلولی مولکولی فیبروبلاست‌ها بوده است.

هدف تحقیق حاضر بررسی اثر لیزر دیود با طول ۸۹۰ نانومتر و فرکانس ۸۰ هرتز بر فرآیند التیام زخم برشی (incision) موش‌های سالم و دیابتی شده به وسیله استرپتوزوتوسین به روش ارزیابی کشش‌پذیری (tensiometry) است. نتیجه تحقیق حاضر ممکن است منجر به طراحی پروتکل‌های درمانی شود که باعث

برنامه تحقیق حذف شدند.

جراحی

موش‌های دیابتی شده به‌وسیله تزریق داخل عضلانی کتامین به میزان ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و دیازپام به میزان ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم بیهوش شدند. موی پشت آن‌ها تراشیده شد. پوست به‌وسیله بتادین و الکل طبی سفید ۷۰ درجه ضدعفونی شد. دو برش در پوست هر موش داده شد [۵۴]. محور طویل این برش‌ها سری دمی (cranio caudal) بوده و هر یک به طول ۱/۵ سانتی‌متر و با فاصله ۴ سانتی‌متر از یکدیگر در پوست پشت، یکی در ناحیه توراسیک فوقانی و دیگری در ناحیه لومبار با ضخامت کامل پوست و شامل عضله جلدی با اسکالپل نمره ۱۵ داده شد و فاصله دو لبه برش به‌وسیله بخیه زدن با یک کوک در قسمت میانی زخم با فاصله حدود ۳ میلی‌متر حفظ شد. در هر موش زخم‌ها به‌طور تصادفی به دو زخم شام (sham) و لیزر تقسیم شدند (شکل ۱).



شکل ۱. تصویر شماتیک محل برش‌های زخم‌های لیزر و شام (Sham) و نقاط تحت تابش لیزر در زخم لیزر و نقاط تابش خاموش در زخم شام

تابش لیزر

هر زخم و پوست اطراف آن به حدود ۱۸ نقطه تقسیم

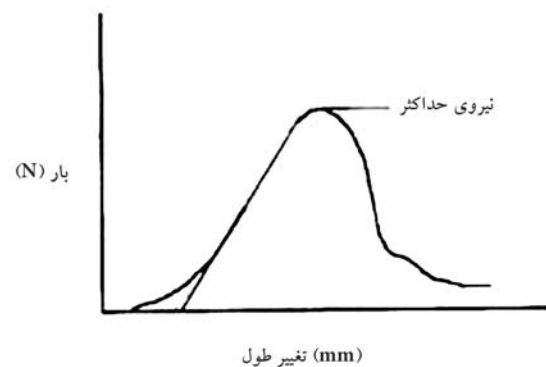
شد. به زخم‌های لیزر موش‌های سالم ۲ دوز لیزر فرسرخ با طول موج ۸۹۰ نانومتر و فرکانس ۸۰ هرتز تابانده شد. برای هر نقطه از زخم‌های لیزر گروه تجربی یک (موش‌های سالم) لیزر به مدت ۳۰ ثانیه تابش شد و دوز آن ۰/۰۳ ژول بر سانتی‌متر مربع بود. به زخم‌های لیزر گروه تجربی دو (موش‌های سالم) همان لیزر به مدت ۲۰۰ ثانیه با دوز ۰/۲ ژول بر سانتی‌متر مربع برای هر نقطه تابش شد. به زخم‌های لیزر گروه تجربی سه (موش‌های دیابتی) همان لیزر به مدت ۲۰۰ ثانیه با دوز ۰/۲ ژول بر سانتی‌متر مربع برای هر نقطه تابش شد. لیزر برای هر نقطه بلافاصله بعد از ایجاد زخم و روزانه یک‌بار و ۶ بار در هفته تابیده شد. پروب لیزر به‌فاصله حدود ۱ سانتی‌متر در بالای بافت هدف بود و سعی شد که تقریباً کل ناحیه زخم و پوست سالم لبه آن به‌وسیله تابش به ۱۸ نقطه تحت پوشش تابش مستقیم لیزر قرار گیرد. دستگاه لیزر MUSTANG 2000 ساخت کشور روسیه و پروب آن LO7 بود. سایر مشخصات لیزر از این قرار بود: حداکثر توان ۷۵ وات و پهنای موج ۱۸۰ نانومتر و سطح مقطع پرتو لیزر ۱ سانتی‌متر مربع بود. موش‌ها در حین تابش لیزر به‌وسیله تزریق ۱/۲ داروهای بیهوشی آرام شدند و در وضعیت prone روی تخت جراحی بی‌حرکت شده و ۴ اندام حرکتی آن‌ها به ۴ گیره واقع در چهار گوشه تخت ثابت شد. با زخم‌های شام نظیر زخم‌های لیزر رفتار شد و فقط دستگاه لیزر خاموش بود.

آزمایش بیومکانیکی از نوع تنسیومتری

نمونه‌برداری ۱۵ روز بعد از جراحی به عمل آمد. همه نمونه‌برداری‌ها به‌وسیله یک ابزار مخصوص انجام شد. این ابزار شامل دو تیغه بیستوری و اسکالپل مربوط است که به‌وسیله گیره کنار هم متصل شده بود. عرض نمونه ۵ میلی‌متر و طول آن ۵ سانتی‌متر بود که بستر زخم در قسمت میانی آن قرار داشت. نمونه درون گاز زخم‌بندی آغشته به محلول نمکی ۰/۹ درصد قرار گرفت و به درون فریزر منهای

بسیست درجه منتقل شد. در موعد مقرر نمونه در دمای اتاق ذوب شد و تحت آزمایش تنسیومتری به وسیله دستگاه Zwick/Roell, Germany قرار گرفت. دو لبه نمونه به دو گیره ثابت و متحرک دستگاه متصل شد و گیره متحرک با سرعت ۱۵ میلیمتر در دقیقه از گیره ثابت دور شد و رایانه متصل به دستگاه منحنی load-deformation و نیروی حداکثر maximum (force, MF) را با واحد نیوتن ارائه کرد (شکل ۲). تعداد نمونه برای گروه ۶ سر موش بود.

برای گروه ۶ سر موش بود.



شکل ۲. منحنی بار تغییر شکل در آزمایش بیومکانیکی تنسیومتری و محل پارامتر بیومکانیکی نیروی حداکثر

روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

داده‌ها به روش student t test تجزیه و تحلیل آماری شد و $p < 0.05$ معنی دار تلقی شد. نتایج به صورت $\text{mean} \pm \text{SD}$ ارائه شد.

یافته‌ها

یافته‌های عمومی

قند خون موش‌های دسته سالم در بدو تحقیق $13/1 \pm 96/4$ و وزن آن‌ها در بدو تحقیق $26/4 \pm 298/4$ و این وزن در انتهای دوره $23/37 \pm 257/6$ بود. اختلاف وزن موش‌ها از نظر آماری با روش paired student t test معنی دار بود ($p = 0.04$). قند خون موش‌های دسته دیابتی در ابتدای تحقیق $14/6 \pm 94/8$ و بعد از القای دیابت $13/13 \pm 454$ بود و اختلاف آن‌ها با روش

یافته‌های آزمایش بیومکانیک

تجزیه و تحلیل آزمایش‌های بیومکانیکی به روش paired student t test نشان داد:

۱) تابش لیزر با دوز $0/03$ ژول بر سانتی‌متر مربع موجب بروز کاهش معنی‌دار آماری نیروی حداکثر در زخم‌های لیزر گروه تجربی یک (سالم) در مقایسه با زخم‌های شام همان گروه شد (paired student t test: $p = 0.015$) (جدول ۱).

۲) تابش لیزر با دوز $0/2$ ژول بر سانتی‌متر مربع موجب بروز افزایش معنی‌دار آماری نیروی حداکثر در زخم‌های لیزر گروه تجربی دو (سالم) در مقایسه با زخم‌های شام همان گروه شد (paired student t test: $p = 0.021$) (جدول ۲).

۳) تابش لیزر با دوز $0/2$ ژول بر سانتی‌متر مربع بر زخم‌های لیزر گروه تجربی سه (دیابتی) سبب بروز افزایش معنی‌دار آماری برای پارامتر نیروی حداکثر نسبت به زخم‌های شام دیابتی شد (paired student t test: $p = 0.000$).

جدول ۱. میانگین و انحراف معیار نیروی حداکثر در موش‌های گروه تجربی یک با دوز $0/03$ ژول بر سانتی‌متر مربع برای هر نقطه

| گروه | زیرگروه | نیروی حداکثر (N) Mean \pm SD | سطح معنی‌داری (p) |
|-------------------|---------|-----------------------------------|----------------------|
| تجربی ۱ (سالم) | شم | $8/50 \pm 1/08$ | 0.015 |
| | لیزر | $5/11 \pm 1/60$ | |

براساس نتایج تجزیه و تحلیل آماری به روش paired student t test، تابش لیزر با دوز $0/03$ ژول بر

با طول موج ۸۹۰ نانومتر و فرکانس ۸۰ هرتز و دوز ۰/۲ ژول بر سانتی‌متر مربع و مدت ۲۰۰ ثانیه در هر نقطه بر زخم‌های لیزری موش‌های دیابتی در مقایسه با زخم‌های لیزری موش‌های سالم بود. از طرفی؛ تیمار همان نوع زخم‌ها با همان لیزر و با دوز ۰/۰۳ ژول بر سانتی‌متر مربع و مدت ۳۰ ثانیه برای هر نقطه نشان دهنده تاثیر منفی لیزر کم توان درمانی بر ویژگی بیومکانیکی نیروی حداکثر زخم‌های موش‌های سالم بود

طی مرور مطالعاتی که در گذشته در خصوص اثر لیزرهای کم توان منقطع بر فرآیند التیام زخم پوستی انجام شده است روشن شد که این تحقیقات تاکنون روی زخم‌های موش‌های سالم و غیر دیابتی بوده است و به نظر می‌رسد این تحقیق برای بار اول نتیجه اثر این نوع لیزرها را روی حیوان دیابتی گزارش می‌کند. تحقیقات فوق‌الذکر را می‌توان در دو گروه تحقیقات با نتایج مثبت و تحقیقات با نتایج منفی دسته‌بندی نمود:

ناسباوم (Nusbaum) و همکاران در سال ۱۹۹۴ اثر تابش لیزرهای کم توان، اولتراسوند درمانی و طیف پرتو فرابنفش را به همراه پرستاری از زخم‌های فشاری روی ۲۲ بیمار بررسی کردند. برنامه لیزر درمانی هفته‌ای ۳ بار انجام می‌شد و مشخصات لیزر از این قرار بود: یک کلاستر خوشه‌ای با لیزر دیود به طول موج ۸۲۰ نانومتر و ۳۰ پروب لیزرهای دیود فرانوری (superluminous) که مشتمل بر ۱۰×۳ منبع لیزر با طول موج‌های ۶۶۰ و ۸۸۰ و ۹۵۰ نانومتر و تراکم انرژی ۴ ژول بر سانتی‌متر مربع و میزان تکرار موج (فرکانس) ۵۰۰۰ موج در ثانیه و طول مدت موج ۱۶۰ نانو ثانیه. محققان با تجزیه و تحلیل نتایج دریافتند که درمان زخم‌ها با ترکیب اولتراسوند و فرابنفش و پرستاری نتایج بهتری در مقایسه با لیزر دارد. آن‌ها اعلام کردند فاکتورهای مداخله‌گری که ممکن بوده است بر نتایج اثر

سانتی‌متر مربع موجب بروز کاهش معنی‌دار آماری پارامتر نیروی حداکثر زخم لیزری در مقایسه با زخم شم گروه تجربی یک شد (p=0.015).

جدول ۲. میانگین و انحراف معیار نیروی حداکثر درموش‌های گروه‌های تجربی دو و سه با دوز ۰/۲ ژول بر سانتی‌متر مربع برای هر نقطه

| گروه | زیر گروه | نیروی حداکثر (N) Mean±SD | سطح معنی‌داری (p value) |
|---------------------|----------|-----------------------------|----------------------------|
| تجربی ۲ (سالم) | شم | ۶/۱۹±۲/۲۷ | 0.021 |
| | لیزر | *۱۰/۲۸±۴/۶۲ | |
| تجربی ۳ (دیابتی) | شم | ۵/۴۸±۱/۰۳ | 0.000 |
| | لیزر | *۸/۵۰±۱/۰۸ | |

نتایج تجزیه و تحلیل آمار به روش paired student t test

نشان داد که:

- ۱- تابش لیزر با دوز ۰/۲ ژول بر سانتی‌متر مربع موجب بروز افزایش معنی‌دار آماری پارامتر نیروی حداکثر در زخم لیزری در مقایسه با زخم شم گروه تجربی دو می‌شود (p=0.021)
- ۲- تابش لیزر با دوز ۰/۲ ژول بر سانتی‌متر مربع موجب بروز افزایش معنی‌دار آماری پارامتر نیروی حداکثر در زخم لیزری در مقایسه با زخم شم گروه تجربی سه شد (p=0.000).

بحث

نتایج آزمایش بیومکانیکی نیروی حداکثر بافت‌های زخم‌های ترمیمی گروه‌های تجربی نشان دهنده افزایش نیروی حداکثر در زخم‌های لیزری در موش‌های سالم و دیابتی بود. بررسی دقیق سطح معنی‌داری اختلافات آماری نمایانگر اثر بیشتر و معنی‌دار لیزر کم توان با امواج منقطع

منفی داشته باشد، کنترل شده بود. آن‌ها در توجیه و تفسیر برخی نتایج اعلام داشتند که سطح زخم‌های گروه لیزر اغلب با چرک (purulent) پوشیده شده بود [۵۵] و از آنجایی که کارو (Karu) و همکاران لیزر با طول موج ۹۵۰ نانومتر و تراکم قدرت (PD: power density) ۱۲۰ میلی‌ولت بر سانتی‌متر مربع را روی محیط کشت استفاده کرده بودند و ارتباطی بین تکرار موج (۵۰۰۰ هرتز) و چگالی انرژی را نشان داده بودند که با میزان تکرار موج ۵۰۰۰ تنها با تراکم انرژی بیش از ۳۰ ژول بر سانتی‌متر مربع تکثیر باکتری‌ها متوقف شد [۵۶]، بنابراین نوستام (Nusstaum) و همکاران نتیجه گرفتند که فرکانس موج ۵۰۰۰ هرتز و چگالی انرژی ۴ ژول بر سانتی‌متر مربع ممکن است توجیه‌گر مشاهده چرک در سطح زخم‌ها باشد به عبارت دیگر؛ میزان تکرار موج ۵۰۰۰ و چگالی انرژی ۴ ژول بر سانتی‌متر مربع برای باکتری زدایی از زخم‌ها کم بوده است [۵۵].

در تحقیق حاضر هم تابش لیزر منقطع با دوز ۰/۰۳ ژول بر سانتی‌متر مربع بر هر نقطه نه تنها تاثیر مثبت نداشت بلکه موجب کاهش معنی‌دار معیار آزمایش بیومکانیکی نیروی حداکثر زخم‌های لیزری در مقایسه با گروه شم شد. اما با افزایش دوز به ۰/۲ ژول بر سانتی‌متر مربع و مدت زمان تابش در هر نقطه به ۲۰۰ ثانیه که با افزایش تراکم انرژی همراه است، نیروی حداکثر زخم لیزری در مقایسه با گروه شم افزایش معنی‌دار یافت که این افزایش در موش‌های دیابتی از سطح معنی‌داری بالاتری هم برخوردار بود.

تابش لیزر در تحقیق حاضر به صورت منقطع است یعنی دوره‌های روشن و خاموش دارد؛ بنابراین برای حصول نتایج مثبت طول مدت تابش لیزر باید آنقدر طولانی باشد تا جبران دوره‌های خاموش لیزر را نماید تا نور لیزر بتواند آثار خود را بر بافت اعمال نماید. در تحقیق

دیگری لویو (Lowe) و همکاران تاثیر تابش نور مونوکروماتیک کم تراکم از نوع گالیوم آلومینیوم آرسناید با طول موج ۸۹۰ نانومتر و تراکم انرژی (radiant exposure) ۰/۱۸ و ۰/۵۴ و ۱/۴۵ ژول بر سانتی‌متر مربع با حداکثر توان خروجی ۳۰۰ میلی‌ولت و میزان تکرار ضربان ۲۷۰ هرتز که به وسیله ۶۰ پروب دیود به ناحیه‌ای با مساحت ۲۲/۵ سانتی‌متر مربع و سه بار در هفته تابش شد را بررسی کردند؛ مساحت زخم‌ها ۷×۷ سانتی‌متر مربع بود که قبلاً به وسیله پرتو x ایجاد شده بود (۵۷). آن‌ها تاثیر تابش نور را به وسیله اندازه‌گیری تغییرات سطح زخم به وسیله یک سیستم آنالیز تصویری ثبت و داده‌ها را به وسیله تکرار اندازه‌گیری با روش one way ANOVA آنالیز و مشاهده کردند. تابش نور مونوکروماتیک با تراکم‌های انرژی ۰/۱۸ ژول بر سانتی‌متر مربع و ۰/۵۴ ژول بر سانتی‌متر مربع اثری روی روند انقباض زخم نداشت اما تاثیر منفی معنی‌دار آماری بر روند انقباض زخم با دوز ۱/۴۵ ژول بر سانتی‌متر مربع در روز ۱۶ بعد از ایجاد زخم داشت. آن‌ها اعلام کردند در مدل زخمشان فاز تکثیر طولانی شده بود در حالی که چنین تغییری در فازهای التهاب و تجدید ساختار معنی‌دار نبود. آن‌ها در توجیه نتایج اعلام کردند که مکانیسم احتمالی برای نحوه عمل فوتواستیمولیشن (photo stimulation) جذب انرژی نور به وسیله میتوکندری‌هاست که این باعث افزایش انرژی سلول و افزایش نفوذپذیری غشای سلول و تحریک آزاد کردن میانجی‌های شیمیایی درگیر در التیام زخم است؛ اما با توجه نبود چنین اثر تحریکی روشن است که به دنبال برنامه تابش لیزر با پارامترهایی که در تحقیقشان به کار رفته است چنین مکانیسمی رخ نداده است. آن‌ها در نهایت اعلام کردند که شناخت نقایص موجود در فرآیندهای التیام زخم مزمن و تاخیری ضرورت دارد و همچنین باید

(rat) بررسی کردند (۱۶). محققان لیزر کم توان نیمه رسانا با طول موج ۸۹۰ نانومتر و میزان تکرار ضربان ۱۵۰۰ هرتز و طول موج ۳۰۰ نانوثانیه و حداکثر قدرت خروجی ۳۶ میلی‌ولت و متوسط قدرت خروجی ۱۵/۴ میلی‌ولت را به مدت زمان ۵ دقیقه و در ۲۱ روز پی در پی تاباندند. زخم‌های شاهد در موش دیگری ایجاد شده بود. میزان انقباض زخم‌ها در گروه لیزر نسبت به گروه شاهد به‌طور معنی‌داری بیشتر بود. محققان در توجیه آثار نتایج مثبت لیزر به نتایج مثبت سایر تحقیقات مربوط به لیزر اشاره کردند و اعلام کردند انتخاب صحیح پارامترهای تابش و ترکیب احتمالی آن‌ها می‌تواند موجب تسریع بخشی فرایند التیام زخم شود. واشقانی (Vasheghani) و همکاران اثر لیزر دیود فروسرخ با طول موج ۸۹۰ نانومتر و میزان تکرار موج ۸۰ هرتز و مدت زمان ۶۹۴ ثانیه برای هر نقطه تابش و مجموعه ۳ نقطه تابش بر التیام سوختگی درجه ۳ را در موش صحرایی آزمایش کردند. تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد میزان انقباض زخم در موش‌های تیمارشده به‌وسیله لیزر به‌طور معنی‌داری بیش از زخم‌های سوختگی شاهد بود. آن‌ها در توجیه نتایج مثبت به اهمیت دو پارامتر حیاتی در تابش لیزر یعنی مدت زمان تابش و میزان تکرار موج (فرکانس) اشاره کردند [۵۹]. بارولت (Barolet) و همکاران اعلام کردند تأثیر پارامترهای تابش در نور درمانی با شدت کم بر واکنش‌های سلولی کاملاً شناخته شده نیست از این‌رو آن‌ها آثار نورهای مختلف را بر تولید کلاژن روی فیبروبلاست‌های انسانی در محیط کشت آزمایش کردند (۶۰). آن‌ها نور red-light-emitting diode با طول موج ۶۳۰ نانومتر و تراکم قدرت (irradiance) ۸ میلی‌ولت بر سانتی‌متر مربع و مدت تابش ۱۰۰ ثانیه و مدت زمان ضربان ۵۰۰ میکروثانیه و تراکم انرژی تام (total flounce) ۱/۳۳ ژول بر سانتی‌متر مربع و فاصله زمانی بین دو موج

استراتژی‌های درمانی را توسعه داد تا در این زخم‌ها اعمال و به رفع این اختلال‌ها کمک شود [۵۷]. لوکاس (Lucas) و همکاران لیزر کم توان درمانی از نوع لیزر دیود گالیوم آرسناید فروسرخ با طول موج ۹۰۴ نانومتر و میزان تکرار موج ۸۳۰ هرتز و مدت زمان موج ۱۵۰ نانوثانیه و میانگین قدرت موج ۱۲×۸ میلی‌ولت و تراکم انرژی یک ژول بر سانتی‌متر مربع که ۱۲۵ ثانیه طول می‌کشید را ۵ بار در هفته بر زخم‌های فشاری بیماران به‌عنوان یک درمان کمکی علاوه بر درمان رایج که شامل تمیز کردن زخم و پانسمان ساده مرطوب و تغییر وضعیت مکرر بیمار بود به‌کار بردند. محققان در تجزیه و تحلیل نتایج به مدارکی دال بر اثر مثبت لیزر کم توان به عنوان درمان کمکی برای التیام زخم فشاری نرسیدند. آن‌ها در توجیه نتایج خود اعلام کردند که پارامترهای لیزر را بر اساس نتایج مثبت تحقیقات حیوانی و انسانی انتخاب کرده بودند و همچنین آن‌ها در این تحقیق به تعداد نمونه بیماران توجه کرده و تعداد نمونه بیماران کافی بوده است و دوز لیزر را به‌طور دقیق کنترل کرده بودند و معیار ارزیابی التیام زخم کاهش سطح زخم بوده است که این نه تنها کاهش نیافت بلکه در برخی از بیماران دچار اختلال شد و شاید دلیل آن‌ها زیاد نبودن تعداد بیماران به حد کافی بوده است که نتوانسته اثر مثبت لیزر درمانی را نشان دهد. آن‌ها همچنین اعلام کردند که برخی فاکتورهای انسانی که بر التیام زخم تأثیر می‌گذارد را بررسی نکرده‌اند و آن‌ها اصل توزیع تصادفی بیماران را در نظر گرفته بودند [۵۸].

در این قسمت به بررسی مقالاتی می‌پردازیم که تأثیر مثبت لیزر منقطع را بر انواع زخم‌ها در مدل‌های آزمایشگاهی سالم و غیر دیابتی آزمایش کرده‌اند. ماتیس (Matic) و همکاران تأثیر انواع میدان‌های الکترومگنتیک را بر فرایند ترمیم زخم پوستی در حیوان آزمایشگاهی موش

نتایج منفی در گروه تحت تابش لیزر با دوز ۰/۰۳ ژول بر سانتی متر مربع را مشخص کند.

از طرفی تابش با دوز ۰/۲ ژول بر سانتی متر مربع موجب افزایش نیروی حداکثر در موش های سالم و دیابتی شد که با نتایج سایر تحقیقات راجع به اثر مثبت لیزر کم توان پیوسته روی زخم های دیابتی هماهنگی دارد [۳۹، ۴۰، ۵۲-۴۸ و ۵۴]. محققان گزارش کرده اند که لیزرهای با طول موج مختلف آثار متفاوتی بر سیستم های بیولوژیک دارد [۵۰]. تحقیقات نشان داده است واکنش به پرتو تولید شده توسط طول موج های نزدیک به طول موج به کار رفته در تحقیق حاضر از غشای سلول شروع می شود و منجر به وقایعی می شود که منجر به تولید واکنش های فتوشیمیایی به وسیله بافت می شود [۵۰] که این مطلب ممکن است از دلایل اثر بخشی لیزر در تحقیق اخیر باشد.

تابش لیزر منقطع با طول موج ۸۹۰ نانومتر و تکرار موج ۸۰ هرتز و مدت زمان موج ۱۸۰ میکرو ثانیه و دوز ۰/۲ ژول بر سانتی متر مربع به صورت ۶ بار در هفته موجب تسریع بخشی فرآیند التیام زخم پوستی در موش های صحرائی سالم و دیابتی شده به وسیله تجویز استرپتوزوتوسین شد که تابش لیزر اثر بیشتری از نظر استحکام بر زخم های دیابتی داشت که این نتیجه به وسیله آزمایش های تنسیومتری مشخص شد. تحقیقات بیشتر با استفاده از روش های ارزیابی سلولی و مولکولی پیشنهاد می شود.

۱۵۰ میکروثانیه را به کار بردند. نتایج نشان داد ۷۲ ساعت بعد از تابش با لیزر ضربانی با مدت زمان ۱۰۰۰ میکروثانیه بین دو موج منقطع بهترین اثر را در تولید کلاژن به وسیله فیبروبلاست ها در محیط کشت دارد و الگوی منقطع ویژه بیشترین تاثیر را در افزایش تولید کلاژن دارد [۶۰].

در تحقیقات زیادی که به بررسی اثر لیزرهای کم توان بر فرآیند التیام زخم پوستی در موش های آزمایشگاهی دیابتی پرداخته اند از مد پیوسته موج لیزر استفاده کرده اند [۴۸] که به هر حال نشان از اهمیت فراوان موضوع دیابت دارد اما به نظر می رسد پروژه حاضر اولین بررسی در خصوص آزمایش اثر لیزر منقطع بر فرآیند التیام زخم در نمونه دیابتی در شرایط *in vivo* باشد که پیامد آن اثر بیشتر این نوع لیزر بر نیروی حداکثر زخم های دیابتی در مقایسه با زخم های سالم بود.

مرور اطلاعات منابع به کار رفته در تحقیق حاضر نشان می دهد که صرف تابش لیزر کم توان با هر دوزی بر زخم ها نمی تواند موجب بروز آثار مثبت ترمیمی شود اما نکته مهمی که در تحقیق حاضر مشاهده شد تأثیر منفی معنی دار تابش لیزر با دوز ۰/۰۳ ژول بر سانتی متر مربع بر التیام زخم در مقایسه با گروه شم بود. در تحقیق حاضر هر دو زخم تحت تیمار با لیزر و شم در یک حیوان بود، بنابراین اکثر متغیرها برای هر دو زخم یکسان بود و تنها اختلاف بین دو زخم، تابش لیزر بود. به هر حال انجام تحقیقات بیشتر می تواند دلیل یا دلایل بروز احتمالی بروز

References

1. Azizi F, Gouya MM, Vazirian P, Dolatshahi P, Habibian S. Screening for type 2 diabetes in the Iranian national programme: a preliminary report. East Mediterr Health J 2003; 9: 1122-7.
2. National hospital Discharge Survey: Detailed Diagnosis and procedures. National center for Health statistics, Washington, DC, 1995.
3. Arrow AK. Biotechnology in wound care. 4th ed. Los Angeles, Calif: Wedbush Morgan Securities, 1995, pp 1-82.
4. Carlson MA. Acute wound failure. Surg Clin North Am 1997; 77: 607-36.
5. Clupp CL, Bloom DC. Gene therapy, electroporation, and the future of wound healing

- therapies. *Facial Plast Surg* 2002; 18: 53-7.
6. **Man LX, Park JC, Terry MJ, Mason JM, Burrell WA, Liu F, et al.** Lentiviral gene therapy with platelet derived growth factor B sustains accelerated healing of diabetic wounds over time. *Ann Plast Surg* 2005; 55: 81-6.
 7. **Nagai MK, Embil JM.** Becaplermin recombinant platelet derived growth factor, a new treatment for healing diabetic foot ulcers. *Expert Opin Biol Ther* 2002; 2: 211-8.
 8. **Greenhalgh DG.** Wound healing and diabetes mellitus, A review. *Clin Plast Surg* 2003; 30: 37-45.
 9. **Mester E, Jaszagi-Nagy E.** The effect of laser radiation on wound healing and collagen synthesis. *Studia Biophys* 1973; 35: 227-34.
 10. **Mester E, Spiry T, Szende B, Tota JG.** Effect of laser rays on wound healing. *Am J Surg* 1971; 122: 532-5.
 11. **Hashemi JT, Huang YY, Sharma SK, Kurup DB, De Taboada L, Carrol JD, et al.** Effect of pulsing in low-level light therapy. *Lasers Surg Med* 2010; 42: 450-66.
 12. **Webb C, Dyson M, Lewis WH.** Stimulatory effect of 660 nm low level laser energy on hypertrophic scar – derived fibroblast: possible mechanisms for increase in cell count 1998; 22: 294-301.
 13. **Kreisler M, Christoffers AB, Al-Haj H, Willershausen B, d'Hoedt B.** Low level 809-nm diode laser-induced in vitro stimulation of the proliferation of human gingival fibroblasts. *Lasers Surg Med* 2002; 30: 365-9.
 14. **Pereira AN, Eduardo EP, Matson E, Marques MM .** Effect of low power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblast. *Lasers Surg Med* 2002; 31: 263-7.
 15. **Medrado AR, Pugliese LS, Reis SR, Andrade ZA.** Influence of low – level laser therapy on wound healing and its biologic action upon myofibroblasts. *Lasers Surg Med* 2003; 32: 239-44.
 16. **Matic M, Lazetic B, Poljacki M, Djuran V, Matic A, Gajinov Z.** Influence of different types of electromagnetic fields on skin reparatory processes in experimental animals. *Lasers Med Sci* 2009; 24: 321-7.
 17. **Bihari I, Mester AR.** The biostimulative effect of low – level laser therapy on longstanding crural ulcers using helium – neon laser plus infrared lasers and non coherent light: preliminary report of a randomized double blind comparative study. *Laser Therapy* 1989; 1: 97-8 .
 18. **Hopkins JT, McLoda TA, Seegmiller JG, David Baxter G.** Low-Level Laser Therapy Facilitates Superficial Wound Healing in Humans: A Triple-Blind, Sham-Controlled Study. *J Athl Train.* 2004; 39: 223-9.
 19. **Bajpai A, Bhargava S, Kumar Jain NK, Gupta PK.** Role of low – level nitrogen laser therapy in chronic drug resistance pulmonary tuberculosis. *Indian J Tuberc* 2006 ; 53: 135-40.
 20. **Gur A, Karakoc M, Cevik R, Nas K, Sarac AJ, Karakoc M.** Efficacy of low – power laser therapy and exercise pain and function in chronic low back pain. *Lasers Surg Med* 2003; 32: 233-8.
 21. **Gur A, Cosut A, Sarac AJ, Cevik R, Uyar A.** Efficacy of different therapy regimes of low power laser in painful osteoarthritis of the knee: a double blind and randomized controlled trial. *Lasers Surg Med* 2003; 33: 330-8.
 22. **Gur A, Sarac AJ, Cevik R, Altinaday O, Sarac S.** Efficacy of 904 nm gallium arsenide low-level laser therapy in management of chronic myofacial pain in neck: a double blind and randomized – controlled trial. *Lasers Surg Med* 2004; 35: 229-35.
 23. **Chang W-D, Wu J-H, Jiang J-A , Yeh C-Y, Tasi CT.** Carpal tunnel syndrome with a diode laser : a controlled treatment of the transvers carpal ligament. *Photomed Laser Surg* 2008; 26: 551-7.

24. **Thawer HA, Houghton PE.** Effect of laser irradiation on the growth and development of fetal mouse limbs in an in vitro model *Lasers Surg Med* 1999; 24: 285-95.
25. **Ilic S, Leich liter S, Streeter J, Oron A, De Taboda L, Oron U.** Effect of power densities, continuous and pulse frequencies and number of sessions of low – level laser therapy on intact rat brain. *Photomed Laser Surg* 2006; 24: 458-66.
26. **Lauto A, Trickett R, Malik R, Dawes JM, Owen ER.** Laser activated solid protein bands for peripheral nerve repair. *Lasers Surg Med* 1997; 21: 134-41.
27. **Byrnes KR, Waynant RW, Ilev IK, Wu X, Barna L, Smith K, et al.** Light promotes regeneration and functional recovery and alters the immune response after spinal cord injury. *Lasers Surg Med* 2005; 31: 171-85 .
28. **Detaboda L, Ilic C, Leichiter – Martha S, Oron U, Oron A, Streeter J.** Transcranial application of low – energy laser irradiation improves neurological deficits following acute stroke: *Lasers Surg Med* 2006 ; 38: 70–3 .
29. **Lapchak PA, Salgado KF, Chao CH , Zivin JA.** Transcranial near-infrared light therapy improves motor function following embolic strokes in rabbits: an extended therapeutic window study using continuous and pulse frequency delivery modes. *Neuroscience* 2007; 148: 907-14.
30. **Mohammed IF, Al-Mustawfi N, Kaka LN.** Promotion of regenerative processes in injured peripheral nerve induced by low-level laser therapy. *Photomed Laser Surg* 2007; 25: 107-11.
31. **Lim KS , Kim JK , Kim SW.** Effect of low level laser irradiation (LLLI) with 904 nm pulsed diode laser on osteoblasts: a controlled trial with the rat osteoblast model. *Laser Therapy* 1996; 8, 223-32.
32. **Udea Y, Shimizu N.** Effects of pulse frequency of low – level laser therapy (LLLT) on bone nodule formation in rat calvarial cells . *J Clin Laser Med Surg* 2003; 21: 271-7 .
33. **Guzzardella GA, Fini M, Torricelli P, Giavaresi G, Giardino R.** Laser stimulation on bone defect healing : an in vitro study. *Lasers Med Sci* 2002; 17: 216-20.
34. **Guzzardella GA, Torricelli P, Nicoli-Aldini N, Giardino R.** Osseointegration of endosseous ceramic implants after postoperative low-power laser stimulation: an in vivo comparative study. *Clin Oral Implants Res* 2003; 14 ; 226– 32 .
35. **Fung DC , Ng GY , Leung MC , Tay DK .** Therapeutic low energy laser improve the mechanical strength of repairing medial collateral ligament. *Lasers Surg Med* 2002; 31: 91-6 .
36. **Fung DT, Ng GY, Leung MC, Tay DK.** Effects of therapeutic laser on the ultrastructural morphology of repairing medial collateral ligament in a rat model. *Lasers Surg Med* 2003; 32: 286– 93.
37. **Bjordal JM, Lopes-Martins RA, Iversen VV.** A randomised, placebo controlled trial of low level laser therapy for activated Achilles tendinitis with microdialysis measurement of peritendinous prostaglandin E2 concentrations. *Br J Sports Med* 2006; 40: 76–80.
38. **Demir H , Balay H , Kirnap M.** A comparative study of the effects of electrical stimulation and laser treatment on experimental wound healing in rats . *J Rehabil Res Dev* 2004; 41: 147–54.
39. **Kawalec JS, Hetherington VJ, Pfennigwerth TC, Dockery DS, Dolce M.** Effect of a diode laser on wound healing by using diabetic and non diabetic mice. *J Foot Ankle Surg* 2004; 43, 214-20.
40. **Byrnes KR, Barna L, Chenault VM, Waynant RW, Ilev IK, Longo L, et al.** Photobiomodulation improves cutaneous wound healing in an animal model of type II diabetes. *Photomed Laser Surg* 2004; 22: 281-90.
41. **Meireles GC, Santos JN, Chagas PO, Moura AP, Pinheiro AL.** Effectiveness of laser photobiomodulation at 660 or 780 nanometers on

- the repair of third-degree burns in diabetic rats. *Photomed Laser Surg* 2008; 26: 47-54.
42. **Anneroth G, Hall G, Rydén H, Zetterqvist L.** The effect of low-energy infra-red laser radiation on wound healing in rats. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1988; 26: 12-17.
 43. **Cambier DC, Vanderstraeten GG, Mussen MJ, van der Spank JT.** Low-power laser and healing of burns: a preliminary assay. *Plast Reconstr Surg* 1996; 97: 555-8.
 44. **Lagan KM, Clements BA, McDonough S, Baxter GD.** Low intensity laser therapy (830nm) in the management of minor postsurgical wounds: a controlled clinical study. *Lasers Surg Med* 2001; 28: 27-32 .
 45. **Schlager A, Oehler K, Huebner KU, Schmuth M, Spoetl L.** Healing of burns after treatment with 670-nanometer low-power laser light. *Plast Reconstr Surg* 2000; 105: 1635-9.
 46. **Schlager A , Kronberger P , Petschke F , Ulmer H .** Low – power laser light in the healing of burns: a comparison between two different wavelengths (635 nm and 690 nm) and a placebo group .*Lasers Surg Med* 2000 ; 27: 39-42 .
 47. **Al – Watban FA, Delgado GD.** Burn healing with a diode laser : 670 nm at different doses as compared to placebo group. *Photomed Laser Surg* 2005; 23: 245-50.
 48. **Carvalho Pde T, Silva IS, Reis FA, Perreira DM, Aydos RD.** Influence of ingaalp laser(660 nm)on healing of skin wounds in diabetic rats. *Acta Cir Bras* 2010; 25:71-90.
 49. **Rabelo SB,Villaverde AB, NicolauR, Salgado MC, Melo Mda S, Pachco MT.** Comparison between wound healing in indused diabetic and nondiabetic rats after low-level laser thrapy. *Photomed Laser Surg* 2006; 24: 474-9.
 50. **Reddy GK.** Comparison of the biostimulatory effect of visible He-Ne and infrared Ga-As lasers on healing impaired diabetic rat wounds.*laser Surg Med* 2003; 33: 344-51.
 51. **Mirzaei M, Bayat M, Mosafa N, Mohsenifar Z, Piryaei A, Farokhi B, et al.** Effect of low-level laser therapy on skin fibroblasts of streptozotocin-diabetic rats. *Photomed Laser Surg* 2007; 25: 519-25.
 52. **Houeld NN, Albrahamse H.** Effectiveness of helium-neon laser irradiation on viability and cytotoxicity of diabetic-wounded fibroblast cells. *Photomed Laser Surg* 2007; 25; 474-81.
 53. **Bayat M, Abdi S, Javadieh F, Mohsenifar Z, Rashid MR.** The effects of low-level laser therapy on bone in diabetic and nondiabetic rats. *Photomed Laser Surg* 2009;27:703-8.
 54. **Reddy GK, Stehno-Bittel L, Enwemeka CS .** Laser photostimulation accelerates wound healing in diabetic rats. *Wound Repair Regen* 2001;9:248-55.
 55. **Nussbaum EL, Biemann I, Mustard B.** Comparison of ultrasound/ultraviolet-C and laser for treatment of pressure ulcers in patients with spinal cord injury. *Phys Ther* 1994; 74:812-23.
 56. **Karu T, Tiphlova O, Samokhina M, Diamantopoulos C, Sarantsev VP, Shveikin V.** Effect of near-infrared laser and super luminous diode irradiation on Escherichia coli division rate. *IEEE J Quantum Electronics* 1990; 26: 2162-5.
 57. **Lowe AS, Walker MD, O`Byrne M, Baxter GD, Hirst DG.** Effect of low intensity monochromatic light therapy(890 nm) on a radiation-impaired, wound healing model in murine skin. *Lasers Surg Med* 1998; 23:291-8.
 58. **Lucas C, Van Gemert MJC, de Haan RJ.** Efficacy of low level laser therapy in the management of stage III decubitus ulcer a prospective, observer-blinded multicenter randomized clinical trial. *Laser Med Sci* 2003; 18: 72-77.
 59. **Vasheghani MM, Bayat M, Dadpay M, Habibi M, Rezaei F.** Low level laser therapy using 80 Hz pulsed infrared diode laser accelerates third-degree

- burn healing in rat. *Photomed Laser Surg* 2009; 27: 959-64.
60. **Barolet D, Duplay P, Jacomy H, Auclair M.**

Importance of pulsing illumination parameters in low-level-light therapy. *J Biomed Optic* 2010; 15:048005.