



**UNIWERSYTET MEDYCZNY**  
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU

**MATEUSZ TRAFALSKI**

**ROZPRAWA DOKTORSKA**

***WYKORZYSTANIE ŹRÓDEŁ ŚWIATŁA NA BAZIE  
PÓLPRZEWODNIKÓW W WYBRANYCH ZASTOSOWANIACH  
MEDYCZNYCH***

**PROMOTOR:**

**Dr hab. n. med. Kamil Jurczyszyn**

**Wrocław, 2022**

*Składam serdeczne podziękowania i wyrazy wdzięczności, mojemu Promotorowi, doktorowi habilitowanemu Kamilowi Jurczyszynowi za wsparcie, wyrozumiałość i przekazaną mi ogromną wiedzę, z której czerpałem inspiracje do pracy naukowej.*

*Dziękuję mojej wspaniałej żonie Agacie oraz córkom Hannie i Urszuli za pomoc, cierpliwość i przede wszystkim za wiarę we mnie.*

*Pragnę podziękować również moim ukochanym Rodzicom, ponieważ mój sukces jest owocem ich ciężkiej pracy, jaką włożyli w moje wychowanie.*

## SPIS TREŚCI

WYKAZ UŻYWANYCH SKRÓTÓW .....	5
I. STRESZCZENIE.....	6
ABSTRACT.....	7
2. WYKAZ PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH PODSTAWĘ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ .....	9
3. WSTĘP .....	10
3.2 Półprzewodniki – podstawowe informacje na temat emisji promieniowania elektromagnetycznego.....	12
3.3 Laser – podstawy budowy i zasada działania.....	15
3.4 Podział laserów i ich zastosowanie w medycynie.....	16
3.5 Laser – oddziaływanie na tkanki z uwzględnieniem optyki tkankowej .....	20
3.6 Terapia fotodynamiczna - podstawowe informacje .....	21
3.7 Fototerapia fotodynamiczna – mechanizm działania .....	22
3.8 Fotouczulacze oraz źródła światła stosowane w PDT .....	23
3.9 Charakterystyka zmian Venous lake .....	25
3.10 Rak podstawnokomórkowy skóry – podstawowe informacje .....	26
3.11 Analiza wymiaru fraktalnego - podstawowe informacje .....	27
3.12 Analiza tekstur – podstawowe informacje .....	29
4. CELE I ZAŁOŻENIA PRACY.....	30
4.1 Cele pracy .....	30
4.2 Założenia pracy.....	31
5. MATERIAŁ I METODY .....	31
5.1 Publikacja: „Treatment of the facial basal cell carcinoma with the use of photodynamic therapy: A case report” .....	32
5.2 Publikacja: „Assessment of Effects of Laser Light Combining Three Wavelengths (450, 520 and 640 nm) on Temperature Increase and Depth of Tissue Lesions in an Ex Vivo Study” .....	33
5.3 Publikacja: ”Application of Fractal Dimension and Texture Analysis to Evaluate the Effectiveness of Treatment of a Venous Lake in the Oral Mucosa Using a 980 nm Diode Laser—A Preliminary Study” .....	34
6. WYNIKI .....	40
6.1 Publikacja: “Treatment of the facial basal cell carcinoma with the use of photodynamic therapy: a case report” .....	40

6.2 Publikacja: "Assessment of effects of laser light combining three wavelengths (450, 520 and 640 nm) on temperature increase and depth of tissue lesions in an ex vivo study" .....	40
6.3 Publikacja: "Application of fractal dimension and texture analysis to evaluate the effectiveness of treatment of a venous lake in the oral mucosa using a 980 nm diode laser - a preliminary study" .....	41
7. WNIOSKI .....	42
8. PIŚMIENNICTWO .....	44
II. PUBLIKACJE STANOWIĄCE PODSTAWĘ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ .....	51
III . ZAŁĄCZNIKI .....	87
1. Informacje o indywidualnym wkładzie współautorów .....	87
2. Opinia komisji bioetycznej.....	98
IV. WYKAZ PUBLIKACJI I STRESZCZEŃ ZJAZDOWYCH AUTORA .....	102

## WYKAZ UŻYWANYCH SKRÓTÓW

5-ALA – kwas 5-aminolewulinowy

ALA – kwas aminolewulinowy

ATP – adenozy-no-5'-trifosforan

BCC – (basal cell carcinoma) – rak podstawnokomórkowy

CW – (ang. continue wave) – tryb pracy ciągłej

Er:YAG – laser YAG domieszkowany erbem

IMP – (ang. impulse mode) – tryb pracy impulsowej

LED – (ang. light-emitting diode) – dioda elektroluminescencyjna, dioda emitująca światło

LLLT – (ang. low level laser therapy) – niskoenergetyczna terapia laserowa

Nd:YAG – laser YAG domieszkowany neodymem

NRS – (ang. numerical rating scale) – numeryczna skala bólu

PBM – (ang. photobiomodulation) - fotobiomodulacja

PDD – (ang. photodynamic diagnosis) – terapia fotodynamiczna

PDT – (ang. photodynamic therapy) – diagnostyka fotodynamiczna

ROI – (ang. region of interest) – obszar zainteresowania

## I. STRESZCZENIE

W związku z ciągłym rozwojem małoinwazyjnych metod leczniczych, coraz częściej sięga się po urządzenia emitujące promieniowanie elektromagnetyczne na bazie półprzewodników, do których należą m.in. lasery półprzewodnikowe. Ich szerokie spektrum emisyjne, zawierające się od ultrafioletu do bliskiej podczerwieni, proponuje szeroki wachlarz zastosowań klinicznych, począwszy od diagnostyki (PDD – photodynamic diagnosis) oraz terapii fotodynamicznej (PDT – photodynamic therapy), poprzez biostymulację tkanek do procedur wykorzystywanych w chirurgii tkanek miękkich.

Podstawę niniejszej rozprawy doktorskiej stanowi spójny tematycznie cykl trzech publikacji w recenzowanych czasopismach naukowych.

W pierwszej publikacji przedstawiono opis przypadku leczenia raka podstawnokomórkowego za pomocą terapii fotodynamicznej, z wykorzystaniem lasera półprzewodnikowego 630 nm. Po roku od zakończenia terapii stwierdzono całkowite wycofanie się nowotworu z bardzo dobrym efektem kosmetycznym. Potwierdza to, iż terapia fotodynamiczna może stanowić alternatywę dla innych opcji terapeutycznych raka podstawnokomórkowego.

Założeniem drugiej publikacji była próba poszukiwania synergizmu (w aspekcie wzrostu temperatury) w oddziaływaniu lasera półprzewodnikowego, emitującego jednocześnie do trzech długości fali na tkankę, w badaniu ex vivo. Przeprowadzone badania wskazują, iż wiązka składająca się z dwóch fal (450 i 520 nm) wykazuje synergizm w stosunku do przyrostu temperatury w funkcji czasu, jak i do maksymalnej temperatury tkanek poddanych jej działaniu. Dodatkowo zaobserwowano, że wiązka 450, 520 i 630 nm wywołuje najgłębsze zmiany w tkankach. Powyższe badania otwierają nowe perspektywy w chirurgii tkanek miękkich i zachęcają do dalszych badań klinicznych nad tego typu laserami.

Celem trzeciej publikacji była ocena skuteczności leczenia zmian typu venous lake na błonie śluzowej jamy ustnej, przy użyciu lasera półprzewodnikowego 980 nm, w trybie bezkontaktowym. Badaniem objęto grupę 23 pacjentów. Uzyskane wyniki potwierdzają, że wykorzystanie lasera półprzewodnikowego 980 nm w leczeniu tych zmian jest skuteczną i bezpieczną metodą terapeutyczną, charakteryzującą się bardzo dobrymi wynikami w kontekście estetyki gojenia. Ponadto zastosowana analiza tekstur i analiza wymiaru

fraktalnego stanowią obiektywną metodę oceny gojenia zmian o typie venous lake na błonie śluzowej jamy ustnej.

Dzięki unikalnym cechom światła laserowego oraz odpowiednim parametrom naświetlania, można uzyskać pozytywne i wysoko estetyczne wyniki leczenia. W związku z tym, wykorzystanie laserów półprzewodnikowych coraz częściej stanowi alternatywę dla klasycznych metod chirurgicznych, szczególnie w obszarach wrażliwych estetycznie.

## **ABSTRACT**

Due to the continuous development of minimally invasive therapeutic methods, devices emitting electromagnetic radiation based on semiconductors are more and more often used. They include, among others, semiconductor lasers. Their wide emission spectrum, ranging from ultraviolet to near infrared, ensures a wide scope of clinical applications, ranging from photodynamic diagnosis (PDD) and photodynamic therapy (PDT), through biostimulation of tissues to the procedures applied in soft tissue surgery.

The basis for this doctoral dissertation is a thematically coherent series of three publications in peer-reviewed scientific journals.

The first publication presents a case report of the treatment of basal cell carcinoma with the use of photodynamic therapy (630 nm semiconductor laser). One year after the completion of the therapy, the tumor had completely withdrawn – with a very good cosmetic effect. This confirms that the photodynamic therapy can be an alternative therapy to other therapeutic options for basal cell carcinoma.

The assumption of the second publication was an attempt to search for synergism (in the aspect of temperature increase) in the effect of a semiconductor laser emitting up to three wavelengths (at the same time) on the tissue in an ex vivo study. The conducted studies show that the beam consisting of two waves (450 and 520 nm) presents synergism in relation to the temperature increase as a function of time and to the maximum temperature of exposed tissues. Furthermore, it was observed that the 450, 520 and 630 nm beam causes the deepest changes in tissues. The above-mentioned research reveals new perspectives in surgery of soft tissues and encourages further clinical research concerning these types of lasers.

The aim of the third publication was to evaluate the effectiveness of the treatment of venous lake lesions on the oral mucosa with the use of a 980 nm semiconductor laser (non-contact mode). The study included a group of 23 patients. The obtained results confirm that the use of the 980 nm semiconductor laser in the treatment of these lesions is an effective and safe therapeutic method, characterized by very good results in the context of healing aesthetics. Moreover, the applied analysis of textures and the fractal dimension analysis constitute an objective method of evaluating the healing of venous lake lesions on the oral mucosa.

Thanks to the unique features of laser light and appropriate radiation parameters, positive and highly aesthetic treatment results can be obtained. Therefore, the use of semiconductor lasers is more and more often an alternative to classical surgical methods, in particular in aesthetically sensitive areas.



## **2. WYKAZ PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH PODSTAWĘ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

Podstawę niniejszej rozprawy doktorskiej stanowi spójny tematycznie cykl publikacji w recenzowanych czasopismach naukowych o łącznym IF=**7,246**, Pkt. MNiSW/KBN=**350**

1. Treatment of the facial basal cell carcinoma with the use of photodynamic therapy: a case report. Mateusz Trafalski, Klaudia Kazubowska, Kamil Jurczyszyn. Dent Med Probl. 2019 Vol.56 no.1 s.105-110. DOI: 10.17219/dmp/100507.  
Pkt. MNiSW/KBN=70
2. Assessment of effects of laser light combining three wavelengths (450, 520 and 640 nm) on temperature increase and depth of tissue lesions in an ex vivo study. Kamil Jurczyszyn, Witold Trzeciakowski, Zdzisław Woźniak, Piotr Ziółkowski, Matesz Trafalski. Materials 2020 Vol.13 no.23 art.5340. DOI: 10.3390/ma13235340,  
IF=3,623, Pkt. MNiSW/KBN=140
3. Application of fractal dimension and texture analysis to evaluate the effectiveness of treatment of a venous lake in the oral mucosa using a 980 nm diode laser – a preliminary study. Mateusz Trafalski, Marcin Kozakiewicz, Kamil Jurczyszyn. Materials 2021 Vol.14 no.15 art.4140. DOI: 10.3390/ma14154140.  
IF=3,623, Pkt. MNiSW/KBN=140

### 3. WSTĘP

#### 3.1 Półprzewodniki – podstawowe informacje

W ostatnich dziesięcioleciach intensywne prace nad półprzewodnikami zaowocowały rozwojem wielu urządzeń elektronicznych oraz optoelektronicznych, takich jak tranzystory, układy scalone, urządzenia emitujące i rejestrujące promieniowanie elektromagnetyczne. Najprostsza definicja mówi, że półprzewodniki są to materiały przewodzące prąd elektryczny, a ich przewodnictwo elektryczne zawiera się pomiędzy metalami a izolatorami. Parametr opisujący przewodnictwo prądu danego materiału niezależnie od jego kształtu i rozmiaru nazywa się rezystywnością (opór elektryczny właściwy), jego symbol to  $\rho$ , a jednostką rezystywności w układzie SI jest ohmometr ( $\Omega \cdot m$ ). Porównując ze sobą materiały pod kątem przewodnictwa prądu, można je podzielić na trzy grupy: przewodniki, półprzewodniki oraz izolatory. Większość metali jest bardzo dobrymi przewodnikami, a ich rezystywność zawiera się w przedziale od  $10^{-7}$  do  $10^{-8} \Omega \cdot m$ . Po drugiej stronie skali znajdują się izolatory, takie jak szkło, drewno, tworzywa sztuczne, guma z rezystywnością powyżej  $10^8 \Omega \cdot m$ . Natomiast półprzewodniki plasują się w przedziale  $10^{-6} - 10^8 \Omega \cdot m$ , a typowymi przedstawicielami tej grupy są m.in. krzem, arsenek galu, german. Dodatkowo ich rezystywność może być szeroko modyfikowana w funkcji temperatury, poprzez zawartość zanieczyszczeń (domieszkowanie) lub wzbudzenie optyczne. Powyższe czynniki mogą wpływać na przewodnictwo danego półprzewodnika do tego stopnia, że może się ono różnić wielkością kilku rzędów. Ze względu na to, że rezystywność półprzewodników jest tak różna, trudno jest uznać ten parametr za w pełni je definiujący. Istotę półprzewodników bardziej precyzyjnie opisuje pasmowa teoria przewodnictwa i energetyczny model pasmowy ciał stałych [1]. Według tego modelu elektrony w atomie mogą znajdować się tylko w ściśle określonym stanie energetycznym. Dozwolone poziomy energetyczne odseparowanych od siebie atomów, na skutek oddziaływania z innymi atomami w sieci krystalicznej, zostają przesunięte tworząc tzw. pasma dozwolone, określające ilość energii, jaką mogą przyjąć elektrony na poszczególnych orbitalach. Natomiast poziomy leżące poza tymi pasmami są nazywane pasmami zabronionymi. Energię elektronów walencyjnych, znajdujących się na ostatniej powłoce elektronowej atomu, zwanej powłoką walencyjną, określa się dwoma pasmami dozwolonymi. Pierwsze to pasmo podstawowe, zwane inaczej walencyjnym, które określa energię elektronu walencyjnego związanego z jądrem atomowym. Drugie to pasmo przewodnictwa, określające

energię, jaką posiadają elektrony walencyjne uwolnione z atomu. Przerwa energetyczna między pasmem walencyjnym a pasmem przewodnictwa, określana jest przerwą zabronioną (ang. band gap) [2, 3]. Żeby uzyskać przepływ prądu elektrycznego w danym ciele, elektrony walencyjne muszą znaleźć się w paśmie przewodnictwa. Dzieje się to wtedy, kiedy przyłożona energia zewnętrzna jest równa lub większa od energii pasma zabronionego. W przewodnikach elektrycznych nie ma pasma zabronionego, dzięki temu może występować swobodny przepływ prądu. W izolatorach przerwa energetyczna jest bardzo duża, sięgająca powyżej 3 eV (elektronowoltów), a dostarczenie z zewnątrz tak wysokiej energii skutkuje uszkodzeniem fizycznym izolatora. Półprzewodniki natomiast posiadają przerwę energetyczną na poziomie od 0 do 3 eV. Należy podkreślić, że jest to zakres przybliżony, ponieważ diament posiadający przerwę energetyczną o wartości 5,5 eV, również posiada właściwości półprzewodnikowe, pod warunkiem odpowiedniego procesowania poprzez domieszkowanie.

W aspekcie składu rozróżnia się półprzewodniki samoistne, zbudowane tylko z atomów jednego pierwiastka chemicznego oraz niesamoistne (domieszkowane), posiadające dodatkowe atomy innego pierwiastka. Wśród popularnych półprzewodników samoistnych, szeroko stosowanych w elektronice i optoelektronice, znajdują się przedstawiciele 14 grupy układu okresowego pierwiastków (krzem i german). Natomiast półprzewodniki domieszkowane tworzone są najczęściej przez domieszkowanie pierwiastków grupy 13 i 15 (AlAs, GaAs, GaP, GaN, InP, InAs, InSb), grupy 12 i 16 (np. ZnS, ZnSe, ZnTe, CdS, CdSe, CdTe) oraz grupy 14 i 16 (np. PbS, PbSe, PbTe). Dodatkowo wyróżnia się również trójskładnikowe półprzewodniki ( $\text{Al}_x\text{Ga}_{1-x}\text{As}$ ,  $\text{GaAs}_{1-x}\text{P}_x$ ,  $\text{Hg}_{1-x}\text{Cd}_x\text{Te}$ ) oraz czteroskładnikowe ( $\text{Ga}_x\text{In}_{1-x}\text{As}_y\text{P}_{1-y}$ ) [4]. Najbardziej rozpowszechnionym półprzewodnikiem w elektronice oraz w optoelektronice jest krzem, ponieważ technologia jego produkcji jest najbardziej rozwinięta, jest łatwo dostępny oraz wolny od wad. Innym powszechnie stosowanym jest arsenek galu (GaAs), cechujący się bardzo dobrą mobilnością elektronów.

### **3.2 Półprzewodniki – podstawowe informacje na temat emisji promieniowania elektromagnetycznego**

Zastosowanie półprzewodników w urządzeniach emitujących bądź rejestrujących światło wynika z ich unikalnych cech. Należy podkreślić, iż przerwa energetyczna tych materiałów determinuje długość fali emitowanego bądź pochłanianego przez nie promieniowania elektromagnetycznego w zakresie od ultrafioletu do podczerwieni. Ponadto w półprzewodnikach trój- i czteroskładnikowych przerwa energetyczna jest przestrajalna, dzięki różnym proporcjom domieszkowania pierwiastków, co wpływa na produkcje materiałów o pożądanych właściwościach, poprzez zmianę składu (różne wartości współczynników  $x$  i  $y$  we wzorach chemicznych). Równanie, które najprościej definiuje proces emisji promieniowania, przedstawia się następująco:

$$h\nu = \Delta E$$

gdzie  $\nu$  to częstotliwość promieniowania,  $\Delta E = E_2 - E_1$ ,  $E_1$  niższy,  $E_2$  wyższy poziom z dwóch stanów energetycznych elektronu,  $h$  to stała Plancka  $6,626070040(81) \cdot 10^{-34}$  J·s.

W tym przypadku energia podawana jest w elektronowoltach (eV), gdzie 1 eV to energia jaką uzyskuje bądź traci elektron, który jest przyspieszany w próżni w polu elektrycznym, gdzie różnica potencjałów wynosi 1 wolt (1V). Wartość elektronowolta może być również wyrażana w dżulach jako iloczyn 1 wolta i wartości elementarnego ładunku elektrycznego  $e$  ( $e = 1,602\ 176\ 634 \times 10^{-19}$  C).

$$1\text{eV} = 1e \cdot 1\text{V} = 1,602176634 \cdot 10^{-19}\text{J}$$

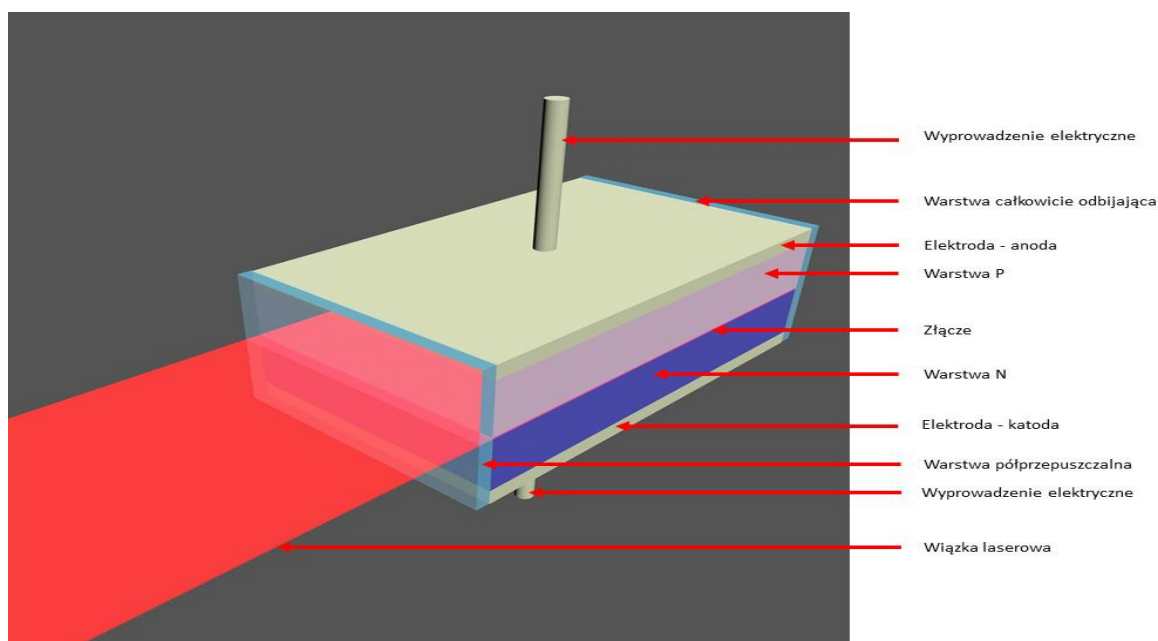
W przypadku energii równej jednemu elektronowoltowi częstotliwość promieniowania wynosi około  $2,418 \cdot 10^{14}$  Hz i znajduje się w obszarze bliskiej podczerwieni widma. W wyniku przekształcenia wzoru:

$$\Delta E = h\nu = h \frac{c}{\lambda},$$

$$\lambda = h \frac{c}{\Delta E}$$

gdzie  $\lambda$  oznacza długość fali elektromagnetycznej,  $c$  oznacz prędkość światła w próżni, można w łatwy sposób obliczyć dokładną długość fali elektromagnetycznej, emitowanej przez półprzewodnik znając jego przerwę energetyczną.

Półprzewodniki samoistne cechują się stosunkowo dużą rezystywnością w porównaniu do niesamoistnych, ponieważ zawierają mało ładunków swobodnych - elektronów, czyli cząsteczek obdarzonych ładunkiem elektrycznym mogących poruszać się w polu elektrycznym. Dzięki domieszkowaniu stan ten ulega radykalnej zmianie, ponieważ w wiąźaniach kowalencyjnych obecnych w strukturze krystalicznej danego półprzewodnika samoistnego istnieje ustalona liczba elektronów walencyjnych. Dodanie innego atomu o odmiennej liczbie elektronów walencyjnych do tej struktury, skutkuje nadmiarem bądź niedoborem elektronów. Poprzez dodanie atomu o większej liczbie elektronów walencyjnych uzyskuje się nadmiar wolnych elektronów, co powoduje powstanie półprzewodnika typu  $n$  (ang. negative), a taka domieszka nazywa się domieszką donorową. W przypadku dodania atomów o mniejszej ilości elektronów walencyjnych powstają tzw. dziury elektronowe, które są charakterystyczne dla półprzewodników typu  $p$  (ang. positive), a domieszkę taką nazywa się akceptorową. W wyniku połączenia ze sobą półprzewodnika typu  $p$  i  $n$  powstaje złącze typu  $p - n$ . W takiej sytuacji nadmiar elektronów z obszaru  $n$  przemieści się do obszaru  $p$ , a dziury elektronowe w przeciwnym kierunku, z obszaru  $p$  do obszaru  $n$ . Obydwa typy nośników ładunku (elektrony jak i dziury elektronowe) poruszają się w kierunku styku półprzewodników, gdzie tworzy się tzw. warstwa zaporowa, która zapobiega dalszemu przemieszczaniu się ładunków. Prowadzi to do sytuacji, w której półprzewodnik  $p$  zostanie naładowany ujemnie, a półprzewodnik  $n$  dodatnio. W przypadku przyłożenia zewnętrznego potencjału elektrycznego, przepływ prądu będzie zależny od wartości napięcia, jak i jego kierunku. Jeżeli potencjał dodatni zostanie przyłożony do obszaru  $p$ , a ujemny do  $n$ , to przez taki układ popłynie prąd. Takie ustawienie złącza  $p - n$  nazywa się polaryzacją w kierunku przewodzenia. W odwrotnej sytuacji warstwa zaporowa znacznie się powiększa, przepływ prądu jest wstrzymany albo jest niewielki, a takie ustawienie złącza  $p - n$  nazywa się polaryzacją w kierunku zaporowym. Dzięki odpowiedniej polaryzacji i wartości przyłożonego napięcia do złącza  $p - n$  można uzyskać wymuszoną emisję promieniowania elektromagnetycznego [5]. Zastosowanie domieszkowania może zmniejszyć wartość progową gęstości prądu o rząd kilku wielkości, co znacznie przyczyniło się do rozwoju urządzeń emitujących promieniowanie elektromagnetyczne na bazie półprzewodników. Schemat budowy podstawowego urządzenia laserowego na bazie półprzewodników przedstawiono na rycinie 1.



Ryc. 1. Schemat działania lasera półprzewodnikowego (ze zbiorów własnych).

Dzięki powyższym właściwościom półprzewodniki stanowią podstawę budowy urządzeń optoelektronicznych, do których zalicza się:

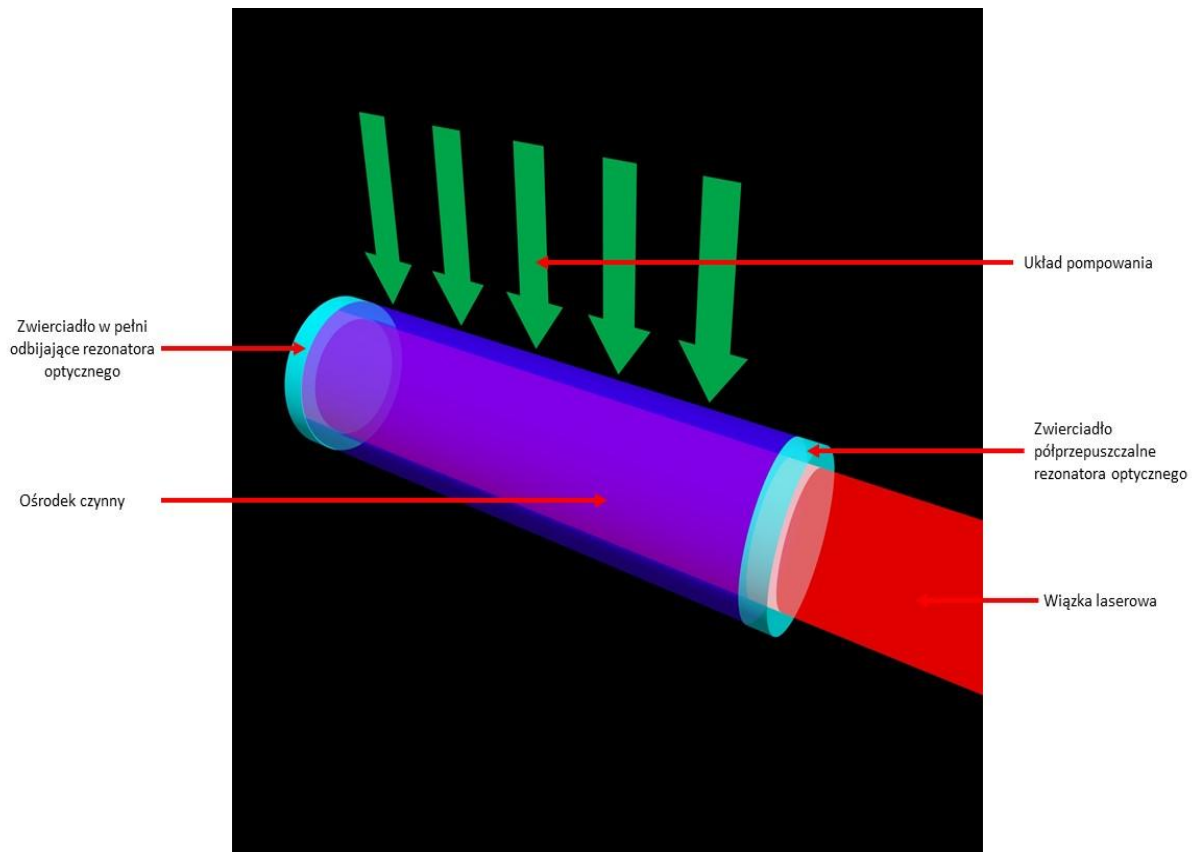
- diody elektroluminescencyjne, LED (ang. light – emitting diode) emitujące niespójne światło od ultrafioletu do podczerwieni;
- fotodiody (fotodetektory);
- lasery półprzewodnikowe – diodowe (obszar czynny jest półprzewodnikiem, pompowanym przez przepływ prądu elektrycznego).

Urządzenia półprzewodnikowe emitujące światło takie jak lasery półprzewodnikowe, oprócz wykorzystania w przemyśle oraz elektronice coraz częściej mają zastosowanie w medycynie. Niewielkie rozmiary, jakimi się charakteryzują, dość wysokie moce, zastosowanie giętkich światłowodów poprawiających ergonomię pracy, generowanie krótkich impulsów rzędu milisekund oraz szeroki zakres emitowanego promieniowania, stanowią o ich atrakcyjności i częstym wykorzystaniu w medycynie [6, 7, 8]. Promieniowanie elektromagnetyczne w obszarze ultrafioletu i światła widzialnego jest najczęściej uzyskiwane na bazie struktur półprzewodnikowych zbudowanych z azotku Galu (GaN), natomiast w zakresie światła widzialnego i podczerwieni z arsenku galu (GaAs) i fosforu indu (InP) [9, 10, 11].

### **3.3 Laser – podstawy budowy i zasada działania**

Nazwa LASER jest akronimem od ang. Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation, co oznacza wzmocnienie światła przez wymuszoną emisję promieniowania. Pierwsze urządzenie laserowe, na bazie kryształu rubinowego, pompowanego lampą błyskową, zostało zbudowane w 1960 roku przez T.H. Maimana [12]. Jednakże koncepcja wymuszonej emisji światła, na bazie której opiera się zasada działania lasera, została opracowana na długo wcześniej przez Alberta Einsteina w 1917 roku [13]. Zjawisko to zachodzi w ośrodku czynnym lasera, kiedy elektron będący w stanie wzbudzonym zderza się z fotonem o odpowiedniej energii (równej energii wzbudzenia atomu ośrodka), w wyniku czego dochodzi do emisji dwóch fotonów oraz powrotu elektronu ze stanu wzbudzonego w stan spoczynkowy. Istotny jest fakt, iż wyemitowane dwa fotony mają taką samą energię, częstotliwość oraz kierunek jak foton wywołujący emisję, co jest podstawą unikalnych cech światła laserowego [14]. Ponadto te fotony mogą zderzać się z kolejnymi elektronami, będącymi w stanie wzbudzonym i stymulować emisję kolejnych fotonów potęgując proces wymuszonej emisji promieniowania. Aby wywołać to zjawisko niezbędne jest ciągłe dostarczanie energii do ośrodka czynnego, za co odpowiedzialny jest układ pompujący lasera. Jego zadaniem jest przeniesienie jak największej liczby elektronów w ośrodku czynnym do stanu wzbudzonego. Uzyskuje się to najczęściej w wyniku rozbłysku lampy błyskowej lub emisji promieniowania innego lasera, przepływu prądu (wyładowania) w gazie lub reakcji chemicznej. Prowadzi to do sytuacji zwanej inwersją obsadzeń poziomów energetycznych, w której istnieje przewaga atomów w stanie wzbudzonym w stosunku do atomów w stanie podstawowym [15]. Inwersja obsadzeń poziomów energetycznych, umożliwia w dalszym etapie kaskadowy wzrost emisji monochromatycznego i koherentnego promieniowania elektromagnetycznego, które jest podstawą unikalnych cech światła laserowego. Jednakże do uporządkowanej akcji laserowej niezbędny jest jeszcze odpowiedni układ optyczny zwany rezonatorem. Jest on zbudowany z luster, otaczających ośrodek czynny lasera, z których jedno jest lustrem półprzepuszczalnym [16]. Odbijają one wielokrotnie światło tylko wzdłuż osi lasera, potęgując wymuszoną emisję promieniowania w ośrodku czynnym. W wyniku odpowiedniego ustawienia luster, uprzywilejowany jest właśnie ten kierunek promieniowania, a światło posiadające kierunek wzdłuż osi lasera, mające taką samą częstotliwość oraz będące zgodne w fazie może opuścić laser (ryc. 2). Dzięki powyższym procesom, zachodzącym w urządzeniu laserowym, wyemitowane światło posiada unikalne cechy takie jak:

monochromatyczność (jednobarwność), koherentność (spójność w fazie) oraz kolimacja wiązki (równoległość wiązki) [17, 18].



Ryc. 2. Schemat działania urządzenia laserowego (ze zbiorów własnych).

### ***3.4 Podział laserów i ich zastosowanie w medycynie***

W klasyfikacji laserów uwzględnia się kryteria podziału w zależności od ośrodka czynnego, mocy urządzenia oraz sposobu emisji promieniowania. Rodzaj lasera wywodzi się od ośrodka czynnego, zwanego też medium laserowym, które definiuje długość emitowanej fali charakterystycznej dla danego urządzenia. W zależności od stanu ośrodka czynnego wyróżnia się lasery na ciele stałym, lasery na cieczy, lasery gazowe oraz lasery półprzewodnikowe. Informacje na temat nazw oraz długości emitowanej fali powszechnie używanych urządzeń laserowych, przedstawiono w tabeli 1.



Tabela 1. Rodzaje najczęściej używanych urządzeń laserowych wraz z długością emitowanej fali.

<b>Lasery półprzewodnikowe</b>	
<b>Ośrodek czynny</b>	<b>Długość emitowanej fali</b>
Arsenek galu GaAs	Bliska podczerwień
Fosforek indu InP	Bliska podczerwień
Azotek galu GaN	Światło widzialne, światło niebieskie i UV
Azotek indu galu InGaN	Światło niebieski i zielone
<b>Lasery na ciele stałym</b>	
<b>Ośrodek czynny</b>	<b>Długość emitowanej fali</b>
Laser rubinowy	694 nm
Laser neodymowy na YAG-u (Nd:YAG)	1064 nm
Laser erbowy na YAG-u (Er:YAG)	2940 nm
Laser holmowy na YAG-u (Ho:YAG)	2090 nm
KTP	532 nm
<b>Lasery na cieczy</b>	
<b>Ośrodek czynny</b>	<b>Długość emitowanej fali</b>
Lasery barwnikowe (ośrodkiem czynnym są roztwory barwników np. rodamina, fluoresceina, kumaryna)	Spektrum emisyjne uzależnione od barwnika
PDL (pulsed dye laser)	595 nm, 585 nm
<b>Lasery na gazowe</b>	
<b>Ośrodek czynny</b>	<b>Długość emitowanej fali</b>
Helowo-neonowy (He-Ne)	543 nm lub 633nm
Argonowy (Ar)	458 nm, 488 nm, 514,5 nm
Azotowy	337,1 nm
Kryptonowy	647,1 nm,
Laser na dwutlenku węgla	10,6 μm

W zależności od wartości mocy, wyrażonej w funkcji czasu, można wyróżnić dwa tryby pracy urządzenia laserowego:

- tryb ciągły (CW, ang. continue wave);
- tryb impulsowy (IMP, ang. impulse mode).

Parametry pracy urządzenia laserowego mogą być modyfikowane poprzez szerokość i częstotliwość impulsu. CW zapewnia stały poziom energii w jednostce czasu. Praca impulsowa ze stałą szerokością impulsu dostarcza dawkę energii, po której następuje przerwa

bez emisji. Impulsy powtarzają się regularnie, a ich długość w czasie (szerokość impulsu) jest mniejsza niż długość okresu. W przypadku pracy CW, szerokość impulsu jest równa długości okresu. Praca impulsowa jest opisana przez dwa parametry: częstotliwość i współczynnik wypełnienia, czyli stosunek szerokości impulsu do okresu, wyrażony jako procent (100% dla pracy ciągłej) [19]. Częstotliwość natomiast określa liczbę cykli (impulsów) występujących w jednostce czasu. W układzie SI jednostką częstotliwości jest Herc (Hz), który jest równy jednemu cyklowi na sekundę. Większość systemów laserowych emituje impulsy o szerokości między 0,1 ms i 100 ms. Krótsze szerokości impulsów, rzędu kilku nanosekund, są charakterystyczne dla trybu pracy zwanego Q-switch [10, 21]. Ten tryb jest używany głównie przy usuwaniu zmian barwnikowych, w tym piegów, plam typu café au lait i tatuaży.

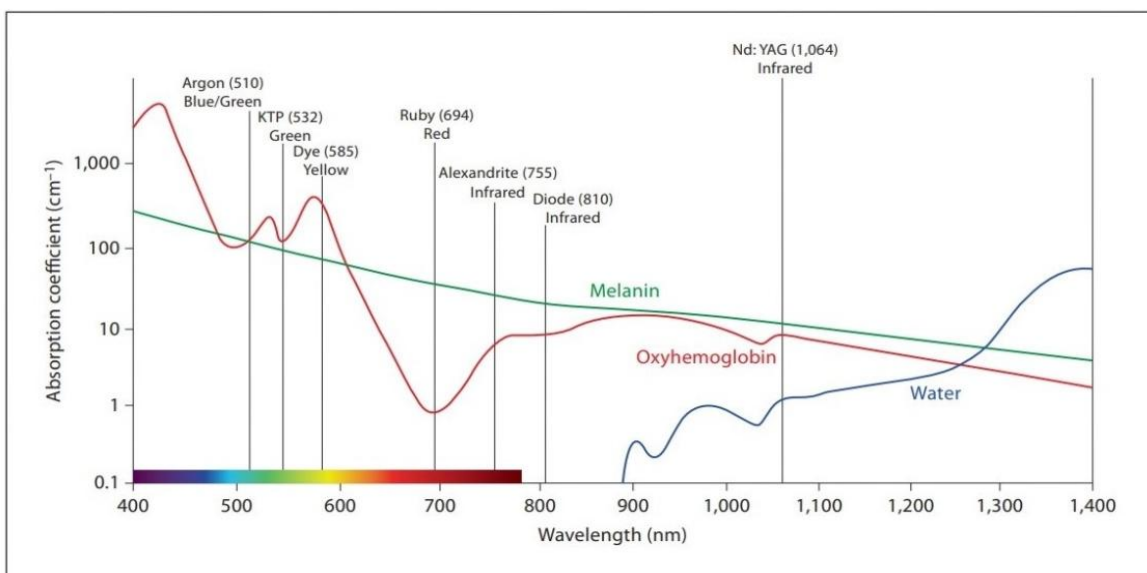
Kolejnym kryterium podziału urządzeń laserowych jest moc emitowanego promieniowania. Wyróżnia się tutaj lasery:

- niskoenergetyczne o mocy do 500 mW zwane też laserami miękkimi;
- wysokoenergetyczne o mocy powyżej 500 mW zwane też laserami twardymi.

Lasery niskoenergetyczne wykorzystuje się głównie do biostymulacji tkanek wspomagając procesy regeneracyjne, redukując ból, stan zapalny oraz przyspieszając gojenie ran [22, 23, 24, 25]. Niskoenergetyczna terapia laserowa (LLLT – ang. low level laser therapy), zwana również fotobiomodulacją (PBM – ang. photobiomodulation), jest stymulacją komórek wykorzystującą promieniowanie laserowe o niskiej mocy – do 500 mW, w zakresie światła czerwonego lub bliskiej podczerwieni [26]. Wywołuje to szereg procesów fizjologicznych w tkankach, zwiększając metabolizm komórkowy i produkcję wysokoenergetycznego adenozyno-5'-trifosforanu (ATP) [27]. Zwiększona zostaje synteza kolagenu i czynników wzrostu, indukowana jest angiogeneza oraz dochodzi do szybszych podziałów komórkowych.

Lasery wysokoenergetyczne są użyteczne w procedurach chirurgicznych, ponieważ dzięki ich zastosowaniu można jednocześnie osiągnąć efekt cięcia, koagulacji oraz hemostazy, co znacznie skraca czas zabiegu, poprawia wgląd w pole operacyjne, często wykluczając konieczność zakładania szwów [28, 29, 30]. Dobierając długość emitowanej fali urządzeń laserowych należy kierować się m.in. obecnością chromoforów w tkankach oraz ich predylekcją do absorpcji odpowiedniej długości fali. W zakresie światła widzialnego w przedziale 400 – 700 nm, absorpcja światła w tkankach zdominowana jest głównie przez

hemoglobinę (ze szczytem w niebieskim i żółtym paśmie widma: 410 – 600 nm) oraz melaninę (400 – 800 nm) zmniejszając się wraz ze wzrostem długości fali w tym zakresie [31]. Ponadto hemoglobina posiada jeszcze drugi, ale słabszy, pik absorpcyjny wykraczający poza spektrum światła widzialnego, w przedziale 800 – 1100 nm (ryc. 3). Pozostałe chromofory tkankowe to woda i hydroksyapatyt, z absorpcją w przedziale odpowiednio: 1400 – 10000 nm oraz 2800 nm. Zatem do leczenia zmian o wysokiej pigmentacji oraz zmian naczyniowych najbardziej użyteczne jest światło emitowane przez lasery półprzewodnikowe (400 nm – 980 nm), impulsowy laser barwnikowy 580-595nm, laser YAG domieszkowany neodymem (Nd:Y<sub>3</sub>Al<sub>5</sub>O<sub>12</sub> – 1064nm) oraz laser KTP – 532nm [16]. Laser na bazie dwutlenku węgla (CO<sub>2</sub> – 10600 nm), bardzo dobrze sprawdza się w cięciu tkanek miękkich, zawierających dużą ilość wody. Natomiast długość fali 2940nm, charakterystyczna dla lasera YAG domieszkowanego erbem (Er:YAG), jest silnie absorbowana w wodzie i hydroksyapatycie. Dzięki temu laser Er:YAG używany jest do cięcia tkanek miękkich oraz opracowywania kości [32].



Ryc. 3 Spektra absorpcyjne trzech głównych chromoforów skóry. [Inja Bogdan Allemann, Joely Kaufman. Laser principles. Curr Probl Dermatol. 2011;42:7-23]

W zależności od mocy, trybu pracy czy długości fali, lasery znajdują szerokie zastosowanie w wielu dziedzinach medycyny. Znając powyższe cechy, budowę tkanek oraz skutki oddziaływania promieniowania elektromagnetycznego, można dokonać właściwego doboru urządzenia laserowego dla konkretnych zastosowań medycznych.

### **3.5 Laser – oddziaływanie na tkanki z uwzględnieniem optyki tkankowej**

Istnieją cztery typy interakcji promieniowania laserowego z tkanką poddaną jego działaniu: absorpcja, odbicie, rozproszenie i transmisja. Te zjawiska zachodzą jednocześnie w tym samym czasie, lecz z różnym stopniem nasilenia [33].

#### **1. Pochłanianie**

W kontekście terapeutycznym główne znaczenie ma zjawisko pochłaniania wiązki laserowej, zgodnie z prawem Grotthusa-Drapera, które mówi, że reakcja fotochemiczna może zachodzić tylko wtedy, gdy przynajmniej część emitowanego światła ma długość fali, która jest pochłaniana przez podłoże [34]. Zatem aby uzyskać biologiczny efekt, światło musi zostać pochłonięte przez tkankę. Zjawisko absorpcji zachodzi wtedy, kiedy docelowa struktura, jaką jest właściwy chromofor tkankowy, pochłania foton, który przekazuje jej całą swoją energię (ryc. 4A). Pozostałe światło, które nie zostanie pochłonięte może zostać odbite, rozproszone, lecz nie skutkuje to istotnymi efektami biologicznymi [35].

#### **2. Odbicie**

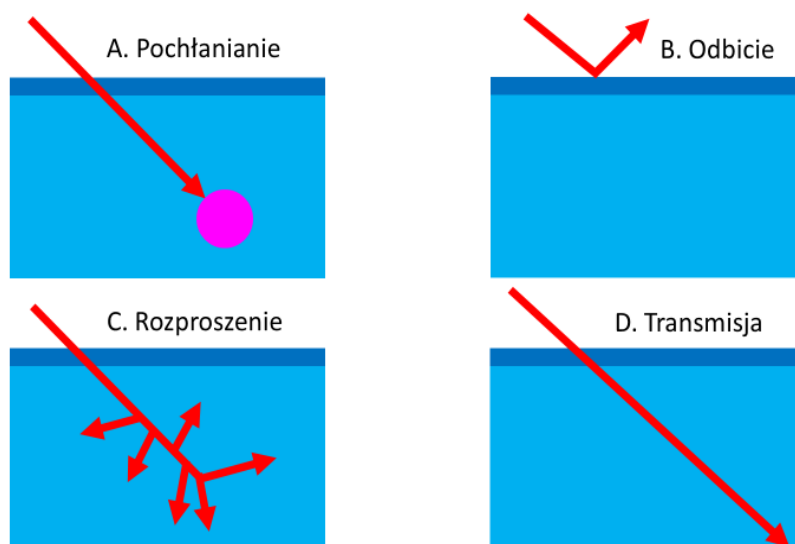
Proces ten zachodzi na powierzchni tkanki poddanej działaniu promieniowania (ryc.4B). Odbicie światła zależy od kąta padania i można je minimalizować, aplikując wiązkę pod kątem prostym do opracowywanej powierzchni. Dodatkowo sucha powierzchnia tkanki zwiększa stopień odbicia światła co można zredukować, aplikując cienkie warstwy żelu na suchą tkankę. W związku z występowaniem zjawiska odbicia, podczas pracy urządzeniem laserowym należy przez cały czas używać okularów ochronnych. Odbicie wiązki znacząco zmniejsza absorpcję promieniowania i tym samym obniża jej skuteczność terapeutyczną, dlatego tak ważne jest, aby minimalizować odbicie wiązki podczas pracy urządzeniem laserowym.

#### **3. Rozproszenie**

Kiedy wiązka laserowa przejdzie przez powierzchnię tkanki może rozproszyć się w jej wnętrzu (ryc. 4C). Rozproszone światło ma inny kierunek niż pierwotne źródło promieniowania. Wielkość rozpraszanej energii jest odwrotnie proporcjonalna do długości fali, dlatego w przypadku krótszych długości fal dochodzi do większego rozproszenia niż przy falach o większej długości.

#### 4. Transmisja

Światło, które nie uległo absorpcji, rozproszeniu ani odbiciu zostaje przepuszczone do głębszych struktur tkankowych (ryc. 4D). Krótsze długości fal penetrują tkankę płycej i ulegają większemu rozproszeniu w porównaniu do fal o większej długości. Dlatego podczas doboru urządzenia laserowego do określonych wskazań klinicznych, nie należy kierować się tylko spektrum absorpcyjnym danego chromoforu, ale należy także brać pod uwagę głębokość penetracji danej fali, aby mogła ona dotrzeć do struktur głębiej położonych.



Ryc. 4. Rodzaje oddziaływania wiązki lasera z tkanką (ze zbiorów własnych).

#### 3.6 Terapia fotodynamiczna - podstawowe informacje

Terapia fotodynamiczna (PDT, ang. photodynamic therapy) jest zatwierdzoną klinicznie metodą terapeutyczną o selektywnej aktywności cytotoksycznej. W skład PDT wchodzi trzy podstawowe składniki: fotouczulacz, światło w zakresie światła widzialnego lub ultrafioletu oraz tlen [36]. Po wnikięciu do tkanki docelowej fotouczulacz pod wpływem absorpcji energii, pochodzącej z padającej fali świetlnej o określonej długości, przechodzi w stan wzbudzony. Wzbudzenie fotouczulacza i przekazanie nadmiaru energii otaczającym strukturom wewnątrzkomórkowym oraz tkankom prowadzi do szeregu reakcji cytotoksycznych, w wyniku których dochodzi do uszkodzenia naczyń, martwicy komórek oraz indukcji apoptozy [37]. Należy podkreślić fakt, iż dawki fotouczulacza, jak i samego światła zastosowane z osobna, są niewystarczające, aby wyzwolić wyżej wymienione

procesy. PDT jest zatwierdzoną metodą leczenia takich schorzeń dermatologicznych jak: rógowacenie słoneczne, odsłoneczne zapalenie warg, trądzik pospolity, choroba Bowena, powierzchowne postacie raka podstawnokomórkowego [38, 39, 40, 41]. Dzięki wprowadzeniu nowoczesnych metod endoskopowych, PDT stosowana jest również w leczeniu nowotworów żeńskiego narządu rodowego, pęcherza moczowego, przewodu pokarmowego, płuc oraz opłucnej [42, 43, 44, 45].

### **3.7 Fototerapia fotodynamiczna – mechanizm działania**

Wyróżnia się dwa podstawowe mechanizmy reakcji fotouczulacza z otaczającymi go cząsteczkami, określane jako reakcja fotochemiczna typu I oraz typu II [46]. Obie reakcje są uzależnione od tlenu cząsteczkowego obecnego w tkankach. W wyniku pochłonięcia światła, fotouczulacz przechodzi ze stanu podstawowego PS do ultrakrótkiego (nanosekundy) wzbudzonego stanu singletowego  $^1PS$ , po czym traci energię emitując światło (fluorescencja) lub oddając energię w postaci ciepła. Stan wzbudzony fotouczulacza  $^1PS$  może przejść również we wzbudzony stan tripletowy  $^3PS$ , w wyniku procesu zwanego krzyżowaniem międzysystemowym, który jest bardziej stabilny i liczony w milisekundach [47]. Jest to stan wyjściowy dla dalszych reakcji, skutkujących właściwą odpowiedzią tkanek poddanych terapii fotodynamicznej.

W reakcji fotochemicznej typu I, zachodzącej w warunkach obniżonego stężenia tlenu,  $^3PS$  reaguje bezpośrednio z wielonasyconymi kwasami tłuszczowymi, zawartymi w błonie komórkowej, oraz z innymi strukturami wewnątrzkomórkowymi, prowadząc do powstania wolnych rodników organicznych. Mogą one reagować z tlenem komórkowym, tworząc reaktywne formy tlenu (ROS – reactive oxygen species) takie jak anion nadotlenkowy ( $O_2^-$ ), rodnik wodoronadlenkowy ( $HOO\cdot$ ), nadtlenki ( $H_2O_2$ ,  $ROOH$ ) i rodnik hydroksylowy ( $HO\cdot$ ), inicjujące reakcje łańcuchowe wolnych rodników [48].

Fotoreakcja typu II polega na przenoszeniu energii wzbudzonego fotouczulacza  $^3PS$  bezpośrednio do tlenu, w wyniku czego tworzy się tlen singletowy, który dalej utlenia różne substraty komórkowe i inicjuje procesy cytotoksyczne prowadzące do martwicy i apoptozy komórek. W wyniku tej reakcji fotouczulacz przechodzi ze stanu tripletowego w stan podstawowy, a jednym z warunków tej reakcji jest dostateczne stężenie tlenu cząsteczkowego.

Reakcje fotochemiczne typu I i typu II mogą zachodzić jednocześnie, a proporcje między nimi uzależnione są od rodzaju fotouczulacza, stężenia substratów oraz dostępności tlenu. Skutki reakcji fotochemicznych dostrzegalne są na poziomie pojedynczych atomów, struktur komórkowych i szlaków biochemicznych, tkanek oraz naczyń krwionośnych. Przyjmuje się, że w przeważającej części odpowiedź biologiczną wywołuje reakcja typu II [49].

### **3.8 Fotouczulacze oraz źródła światła stosowane w PDT**

Jednym z trzech składowych PDT, oprócz światła oraz tlenu jest fotouczulacz. Jest to substancja mająca zdolność pochłaniania światła o odpowiedniej długości, wywołując właściwe reakcje fotochemiczne i fotofizyczne w tkankach [44]. Idealny fotouczulacz powinien charakteryzować się następującymi cechami [44, 50]:

- wysokim stopniem czystości chemicznej;
- stabilnością w temperaturze pokojowej;
- selektywnością akumulacji w patologicznych tkankach
- absorpcją w zakresie widma, w którym tkanki charakteryzują się najwyższą przepuszczalnością dla światła;
- wysoką reaktywnością fotochemiczną;
- minimalną absorpcją w przedziale 400 – 600 nm (zapobiega to nadmiernej światłoczułości tkanek na światło słoneczne);
- minimalną cytotoksycznością przy braku światła;
- wysoką wydajnością kwantową tworzenia tlenu singletowego oraz innych reaktywnych form tlenu.

Pierwszymi fotouczulaczami stosowanymi w PDT były pochodne hematoporfiryny, które należą do pierwszej generacji fotouczulaczy. W związku z licznymi wadami, m.in. długo utrzymującą się fotowrażliwością skóry oraz długim czasem niezbędnym od podania preparatu do wysycenia nim tkanek, poszukiwano innych związków wolnych od tych ograniczeń [51]. Obecnie najczęściej stosuje się fotouczulacze drugiej generacji, do których

należą pochodne protoporfiryny IX, takie jak kwas  $\delta$ -aminolewulinowy (ALA) i jego estry, pochodne benzoporfiryny, pochodne tiopuryny, ftalocyjany, chloryny [52, 53, 54]. Trzecia generacja fotouczulaczy obejmuje związki powstałe na drodze inżynierii genetycznej i nanotechnologii, łącząc fotouczulacze z przeciwciałami monoklonalnymi oraz wykorzystując liposomy będące ich nośnikami [55, 56, 57]

Kwas  $\delta$ -aminolewulinowy jest prekursorem protoporfiryny IX, która jest właściwym fotouczulaczem. Po wnikięciu do komórki przechodzi szereg reakcji biochemicznych, związanych z syntezą hemu, co w końcowym efekcie skutkuje powstaniem cząsteczki protoporfiryny IX (pp. IX). Jest to preparat bardzo często wykorzystywany w PDT jak i w PDD, szczególnie w leczeniu powierzchniowych zmian skóry jak i błon śluzowych. Może być aplikowany miejscowo w postaci kremów (dermatologia, ginekologia), wlewk (urologia) oraz doustnie lub dożylnie. Maksymalne pasmo absorpcyjne dla protoporfiryny IX przypada w tzw. paśmie Soreta – 405 nm. Kolejne wzrosty absorpcji, lecz o niższej intensywności, obserwuje się dla tego związku w paśmie Q. Wynoszą one odpowiednio: 505 nm (pasmo Q IV), 540 nm (pasmo Q III), 580 nm (pasmo Q II) oraz 630 nm (pasmo Q I). Wraz ze wzrostem długości fali rośnie również głębokość penetracji światła w tkankach, dlatego najczęściej wykorzystuje się światło czerwone podczas stosowania ALA [58]. Jednakże powierzchniowe zmiany skórne mogą być również naświetlane światłem fioletowym lub niebieskim. Ponadto światło białe, jak i fioletowe wykorzystywane jest do diagnostyki fotodynamicznej z użyciem ALA [59, 60]. Wśród źródeł światła, mających zastosowanie w terapii fotodynamicznej, znajdują się diody emitujące światło, lasery półprzewodnikowe, lasery barwnikowe, laser Nd-YAG, laser KTP, żarówki oraz lampy halogenowe [61]. Dzięki zastosowaniu odpowiednich filtrów pasmowych w przypadku żarówek lub lamp halogenowych, można uzyskać odpowiednią długość emitowanej przez nie fali. Jednakże ich niska sprawność, przekładająca się na duże straty energii, brak koherentności oraz kolimacji wiązki, stanowi o ich istotnych wadach w przypadku PDT. Dlatego coraz częściej sięga się po urządzenia na bazie struktur półprzewodnikowych, takich jak lasery, które charakteryzują się wąskim spektrum emisyjnym promieniowania, wykluczającym potrzebę stosowania filtrów oraz koherentnością i kolimacją wiązki, przez co można uzyskać wysokie wartości gęstości promieniowania. Zatem aby uzyskać najlepsze rezultaty terapii fotodynamicznej, oprócz wyboru właściwego fotouczulacza, istotne jest również źródło światła, którego dobór musi uwzględniać lokalizację zmiany, głębokość penetracji światła w tkankach oraz właściwości absorpcyjne danego fotouczulacza.



### 3.9 Charakterystyka zmian Venous lake

Jeziro żylne (VL, ang. venous lake) jest powszechnie występującą zmianą powstającą w wyniku rozszerzenia cienkościennych żył otoczonych grubą ścianą tkanki włóknistej [62]. W 1956 roku Bean i Walsh opisali te zmiany jako miękkie, dające się łatwo ucisnąć, lokalizujące się w miejscach narażonych na działanie promieniowania słonecznego (uszy, twarz, dłonie, wargi), występujące częściej u osób starszych [63]. Lokalizują się one również na błonie śluzowej jamy ustnej, czerwieni wargowej, brzusznej stronie języka. W jamie ustnej manifestują się jako niebolesne, miękkie, niekrwawiące, dobrze odgraniczone, granatowe lub fioletowe grudki, średnicy od 2 – 10 mm, wykazujące dodatni test diaskopii [64]. W piśmiennictwie można również spotkać się z inną nazwą - *senile hemangioma* albo *lip varices* [65]. Mechanizm ich powstawania nie jest do końca wyjaśniony. Uważa się, że wraz z wiekiem pacjenta, wzrasta ryzyko ich powstawania, ponieważ najczęściej spotykane są u ludzi starszych, powyżej 50 roku życia. Innym czynnikiem usposabiającym do powstawania tego typu zmian jest uraz mechaniczny. Jeśli nie są przyczyną problemów natury estetycznej, bądź nie są źródłem krwawienia nie wymagają leczenia. Mogą jednak negatywnie wpływać na jakość życia, głównie z powodu zaburzenia estetyki lub obawy przed możliwością zezłośliwienia, co często skłania pacjentów do szukania pomocy u specjalisty. Do współczesnych metod leczenia tych zmian zalicza się: wycięcie chirurgiczne, kriochirurgię z wykorzystaniem ciekłego azotu, elektrokoagulację, fotokoagulację i skleroterapię [66, 67, 68]. Jeśli lokalizacja tych zmian obejmuje miejsca wrażliwe estetycznie, ważny jest dobór odpowiedniej metody terapeutycznej. Wiąże się to z obraniem dla danego przypadku najmniej inwazyjnej metody, która nie pozostawia blizn i przebarwień, a zakres jej nie wykracza znacznie poza granice patologicznych zmian. Taką metodą jest fotokoagulacja z wykorzystaniem laserów półprzewodnikowych emitujących promieniowanie w zakresie światła widzialnego oraz bliskiej podczerwieni. Wynika to z faktu, iż spektrum absorpcyjne dla hemoglobiny zawartej w świetle zmian naczyniowych obejmuje dwa obszary widma 410 – 600 nm oraz 800 - 1100nm [31]. Dzięki temu lasery półprzewodnikowe dobrze sprawdzają się w terapii tego typu zmian, gdyż w selektywny sposób oddziałują na hemoglobinę zawartą w ich wnętrzu. W związku z powyższym fotokoagulacja z wykorzystaniem laserów półprzewodnikowych staje się metodą z wyboru w przypadku leczenia zmian naczyniowych o typie VL w obszarze jamy ustnej.

### 3.10 Rak podstawnocomórkowy skóry – podstawowe informacje

Rak podstawnocomórkowy (BCC, ang. basal cell barcinoma) jest najczęstszym nowotworem skóry, stanowi ok. 80% przypadków raków skóry u człowieka i należy do grupy nieczerniakowych nowotworów skóry – (NMSC, ang. nonmelanoma skin cancers) [69, 70, 71]. Największą zapadalność na ten nowotwór wykazują osoby starsze, powyżej 65 roku życia, jednak w ostatnich latach zaobserwowano znaczny wzrost występowania BCC wśród ludzi młodych [72]. Do najczęstszych lokalizacji BCC zalicza się odsłonięte części ciała takie jak: nos, czoło, warga górna, fałd nosowo-policzkowy, powieki, plecy, ramiona, grzbietowe części rąk, a 90% zmian umiejscawia się pomiędzy linią włosów a wargą górną. Nowotwór wykazuje predylekcje do rasy białej o fototypie skóry I oraz II wg klasyfikacji Fitzpatricka [73, 74, 75]. Głównym czynnikiem wyzwalającym schorzenie jest promieniowanie ultrafioletowe szczególnie UV-B, co koreluje z największą liczbą zachorowań w obszarach o dużym nasłonecznieniu [76]. Dodatkowe cechy predysponujące do karcynogenezy to: immunosupresja, kontakt skóry z węglowodorami i arsenem, promieniowanie jonizujące, infekcja wirusem HPV, zespół Gorlina – Goltza [70, 77, 78]. BCC w obrębie głowy rośnie w postaci guzka o wałowatych brzegach często z centralnym owrzodzeniem lub jako zaczerwieniona plama z drobnymi owrzodzeniami, często z centralnym zagłębieniem i ogniskami silniejszej pigmentacji, częściowo pokryta strupem. Natomiast w obrębie tułowia obraz makroskopowy jest odmienny, przedstawia się jako płaskie i brunatne zmiany z delikatnym złuszczeniem na powierzchni o wyniosłych ograniczeniach. Nowotwór wykazuje powolny wzrost i niski stopień złośliwości miejscowej, rzadko doprowadzając do powstania przerzutów odległych [79]. Nieleczony wieloletni rozwój guza powoduje rozległą destrukcję, nie tylko skóry, lecz również struktur położonych w sąsiedztwie guza, stanowiąc istotne zagrożenie dla ważnych struktur anatomicznych szczególnie w obszarze głowy i szyi.

BCC wywodzi się z komórek warstwy podstawnej naskórka. Pod względem histologicznym wyróżnić można następujące postacie: niezróżnicowany (*solidum*), torbielowaty (*cysticum*), gruczołakowaty (*adenoides*), rogowaciejący (*keratoticum*), barwnikowy (*pigmentosum*), powierzchniowy (*superficiale multicentricum*), bliznowaciejący (*citaticans*) oraz podstawnokolczystkomórkowy - metatypowy [80]. Obraz kliniczny nowotworu jest znacznie zróżnicowany i może przyjmować postać [81]:

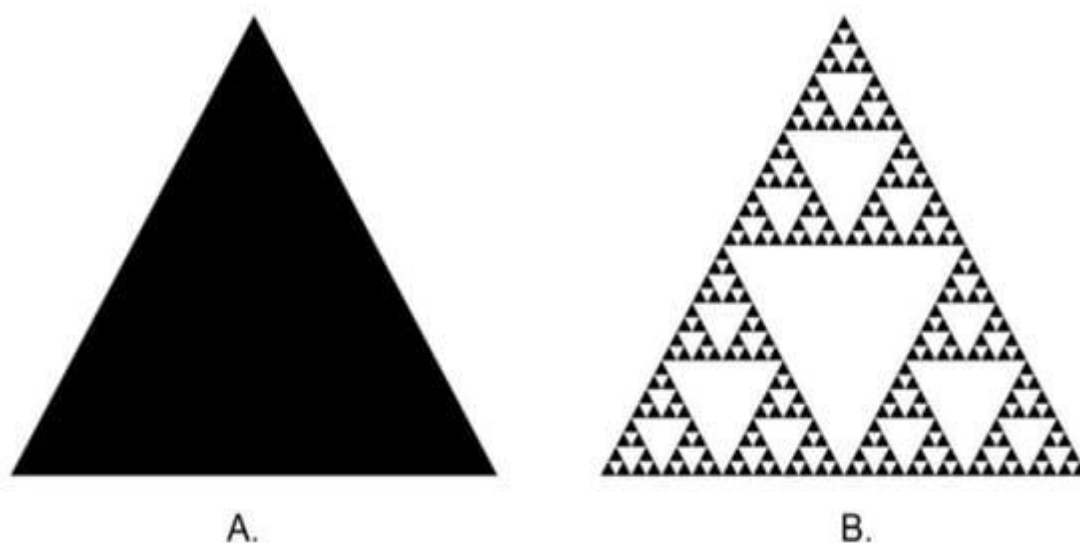
- guzkową lub guzkowo-wrzodziejącą;
- barwnikową;
- twardzino podobną;
- powierzchniową;
- naciekową.

W leczeniu BCC złotym standardem nadal pozostaje leczenie chirurgiczne, ale z uwagi na ograniczenia tej metody w obszarach szczególnie wrażliwych estetycznie dużą rolę odgrywają metody zachowawcze. Zalicza się do nich: terapię fotodynamiczną, radioterapię, miejscową lub systemową farmakoterapię (5-Fluorouracyl, Vismodegib, Imiquimod) [82, 83, 84]. Wśród metod inwazyjnych wyróżnia się metody polegające na wycięciu zmiany oraz metody ablacyjne, oparte na zniszczeniu patologicznej tkanki, takie jak: wymrażanie, laseroterapię i łyżeczkowanie, uzupełniane elektrodesykacją tkanek. Często ze względów estetycznych nowotwór nie może zostać wycięty z właściwym marginesem, co skutkuje późniejszymi miejscowymi wznowami. W tych przypadkach nieocenioną korzyść dają właśnie metody nieinwazyjne do których należy m.in. PDT z wykorzystaniem kwasu 5-amino lewulinowego (5-ALA).

### ***3.11 Analiza wymiaru fraktalnego - podstawowe informacje***

Fraktal to twór geometryczny, charakteryzujący się samopodobieństwem. Jest to cecha unikalna, polegająca na tym, że kształt fraktala jest podobny, niezależnie od skali w jakiej go obserwujemy. Drugą unikalną właściwością fraktala jest, to że można powiększać go w nieskończoność uzyskując coraz to nowe szczegóły. Za ojca geometrii fraktalnej uznaje się Benoît Mandelbrota (1924-2010), który podstawy geometrii fraktalnej opisał 1982 roku [85]. W klasycznej euklidesowej geometrii jesteśmy przyzwyczajeni, że ilość wymiarów opisujących jakąkolwiek formę geometryczną, jest liczbą całkowitą. Przyjmujemy, że punkt jest bezwymiarowy, czyli ilość wymiarów równa się 0, odcinek posiada długość (1 wymiar), figury płaskie mają dwa wymiary (długość, szerokość), natomiast bryły mają trzy wymiary (długość, szerokość, wysokość). Trudno sobie wyobrazić, że mamy do czynienia z tworem mającym np. 2.5 wymiaru. Fraktale wymykają się tym prostym zasadom. Wymiar fraktalny jest liczbą wymierną i zawiera się w przedziale otwartym od 0 do 3. Ciekawym przykładem fraktala jest trójkąt Sierpińskiego, opisany przez polskiego matematyka, na długo przed

wprowadzeniem geometrii fraktalnej. Kształt ten wraz z porównaniem do klasycznego trójkąta przedstawiony jest na rycinie 5. O ile trójkąt jako figura geometryczna posiada dwa wymiary, to wymiar fraktalny trójkąta Sierpińskiego wynosi w przybliżeniu 1.585. Wartość ta sugeruje, że mamy do czynienia z kształtem, cechującym się mniejszym uporządkowaniem od klasycznego trójkąta, formą pośrednią między dwu- i jednowymiarowym kształtem. W przypadku analizy dwuwymiarowych obrazów, im mniejsza wartość wymiaru fraktalnego, tym obraz cechuje się większą szczegółowością, mniejszym uporządkowaniem. Analiza wymiaru fraktalnego daje zatem możliwości porównywania, na pozór trudnych do rozróżnienia skomplikowanych wzorów, w przypadku których geometria euklidesowa zawodzi całkowicie.



Rycina 5. A - Klasyczny trójkąt wymiar fraktalny (FD)=2, B – trójkąt Sierpińskiego  $FD \approx 1.585$ . [Skośkiewicz-Malinowska, K.; Mysior, M.; Rusak, A.; Kuropka, P.; Kozakiewicz, M.; Jurczyszyn K. Application of texture and fractal dimension analysis to evaluate subgingival cement surfaces in terms of biocompatibility. Materials 2021, 14, 5857]

### ***3.12 Analiza tekstur – podstawowe informacje***

W medycynie badania obrazowe stanowią nieodzowny element w procesie diagnostycznym, monitorowaniu stanu pacjenta oraz ocenie postępu bądź remisji procesu chorobowego. Obrazy rejestrowane są w zakresie promieniowania widzialnego (zbieranie dokumentacji fotograficznej), elektromagnetycznego (zdjęcia rentgenowskie, tomografia komputerowa, pozytronowa tomografia emisyjna, scyntygrafia) oraz innych zjawisk fizycznych (odwzorowanie czasu relaksacji atomów wodoru w magnetycznym rezonansie jądrowym – MRI). Często oprócz samego oglądania obrazów potrzebne są dodatkowe metody, dostarczające ilościowych informacji na jego temat, do których należy m.in. analiza tekstur (TA, ang. texture analysis). Tekstura definiowana jest jako złożony wzór obrazu, posiadający elementy o określonym kształcie, kolorze czy jasności. Są nimi powtarzające się atrybuty graficzne, takich jak jasność, gładkość, chropowatość, liniowość, entropia oraz regularność [86]. Teksturę można również zdefiniować jako strukturę obrazu utworzonego przez piksele, czyli najmniejszą jednostkę obrazu cyfrowego zawierającą informacje na temat koloru/jasności oraz jego współrzędnych. Analiza tekstury pozwala na ilościowe, dokładne i czułe wykrywanie subtelnych zmian w badanych obrazach. TA zawiera szereg matematycznych technik, służących do ilościowego określania i oceny zmienności przestrzennej intensywności skali szarości pikseli w obrazie cyfrowym [87]. Analiza tekstur jest często wykorzystywana do oceny obrazów rezonansu magnetycznego, tomografii komputerowej, zdjęć rentgenowskich oraz analizy obrazów medycznych [88,89]. Tekstury przedstawiane są najczęściej w postaci dwuwymiarowej płaszczyzny pikseli, gdzie każdy piksel reprezentuje poziom jasności w zakresie zdefiniowanego obszaru. Dalej w oparciu o cechy statystyczne, dokonywana jest ich analiza na podstawie histogramu, macierzy gradientu, macierzy długości pasm i macierzy zdarzeń [90]. Cechy uzyskane z macierzy zdarzeń inaczej zwanej macierzą współwystępowań są jednymi z najczęściej wykorzystywanych cech statystycznych do analizy obrazów biomedycznych.

## 4. CELE I ZAŁOŻENIA PRACY

### 4.1 Cele pracy

Celem rozprawy doktorskiej jest ocena skuteczności źródeł światła na bazie półprzewodników (w zakresie światła widzialnego oraz bliskiej podczerwieni), w wybranych aplikacjach medycznych.

W pierwszej części (publikacja nr 1) celem była ocena zastosowania terapii fotodynamicznej z wykorzystaniem lasera półprzewodnikowego, w leczeniu raka podstawnocomórkowego skóry, a także wykorzystanie diagnostyki fotodynamicznej w ocenie skuteczności gojenia zmiany w trakcie leczenia. W opisanym przypadku klinicznym zastosowano laser półprzewodnikowy w zakresie pracy 405 i 630 nm oraz fotouczulacz 5-ALA.

W drugiej części (publikacja nr 2) celem była ocena pracy lasera półprzewodnikowego, mogącego emitować jednocześnie trzy długości fali (450, 520 i 640 nm), na wzrost temperatury oraz głębokość wywołanych zmian w tkance, w badaniach *ex vivo*. Innowacyjność tego badania polegała na możliwości łączenia dwóch oraz trzech długości fali w jednej wiązce. Głębokość zmian w tkance oceniana była w badaniu histopatologicznym. Temperatura mierzona była z użyciem kamery termowizyjnej. Wymienione parametry oceniane były w kontekście fali ciągłej oraz pracy impulsowej przy różnym współczynniku wypełnienia.

Celem trzeciej części (publikacja nr 3) była ocena skuteczności leczenia zmian typu leukoplakii na błonie śluzowej jamy ustnej, przy użyciu lasera półprzewodnikowego 980 nm (Smart M, Lasotronix, Piaseczno, Polska). Do badań zostało włączonych 23 pacjentów, ocena efektywności leczenia została przeprowadzona z wykorzystaniem analizy tekstur oraz wymiaru fraktalnego fotografii zmian przed leczeniem, bezpośrednio po leczeniu oraz 12 tygodni po terapii.

## 4.2 Założenia pracy

Założenia rozprawy doktorskiej przedstawiają się następująco:

1. Wykazanie skuteczności terapii fotodynamicznej w przypadku leczenia raka podstawnocomórkowego skóry twarzy z wykorzystaniem źródła światła na bazie lasera półprzewodnikowego.
2. Próba poszukiwania synergizmu (w aspekcie wzrostu temperatury) w oddziaływaniu jednocześnie dwóch oraz trzech długości fali na tkankę w badaniu *ex vivo*.
3. Wykazanie skuteczności lasera półprzewodnikowego 980nm, w leczeniu zmian o typie venous lake w kontekście estetyki gojenia, z wykorzystaniem algorytmu analizy tekstur oraz wymiaru fraktalnego.

## 5. MATERIAŁ I METODY

Materiał dla prezentowanej rozprawy doktorskiej podzielono na trzy części odpowiednio do trzech spójnych tematycznie artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

1. Treatment of the facial basal cell carcinoma with the use of photodynamic therapy: a case report. Mateusz Trafalski, Klaudia Kazubowska, Kamil Jurczyszyn. Dent.Med.Probl. 2019 Vol.56 no.1 s.105-110. DOI: 10.17219/dmp/100507.
2. Assessment of effects of laser light combining three wavelengths (450, 520 and 640 nm) on temperature increase and depth of tissue lesions in an ex vivo study. Kamil Jurczyszyn, Witold Trzeciakowski, Zdzisław Woźniak, Piotr Ziółkowski, Matesz Trafalski. Materials 2020 Vol.13 no.23 art.5340. DOI: 10.3390/ma13235340.
3. Application of fractal dimension and texture analysis to evaluate the effectiveness of treatment of a venous lake in the oral mucosa using a 980 nm diode laser - a preliminary study. Mateusz Trafalski, Marcin Kozakiewicz, Kamil Jurczyszyn. Materials 2021 Vol.14 no.15 art.4140. DOI: 10.3390/ma14154140.

### ***5.1 Publikacja: „Treatment of the facial basal cell carcinoma with the use of photodynamic therapy: A case report”***

W artykule przedstawiono opis przypadku leczenia pacjenta chorującego na raka podstawnocomórkowego skóry z wykorzystaniem PDT. Pacjent w wieku 82 lat, z współistniejącym nadciśnieniem tętniczym, zgłosił się do poradni Zakładu Chirurgii Stomatologicznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu z powodu obecności zmiany na skórze, okolicy kąta żuchwy po stronie prawej. Powierzchnowa zmiana o wymiarach 0,5 x 1,5 cm była wznową po przebytych 13 lat temu leczeniu chirurgicznym BCC tej okolicy. Przed wdrożeniem leczenia rozpoznanie kliniczne było potwierdzone badaniem histopatologicznym – carcinoma basocellulare. Pacjent nie wyrażał zgody na powtórne leczenie chirurgiczne, dlatego zdecydował się na alternatywną metodę leczenia BCC jaką jest terapia fotodynamiczna z wykorzystaniem kwasu 5-aminolewulinowego (5-ALA) jako fotouczulacza. Przez trzy miesiące w odstępach dwutygodniowych, przeprowadzono terapie fotodynamiczną zmiany wraz z diagnostyką fotodynamiczną. Algorytm leczenia dla PDT oraz PDD przedstawiał się następująco. Badanie kliniczne, zebranie dokumentacji fotograficznej, miejscowa aplikacja fotouczulacza na guz wraz z przyległymi tkankami – 20% kwas 5-ALA w postaci maści na bazie euceryny (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) pokryty opatrunkiem okluzyjnym. Po dwóch godzinach przeprowadzano PDD (parametry ekspozycji: długość fali - 405nm, 50mW/cm<sup>2</sup>, źródło promieniowania laser półprzewodnikowy (Instytut Wysokich Ciśnień w Warszawie, Polska, numer patentu: 9223123 B2), zebranie dokumentacji fotograficznej w trakcie PDD. Kolejna aplikacja fotouczulacza (20% 5-ALA) na czas dwóch godzin. Przeprowadzenie PDT wcześniej wspomnianym laserem półprzewodnikowym o parametrach naświetlania: 630 nm, 250 mW/cm<sup>2</sup> z energią wyemitowaną na poziomie 120 J.

Guz po 3 miesiącach od rozpoczęcia terapii, uległ częściowej regresji, a po kolejnych trzech miesiącach nie stwierdzono obecności wznowy. Na wizycie kontrolnej po 9 miesiącach od zakończenia terapii, również nie stwierdzono wznowy procesu nowotworowego. Przeprowadzona na tej wizycie diagnostyka fotodynamiczna, nie ujawniła obszarów fluorescencji fotouczulacza, co świadczy o braku obecności komórek nowotworowych, jednakże pacjent nie wyraził zgody na pobranie wycinka do badania histopatologicznego.



## ***5.2 Publikacja: „Assessment of Effects of Laser Light Combining Three Wavelengths (450, 520 and 640 nm) on Temperature Increase and Depth of Tissue Lesions in an Ex Vivo Study”***

W tym badaniu opisano wpływ działania lasera o trzech długościach fali, z możliwością łączenia ich ze sobą w jednej wiązce, na tkankę w badaniu ex vivo. Oddziaływanie lasera oceniane było pod względem fizycznym (wzrost temperatury powierzchniowej tkanki poddanej pracy lasera) oraz histopatologicznym (zakres głębokości zmian w tkankach wywołanych pracą lasera).

Materiał do badań stanowiły świeże języki wołowe. Badaniem poddano ich powierzchnie grzbietową, a każdy naświetlany obszar był wycinany i utrwalany w buforowanym roztworze 10 % formaldehydu. Próbkki do badań zostały zatopione w bloki parafinowe i cięte na grubość 5  $\mu\text{m}$  z barwieniem hematoksyliną i eozyna (HE). Następnie przeprowadzono badanie mikroskopowe przez dwóch niezależnych patologów. Oceniano następujące zmiany mikroskopowe: martwicę, zwęglenie tkanek, zapadnięcie się naczyń krwionośnych, zatarcie struktury komórkowej oraz zaciemnienie struktury tkanek. Patolodzy zaznaczali granicę pomiędzy prawidłową tkanką, a tkanką objętą zmianami opisanymi powyżej. Głębokość zmian określano jako długość linii, zawartą między tą granicą, a powierzchnią próbki.

Naświetlanie prowadzono przy użyciu lasera półprzewodnikowego o trzech długościach fali 450, 520 i 640 nm (Instytut Wysokich Ciśnień w Warszawie, Polska, numer patentu: 9 223 123, B2; data patentu: 29 grudnia 2015). W skład tego urządzenia wchodzi lasery diodowe sprzężone w światłowód wielomodułowy (o rdzeniu 200 – 400  $\mu\text{m}$ ) z odbłyśnikiem (w postaci regularnej piramidy). Optymalizacja układu optycznego umożliwia sprzężanie 70% - 90% światła do światłowodu. Urządzenie umożliwia pracę w trybie fali ciągłej i impulsowej (od 1 ms wzwyż) oraz emisję poszczególnych fal z osobna jak i w połączeniu ze sobą. Napromieniowanie pojedynczej długości fali przeprowadzono przy mocy wyjściowej 1,5 W. Jeśli zastosowano dwie długości fal jednocześnie, ustawiono 0,75 W dla każdej długości fali. W przypadku zastosowania trzech długości fal razem, moc wyjściowa dla każdej z nich wynosiła 0,5 W. Dla pracy impulsowej, szerokość impulsu wynosiła 1 ms (10% wypełnienia), 5 ms (50% wypełnienia) oraz 8 ms (80% wypełnienia), z okresem 10 ms (częstotliwość 100 Hz). 100% wypełnienia odpowiadało pracy fali ciągłej. Średnicę plamki lasera ustawiono na 4 mm. Czas naświetlania wynosił 7 s dla 100% wypełnienia, 9 s dla 80% wypełnienia, 14 s dla 50% wypełnienia oraz 70 s dla 10% wypełnienia. Całkowita dawka

wyemitowanej energii dla każdej wiązki wynosiła około 10,5 J, a powierzchniowa gęstość energii wynosiła 12 W/cm<sup>2</sup>. Badanie przeprowadzono na wiązkach laserowych z różnym stopniem wypełnienia:

- Blue 450 nm (B): 100%, 80%, 50%, 10%;
- Green 520 nm (G): 100%, 80%, 50%, 10%;
- Red 640 nm (R): 100%, 80%, 50%, 10%;
- Blue + Green (B + G): 100%, 80%, 50%, 10%;
- Blue + Red (B + R): 100%, 80%, 50%, 10%;
- Green + Red (G + R): 100%, 80%, 50%, 10%;
- Green + Blue + Red (G + B + R): 100%, 80%, 50%, 10%.

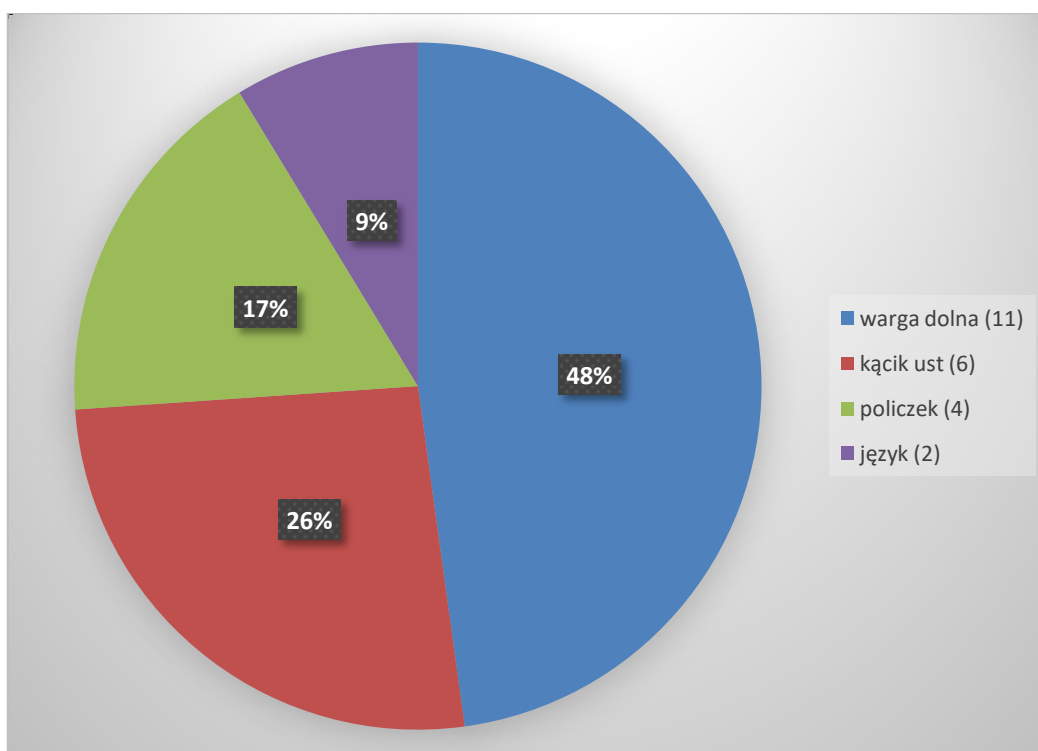
Pomiar temperatury powierzchniowej tkanek dla każdej badanej wiązki przeprowadzono za pomocą kamery Compact Seek Thermal FLIR Camera (Seek Thermal Inc., Santa Barbara, CA, USA). Każde naświetlanie było rejestrowane nagraniem wideo, które było analizowane przy użyciu oprogramowania Avidemux 2.7.5 (WWW. Avidemux.org. licencja GNU GPL). Temperatura była mierzona co jedną sekundę. Odchylenie standardowe maksymalnej temperatury zostało wzięte z ostatnich trzech pomiarów. Przed naświetlaniem temperatura tkanki wynosiła 27°C. Szybkość wzrostu temperatury (dT/dt) określono jako całkowity przyrost temperatury podzielony przez całkowity czas naświetlania (7 - 70 s). Cały eksperyment został powtórzony dwukrotnie w tych samych warunkach, uzyskując w każdym przypadku takie same wyniki.

### ***5.3 Publikacja: "Application of Fractal Dimension and Texture Analysis to Evaluate the Effectiveness of Treatment of a Venous Lake in the Oral Mucosa Using a 980 nm Diode Laser—A Preliminary Study"***

W trzecim artykule przedstawiono skuteczność leczenia zmian typu venous lake na błonie śluzowej jamy ustnej, przy użyciu lasera diodowego 980 nm (Smart M, Lasotronix, Piaseczno, Polska). Do oceny leczenia wykorzystano analizę tekstur oraz analizę wymiaru

fraktalnego fotografii zmian przed leczeniem, bezpośrednio po leczeniu oraz 12 tygodni po terapii.

Do badania włączono grupę 23 pacjentów (12 kobiet i 11 mężczyzn) ze zmianami typu venous lake na błonie śluzowej jamy ustnej. Średnia wieku wynosiła 66 lat (SD=14). Najmłodszy pacjent miał 36 lat, najstarszy 87 lat. Lokalizacja zmian w jamie ustnej została przedstawiona na ryc.6.



Ryc. 6. Lokalizacja zmian na błonie śluzowej wśród pacjentów objętych badaniem.

Przyjęto następujące kryteria wykluczeń: aktywna bądź przebyta choroba nowotworowa w obszarze głowy i szyi, stan po radioterapii i chemioterapii nowotworów głowy i szyi, leczenie immunosupresyjne, wrodzone guzy oraz malformacje naczyniowe. Projekt został zaakceptowany przez Komisję Bioetyczną przy Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu,

zgoda numer KB – 805/2019 (2 grudnia 2019 r.) oraz KB – 14/2020 (16 stycznia 2020 r.), numer regulacyjny CWN UMED: BW-110.

Rozpoznanie oparto na podstawie wnikliwego wywiadu oraz badania. Pod uwagę brano: czas jaki upłynął od pojawienia się zmiany chorobowej, towarzyszące objawy, dynamikę wzrostu, wygląd zmiany oraz objaw diaskopii. Pacjenci poddawani byli badaniu przedmiotowemu i podmiotowemu przed leczeniem oraz kontrolowani byli w 7, 14 i 90 dniu po zabiegu. Podczas każdej wizyty zmiany były mierzone przy pomocy wyskalowanej sondy periodontologicznej. Dodatkowo wykonywano dokumentację fotograficzną. Za kryterium remisji uznano całkowity brak zmiany lub nieznacznie jaśniejszą śluzówkę, uznawaną jako bliznę, w miejscu przeprowadzonego zabiegu. W przypadku braku gojenia po okresie 3 miesięcy od zabiegu przeprowadzano ponowny zabieg z taką samą częstotliwością wizyt kontrolnych.

Przed przystąpieniem do zabiegu, błonę śluzową znieczulano 10% lidokainą (Lidocain-Egis 10 % Delfarma, Łódź, Polska), za pomocą opatrunku okluzyjnego przez 2 minuty. Operator jak i pacjent w trakcie zabiegu byli zaopatrzeni w okulary ochronne. Procedurę wykonywano przy użyciu lasera półprzewodnikowego 980 nm (Lasotronix Smart M, Piaseczno, Polska). Średnica optycznego włókna światłowodu wynosiła 400  $\mu\text{m}$ , długość fali 980  $\mu\text{m}$ , moc 6 W, tryb impulsowy 100 ms z wypełnieniem wiązki na poziomie 50%. Całkowita dawka wyemitowanej energii podczas zabiegu zależała od wielkości zmiany i zawierała się w przedziale od 80 – 600 J. Naświetlanie prowadzono w trybie bezkontaktowym przez szkiełko podstawowe o grubości 1 mm. Transparencja szkła wynosiła 90%, a do oceny tego parametru użyto miernika mocy i energii PM100USB (Thorlabs Inc, Newton, NJ, Stany Zjednoczone). Tym samym 90% energii emitowanej przez urządzenie zostało przekazane do tkanki, a pozostałe 10% uległo rozproszeniu i odbiciu przez szkło. Szkiełko podstawowe przykładano na leczonej zmianę z lekkim uciskiem, celem zmniejszenia jej wymiaru pionowego i tym samym lepszej penetracji wiązki laserowej w głąb tkanki. Następnie końcówkę światłowodu przykładano pod kątem prostym do powierzchni szkiełka podstawowego i aktywowano urządzenie laserowe. Naświetlanie prowadzono do momentu uzyskania nieznacznego zbielenia w miejscu przyłożenia, a następnie przesuwno końcówkę w kolejne miejsce obok poprzedniego. Po uzyskaniu zbielenia całej powierzchni zmiany kończono zabieg. Ból okołozabiegowy określano za pomocą skali NRS (ang. Numerical Rating Scale), zawierającej 11 stopni nasilenia bólu, gdzie 0 to brak bólu a 10 to ból niemożliwy do zniesienia. Średnie nasilenie bólu było na poziomie 4,76. Tylko w dwóch

przypadkach dolegliwości bólowe były na tyle silne, że zabieg wymagał infiltracyjnego znieczulenia 4% arykainą (Septodont, Saint-Maur-des-Fosses, Francja). Po zabiegu zmiany były pozostawione do samoistnego gojenia. Zalecano unikania spożywania gorących i pikantnych potraw oraz unikania drażnienia mechanicznego zmiany. Żaden pacjent nie wymagał zażywania środków przeciwbólowych i we wszystkich przypadkach gojenie przebiegało bez powikłań.

Wszystkie zdjęcia zostały wykonane aparatem telefonu komórkowego Samsung S9 (Samsung Electronics, Seul, Korea Południowa) w formacie RAW, aby zredukować efekty wyostrzania i algorytmy odszumiania. Wszystkie zdjęcia zostały wykonane z tej samej odległości (45 cm), a oś optyczna obiektywu była prostopadła do powierzchni zmiany. Dla uzyskania powtarzalności ogniskowa obiektywu była ustawiona na 45 cm. W zależności od rozmiaru zmiany, obszar zainteresowania (ROI, ang. region of interest) wynosił:  $50 \times 50$ ,

$100 \times 100$  lub  $150 \times 150$  pikseli. Obrazy ROI zostały przekonwertowane na 8-bitowe fotografie w skali szarości. Wszystkie operacje graficzne zostały wykonane przy użyciu GIMP w wersji 2.10.24 (GNU Image Manipulation Program - [www.gimp.org](http://www.gimp.org), bezpłatna licencja, dostęp 3 maja 2021).

Do pomiaru powierzchni zmiany wykorzystywano oprogramowanie ImageJ, ver 1.53e (bezpłatna licencja, <https://imagej.nih.gov>). Obecna na zdjęciu sonda periodontologiczna z podziałką milimetrową, przyłożona obok leczonego obszaru, służyła jako skala odwzorowania dla obliczania pola powierzchni zmian. Obliczanie powierzchni wykonywano przed leczeniem oraz w przypadkach, gdzie nie zaobserwowano odpowiedzi na leczenie. Średnia powierzchnia leczonych zmian wynosiła  $38\text{mm}^2$  (SD=48). Najmniejsza zmiana poddana leczeniu miała  $10\text{mm}^2$  a największa  $220\text{mm}^2$ .

Analizę wymiaru fraktalnego (FDA, ang. fractal dimension analysis) zmian chorobowych przeprowadzono w każdym przypadku przed leczeniem, po 7 dniach oraz po 3 miesiącach od leczenia. Grupę kontrolną stanowiła prawidłowa błona śluzowa. Referencje obrazy prawidłowej błony śluzowej (grupy kontrolnej) rejestrowano po 3 miesiącach z tej samej lokalizacji co badana zmiana; np. jeśli zmiana znajdowała się na wardze, kontrolny region zainteresowania pobierano ze zdrowej okolicy błony śluzowej wargi. Rozmiar ROI zależał od wielkości zmiany. W badaniu wykorzystano trzy rozmiary ROI:  $50 \times 50$ ,  $100 \times 100$  i  $150 \times 150$  pikseli. Wszystkie analizy wymiaru fraktalnego zostały wykonane przy pomocy oprogramowania ImageJ wersja 1.53e (<https://imagej.nih.gov/ij/>, dostęp 3 maja 2021)

i wtyczką FracLac w wersji 2.5 (Charles Sturt University, Australia). Do analizy wymiaru fraktalnego zastosowano algorytm różnicy intensywności. Zastosowany sposób obliczeń umożliwia analizę 8- lub 16-bitowych obrazów w skali szarości. Analizowany obraz został podzielony siatką kwadratów. Analizę wykonywano w następujących po sobie krokach, w których dochodzi do zmiany wymiaru kwadratów (skala  $\varepsilon$ ) pokrywających badany obraz. W każdym kroku, dla każdego analizowanego kwadratu wykonywano są następujące operacje.

Różnica między maksymalną i minimalną intensywnością pikseli była liczona w każdym analizowanym kwadracie ( $\delta I_{i,j,\varepsilon}$ , gdzie  $i,j$  oznacza pozycje analizowanego kwadratu na skali  $\varepsilon$ ):

$$\delta I_{i,j,\varepsilon} = \text{maksymalna intensywność piksela}_{i,j,\varepsilon} - \text{minimalna intensywność piksela}_{i,j,\varepsilon}$$

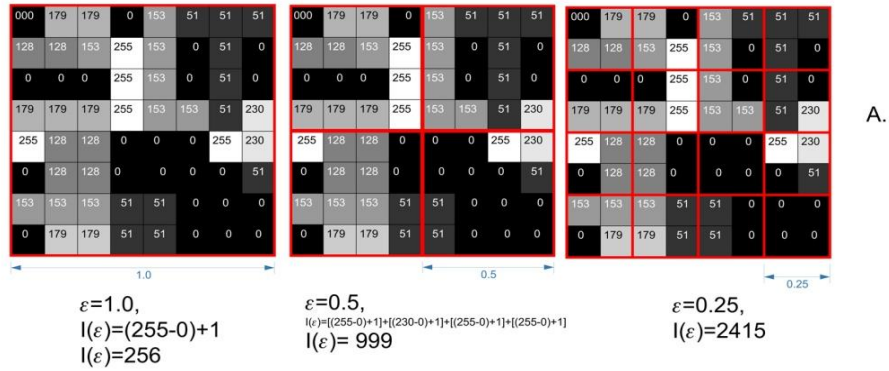
Ponieważ powyższa wartość znajdzie się w mianowniku, do uzyskanego wyniku dodawane jest 1 by uniknąć dzielenia przez 0):

$$I_{i,j,\varepsilon} = \delta I_{i,j,\varepsilon} + 1$$

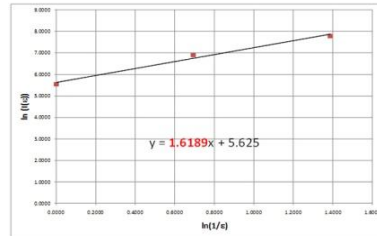
Ostatecznie, fraktalny wymiar różnicy intensywności opisany jest następującym wzorem:

$$FD = \lim_{\varepsilon \rightarrow 0} \frac{\ln(I_{\varepsilon})}{\ln\left(\frac{1}{\varepsilon}\right)}$$

Gdzie FD – wymiar fraktalny,  $I_{\varepsilon} = \Sigma[\delta I_{i,j,\varepsilon} + 1]$  i  $\varepsilon$ —skala. Wszystkie operacje pokazano na rycinie 3.



$\epsilon$	$l(\epsilon)$	$\ln(1/\epsilon)$	$\ln(l(\epsilon))$
1.00	256	0.0000	5.5452
0.50	999	0.6931	6.9068
0.25	2415	1.3863	7.7895



Rycina 3. Graficzna interpretacja algorytmu różnicy intensywności wymiaru fraktalnego. (A) Przykład 8 – bitowego obrazu w skali szarości; Liczby w kwadratach pokazują poziom intensywności każdego piksela: 0, czarny i 255, biały. Czerwony kwadrat pokazuje skale - (□). (B). Wartość różnicy intensywności dla każdego stopnia redukcji skali (□). (C) Linia prosta poprowadzona przez punkty z tabeli B na wykresie x-y w naturalnej skali logarytmicznej. Współczynnik nachylenia prostej jest wartością wymiaru fraktalnego obliczoną przez algorytm różnicy intensywności.

Teksturę obrazu VL oraz błony śluzowej oceniano za pomocą cech pochodzących z macierzy współwystępowania. Obszary zainteresowania zostały znormalizowane ( $\mu \pm 3\sigma$ ), aby mieć tę samą średnią ( $\mu$ ) i standardowe odchylenie gęstości optycznej w ROI. Wybrane cechy tekstury obrazu (entropia i entropia różnicowa (DifEntr) z macierzy współwystępowania, moment uwydatniania krótkich i długich pasm macierzy długości pasm w ROI obliczano dla każdego badanego obrazu poniższymi wzorami:

$$DifEntr = - \sum_{i=1}^{Ng} p_{x-y}(i) \log(p_{x-y}(i))$$

$$Contrast = \sum_{|i-j|=0}^{Ng-1} (|i-j|)^2 \sum_{i=1}^{Ng} \sum_{j=1}^{Ng} p(i,j)$$

gdzie  $\Sigma$  to suma,  $N_g$  to liczba poziomów gęstości optycznej obrazu,  $i$  oraz  $j$  to gęstość optyczna pikseli oddalonych od siebie o 5 pikseli,  $p$  to prawdopodobieństwo. Analiza tekstur została wykonana przy pomocy oprogramowania MaZda 4.6 (Politechnika Łódzka, Polska).

## 6. WYNIKI

### ***6.1 Publikacja: "Treatment of the facial basal cell carcinoma with the use of photodynamic therapy: a case report"***

W wyniku zastosowania PDT, z wykorzystaniem 5-ALA oraz lasera półprzewodnikowego 630 nm, uzyskano pełne wyleczenie ogniska BCC, zlokalizowanego na skórze twarzy. Ponadto uzyskano wysoce estetyczny wynik terapii. Na wizytach kontrolnych po 3 oraz 12 miesiącach od zakończonego leczenia nie stwierdzono makroskopowo ognisk nowotworu w obszarze poddanym leczeniu. Równocześnie przeprowadzona diagnostyka fotodynamiczna tego obszaru w trakcie wizyt kontrolnych nie wykazała ognisk fluorescencji (w kolorze czerwonym), co można interpretować jako brak ognisk nowotworowych w leczonym obszarze.

### ***6.2 Publikacja: "Assessment of effects of laser light combining three wavelengths (450, 520 and 640 nm) on temperature increase and depth of tissue lesions in an ex vivo study"***

W przypadku zastosowania wiązki składającej się z dwóch fal (450 i 520 nm), niezależnie od jej stopnia wypełnienia, zaobserwowano synergistyczny efekt na przyrost temperatury w funkcji czasu jak i na maksymalną temperaturę tkanek poddanych jej działaniu. W przypadku tej wiązki w trybie pracy ciągłej, maksymalny przyrost temperatury wynosił 10,43°C/s, a maksymalna temperatura powierzchniowa badanych tkanek osiągnęła 100°C. Natomiast najgłębsze zmiany w tkankach odnotowano podczas naświetlania wiązką o trzech długościach fali (450 + 520 + 640 nm) przy wypełnieniu 50%, 80% i 100%, co ciekawe bez istotnych różnic statystycznych między tymi grupami. Wartości te wynosiły odpowiednio 1,44 mm, 1,36 mm oraz 1,43 mm.



### ***6.3 Publikacja: “Application of fractal dimension and texture analysis to evaluate the effectiveness of treatment of a venous lake in the oral mucosa using a 980 nm diode laser - a preliminary study”***

W badaniu obejmującym leczenie 23 pacjentów ze zmianami VL, uzyskano całkowite wygojenie bez formowania się blizn w 83% przypadków. W 9% (dwa przypadki) obszar poddany leczeniu wygoił się z pozostawieniem blizny. Brak gojenia zaobserwowano w 4% (jeden przypadek) oraz częściowe gojenie poprzez redukcje rozmiaru zmiany uzyskano również w 4% (jeden przypadek). W kontekście gojenia wymiar fraktalny zmian był mniejszy przed leczeniem (1,359) i 7 dni po leczeniu (1,354) w porównaniu do wygojonego obszaru po 3 miesiącach (1,440). Nie zaobserwowano również statystycznych różnic między FD wygojonego obszaru a zdrową błoną śluzową. Zarówno leczone zmiany naczyniowe jak i zmiany po 7 dniach od zastosowanego leczenia charakteryzowały się zmniejszonym mikrokontrastem ( $31 \pm 19$ ,  $40 \pm 18$ ) w porównaniu do zdrowej błony śluzowej oraz wygojonych obszarów. W wyniku zabiegu, po 3 miesiącach od zastosowanego leczenia, tekstura obrazu zmiany naczyniowej powróciła do normy ( $57 \pm 32$ ), przybierając cechy prawidłowej błony śluzowej. W procesie leczenia nie zaobserwowano istotnych zmian podczas badania entropii różnicowej, jako miary losowych wzorów w teksturze. Powyższe wyniki potwierdzają skuteczność leczenia zmian VL z wykorzystaniem lasera półprzewodnikowego 980 nm. Zastosowanie FDA i TA obejmującej mikrokontrast w kontekście oceny gojenia zmian VL, potwierdza użyteczność tych metod.

## 7. WNIOSKI

Wnioski płynące z powyższych prac naukowych przedstawiają się następująco:

1. Terapia fotodynamiczna, z wykorzystaniem 5-ALA oraz lasera półprzewodnikowego 630 nm, jest skuteczną metodą leczenia powierzchniowych postaci BCC. Z uwagi na swoją wysoką selektywność w stosunku do komórek nowotworowych, skutkuje bardzo dobrymi efektami kosmetycznymi po zabiegu. Stanowi alternatywę dla innych opcji terapeutycznych, szczególnie w obszarach ważnych w kontekście estetycznym, jakim są głowa i szyja. Pomimo, iż leczenie chirurgiczne nadal pozostaje „złotym standardem” w leczeniu BCC, terapia fotodynamiczna może być również stosowana, jako uzupełnienie innych metod leczniczych, szczególnie u pacjentów, którzy nie akceptują efektów kosmetycznych oferowanych przez klasyczne metody chirurgiczne lub są wykluczeni z leczenia operacyjnego.
2. Wiązka lasera półprzewodnikowego składająca się z dwóch fal o długości 450 i 520 nm, wykazuje synergizm w stosunku przyrostu temperatury w funkcji czasu jak i do maksymalnej temperatury tkanek poddanej jej działaniu (badania ex vivo). Ponadto w trakcie naświetlania wiązką składająca się z trzech fal o długości 450, 520 i 630 nm, obserwuje się największą głębokość zmian zachodzących w tkance w porównaniu do głębokości zmian, jakie wywołują te wiązki użyte osobno. Powyższe badania otwierają nowe perspektywy w chirurgii tkanek miękkich, oferując zastosowanie laserów diodowych o różnych długościach fali w jednej wiązce. Poprzez odpowiedni dobór parametrów wiązki, tego typu urządzenie laserowe może mieć zastosowanie w różnych sytuacjach klinicznych, np. w cięciu tkanek miękkich, leczeniu zmian o podłożu naczyniowym, pobieraniu wycinków tkankowych z tkanek miękkich. Odpowiednia konfiguracja wiązki może wpływać na uzyskanie optymalnych wyników leczenia, jednocześnie minimalizując skutki uboczne oddziaływania lasera z tkankami.
3. Praca w trybie bezkontaktowym lasera półprzewodnikowego 980 nm jest skuteczną i bezpieczną metodą leczenia zmian typu venous lake zlokalizowanych na błonie śluzowej jamy ustnej. Ponadto w kontekście estetyki gojenia tych zmian, laser półprzewodnikowy 980 nm wykazuje się bardzo dobrymi wynikami.

4. Analiza tekstur oraz analiza wymiaru fraktalnego stanowią obiektywną i skuteczną metodą oceny skuteczności leczenia zmian o typie venous lake na błonie śluzowej jamy ustnej. Wymiar fraktalny zmian naczyniowych jest istotnie mniejszy niż zdrowej błony śluzowej jamy ustnej, a po 3 miesiącach od zastosowanego leczenia wygojone miejsca nie wykazują statystycznych różnic w wymiarze fraktalnym w porównaniu do prawidłowej błony śluzowej. Zmiany naczyniowe posiadają mniejszy kontrast niż prawidłowa błona śluzowa. Po 3 miesiącach od zastosowanego leczenia wygojone miejsce osiąga cechy tekstur zdrowej błony śluzowej.

## 8. PIŚMIENNICTWO

- [1] Madelung O. Introduction to Solid-State Theory. 1987. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 1978. ISBN-13: 978-3-540-7806\8
- [2] Sangtae K, Miso L, Changho H, Youngchae Y, Hyungmin A, Dongheon L, Wonseok J, Dongsun Y, Youngho K, Yong Y , Seungwu H. A band-gap database for semiconducting inorganic materials calculated with hybrid functional. *Sci Data*. 2020,11;7(1):387. doi: 10.1038/s41597-020-00723-8
- [3] Baodan L, Jing L, Wenjin Y, Xinglai Z, Xin J, Yoshio B. Semiconductor Solid-Solution Nanostructures: Synthesis, Property Tailoring, and Applications. *Small*. 2017,13(45). doi: 10.1002/sml.201701998
- [4] Yacobi B.G. Semiconductor Materials: An Introduction to Basic Principles. 2004. Kluwer Academic Publishers New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow. eBook ISBN: 0-306-47942-7
- [5] Annamraju KV. GaN nanostructure-based light emitting diodes and semiconductor lasers. *J Nanosci Nanotechnol*. 2014;14(2):1947-82. doi: 10.1166/jnn.2014.9123.
- [6] Hilary SB, Lucy HYY. Subthreshold Diode Micropulse Laser: A Review. *Semin Ophthalmol*.2016;31(1-2):30-9. doi: 10.3109/08820538.2015.1114837.
- [7] Helena HA, Larissa N, Carina YF, Rui I. Diode Laser for Laryngeal Surgery: a Systematic Review. *Int Arch Otorhinolaryngol*. 2016,20(2):172-9. doi: 10.1055/s-0036-1579741
- [8] Saydjari Y, Kuypers T, Gutknecht N. Laser Application in Dentistry: Irradiation Effects of Nd:YAG 1064 nm and Diode 810 nm and 980 nm in Infected Root Canals-A Literature Overview. *Biomed Res Int*. 2016,2016:8421656. doi: 10.1155/2016/8421656.
- [9] Chen B, Li D, Wang F. InP Quantum Dots: Synthesis and Lighting Applications. *Small*. 2020,16(32):e2002454. doi: 10.1002/sml.202002454.
- [10] Yamashita Y, Kuwabara M, Torii K, Yoshida H. A 340-nm-band ultraviolet laser diode composed of GaN well layers. *Opt Express*.2013,11;21(3):3133-7.doi: 10.1364/OE.21.003133.
- [11] Ra YH, Rashid RT, Liu X, Sadaf S, Mashooq K, Mi Z. An electrically pumped surface-emitting semiconductor green laser. *Sci Adv*. 2020,3;6(1):eaav7523. doi: 10.1126/sciadv.aav7523.
- [12] Maiman T: Stimulated optical radiation in ruby. *Nature* 1960;187:493– 494.
- [13] Einstein A. Zur Quantentheorie der Strahlung. *Physiol Z* 1917;18:121– 128.
- [14] Lisa C, Tatyana RH.LASER-tissue interactions. *Clin Dermatol*. 2006;24(1):2-7. doi: 10.1016/j.clindermatol.2005.10.019.
- [15] Inja BA, Joely K. Laser principles. *Curr Probl Dermatol*. 2011,42:7-23. doi: 10.1159/000328236.
- [16] Yates B, Que SK , D'Souza L, Suchecki J, Finch JJ. Laser treatment of periocular skin conditions. *Clin Dermatol*. 2015,33(2):197-206. doi: 10.1016/j.clindermatol.2014.10.011
- [17] Alster TS, Husain Z. The role of lasers and intense pulsed light technology in dermatology. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol*. 2016, 9, 29–40. doi: 10.2147/CCID.S69106

- [18] Najeeb, S.; Khurshid, Z.; Zafar, M.S.; Ajlal, S. Applications of Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation (Lasers) for Restorative Dentistry. *Med. Princ. Pr.* 2016, 25, 201–211. doi: 10.1159/000443144.
- [19] Jurczyszyn K, Trzeciakowski W, Woźniak Z, Ziółkowski P, Trafalski M. Assessment of Effects of Laser Light Combining Three Wavelengths (450, 520 and 640 nm) on Temperature Increase and Depth of Tissue Lesions in an Ex Vivo Study. *Materials (Basel)*. 2020, 25;13(23) :5340. doi: 10.3390/ma13235340.
- [20] Namour M, Verspecht T, El Mobadder M, Teughels W, Peremans A, Nammour S, Rompen E. Q-Switch Nd:YAG Laser-Assisted Elimination of Multi-Species Biofilm on Titanium Surfaces. *Materials* 2020, 13, 1573. doi: 10.3390/ma13071573.
- [21] Barua S. Laser-tissue interaction in tattoo removal by Q-switched lasers. *J. Cutan. Aesthetic Surg.* 2015, 8,5–8. doi: 10.4103/0974-2077.155063.
- [22] Musstaf RA, Jenkins DFL , Jha AN. Assessing the impact of low level laser therapy (LLLT) on biological systems: a review. *Int J Radiat Biol.* 2019,95(2):120-143.doi: 10.1080/09553002.2019.1524944.
- [23] Nadhreen AA, Alamoudi NM , ElkhodaryHM. Low-level laser therapy in dentistry: Extra-oral applications. *Niger J Clin Pract.* 2019,22(10):1313-1318. doi: 10.4103/njcp.njcp\_53\_19.
- [24] Taradaj J, Shay B, Dymarek R, Sopol M, Walewicz K, Beeckman D, Schoonhoven L, Gefen A, Rosińczuk J. Effect of laser therapy on expression of angio- and fibrogenic factors, and cytokine concentrations during the healing process of human pressure ulcers. *Int J Med Sci.* 2018; 15(11): 1105–1112. Published online 2018 Jul 13. doi: 10.7150/ijms.2565
- [25] Amorim Dos Santos J, Normando AGC, de Toledo IP, Melo G, De Luca Canto G, Santos-Silva AR, Guerra ENS. Laser therapy for recurrent aphthous stomatitis: an overview. *Clin Oral Investig.* 2020,24(1):37-45. doi: 10.1007/s00784-019-03144
- [26] Heiskanen V, Hamblin MR. Photobiomodulation: Lasers vs Light Emitting Diodes?. *Photochem Photobiol Sci.* 2018, 8; 17(8): 1003–1017.doi: 10.1039/c8pp00176f
- [27] Glass GE. Photobiomodulation: The Clinical Applications of Low-Level Light Therapy. *Aesthet Surg J.* 2021, 18;41(6):723-738. doi: 10.1093/asj/sjab025.
- [28] Belikov AV, Skrypnik AV. Soft tissue cutting efficiency by 980 nm laser with carbon-, erbium-, and titanium-doped optothermal fiber converters. *Lasers Surg Med.* 2019,51(2), 185-200 DOI:10.1002/lsm.23006
- [29] Tunc SK, Yayli NZ, Talmac AC, Feslihan E, Akbal D. Clinical comparison of the use of ER,CR:YSGG and diode lasers in second stage implants surgery. *Saudi Med J.* 2019, 40, 490–498. doi:10.15537/smj.2019.5.24105.
- [30] Belykh E, Yagmurlu K, Martirosyan NL, Lei T, Izadyazdanabadi M, Malik KM, Byvaltsev VA 2, Nakaji P. Preul MC. Laser application in neurosurgery. *Surg Neurol Int.* 2017, 9;8:274. doi: 10.4103/sni.sni\_489\_16. eCollection 2017.

- [31] Khalkhal E, Razzaghi M, Rostami-Nejad M, Rezaei-Tavirani M, Beigvandi HH, Tavirani MR. Evaluation of Laser Effects on the Human Body After Laser Therapy. *J. Lasers Med. Sci.* 2020, 11, 91–97. doi: 10.15171/jlms.2020.15.
- [32] Cobb CM. Lasers in Periodontics: A Review of the Literature. *J. Periodontol.* 2006, 77, 545–564 doi: 10.1902/jop.2006.050417.
- [33] Ratz JL. Laser physics. *Clin Dermatol.* 1995;13(1):11-20. doi: 10.1016/0738-081x(94)00023-u
- [34] Menzel JP, Noble BB, Blinco JP, Barner-Kowollik C. Predicting wavelength-dependent photochemical reactivity and selectivity. *Nat Commun.* 2021, 16;12(1):1691. doi: 10.1038/s41467-021-21797-x.
- [35] Anderson RR, Parrish JA. The optics of human skin. *J Invest Dermatol* 1981;77:13– 19. doi: 10.1111/1523-1747.ep12479191.
- [36] Dobson J, de Queiroz GF, Golding JP. Photodynamic therapy and diagnosis: Principles and comparative aspects. *Vet J.* 2018 Mar;233:8-18. doi:10.1016/j.tvjl.2017.11.012.
- [37] Zhang Q, Li L. Photodynamic combinational therapy in cancer treatment. *J BUON.* May-Jun 2018;23(3):561-567
- [38] Lai M, Pampena R, Cornacchia L, Pellacani G, Peris K, Longo C. Treatments of actinic cheilitis: A systematic review of the literature. *J Am Acad Dermatol.* 2020 Sep;83(3):876-887. doi: 10.1016/j.jaad.2019.07.106. Epub 2019 Aug 7
- [39] Dianzani C, Conforti C, Giuffrida R, Corneli P, di Meo N, Farinazzo E, Moret A, Rizzi GM, Zalaudek I. Current therapies for actinic keratosis. *Int J Dermatol.* 2020 Jun;59(6):677-684. doi: 10.1111/ijd.14767.
- [40] O'Connell KA, Okhovat JP, Zeitouni NC. Photodynamic therapy for Bowen's Disease (squamous cell carcinoma in situ) current review and update. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2018, 24:109-114. doi: 10.1016/j.pdpdt.2018.09.009. Epub 2018 Sep 18
- [41] Lei S, Yang J, Zhang L, Zhang Y, Yan G, Zhang H, Liu X, Yang J, Wang P, Zhang G, Zhou Z, Xiuli W. A prospective study of adverse reactions of ALA-PDT for acne vulgaris. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2022, 14;38:102752. doi: 10.1016/j.pdpdt.2022.102752.
- [42] Dong W, Li K, Wang S, Qiu L, Liu Q, Xie M, Lin J. Targeted Photodynamic Therapy (PDT) of Lung Cancer with Biotinylated Silicon (IV) Phthalocyanine. *Curr Pharm Biotechnol.* 2021;22(3):414-422. doi:10.2174/1389201021666200510001627.
- [43] Kubrak T, Karakuła M, Czop M, Kawczyk-Krupka A, Aebischer D. Advances in Management of Bladder Cancer-The Role of Photodynamic Therapy. *Molecules.* 2022, 23;27(3):731. doi: 10.3390/molecules27030731.
- [44] Agostinis P, Berg K, Cengel KA, Foster TH, Girotti AW, Gollnick SO, Hahn SM, Hamblin MR, Juzeniene A, Kessel D, Korbelik M, Moan J, Mroz P, Nowis D, Piette J, Wilson BC, Golab J. Photodynamic therapy of cancer: an update, *CA Cancer J. Clin.* 2011;61(4):250-81. doi: 10.3322/caac.20114

- [45] Yano T, Wang KK. Photodynamic Therapy for Gastrointestinal Cancer. *Photochem Photobiol.* 2020, 96(3):517-523. doi: 10.1111/php.13206. Epub 2020 Mar 17.
- [46] Baptista MS, Cadet J, Di Mascio P, Ghogare AA, Greer A, Hamblin MR, Lorente C, Nunez SC, Ribeiro MS, Thomas AH, Vignoni M, Yoshimura TM. Type I and II Photosensitized Oxidation Reactions: Guidelines and Mechanistic Pathways. *Photochem Photobiol.* 2017, 93(4): 912–919. doi: 10.1111/php.12716
- [47] Alzeibak R, Mishchenko TA, Shilyagina NY, Balalaeva IV, Vedunova MV, Krysko DVJ. Targeting immunogenic cancer cell death by photodynamic therapy: past, present and future. *Immunother Cancer.* 2021, 9(1): e001926. doi: 10.1136/jitc-2020-001926
- [48] Shi X, Zhang CY, Gao J, Wang Z. Recent advances in photodynamic therapy for cancer and infectious diseases. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2019;11(5):e1560. doi: 10.1002/wnan.1560.
- [49] Kim M, Jung HY, Park HJ. Topical PDT in the Treatment of Benign Skin Diseases: Principles and New Applications. *Int J Mol Sci.* 2015, 25;16(10):23259-78. doi: 10.3390/ijms161023259.
- [50] Nowak-Stepniowska A, Pergoł P, Padzik-Graczyk A. Photodynamic method of cancer diagnosis and therapy—mechanisms and applications. *Postepy Biochem.* 59 (2013) 53–63
- [51] Kou J, Dou D, Yang. Porphyrin photosensitizers in photodynamic therapy and its applications. *Oncotarget.* 2017, 11;8(46):81591-81603. doi: 10.18632/oncotarget.20189.
- [52] Abrahamse H, Hamblin MR. New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochem J.* 2016, 15;473(4):347-64. doi: 10.1042/BJ20150942.
- [53] Yoon I, Li JZ, Shim YK. Advance in photosensitizers and light delivery for photodynamic therapy. *Clin Endosc.* 2013, 46(1):7-23. doi: 10.5946/ce.2013.46.1.7.
- [54] Lan M, Zhao S, Liu W, Lee CS, Zhang W, Wang P. Photosensitizers for Photodynamic Therapy. *Adv Healthc Mater.* 2019, 8(13):e1900132. doi: 10.1002/adhm.201900132
- [55] Kataoka H, Nishie H, Hayashi N, Tanaka M, Nomoto A, Yano S, Joh T. New photodynamic therapy with next-generation photosensitizers. *Ann Transl Med.* 2017, 5(8):183. doi: 10.21037/atm.2017.03.59
- [56] Babincová M, Sourivong P, Babinec P. Gene transfer-mediated intracellular photodynamic therapy. *Med Hypotheses.* 2000, 54(2):180-1. doi: 10.1054/mehy.1999.0012.
- [57] Bonneau S, Vever-Bizet C, Mojzisova H, Brault D. Tetrapyrrole-photosensitizers vectorization and plasma LDL: A physico-chemical approach. *Int J Pharm.* 2007, 1;344(1-2):78-87. doi: 10.1016/j.ijpharm.2007.06.019
- [58] Shi L, Yang J, Zhang L, Zhang Y, Yan G, Zhang H, Yang J, Wang P, Zhang G, Zhou Z, Wang X. Adverse reactions of ALA-PDT for the treatment of cutaneous diseases: a retrospective study. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2022, 24;38:102783. doi: 10.1016/j.pdpdt.2022.102783.

- [59] Inoue K, Matsuyama H, Fujimoto K, Hirao Y, Watanabe H, Ozono S, Oyama M, Ueno M, Sugimura Y, Shiina H, Mimata H, Azuma H, Nagase Y, Matsubara A, Ito YM, Shuin T. The clinical trial on the safety and effectiveness of the photodynamic diagnosis of non-muscle-invasive bladder cancer using fluorescent light-guided cystoscopy after oral administration of 5-aminolevulinic acid (5-ALA). *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2016, 13:91-96. doi: 10.1016/j.pdpdt.2015.12.011.
- [60] Yonemura Y, Endo Y, Canbay E, Liu Y, Ishibashi H, Mizumoto A, Hirano M, Imazato Y, Takao N, Ichinose M, Noguchi K, Li Y, Wakama S, Yamada K, Hatano K, Shintani H, Yoshitake H, Ogura SI. Photodynamic Detection of Peritoneal Metastases Using 5-Aminolevulinic Acid (ALA). *Cancers (Basel).* 2017, 1;9(3):23. doi: 10.3390/cancers9030023.
- [61] Kim MM, Darafsheh A. Light Sources and Dosimetry Techniques for Photodynamic Therapy. *Photochem Photobiol.* 2020, 96(2):280-294. doi: 10.1111/php.13219
- [62] Alcalay J, Sandbank M. The ultrastructure of cutaneous venous lakes. *Int. J. Dermatol.* 1987, 26:645–646. doi: 10.1111/j.1365-4362.1987.tb02271.x.
- [63] Bean WB, Walsh JR. Venous lakes. *AMA Arch Derm* 1956;74(5):459-63. doi: 10.1001/archderm.1956.01550110003002.
- [64] Migliari D, Vieira RR, Nakajima EK, Azevedo LH. Successful Management of Lip and Oral Venous Varices by Photocoagulation with Nd:YAG Laser. *J Contemp Dent Pract.* 2015,1;16(9):723-6. doi: 10.5005/jp-journals-10024-1747.
- [65] Tobouti PL, Olegário I, de Sousa SC. Benign vascular lesions of the lips: Diagnostic approach. *J Cutan Pathol.* 2017,44(5):451-455. doi: 10.1111/cup.12911
- [66] Suhonen R, Kuflik EG. Venous lakes treated by liquid nitrogen cryosurgery. *Br J Dermatol* 1997 Dec;137(6):1018-1019.
- [67] Mlacker S, Shah VV, Aldahan AS, McNamara CA, Kamath P, Nouri K. Laser and light-based treatments of venous lakes: a literature review. *Lasers Med Sci.* 2016 Sep;31(7):1511-9. doi: 10.1007/s10103-016-1934-7
- [68] Ah-Weng A, Natarajan S, Velangi S, Langtry JA. Venous lakes of the vermilion lip treated by infrared coagulation. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2004 Jun;42(3):251-3. doi: 10.1016/S0266-4356(03)00263-8.
- [69] Lomas A, Leonardi-Bee J, Bath-Hextall F. A systematic review of worldwide incidence of nonmelanoma skin cancer. *Br J Dermatol.* 2012, 166(5):1069-80. doi: 10.1111/j.1365-2133.2012.10830.x.
- [70] Migden MR, Chang ALS, Dirix L, Stratigos AJ, Lear JT. Emerging trends in the treatment of advanced basal cell carcinoma. *Cancer Treat Rev.* 2018, 64:1-10. doi: 10.1016/j.ctrv.2017.12.009.
- [71] Abbas OL, Borman H. Basal cell carcinoma: a single-center experience. *ISRN Dermatol.* 2012; 2012: 246542. doi: 10.5402/2012/246542
- [72] Nejc D, Piekarski J, Pasz-Walczak G, Jeziorski A. Rak podstawnokomórkowy skóry - młody wiek chorych przyczyną wątpliwości diagnostycznych. *Onkologia Polska.* 2002; 3-4, 179-181



- [73] Tan E, Lin FP, Sheck LH, Salmon PJ, Ng SG. Growth of periocular basal cell carcinomas. *Br J Dermatol.* 2015, 172(4):1002-7. doi: 10.1111/bjd.13470.
- [74] Sykes AJ, Wlodek C, Trickey A, Clayton GL, Oakley A. Growth rate of clinically diagnosed superficial basal cell carcinoma and changes in dermoscopic features over time. *Australas J Dermatol.* 2020, 61(4):330-336. doi: 10.1111/ajd.13352.
- [75] Bauer A, Haufe E, Heinrich L, Seidler A, Schulze HJ, Elsner P, Drexler H, Letzel S, John SM, Fartasch M, Brüning T, Dugas-Breit S, Gina M, Weistenhöfer W, Bachmann K, Bruhn I, Lang BM, Brans R, Allam JP, Grobe W, Westerhausen S, Knuschke P, Wittlich M, Diepgen TL, Schmitt J; FB181 study group. Basal cell carcinoma risk and solar UV exposure in occupationally relevant anatomic sites: do histological subtype, tumor localization and Fitzpatrick phototype play a role? A population-based case-control study. *J Occup Med Toxicol.* 2020, 10;15:28. doi: 10.1186/s12995-020-00279-8.
- [76] Liu-Smith F, Jia J, Zheng Y. UV-Induced Molecular Signaling Differences in Melanoma and Non-melanoma Skin Cancer *Adv Exp Med Biol.* 2017;996:27-40. doi: 10.1007/978-3-319-56017-5\_3.
- [77] Leiter U, Eigentler T, Garbe C. Epidemiology of skin cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2014;810:120-40. doi: 10.1007/978-1-4939-0437-2\_7.
- [78] Ramezani M, Sadeghi M. Human papilloma virus infection in basal cell carcinoma of the skin: a systematic review and meta-analysis study. *Pol J Pathol.* 2017;68(4):330-342. doi: 10.5114/pjp.2017.73929.
- [79] Ormerod A, Rajpara S, Craig F. Basal cell carcinoma *BMJ Clin Evid.* 2010; 2010: 1719.
- [80] Pabiańczyk R, Cieślík K, Tuleja T. Management methods of basal cell carcinoma [in Polish]. *Chir Pol.* 2011;13(1):48–58.
- [81] Wu A, Sun MT, Huilgol SC, Madge S, Selva D. Histological subtypes of periocular basal cell carcinoma. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2014;42(7):603–607. doi: 10.1111/ceo.12298
- [82] Kim DP, Kus KJB, Ruiz E. Basal Cell Carcinoma Review. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2019, 33(1):13-24. doi: 10.1016/j.hoc.2018.09.004.
- [83] Marzuka AG, Book SE. Basal Cell Carcinoma: Pathogenesis, Epidemiology, Clinical Features, Diagnosis, Histopathology, and Management. *Yale J Biol Med.* 2015, 1;88(2):167-79.
- [84] Tanese K. Diagnosis and Management of Basal Cell Carcinoma. *Curr Treat Options Oncol.* 2019, 11;20(2):13. doi: 10.1007/s11864-019-0610-0. DOI: 10.1007/s11864-019-0610-0
- [85] Gomory, R. Benoît Mandelbrot (1924–2010). *Nature* 2010, 468, 378–378, doi:10.1038/468378a
- [86] Skośkiewicz-Malinowska K, Mysior M, Rusak A, Kuropka P, Kozakiewicz M, Jurczyszyn K. Application of Texture and Fractal Dimension Analysis to Evaluate Subgingival Cement Surfaces in Terms of Biocompatibility. *Materials (Basel).* 2021, 7;14(19):5857. doi: 10.3390/ma14195857.
- [87] Texture Analysis for Magnetic Resonance Imaging; Hajek M, Dezortova M, Materka A, Lerski R. Prague, Czech Republic, Med4publishing s.r.o., 2006; pp. 7–41. ISBN 80-903660-0-7.

[88] Lubner MG, Smith AD, Sandrasegaran K, Sahani DV, Pickhardt PJ. CT Texture Analysis: Definitions, Applications, Biologic Correlates, and Challenges. *Radiographics* 2017, 37, 1483–1503. doi:10.1148/rg.2017170056.

[89] Guo C, Zhuge X, Wang Q, Xiao W, Wang Z, Wang Z, Feng Z, Chen X. The differentiation of pancreatic neuroendocrine carcinoma from pancreatic ductal adenocarcinoma: The values of CT imaging features and texture analysis. *Cancer Imaging* 2018, 18, 37. doi: 10.1186/s40644-018-0170-8.

[90] Haralick RM, Shanmugam K, Dinstein I. Textural Features for Image Classification. *IEEE Transactions on Systems, Man and Cybernetics*, Vol. SMC3, 1973, No. 6, pp. 610-621

## **II. PUBLIKACJE STANOWIĄCE PODSTAWĘ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

1. Mateusz Trafalski, Klaudia Kazubowska, Kamil Jurczyszyn. Treatment of the facial basal cell carcinoma with the use of photodynamic therapy: a case report. Dent Med. Probl. 2019 Vol.56 no.1 s.105-110. DOI: 10.17219/dmp/100507.
2. Kamil Jurczyszyn, Witold Trzeciakowski, Zdzisław Woźniak, Piotr Ziółkowski, Matesz Trafalski Assessment of effects of laser light combining three wavelengths (450, 520 and 640 nm) on temperature increase and depth of tissue lesions in an ex vivo study. Materials 2020 Vol.13 no.23 art.5340. DOI: 10.3390/ma13235340, IF=3,623
3. Mateusz Trafalski, Marcin Kozakiewicz, Kamil Jurczyszyn Application of fractal dimension and texture analysis to evaluate the effectiveness of treatment of a venous lake in the oral mucosa using a 980 nm diode laser - a preliminary study. Materials 2021 Vol.14 no.15 art.4140. DOI: 10.3390/ma14154140. IF=3,623, Pkt. MNiSW/KBN: 140,00

## Treatment of the facial basal cell carcinoma with the use of photodynamic therapy: A case report

### Leczenie ogniska raka podstawnkomórkowego skóry twarzy z użyciem terapii fotodynamicznej – opis przypadku

Mateusz Trafalski<sup>1,B,D</sup>, Klaudia Kazubowska<sup>2,C,D</sup>, Kamil Jurczyszyn<sup>1,A,F</sup>

<sup>1</sup> Department of Oral Surgery, Faculty of Dentistry, Wrocław Medical University, Poland

<sup>2</sup> Academic Dental Polyclinic in Wrocław, Poland

A – research concept and design; B – collection and/or assembly of data; C – data analysis and interpretation; D – writing the article; E – critical revision of the article; F – final approval of the article

Dental and Medical Problems, ISSN 1644-387X (print), ISSN 2300-9020 (online)

*Dent Med Probl.* 2019;56(1):105–110

#### Address for correspondence

Kamil Jurczyszyn  
E-mail: kjurczysz@interia.pl

#### Funding sources

None declared

#### Conflict of interest

None declared

#### Acknowledgements

This work was supported by the National Centre for Research and Development (NCBR), Poland (No. PBS3/A7/18/2015 „LASDER”).

Received on September 26, 2018

Reviewed on October 23, 2018

Accepted on December 5, 2018

Published online on March 29, 2019

#### Cite as

Trafalski M, Kazubowska K, Jurczyszyn K. Treatment of the facial basal cell carcinoma with the use of photodynamic therapy: A case report. *Dent Med Probl.* 2019;56(1):105–110. doi:10.17219/dmp/100507

#### DOI

10.17219/dmp/100507

#### Copyright

© 2019 by Wrocław Medical University  
This is an article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

#### Abstract

Basal cell carcinoma (BCC) is the most common skin cancer. It accounts for approx. 80% of human skin cancers and belongs to the group of non-melanoma skin cancers (NMSC). The highest incidence of this cancer is visible in older people, over 65 years of age. Photodynamic therapy (PDT) is a clinically approved method with a selective cytotoxic activity. It is used in the treatment of superficial forms of BCC, precancerous conditions (hyperkeratosis, actinic keratosis) and non-cancerous diseases (acne vulgaris, infection with herpes simplex virus – HSV, leukoplakia, lichen planus).

The aim of the study was to apply PDT to a patient with a clinical diagnosis and histopathologically confirmed BCC.

The patient, male, aged 82, reported to the Department of Oral Surgery at Wrocław Medical University with BCC of dimensions 0.5 × 1.5 cm, present for 13 years in the area of the right mandibular angle, after previous surgical treatment. Photodynamic diagnosis (PDD) and PDT were employed using a semiconductor laser. 5-aminolevulinic acid (5-ALA) was used as a photosensitizer. The PDD and PDT procedures were applied at 2-week intervals for 3 months. Control visits after 3, 6 and 12 months did not show local recurrence. Photodynamic therapy is a highly useful, independent method of treating superficial forms of BCC.

**Key words:** basal cell carcinoma, photodynamic therapy, photodynamic diagnosis, aminolevulinic acid

**Słowa kluczowe:** rak podstawnkomórkowy, terapia fotodynamiczna, diagnostyka fotodynamiczna, kwas aminolewulinowy

## Introduction

Basal cell carcinoma (BCC) is the most common skin cancer. It accounts for approx. 80% of human skin cancers and belongs to the group of non-melanoma skin cancers (NMSC). The highest incidence of this cancer is visible in older people, over 65 years of age, but in recent years, a significant increase in the incidence of BCC among young people has been observed.<sup>1</sup> The most common BCC locations include exposed parts of the body, such as the nose, forehead, upper lip, nasolabial fold, eyelids, and 90% of lesions are placed between the hairline and the upper lip. Furthermore, BCC may also appear in other areas (the back, shoulders, dorsal parts of the hands).<sup>2,3</sup> In relation to sex, men are slightly more likely to get ill. The main factor triggering this disorder is ultraviolet radiation, especially UVB (280–320 nm). This correlates with the highest number of cases in areas with high insolation. Additional features that predispose to carcinogenesis include skin contact with hydrocarbon or arsenic, ionizing radiation, human papilloma virus (HPV), as well as Gorlin and Goltz's syndrome. In the area of the head, BCC grows in the form of a nodule with heaped-up edges, often with central ulceration or as a red spot with minor ulcers, often with a central cavity and centers of more intense pigmentation (partially covered with a scab). On the other hand, in the area of the trunk, the macroscopic image is different. The cancer is presented as flat and brown lesions with delicate exfoliation on the surface, with elevated borders. The tumor shows slow growth and low local malignancy rates, rarely leading to distant metastases.<sup>4</sup> Long-term growth of untreated tumor causes extensive destruction of the skin, as well as destruction of the neighboring tissues, posing a significant threat to important anatomical structures, in particular in the area of the head and neck.

Basal cell carcinoma is derived from cells found in the basal layer of the epidermis. Histologically, the following forms of BCC have been distinguished: solidum, cysticum, adenoides, keratoticum, pigmentosum, superficiale multicentricum (located mainly on the trunk and limbs), cicatricans, and styloides – it is characterized by the least favorable prognosis; it grows deeper in the form of a separating strand that penetrates tissues.<sup>5</sup> Diagnostics of BCC usually does not cause any problems during an interview and physical examination of the patient. However, the final verification and diagnosis is based on a histopathological examination of the lesions – entirely cut out or their fragments.

In the treatment of BCC, surgical treatment remains the golden standard, but due to the limitations of this method in the particularly sensitive or esthetically important areas, behavioral methods play an important role and they include the following: photodynamic therapy (PDT), radiotherapy and local pharmacotherapy.

In contrast, invasive methods include methods involving the excision of the lesion and ablative methods, based on destruction of pathological tissue, such as freezing, laser therapy and curettage, supplemented by electrodesiccation of tissues. For esthetic reasons, the tumor often cannot be cut out with the right margin, which results in later local recurrence. In these cases, an invaluable advantage is given by non-invasive methods, which include, among others, PDT.

Photodynamic therapy is a clinically approved method with a selective cytotoxic activity. It is used for the treatment of superficial forms of BCC, precancerous conditions (hyperkeratosis, actinic keratosis) and non-cancerous diseases (acne vulgaris, infection with herpes simplex virus – HSV, leukoplakia, lichen planus).<sup>6–9</sup> However, PDT is used for small and superficial lesions located on the skin and mucosa. The effectiveness of PDT is limited mainly by the ability of light to penetrate into tissues (approx. 3 mm). It is particularly recommended in the treatment of superficial BCC (sBCC).<sup>10</sup>

The main components of PDT are a compound called a photosensitizer and light. As a result of the absorption of energy coming from an incident light wave, the photosensitizer goes into an excited state. Excitation of the photosensitizer and transfer of the excess energy around the intracellular structures and tissues lead to a series of cytotoxic reactions, resulting in necrosis or induction of apoptosis. One of the widely used compounds which act as photosensitizers are porphyrin derivatives. These compounds have a maximum absorption around 405 nm. Therefore, it would seem that the best source of light to excite this group of photosensitizers is a light-emitting source in this range. Due to the presence of melanocytes, the skin and mucous membranes strongly attenuate ultraviolet radiation, which is why light in the range from blue to near infrared is used in PDT. Transmission of light in the skin and mucosa is increased along with the wavelength. In order to achieve greater effectiveness of PDT in deeper layers of the treated lesions, photosensitizers whose absorption window falls within the range from 600 nm to near infrared are used. Due to the fact that porphyrin-based photosensitizers have a high affinity for cells with increased metabolism, it is possible to preserve PDT selectivity only for the treated lesions. In addition to photosensitizers, their precursors are also used in PDT. One of the most frequently used precursors of protoporphyrin IX is 5-aminolevulinic acid (5-ALA) and its methyl derivative (MAL).

## Case report

The patient, R.R. (man), aged 82, suffering from arterial hypertension, reported to the Department of Oral Surgery at Wrocław Medical University concerned about a lesion

of dimensions  $0.5 \times 1.5$  cm, which had been recurring for 13 years in the area of the right mandibular angle (Fig. 1) after surgical treatment. Figure 2 shows the lesion during PDD – red fluorescence of the photosensitizer indicates neoplasm cells. Before the implementation of the treatment, a clinical diagnosis was confirmed by a histopathological examination. For 3 months, the patient had PDD at 2-week intervals and he was treated with PDT.



Fig. 1. Local state of patient before treatment

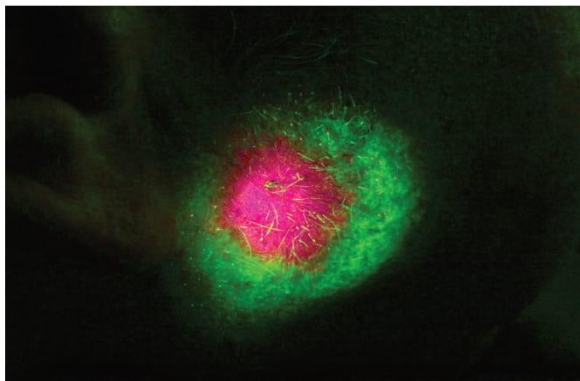


Fig. 2. Lesion during photodynamic diagnosis (PDD) – red fluorescence of photosensitizer indicates neoplasm cells

The treatment algorithm for PDT and PDD was as follows: clinical examination; collection of photographic documentation; local application of the photosensitizer on the BCC site – 20% 5-ALA ointment on eucerin base (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA); after 2 h, PDD carried out with the following exposure parameters: wavelength – 405 nm, 50 mW/cm<sup>2</sup>, source of radiation – a semiconductor laser (developed by professor Witold Trzeciakowski, Polish Academy of Science, Warszawa, Poland, patent No. 9223123 B2); photographic documentation during the PDD procedure; after PDD, another application of the photosensitizer – 20% 5-ALA covered with dressing – for another 2 h; PDT carried out with the following parameters: wavelength – 630 nm, 250 mW/cm<sup>2</sup>, total energy – 120 J, source of radiation – the above-mentioned semiconductor laser. After 3 months, the BCC outbreak

partially regressed. Figure 3 presents the local condition. After another 3 months, the patient reported to the control visit – no recurrence was found (Fig. 4). The next control was performed 9 months after the procedure. There was no local recurrence in the postoperative area. The state after a period of 12 months is shown in Fig. 5. Photodynamic diagnosis after 12 months is shown in Fig. 6 – there is no red fluorescence of the photosensitizer, which indicates there are no more neoplasm cells. Figure 7 shows a standard histological pattern of BCC before treatment (magnification  $\times 100$ , hematoxylin-eosin (H&E) stain).



Fig. 3. Local state after 3 months



Fig. 4. Local state after 6 months



Fig. 5. Local state after 12 months

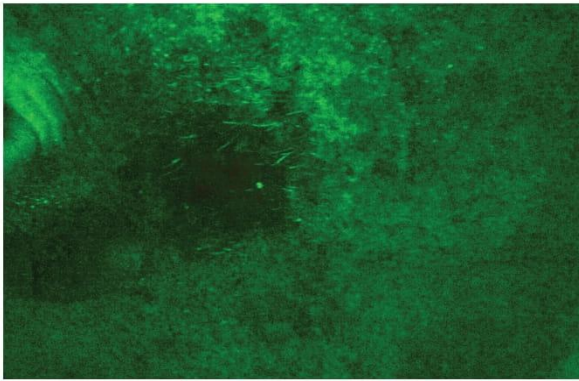


Fig. 6. Photodynamic diagnosis (PDD) procedure after 12 months – there is no red fluorescence of photosensitizer

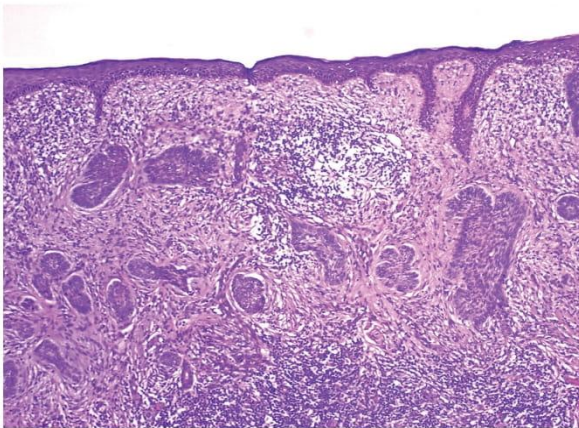


Fig. 7. Standard histological pattern of basic cell carcinoma (BCC) before treatment (magnification  $\times 100$ , hematoxylin-eosin (H&E) stain)

## Discussion

Factors that should be taken into account before the selection of a treatment strategy for BCC include, among others, the following: degree of advancement and size of the tumor, infiltration of the tumor into the adjacent tissues, location of the tumor, general condition of the patient, and any previous treatment of the lesion. Among the many possible therapies, surgical treatment of BCC remains the golden standard. It ranks first among the methods with the lowest numbers of relapses in the 5-year period after the end of treatment – 98.6% effectiveness in primary BCC and 96% efficiency in secondary BCC.<sup>11</sup> In comparison with conservative therapies, surgical treatment gives the opportunity to evaluate the radicality of the resection of the tumor by performing intraoperative examinations with the use of the Mohs micrographic surgery (MMS). Moreover, it provides the final histopathological verification of the tumor, which is impossible with the use of conservative methods. The Mohs micrographic surgery is based on precise excision of lesions due to a histopathological examination of the edges in the removed tissues. This technique gives the maximum possibility of saving

healthy tissues and it is recommended especially in areas requiring high esthetics after treatment, such as the face. Furthermore, it is preferred in the cases of recurrent BCC lesions with poorly marked borderlines and tumors exceeding 2 cm in diameter. The Mohs micrographic surgery gives less recurrence over a 5-year period compared to classical tumor excision.<sup>12,13</sup> When determining the extent of the surgical margin for BCC, the doctor should be guided mainly by the diameter of the tumor. Therefore, it is assumed that for lesions not exceeding 2 cm in diameter, a margin of 3 mm ensures effective resections in 85% of the cases and a 5-millimeter margin guarantees successful resections in 95% of the cases.<sup>5</sup> This significantly affects the post-operative esthetic effect in a given anatomical area, which is very important for the head and neck region. Scars after surgical treatment depend mainly on the extent of the tumor and the method of closing the defect in the resected tissues. Apart from the excised lesions in the treatment area, healthy tissues are often also excised in order to collect skin patches used to close the primary cavity. This procedure significantly increases the surgical area above the correct surgical margin of the resected tumor.

However, there are situations, especially in the head area, where the determination of a sufficient margin is limited by the presence of important anatomical structures, such as the eyeballs, eyelids and earlobes. In these cases, there are methods that work outstandingly selectively against cancer cells. They include PDT, local therapy with 5% imiquimod and 5-fluorouracil (5-FU), and targeted molecular therapy with vismodegib, all of which specifically save the healthy tissues adjacent to the tumor.

Comparing the response to treatment in the case of a surgical method and PDT with MAL as a photosensitizer (MAL-PDT), a complete response at the level of 96% for the surgical method and 73% for PDT (in the observation period of 5 years) has been shown.<sup>14</sup> However, when analyzing the esthetic effect of both methods obtained after the treatment, PDT significantly exceeds the surgical treatment.<sup>14–16</sup> Therefore, PDT has become an alternative method for patients excluded from the surgical treatment due to general health reasons and for patients in whom, because of the location of the lesion, scarring after the surgical treatment would disrupt the esthetic effect.

Methods including topical pharmacological therapy are mainly used for the treatment of small-size tumors. In these cases, imiquimod can be used. This is a modulator of the immune response, especially in the field of dendritic cells and monocytes. It has been approved by the Food and Drug Administration (FDA) and the European Medicines Agency (EMA) for the treatment of BCC with a diameter not exceeding 2 cm. In addition to anticancer activity, it is used in the treatment of viral diseases, especially related to HPV. It is used in the form of 5% cream in occlusive dressings, depending on the form of BCC, from 6 to 12 weeks, 5–6 times a week. A comparison of local treatment with the use of 5% imiquimod for 6 weeks

in sBCC and for 12 weeks in the nodular form of BCC with the classical surgical excision showed a 5-year cure rate at the level of 82.5% for the group treated with imiquimod and 97.7% for the group where the lesion was excised.<sup>17</sup> Imiquimod is generally well-tolerated by patients, and the most common side effects observed during therapy are erythema, scabs, erosions, or dermatitis. The conducted research comparing the topical therapy with imiquimod and MAL-PDT showed a slightly higher effectiveness of the imiquimod treatment in the period of 3 months and 12 months – 83.4% of patients fully responding to the treatment in relation to 72.8% in the case of MAL-PDT.<sup>18</sup>

Another topical treatment of BCC, approved by FDA, is the 5-FU therapy. 5-fluorouracil is a locally used pyrimidine analog in the form of a cream which acts as an antimetabolite disturbing the local DNA synthesis. Pilot studies on the efficiency of this monotherapy demonstrated 90% of responses to the treatment with 5% cream with 5-FU on the phosphatidylcholine substrate. Among patients treated with 5-FU on the petrolatum substrate, a positive response was received in 57% of the lesions.<sup>19</sup> Other studies examined the effectiveness of MAL-PDT compared to the 5-FU therapy. These examinations showed that the percentage of patients fully responding to the treatment in the period of 3 months and 12 months was 72.8% for MAL-PDT and 80.1% for the 5-FU therapy. Patients after local pharmacotherapy more often reported moderate or severe swellings, erosions, scab formation, and itchy skin compared to patients treated with MAL-PDT. On the other hand, during MAL-PDT, moderate or severe pain, burning sensation and redness of the skin were most commonly reported.<sup>18</sup>

Non-invasive BCC treatment methods include molecular therapy with the use of vismodegib. It works by interrupting the Hedgehog signaling pathway, which becomes excessively active in BCC. Vismodegib is an inhibitor of Smoothed transmembrane protein (SMO), involved in the activation of the Hedgehog pathway. By blocking this pathway, vismodegib inhibits the development of the tumor and slows down its growth. In 2012, it was approved by FDA for the treatment of BCC metastases, recurrence after the resection of the tumor, and for the treatment of patients excluded from surgery and radiotherapy. The Safety Events in Vismodegib study (STEVIE) is one of the largest examinations involving the use of vismodegib. It showed 66.7% of responses in patients with locally advanced BCC and 37.9% of responses in patients with a metastatic form of BCC. Patients took orally 150 mg of vismodegib in 28-day cycles. The median of response time was 22.7 months, with an average treatment time of 36.4 weeks. Side effects during the treatment were reported in 98% of patients. The most common side effects are the following: muscle spasms (64%), baldness (62%), taste disorders (54%), weight loss (33%), fatigue (28%), decreased appetite (25%), and diarrhea (18%).<sup>20</sup>

Furthermore, there are reports on the possibility of combining PDT with vismodegib. The research conducted in this direction showed that the combined therapy

was well-tolerated by patients. The percentage of responses to the treatment was 90% (total) and 10% (partial) responses within 30 days since the end of the therapy. The combination of vismodegib and PDT is a potentially safe and effective therapy in the treatment of BCC. It increases the effectiveness of individual therapies, while maintaining a perfect cosmetic effect.<sup>21</sup>

Among the invasive methods of BCC treatment, cryotherapy (i.e., local freezing) deserves special attention. It involves the application of a freezing agent in the form of liquid nitrogen at a temperature of approx.  $-196^{\circ}\text{C}$  to the pathological lesion, thus causing local tissue necrosis. In order to destroy BCC tumor cells, it is necessary to achieve a temperature in the tissue at the level of  $-50^{\circ}\text{C}$  with 2 freezing and thawing cycles.<sup>22</sup> Cryotherapy, just like PDT, is applicable to the treatment of small and superficial forms of BCC. Conducted research concerning the comparison of cryotherapy and MAL-PDT in the treatment of sBCC has shown the response to treatment at a similar level. During a 5-year period, recurrence of the diseases at the level of 22% for MAL-PDT and 20% for cryotherapy was observed. However, the cosmetic effect obtained with the use of PDT significantly exceeded the results received after the use of cryotherapy, since healing after freezing very often leaves scars and discoloration on the skin.<sup>23</sup> August believes that this method should be avoided in the treatment of BCC on the scalp and in the nasolabial folds due to the large number of recurrences after the treatment.<sup>24</sup> Ceilley and Del Rosso also mentioned that cryotherapy can cause recurrence due to the survival of the tumor in the fibrous stroma of the scar.<sup>25</sup> Moreover, there was also an attempt to combine PDT with  $\text{CO}_2$  laser ablation and modified cryotherapy. This attempt demonstrated high efficiency and a good cosmetic effect in the treatment of BCC in the nodular form.<sup>26</sup>

## Conclusions

In the light of the above-mentioned factors, PDT is a highly useful, independent method of treating superficial forms of BCC. Furthermore, it provides a satisfactory effect in combination with other therapeutic options. Due to its advantage over other therapies in the form of highly selective action toward cancer cells and very good cosmetic results after the treatment, it has become an important alternative to other approaches, especially in esthetically sensitive areas, such as the head and neck. Studies on PDT with regard to sBCC show satisfactory treatment response rates. The surgery procedures are recommended for the treatment of BCC, but in special cases, PDT could be applied. Therefore, it can be considered as a reasonable therapeutic option, especially for patients who do not accept possible surgical complications or for patients excluded from the surgical treatment.



### ORCID iDs


Mateusz Trafalski  <https://orcid.org/0000-0002-7643-9664>  
 Klaudia Kazubowska  <https://orcid.org/0000-0003-3934-4305>  
 Kamil Jurczynszyn  <https://orcid.org/0000-0002-0667-7261>

### References

1. Nejc D, Piekarski J, Pasz-Walczak G, Jezierski A. Basal cell carcinoma of the skin – the young age of the patients causes diagnostic doubts [in Polish]. *Onkol Pol.* 2002;5(3–4):179–181.
2. Yaghoobi R, Ranjbari N, Pazyar N, Foroozan M, Feily A. Basal cell carcinoma of vermillion mucosa of upper lip: A rare case report. *Acta Med Indones.* 2017;49(3):255–258.
3. Loh T, Rubin AG, Brian Jiang SI. Management of mucosal basal cell carcinoma of the lip: An update and comprehensive review of the literature. *Dermatol Surg.* 2016;42(12):1313–1319.
4. Snow SN, Sahl W, Lo JS, et al. Metastatic basal cell carcinoma. Report of five cases. *Cancer.* 1994;73(2):328–335.
5. Pabiańczyk R, Cieślak K, Tuleja T. Management methods of basal cell carcinoma [in Polish]. *Chir Pol.* 2011;13(1):48–58.
6. Taub AF. A comparison of intense pulsed light, combination radio-frequency and intense pulsed light, and blue light in photodynamic therapy for acne vulgaris. *J Drugs Dermatol.* 2007;6(10):1010–1016.
7. Tao JN, Duan SM, Li J. Experimental studies on treatment of HSV infections with photodynamic therapy using 5-aminolevulinic acid [in Chinese]. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi.* 2007;21(1):79–82.
8. Chen HM, Yu CH, Tu PC, Yeh CY, Tsai T, Chiang CP. Successful treatment of oral verrucous hyperplasia and oral leukoplakia with topical 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy. *Lasers Surg Med.* 2005;37(2):114–122.
9. Aghahosseini F, Arbabi-Kalati F, Fashtami LA, Fateh M, Djavid GE. Treatment of oral lichen planus with photodynamic therapy mediated methylene blue: A case report. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2006;11(2):E126–E129.
10. Rhodes LE, de Rie M, Enström Y, et al. Photodynamic therapy using topical methyl aminolevulinate vs surgery for nodular basal cell carcinoma: Results of a multicenter randomized prospective trial. *Arch Dermatol.* 2004;140(1):17–23.
11. Leibovitch I, Huilgol SC, Selva D, Richards S, Paver R. Basal cell carcinoma treated with Mohs surgery in Australia II. Outcome at 5-year follow-up. *J Am Acad Dermatol.* 2005;53(3):452–457.
12. Mosterd K, Krekels GA, Nieman FH, et al. Surgical excision versus Mohs' micrographic surgery for primary and recurrent basal-cell carcinoma of the face: A prospective randomised controlled trial with 5-years' follow-up. *Lancet Oncol.* 2008;9(12):1149–1156.
13. Smeets NW, Kuijpers DJ, Nelemans P, et al. Mohs' micrographic surgery for treatment of basal cell carcinoma of the face – results of a retrospective study and review of the literature. *Br J Dermatol.* 2004;151(1):141–147.
14. Roozeboom MH, Aardoom MA, Nelemans PJ, et al. Fractionated 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy after partial debulking versus surgical excision for nodular basal cell carcinoma: A randomized controlled trial with at least 5-year follow-up. *J Am Acad Dermatol.* 2013;69(2):280–287.
15. Rhodes LE, de Rie MA, Leifsdottir R, et al. Five-year follow-up of a randomized, prospective trial of topical methyl aminolevulinate photodynamic therapy vs surgery for nodular basal cell carcinoma. *Arch Dermatol.* 2007;143(9):1131–1136.
16. Bath-Hextall FJ, Perkins W, Bong J, Williams HC. Interventions for basal cell carcinoma of the skin. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007;24(1):CD003412.
17. Williams HC, Bath-Hextall FJ, Ozolins M, et al. Surgery versus 5% imiquimod for nodular and superficial basal cell carcinoma: 5-year results of the SINS randomized controlled trial. *J Invest Dermatol.* 2017;137(3):614–619.
18. Arits AH, Mosterd K, Essers BA, et al. Photodynamic therapy versus topical imiquimod versus topical fluorouracil for treatment of superficial basal-cell carcinoma: A single blind, non-inferiority, randomized controlled trial. *Lancet Oncol.* 2013;14(7):647–654.
19. Romagosa R, Saap L, Givens M, et al. A pilot study to evaluate the treatment of basal cell carcinoma with 5-fluorouracil using phosphatidylcholine as a transepidermal carrier. *Dermatol Surg.* 2000;26(4):338–340.
20. Basset-Seguín N, Hauschild A, Grob JJ, et al. Vismodegib in patients with advanced basal cell carcinoma (STEVIE): A pre-planned interim analysis of an international, open label trial. *Lancet Oncol.* 2015;16(6):729–736.
21. Rizzo JM, Segal RJ, Zeitouni NC. Combination vismodegib and photodynamic therapy for multiple basal cell carcinomas. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2018;21:58–62.
22. Nakayama M, Tabuchi K, Nakamura Y, Hara A. Basal cell carcinoma of the head and neck. *J Skin Cancer.* 2011;2011:496910.
23. Basset-Seguín N, Ibbotson SH, Emtestam L, et al. Topical methyl aminolevulinate photodynamic therapy versus cryotherapy for superficial basal cell carcinoma: A 5 year randomized trial. *Eur J Dermatol.* 2008;18(5):547–553.
24. August PJ. Cryotherapy of nonmelanoma skin cancer. *Clin Dermatol.* 1995;13(6):589–592.
25. Ceilley RI, Del Rosso JQ. Current modalities and new advances in the treatment of basal cell carcinoma. *Int J Dermatol.* 2006;45(5):489–498.
26. Kim SA, Lee KS, Cho JW. Photodynamic therapy combined with cryotherapy for the treatment of nodular basal cell carcinoma. *Oncol Lett.* 2013;6(4):939–941.

Article

# Assessment of Effects of Laser Light Combining Three Wavelengths (450, 520 and 640 nm) on Temperature Increase and Depth of Tissue Lesions in an Ex Vivo Study

Kamil Jurczyszyn <sup>1,\*</sup>, Witold Trzeciakowski <sup>2</sup>, Zdzisław Woźniak <sup>3</sup>, Piotr Ziółkowski <sup>3</sup> and Mateusz Trafalski <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Dental Surgery, Wrocław Medical University, 50-425 Wrocław, Poland; mateusz.trafalski@umed.wroc.pl

<sup>2</sup> Institute of High Pressure Physics, Polish Academy of Sciences, 01-142 Warsaw, Poland; wt@unipress.waw.pl

<sup>3</sup> Department of Pathology, Wrocław Medical University, 50-368 Wrocław, Poland; zdzislaw.wozniak@umed.wroc.pl (Z.W.); piotr.ziolkowski@umed.wroc.pl (P.Z.)

\* Correspondence: kamil.jurczyszyn@umed.wroc.pl

Received: 25 October 2020; Accepted: 23 November 2020; Published: 25 November 2020



**Abstract:** Background: Lasers are widely used in medicine in soft and hard tissue surgeries and biostimulation. Studies found in literature typically compare the effects of single-wavelength lasers on tissues or cell cultures. In our study, we used a diode laser capable of emitting three components of visible light (640 nm, red; 520 nm, green; 450 nm, blue) and combining them in a single beam. The aim of the study was to assess the effects of laser radiation in the visible spectrum on tissue in vitro, depending on the wavelength and pulse width. Methods: All irradiations were performed using the same output power (1.5 W). We used various duty cycles: 10, 50, 80 and 100% with 100 Hz frequency. Maximum superficial temperature, rate of temperature increase and lesion depth were investigated. Results: Maximum superficial temperature was observed for 450 + 520 nm irradiation (100% duty cycle). The highest rate of increase of temperature was noted for 450 + 520 nm (100% duty cycle). Maximum lesion depth was observed in case of three-wavelength irradiation (450 + 520 + 640 nm) for 100, 80 and 50% duty cycles. Conclusions: The synergistic effect of two-wavelength (450 + 520 nm) irradiation was observed in case of maximum temperature measurement. The deepest depth of lesion was noted after three-wavelength irradiation (450 + 520 + 640 nm).

**Keywords:** diode laser; multi-wavelength laser; diode laser surgery; interaction light-tissue

## 1. Introduction

Lasers, including semiconductor lasers are widely used in medicine. They are mainly used in soft tissue surgery for cutting and cauterization [1,2]. They are also used in biostimulation and photodynamic therapy [3–5]. Their usefulness stems from their small size, low cost of operation and the use of flexible optical fibres, which have a positive impact on work comfort. Properties which characterise laser light include approximate monochromaticity, coherence and beam parallelism [6,7]. Laser beams can selectively affect chromophores found in tissues, as they absorb electromagnetic waves with predilection to their specific length [6]. In the visible range (400–700 nm), the absorption in the tissue is dominated by hemoglobin (with peaks in the blue and yellow region) and by melanin (decreasing monotonically towards longer wavelengths) [5,8]. The above properties are used to select the right laser device for given clinical needs. For the treatment of highly pigmented lesions and vascular lesions, light emitted by diode lasers (400–980 nm), pulsed dye lasers (580–595 nm), neodymium-doped

yttrium aluminum garnet lasers (Nd:YAG,  $\text{Nd:Y}_3\text{Al}_5\text{O}_{12}$ , 1064 nm) and frequency-doubled (using potassium titanyl phosphate, KTP) YAG lasers (532 nm) is most useful [9]. Carbon dioxide-based lasers ( $\text{CO}_2$ , 10,600 nm) are very well suited to cutting soft tissue with high water content. A wavelength of 2940 nm, characteristic for erbium-doped YAG lasers (Er:YAG), is in turn strongly absorbed by water and hydroxyapatite. Due to this, Er:YAG lasers are used for both soft tissue cutting and bone preparation [1,10]. Apart from wavelength, tissue response is affected by power, energy density and radiation dose. An increase in power and energy density leads to intensification of thermal and ablative processes [11,12].

Depending on the value of power expressed as a function of time, lasers can be divided into continuous wave (CW) lasers and pulsed wave lasers. Operating parameters of a laser device can be further modified via pulse width and frequency. CW lasers provide a constant light beam, and the supplied energy is constant within a unit of time. Pulsed operation, with a constant pulse width, supplies a dose of energy, which is followed by an interval with no emission. Impulses repeat regularly, and their length over time (pulse width) is lower than the length of the period. Equality between pulse width and the length of the period indicates a CW laser. Pulsed operation is described by two parameters: frequency and duty cycle, that is, the ratio of pulse width to period, expressed as a percentage (100% for continuous wave lasers) [9]. Most laser systems emit pulses with a width between 0.1 ms and 100 ms. Even shorter pulse widths, in the order of a few nanoseconds ( $1.0 \text{ ns} = 10^{-9} \text{ s}$ ), are characteristic for a mode of operation called Q-switch [13,14]. This mode is used mainly in removal of pigmented lesions, which include freckles, café au lait spots, lentiginos and tattoos [15].

Studies found in literature typically compare the effects of single-wavelength lasers on tissues or cell cultures. In our study, we used a diode laser capable of emitting three components of visible light (RGB: 640 nm, red; 520 nm, green; 450 nm, blue) and combining them in a single beam. The aim of the study was to assess the effects of laser radiation in the visible spectrum on tissue *in vitro*, depending on wavelength and pulse width. This assessment concerned not only the individual RGB components, but also their combination during exposure. The effects on tissue were studied from physical (assessment of temperature using a thermal imaging camera) and histopathological points of view, the latter of which involved an assessment of the depth of lesions caused by irradiation. We found unexpected synergies while combining two different wavelengths simultaneously.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Laser Irradiation

Irradiation was performed using a three-wavelength laser source (450 nm, 520 nm and 640 nm). This laser was developed specifically for this project at the Institute of High Pressure Physics, Warsaw, Poland (patent number: 9,223,123, B2; date of patent: 29 December 2015). Diode lasers are coupled to a multi-mode fibre (with a 200–400  $\mu\text{m}$  core) using a reflector in the form of a regular pyramid [16]. Optimization of the optical setup makes it possible to couple 70%–90% of light into the fibre. Our laser device allows continuous wave (CW) and pulsed operation (from 1 ms upwards). All single-wavelength irradiations were performed using the same output power (1.5 W). If two wavelengths were used simultaneously, 0.75 W was set for each wavelength. In case of three wavelengths applied together, 0.5 W was set for each. For pulsed operation, a pulse width of 1 ms (10% duty cycle), 5 ms (50% duty cycle) and 8 ms (80% duty cycle) was set, with a 10 ms period (frequency 100 Hz). The 100% duty cycle corresponded to continuous wave operation. Our pulses were much longer than those of Q-switched or mode-locked lasers so we expected mainly thermal effects on the tissue. Laser spot diameter was set to 4 mm. The time of irradiation was 7 s for 100% duty cycle, 9 s for 80% duty cycle, 14 s for 50% duty cycle and 70 s for 10% duty cycle. The total dose for each irradiation was approximately 10.5 J.

## 2.2. Tissue

Irradiation was performed on the dorsal surface mucosa of a fresh (not frozen) cow's tongue. Each irradiated area was cut off and placed in a 10% buffered formaldehyde solution. Samples were routinely processed as paraffin-embedded blocks, cut into 5  $\mu\text{m}$  slices and stained with haematoxylin and eosin (HE). Each microscopic examination was performed by two independent pathologists. The following microscopic changes were examined: necrosis, occlusion of blood vessels and congestion, inflammatory reactions and obfuscation of tissue structure. Pathologists marked the border between affected tissue and normal tissue (on the digital microscopic image of the tissue). The length of the line between the border of lesions and perpendicular to the surface of the sample was a depth lesion.

## 2.3. Temperature Measurement

All irradiation procedures were recorded using a Compact Seek Thermal FLIR (forward looking infra red) Camera (Seek Thermal Inc., Santa Barbara, CA, USA). Recorded video clips were analysed using Avidemux 2.7.5 ([www.avidemux.org](http://www.avidemux.org), GNU GPL licence). Temperature was measured every 1 s. The standard deviation of maximum temperature was taken from the last three measurements. The temperature of tissue before irradiation was 27 °C. The rate of temperature increase (dT/dt) was determined as the total temperature increase divided by the total illumination time (7–70 s). However, since the increase was non-linear (faster at the beginning and slow towards the end), we also included the T(t) curves for each of the illumination parameters in Appendix A (Figure A1).

The whole experiment was repeated two times under the same conditions.

## 2.4. Statistical Analysis

Statistica version 13.3 (StatSoft, Cracow, Poland) was used to perform all statistical analyses. A statistical significance level of 0.05 was assumed. The Shapiro–Wilk test was used to check the normality of distribution. Analysis of variance (ANOVA) was applied to check temperature increase and maximum temperature differences between groups. The least significant difference post hoc test was used to check the differences in temperature between individual groups. The correlation matrix was used to estimate the correlation between lesion depth and maximum temperature and the rate of temperature increase (dT/dt).

## 3. Results

The ambient surface temperature of tissue was 27 °C. Maximum surface temperatures after irradiation are shown in Table 1 and Figure 1. In the 10% duty cycle group, maximum temperature was observed during 450 + 520 nm (BG) irradiation; it reached 37 °C, which was significantly higher compared with other wavelengths ( $p < 0.05$ , Table 2). In the 50% duty cycle group, maximum temperature reached 71 °C; and in the 80% duty cycle, maximum temperature reached 89 °C, while for the 100% duty cycle, maximum temperature reached 100 °C.

**Table 1.** Mean of increase of temperature in time (dT/dt), maximum temperature (Max temp) and lesion depth. SD, standard deviation; blue (B), 450 nm; green (G), 520 nm; red (R), 640 nm; RGB, 450 + 520 + 640 nm; BG, 450 + 520 nm; BR, 450 + 640 nm; GR, 520 + 640 nm; bold font, highest value in the duty cycle group.

Wavelength/ Duty Cycle (%)	dT/dt (°C/s)	SD	Max Temp (°C)	SD	Lesion Depth (mm)	SD
B10%	0.11	0.53	35.00	0.58	0.00	0.00
G10%	0.06	0.24	31.00	0.00	0.00	0.00
R10%	0.03	0.24	29.00	0.00	0.00	0.00
RGB10%	0.09	0.28	33.00	0.00	0.00	0.00
BG10%	<b>0.14</b>	0.39	<b>37.00</b>	0.00	0.00	0.00

Table 1. Cont.

Wavelength/ Duty Cycle (%)	dT/dt (°C/s)	SD	Max Temp (°C)	SD	Lesion Depth (mm)	SD
BR10%	0.10	0.39	34.00	0.00	0.00	0.00
GR10%	0.03	0.17	29.00	0.00	0.00	0.00
B50%	2.64	2.85	64.00	1.00	0.27	0.05
G50%	1.93	2.08	54.00	0.58	0.49	0.02
R50%	0.64	0.69	36.00	0.58	0.33	0.06
RGB50%	2.00	2.15	55.00	0.58	1.44	0.02
BG50%	<b>3.14</b>	3.38	<b>71.00</b>	1.00	0.38	0.03
BR50%	2.36	2.54	60.00	1.00	0.43	0.02
GR50%	1.71	1.85	51.00	0.58	0.36	0.05
B80%	5.67	4.24	78.00	2.52	1.04	0.06
G80%	3.78	2.82	61.00	3.00	0.41	0.05
R80%	1.33	0.76	39.00	1.00	0.26	0.12
RGB80%	4.56	3.44	68.00	2.52	1.36	0.06
BG80%	<b>6.89</b>	6.69	<b>89.00</b>	2.08	0.63	0.10
BR80%	5.44	4.82	76.00	1.73	0.64	0.06
GR80%	5.11	3.06	73.00	5.51	0.56	0.07
B100%	9.00	6.66	90.00	4.04	1.00	0.24
G100%	4.86	2.66	61.00	3.51	1.04	0.07
R100%	1.57	0.41	38.00	2.00	0.42	0.02
RGB100%	7.43	6.41	79.00	6.00	1.43	0.05
BG100%	<b>10.43</b>	6.18	<b>100.00</b>	8.74	1.26	0.04
BR100%	8.43	4.62	86.00	5.51	0.75	0.04
GR100%	6.57	2.42	73.00	6.03	0.57	0.08

In every duty cycle group, the highest temperature was recorded during irradiation using 450 + 520 nm wavelengths. Conversely, the lowest temperature was recorded for the 640 nm wavelength; it did not exceed 39 °C in any duty cycle group. Regardless of duty cycle, the temperature reached during irradiation using the 640 nm wavelength showed statistical differences compared to other wavelengths. It is worth noting that for the 10% duty cycle group, irradiation using 520 + 640 nm wavelengths (GR) yielded a temperature of 29 °C, similar to red light. In other duty cycle groups, irradiation using 520 + 640 nm wavelengths resulted in statistical differences compared to the 640 nm wavelength.

Combining three wavelengths during irradiation (450 + 520 + 640 nm, RGB) in the 50% and 80% duty cycle groups yielded a temperature reading statistically similar to irradiation using green light alone (520 nm). In continuous wave operation (100% duty cycle), temperature reading was statistically similar to subgroups irradiated using 520 + 640 nm wavelengths (GR) and 450 + 640 nm wavelengths (BR).

For the 50% and 80% duty cycle groups, obtained temperatures were similar between the 450 nm wavelength and 450 + 640 nm wavelengths.

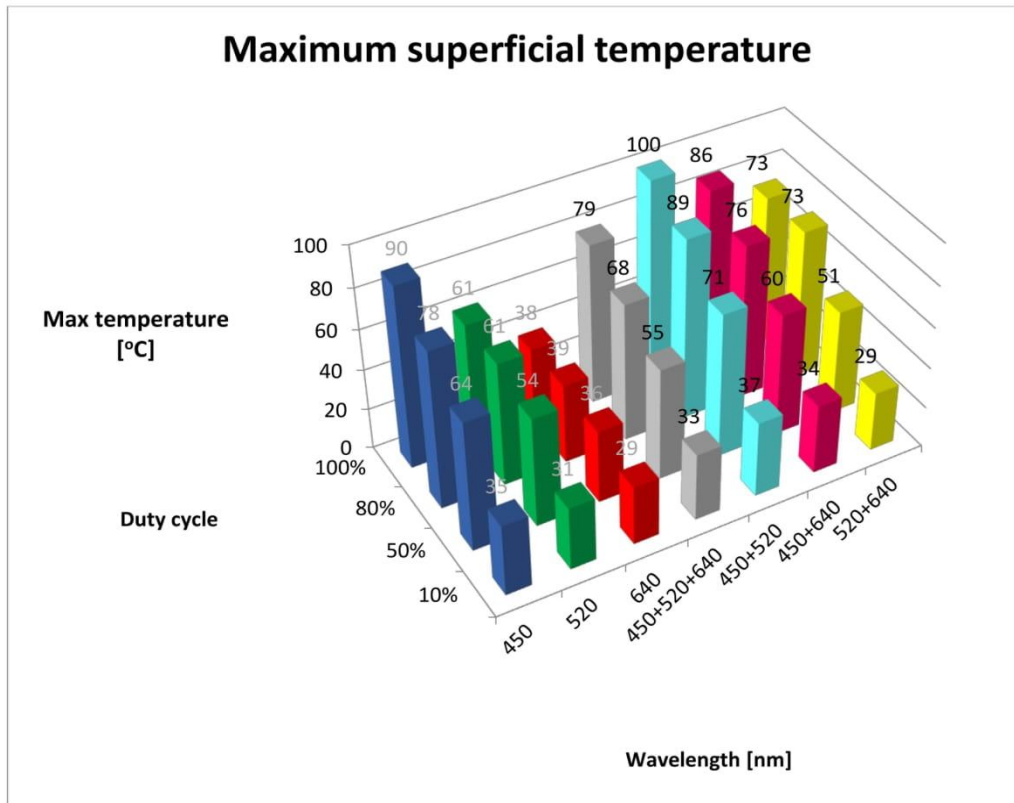
In the 100% duty cycle group, the highest temperatures, statistically comparable, were recorded for the 450 nm wavelength (B, 90 °C), 450 + 520 nm wavelengths (BG, 100 °C) and 450 + 640 nm wavelengths (BR, 86 °C).

For continuous wavelength operation (100% duty cycle), the highest recorded temperature was 100 °C for 450 + 520 nm wavelengths (BG) and 90 °C for the 450 nm wavelength (B). No statistical differences were observed between individual groups; however, such differences did occur with respect

to remaining wavelengths. The lowest temperature of 39 °C was recorded during irradiation using the 640 nm wavelength (R).

**Table 2.** Results of post hoc statistical analysis (least significant differences) for maximum temperature. Bold font, statistically significant,  $p < 0.05$ ; B, 450 nm; G, 520 nm; R, 640 nm; RGB, 450 + 520 + 640 nm; BG, 450 + 520 nm; BR, 450 + 640 nm; GR, 520 + 640 nm).

Maximum Temperature							
Wavelength/ duty cycle	B10%	G10%	R10%	W10%	BG10%	BR10%	GR10%
B10%		<b>0.000000</b>	<b>0.000000</b>	<b>0.000000</b>	<b>0.000000</b>	<b>0.002189</b>	<b>0.000000</b>
G10%	<b>0.000000</b>		<b>0.000000</b>	<b>0.000000</b>	<b>0.000000</b>	<b>0.000000</b>	<b>0.000000</b>
R10%	<b>0.000000</b>	<b>0.000000</b>		<b>0.000000</b>	<b>0.000000</b>	<b>0.000000</b>	<b>1.000000</b>
RGB10%	<b>0.000000</b>	<b>0.000000</b>	<b>0.000000</b>		<b>0.000000</b>	<b>0.000064</b>	<b>0.000000</b>
BG10%	<b>0.000000</b>	<b>0.000000</b>	<b>0.000000</b>	<b>0.000000</b>		<b>0.000000</b>	<b>0.000000</b>
BR10%	<b>0.002189</b>	<b>0.000000</b>	<b>0.000000</b>	<b>0.000064</b>	<b>0.000000</b>		<b>0.000000</b>
GR10%	<b>0.000000</b>	<b>0.000000</b>	<b>1.000000</b>	<b>0.000000</b>	<b>0.000000</b>	<b>0.000000</b>	
Maximum Temperature							
Wavelength/ duty cycle	B50%	G50%	R50%	W50%	BG50%	BR50%	GR50%
B50%		<b>0.000000</b>	<b>0.000000</b>	<b>0.000000</b>	<b>0.000000</b>	<b>0.000022</b>	<b>0.000000</b>
G50%	<b>0.000000</b>		<b>0.000000</b>	0.141872	<b>0.000000</b>	<b>0.000001</b>	<b>0.000137</b>
R50%	<b>0.000000</b>	<b>0.000000</b>		<b>0.000000</b>	<b>0.000000</b>	<b>0.000000</b>	<b>0.000000</b>
RGB50%	<b>0.000000</b>	0.141872	<b>0.000000</b>		<b>0.000000</b>	<b>0.000009</b>	<b>0.000009</b>
BG50%	<b>0.000000</b>	<b>0.000000</b>	<b>0.000000</b>	<b>0.000000</b>		<b>0.000000</b>	<b>0.000000</b>
BR50%	<b>0.000022</b>	<b>0.000001</b>	<b>0.000000</b>	<b>0.000009</b>	<b>0.000000</b>		<b>0.000000</b>
GR50%	<b>0.000000</b>	<b>0.000137</b>	<b>0.000000</b>	<b>0.000009</b>	<b>0.000000</b>	<b>0.000000</b>	
Wavelength/ Duty cycle	B80%	G80%	R80%	W80%	BG80%	BR80%	GR80%
B80%		<b>0.000034</b>	<b>0.000000</b>	<b>0.000941</b>	<b>0.000192</b>	0.586834	0.418096
G80%	<b>0.000034</b>		<b>0.000000</b>	0.092173	<b>0.000000</b>	<b>0.000090</b>	<b>0.000149</b>
R80%	<b>0.000000</b>	<b>0.000000</b>		<b>0.000000</b>	<b>0.000000</b>	<b>0.000000</b>	<b>0.000000</b>
RGB80%	<b>0.000941</b>	0.092173	<b>0.000000</b>		<b>0.000000</b>	<b>0.002811</b>	<b>0.004885</b>
BG80%	<b>0.000192</b>	<b>0.000000</b>	<b>0.000000</b>	<b>0.000000</b>		<b>0.000070</b>	<b>0.000043</b>
BR80%	0.586834	<b>0.000090</b>	<b>0.000000</b>	<b>0.002811</b>	<b>0.000070</b>		0.784989
GR80%	0.418096	<b>0.000149</b>	<b>0.000000</b>	<b>0.004885</b>	<b>0.000043</b>	0.784989	
Wavelength/ duty cycle	B100%	G100%	R100%	W100%	BG100%	BR100%	GR100%
B100%		<b>0.000017</b>	<b>0.000000</b>	<b>0.010143</b>	0.180197	0.227531	<b>0.000837</b>
G100%	<b>0.000017</b>		<b>0.000269</b>	<b>0.004185</b>	<b>0.000002</b>	<b>0.000155</b>	<b>0.049241</b>
R100%	<b>0.000000</b>	<b>0.000269</b>		<b>0.000001</b>	<b>0.000000</b>	<b>0.000000</b>	<b>0.000006</b>
RGB100%	<b>0.010143</b>	<b>0.004185</b>	<b>0.000001</b>		<b>0.000628</b>	0.109788	0.227531
BG100%	0.180197	<b>0.000002</b>	<b>0.000000</b>	<b>0.000628</b>		<b>0.018204</b>	<b>0.000061</b>
BR100%	0.227531	<b>0.000155</b>	<b>0.000000</b>	0.109788	<b>0.018204</b>		<b>0.010143</b>
GR100%	<b>0.000837</b>	<b>0.049241</b>	<b>0.000006</b>	0.227531	<b>0.000061</b>	<b>0.010143</b>	

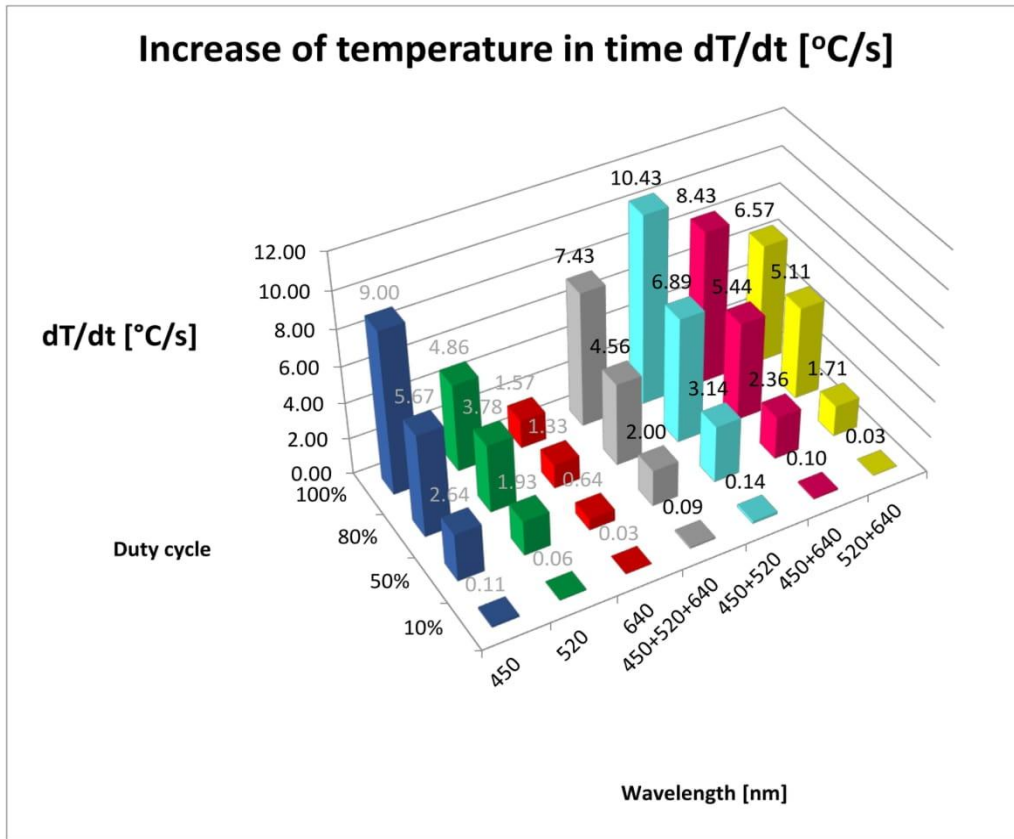


**Figure 1.** Maximum superficial temperature. B, 450 nm; G, 520 nm; R, 640 nm; RGB, 450 + 520 + 640 nm; BG, 450 + 520 nm; BR, 450 + 640 nm; GR, 520 + 640 nm).

Maximum temperatures for all studied groups are shown in Table 1 and Figure 1. A post hoc statistical analysis between the groups is shown in Table 2.

The  $dT/dt$  values for all studied groups are shown in Table 1 and Figure 2. Table 3 shows the results of post hoc analysis between the groups. The highest value of temperature increase over time ( $dT/dt$ ) for the all duty cycle groups was recorded for 450 + 520 nm wavelengths (BG). In the 100% duty cycle group, the highest increase of temperature was 10.43 °C/s for 450 + 520 nm wavelengths. The lowest increase of temperature was seen during 640 nm irradiation in all of the duty cycle groups (0.03–1.57 °C/s).

A breakdown of lesion depths is given in Table 1 and Figure 3. The results of post hoc analysis between the groups are presented in Table A1. In the 10% duty cycle group, no tissue lesions were observed under microscopic examination, regardless of the wavelength. It was interesting that the deepest penetration of tissue lesions was observed for 450 + 520 + 640 nm wavelengths (RGB) at duty cycles of 50%, 80% and 100%. It was important that the values did not differ statistically between the 50%, 80% and 100% duty cycle groups. A similar, albeit less intense, effect (limited to only two duty cycle groups, 80% and 100%) was observed for the 450 nm (B) range. For the 520 nm (G) range and 450 + 520 nm (BG) range, the greatest depth of lesions was observed only in the 100% duty cycle group with statistical differences in relation to the other duty cycle group. The least intense lesions in tissue were observed in the 630 nm (R) range. Macroscopically, charring of the surface of the mucous membrane and, microscopically, presence of erosions were observed only in the group exposed to the 450 nm (B) and 450 + 520 nm (BG) lasers with the duty cycle coefficient of 100%.



**Figure 2.** Increase of temperature in time ( $dT/dt$  ( $^{\circ}C/s$ )). B, 450 nm; G, 520 nm; R, 640 nm; RGB, 450 + 520 + 640 nm; BG, 450 + 520 nm; BR, 450 + 640 nm; GR-520 + 640 nm.

**Table 3.** Results of post hoc statistical analysis (least significant differences) for increase of temperature. Bold font, statistically significant,  $p < 0.05$ ; B, 450 nm; G, 520 nm; R, 640 nm; RGB, 450 + 520 + 640 nm; BG, 450 + 520 nm; BR, 450 + 640 nm; GR, 520 + 640 nm.

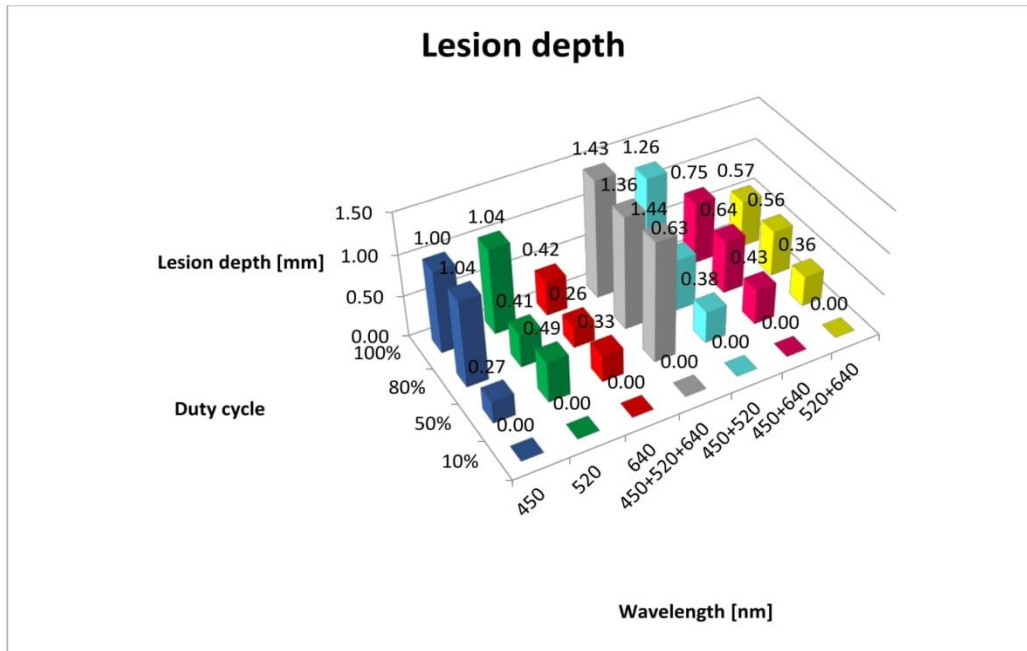
Wavelength/ duty cycle (%)	dT/dt						
	B10%	G10%	R10%	RGB10%	BG10%	BR10%	GR10%
B10%		0.307940	0.126436	0.610064	0.610064	0.798710	0.123345
G10%	0.307940		0.610064	0.610064	0.126436	0.444364	0.603765
R10%	0.126436	0.610064		0.307940	<b>0.041767</b>	0.202643	0.994248
RGB10%	0.610064	0.610064	0.307940		0.307940	0.798710	0.302842
BG10%	0.610064	0.126436	<b>0.041767</b>	0.307940		0.444364	<b>0.040348</b>
BR10%	0.798710	0.444364	0.202643	0.798710	0.444364		0.198530
GR10%	0.123345	0.603765	0.994248	0.302842	<b>0.040348</b>	0.198530	



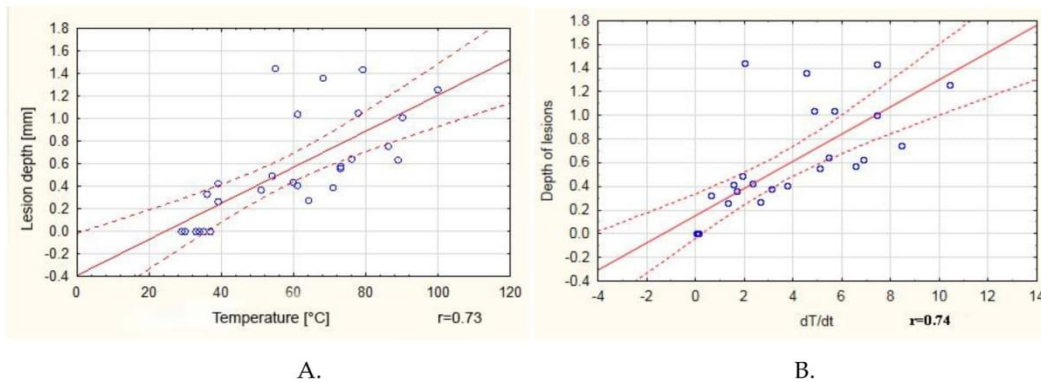
Table 3. Cont.

Wavelength/ duty cycle (%)	dT/dt						
	B50%	G50%	R50%	RGB50%	BG50%	BR50%	GR50%
B50%		0.372804	<b>0.013920</b>	0.422296	0.532259	0.720979	0.247329
G50%	0.372804		0.110389	0.928830	0.131326	0.592311	0.788773
R50%	<b>0.013920</b>	0.110389		0.092220	<b>0.002316</b>	<b>0.034243</b>	0.182460
RGB50%	0.422296	0.928830	0.092220		0.155274	0.655344	0.720979
BG50%	0.532259	0.131326	<b>0.002316</b>	0.155274		0.327132	0.076570
BR50%	0.720979	0.592311	<b>0.034243</b>	0.655344	0.327132		0.422296
GR50%	0.247329	0.788773	0.182460	0.720979	0.076570	0.422296	
Wavelength/ duty cycle (%)	B80%	G80%	R80%	RGB80%	BG80%	BR80%	GR80%
B80%		0.347996	<b>0.034168</b>	0.579935	0.542755	0.911741	0.781760
G80%	0.347996		0.225781	0.698232	0.124672	0.407219	0.506835
R80%	<b>0.034168</b>	0.225781		0.112041	<b>0.007317</b>	<b>0.044070</b>	0.063549
RGB80%	0.579935	0.698232	0.112041		0.247309	0.657763	0.781760
BG80%	0.542755	0.124672	<b>0.007317</b>	0.247309		0.472238	0.376871
BR80%	0.911741	0.407219	<b>0.044070</b>	0.657763	0.472238		0.867958
GR80%	0.781760	0.506835	0.063549	0.781760	0.376871	0.867958	
Wavelength/ duty cycle (%)	B100%	G100%	R100%	RGB100%	BG100%	BR100%	GR100%
B100%		0.161044	<b>0.014214</b>	0.591242	0.625293	0.844939	0.407680
G100%	0.161044		0.264239	0.380892	0.061831	0.225558	0.558100
R100%	<b>0.014214</b>	0.264239		0.050103	<b>0.003950</b>	<b>0.022914</b>	0.092439
RGB100%	0.591242	0.380892	0.050103		0.307440	0.732273	0.769303
BG100%	0.625293	0.061831	<b>0.003950</b>	0.307440		0.494752	0.191235
BR100%	0.844939	0.225558	<b>0.022914</b>	0.732273	0.494752		0.525921
GR100%	0.407680	0.558100	0.092439	0.769303	0.191235	0.525921	

A positive correlation ( $r = 0.73$ ) between the maximum obtained temperature and the depth of lesions in tissue was observed (Figure 4A). It is worth noting that, above 60 °C, the correlation coefficient was only 0.37. A positive correlation was also observed between the dT/dt value and the depth of the lesions, although in this case the correlation coefficient was 0.74 (Figure 4B).



**Figure 3.** Lesion depth (mm). B, 450 nm; G, 520 nm; R, 640 nm; RGB, 450 + 520 + 640 nm; BG, 450 + 520 nm; BR, 450 + 640 nm; GR, 520 + 640 nm.



**Figure 4.** (A) Correlation between the maximum obtained temperature and the depth of lesions in tissue. (B) Correlation between lesion depth temperature and the rate of temperature increase.

#### 4. Discussion

Despite the dynamic development of laser devices, we have not encountered in the literature research on lasers enabling simultaneous emission of three components (RGB) of visible light (red, 640 nm; green, 520 nm; blue, 450 nm) in one beam. Most of the research available in the literature compares the impact of lasers with different wavelengths on live tissue, tissue cultures or tissue preparations. However, even irradiation with different wavelengths is not conducted simultaneously, but subsequently [17–20]. Every type of laser may cause thermal damage to tissue. It can be divided into selective or non-selective. In the first case, the activity of lasers is based on the selective photothermolysis principle (ST), in which the conversion of laser energy into heat is limited to proper chromophores [21,22]. Selective destruction of target structure, with minimum thermal damage to the adjacent tissues, can be achieved through the selection of adequate wavelength (with the right

absorption spectrum for a given tissue), pulse length (equal to or shorter than the time of thermal relaxation of the tissue) and energy density (enabling an effective increase of the temperature in the target tissue). The ability of tissues to dissipate heat, sometimes referred to as thermal relaxation time (TRT), is the time in which the tissue temperature is reduced to the half of beginning value [23]. The value depends on the type and volume of the tissue. If the duration of the pulse is shorter or equal to the thermal relaxation time, heat is not accumulated, which protects the adjacent structures from thermal damage. This type of action is useful when removing pigmentary lesions, vascular malformations or tattoos [24]. When selective removal of tissue is not necessary, a significant increase in temperature occurs with an increase in energy power and density and pulse width, which results in non-selective damage to tissues. Thermal effects may take the form of reversible hyperthermia when the temperature of tissues does not exceed 42 °C. Denaturation of proteins and nucleic acids occurs within the temperature range from 42 °C to 60 °C, and coagulation occurs within the range from 60 °C to 100 °C. Evaporation of water and tissue is observed above 100 °C; however, when the temperature exceeds 200 °C, tissues are charred [2]. The above phenomena are used mainly in soft tissue surgery as we can simultaneously achieve the effect of cutting, coagulation and homeostasis with the use of high-energy lasers [25]. It shortens the procedure time, improves the insight into the operating field and frequently removes the need for stitches. Most of the diode lasers available in the market enable work within a power range of up to 10 W together with regulation of pulse duration and intervals between them, the so-called Ton/Toff (Time on/Time off) [26]. Studies conducted by Matys et al. showed the impact of the operation mode of a 980 nm diode laser (SmartM, Lasotronix, Poland) on the increase in the temperature measured with the use of a TM-902-C thermometer, on a K-type probe, TP-02 (Zhangzhou Weihua Electronic Co., Fujian, China) [27]. The authors of the study observed that, regardless of the mode of operation, a significant increase in temperature occurred together with an increase in the laser power. During the pulsed mode (PM) operation, they did not observe significant differences in the increase in temperature between various pulse length settings for all ranges of the tested beam power. However, the duty cycle in all PM groups was 50% as the interval between them was proportionately extended together with the lengthening of the pulse. The aforementioned authors observed that the emission of 180 J of energy in the pulsed mode for 60 s caused an increase in temperature that was 26 °C higher compared with that of the CW mode. It may suggest that, in order to achieve a similar thermal effect, the total dose of PM energy should be decreased by approximately 30% compared to the CW dose. Our observations obtained on the basis of our own studies were contrary to this conclusion as in all groups the increase in temperature occurred together with an increase in the duty cycle value. It should be taken into account, however, that the study conducted by Matys et al. was based only on temperature measurements with the use of the K-type probe (TP-02) subjected to direct exposure to laser beam irradiation, and the measurements of the surface temperature of tissue preparations in our research were conducted with the use of a thermal imaging camera.

Another study conducted by Fornaini et al. compared the increase in tissue temperature during the collection of specimens (*ex vivo*) with the use of four diode lasers with various wavelengths: 808 nm (Eufoton, Italy), 980 nm (Quanta System, Italy), 1470 nm (Quanta System, Italy) and 1950 nm (Quanta System, Italy) [28]. Power settings were 2 W and 4 W in the CW mode for all groups, with a fibre diameter of 320 µm, providing power densities of 2488 W/cm<sup>2</sup> and 4976 W/cm<sup>2</sup>. The increase in temperature was measured with the use of two thermocouples, the first at the depth of 0.5 mm and the second at 2 mm from the incision line. The initial and final surface temperatures were recorded with the use of an IR thermometer. The greatest increase in temperature measured on the surface was observed for the 980 nm beam and 4 W ( $\Delta T$  16.3 °C), while the lowest was observed for the 1950 nm beam and 2W ( $\Delta T$  9.2 °C), which was also observed during temperature measurements in deeper tissue layers (980 nm and 4W,  $\Delta T$  40.7 °C; 1950 nm and 2W,  $\Delta T$  34.9 °C). It stems from the fact that, together with an increase in wavelength in the range from near to far infrared, the absorption of light by haemoglobin and melanin decreases (the last and the lowest of the three absorption peaks occurs at

the wavelength of 920–940 nm) and the value of absorption for water increases (beginning from 700 nm, reaching the highest peak at 2500–3000 nm [29]). The authors also observed that the fastest cutting of tissue was achieved when using the 1950 beam and 4 W, and the slowest cutting was achieved when using the 880 nm beam and 2 W. It may be explained by the high value of absorption of light of 1950 nm wavelength in water. Our studies confirmed the fact that the highest tissue temperature was observed when using a beam created after combining blue and green light (BG group at all duty cycle values: 10%, 35 °C; 50%, 71 °C; 80%, 89 °C; 100%, 100 °C) as the highest absorption peaks for haemoglobin (420 nm and 520–577 nm) occurred for this wavelength. The greatest increase in temperature ( $dT/dt$ ) was observed in the CW mode for wavelength BG (10.43 °C/s).

We analysed the range of the changes that occurred in tissues and observed that the greatest depth of damage was observed during exposure to beam RGB, formed after the combining of colours R+G+B for all duty cycles except for the 10% duty cycle, and amounted to 1.43 mm (standard deviation (SD) = 0.05). In addition, no statistically significant differences in terms of their depth were observed for 50%, 80% and 100% cycle duties. The most-shallow lesions were visible for the red light (640 nm) in all duty cycle groups and ranged from 0 to 0.42 mm. Many studies presenting the scope of tissue damage as a result of the application of various laser devices can be found in the literature. *Ex vivo* studies, conducted by Romeo et al. with the use of lasers Er:YAG, Nd:YAG and Er-Cr:YSGG (erbium, chromium: yttrium-scandium-gallium-garnet) as well as two diode lasers (808 nm and 980 nm), showed that the 808 nm diode laser (2 W, 100 ms, duty cycle 50%, 248 J/cm<sup>2</sup>) and Er-Cr:YSGG (2780 nm, 3 W, 20 Hz, 53 J/cm<sup>2</sup>) were characterised by the smallest range of tissue damage during biopsy, which did not exceed 1 mm [30]. Moreover, comparing the 808 nm diode laser in the CW mode (2 W in power, 2400 J/cm<sup>2</sup>) and in the PM mode (2 W in power, 100 ms, duty cycle 50%, 248 J/cm<sup>2</sup>), they observed that much deeper damage occurred in the CW mode than in the PM mode (3 mm and 1 mm, respectively).

*Ex vivo* studies conducted by Azevedo et al. also indicated a different range of tissue damage depth depending on the applied laser device [31]. The instruments among the studied lasers—CO<sub>2</sub>, 10.6 μm, 3.5 W, 50 Hz; CO<sub>2</sub>, 10.6 μm, 7 W, 50 Hz; CO<sub>2</sub>, 10.6 μm, 7 W, CW; Nd:YAG, 1.06 μm, 6 W, 40 Hz; Er:YAG, 2940 nm, 2 W, 10 Hz; laser diode, 980 nm, 3.5 W, PM—causing the deepest damage within the margin of the collected tissue were the Nd:YAG laser and the 908 nm diode laser, and the mean depth was 670.68 μm and 626.82 μm, respectively. The most-steady cuts were observed when using the CO<sub>2</sub> (3.5 W, PM) laser. It stems from the fact that the light of the 980 nm diode laser and Nd:YAG is to a lesser extent absorbed by water and to a greater extent absorbed by melanin and haemoglobin. As a result, they penetrate tissues better than the light of lasers with a larger wavelength, such as the CO<sub>2</sub> laser, the activity of which is rather superficial [32].

Studies on the 445 nm diode laser (2.5 W, CW, 3100 J/cm<sup>2</sup>; Eltech K-Laser srl, Treviso, Italy), used during the biopsy of soft tissues within the oral cavity, showed the mean scope of thermal damage to the epithelium reaching a depth of 650.43 μm (± 311.96 μm) and damage to the subepithelial connective tissue reaching a depth of 468.23 μm (± 264.23 μm) [33]. In all samples, but one, the total thickness of thermal damage did not exceed 1 mm. Lesions of vascular aetiology, such as granuloma pyogenicum, showed much greater depth of thermal damage, which can be explained by the high absorption of light of 445 nm in wavelength for haemoglobin, occurring in large numbers in this type of lesions. Lesions diagnosed as papillomavirus showed less thermal damage due to the small share of vessels in their structure. The authors did not observe any negative impact of the laser activity on histopathological evaluation of the examined tissue. In our study, we observed a similar range of tissue penetration by a laser of 450 nm in wavelength, namely 1 mm for the 100% duty cycle. Interestingly, there were no statistically significant differences between the depth of the damage for the 80% and 100% duty cycle. The above studies suggest that most laser devices can be used for the collection of soft tissue specimens. The condition is to take into account the depths of lesions in tissues as a result of the activity of laser radiation, extending the margins of surgical excisions accordingly. A reduction of thermal damage is of key importance for histopathological evaluation. The presence of pathological tissue in the marginal area with thermal damage makes it impossible to determine the radicality of

the lesion excision and creates the risk of miscalculation of its extent, which is of key importance for further treatment. Therefore, in order to obtain a proper specimen collected with the use of a laser device, proper margin should be maintained. The margin must be greater than the depth of thermal damage characteristic for a given wavelength and laser beam parameters.

According to our research, the optimum beam for the collection of soft tissue specimens is the 450 nm beam (B). The temperature reached at 100% duty cycle (90°C) and  $dT/dt$  at the level of 9.0 °C/s are sufficient to obtain the necessary tissue cutting and coagulation effect. In addition, the depth of the thermal changes does not exceed 1 mm, thanks to which it is possible to maintain a small surgical margin during biopsy. The RGB beam (640 + 520 + 450 nm) was characterised by the greatest penetration depth (1.43 mm) among all studied groups. In addition, it caused an increase in tissue temperature (100% duty cycles, 79 °C;  $dT/dt$ , 7.43 °C) to the level enabling effective coagulation thereof. It can be applied in the treatment of shallow vascular lesions on mucous membranes, for which other laser systems are also used [34,35]. The diode lasers used most frequently in these cases are the lasers ranging from 800 nm to 980 nm as such wavelength is within one of the three absorption peaks for haemoglobin [29,36]. In addition, systems of this type rarely offer wavelengths within the range of 410–577 nm, encompassing the highest absorption peak for the protein. For this reason, the use of the RGB beam becomes promising as the components of its spectrum are within the optimum haemoglobin absorption range. Moreover, the depth of penetration was the greatest among all groups included in our study.

## 5. Conclusions

The synergistic effect of two-wavelength (450 + 520 nm) irradiation was observed in case of maximum temperature measurement. The deepest depth of lesion was noted after three-wavelength irradiation (450 + 520 + 640 nm). Our research, although conducted *ex vivo*, opens new perspectives in the field of soft tissue surgery, proposing the use of diode lasers with various wavelengths in one beam. They may be useful in the selection of proper configuration when working with diode lasers in various clinical settings. However, due to the lack of reports in the literature regarding this type of laser devices (combining several wavelengths in one optic beam), it was not possible to compare our results with other studies. Thus, further research is needed in order to obtain more detailed information regarding the activity of such lasers on tissues.

**Author Contributions:** Conceptualization, K.J. and W.T.; methodology, K.J.; validation, K.J., M.T. and Z.W.; statistical analysis, K.J.; investigation, K.J. and M.T.; writing—original draft preparation, K.J. and M.T.; writing—review and editing, K.J.; supervision, K.J., P.Z. and W.T.; project administration, K.J.; funding acquisition, T.W. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** National Center for Research and Development in Poland (NCBR), Grant: PBS3/A7/18/2015 “LASDER”.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

**Patents:** Patent number: 9,223,123, B2; date of patent: 29 December 2015.

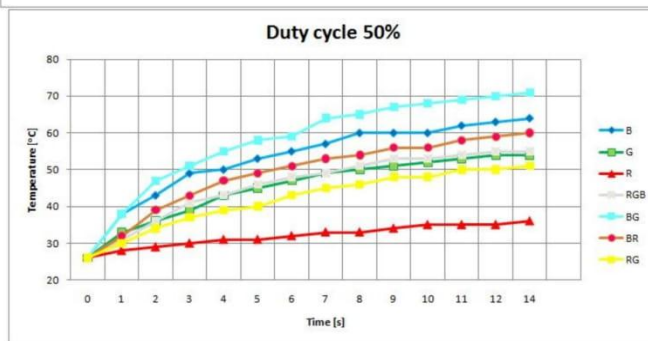
Appendix A

**Table A1.** Post hoc Scheffe’s test results in case of duty cycle vs. lesion depth. Bold font, statistically significant,  $p < 0.05$ ; B, 450 nm; G, 520 nm; R, 640 nm; RGB, 450 + 520 + 640 nm; BG, 450 + 520 nm; BR, 450 + 640 nm; GR, 520 + 640 nm).

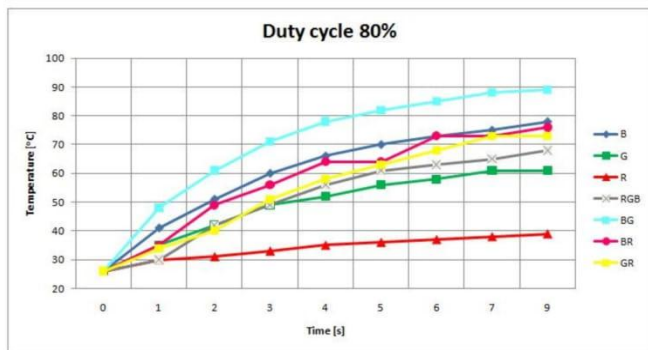
Wavelength/ DutyCycle	B 10%	B 50%	B 80%	B 100%	G 10%	G 50%	G 80%	G 100%	R 10%	R 50%	R 80%	R 100%	RGB 10%	RGB 50%	RGB 80%	BG 10%	BG 50%	BG 80%	BG 100%	BR 10%	BR 50%	BR 80%	BR 100%	GR 10%	GR 50%	GR 80%	GR 100%	RGB 100%	
B10%		0.634	0.000	0.000	1.000	0.000	0.012	0.000	1.000	0.689	0.189	0.007	1.000	0.000	0.000	1.000	0.030	0.000	0.000	1.000	0.005	0.000	0.000	1.000	0.061	0.000	0.000	0.000	0.000
B50%	0.634		0.000	0.000	0.634	0.914	1.000	0.000	0.634	1.000	1.000	1.000	0.634	0.000	0.000	0.634	1.000	0.061	0.000	0.634	0.999	0.038	0.000	0.634	1.000	0.438	0.310	0.000	0.000
B80%	0.000	0.000		1.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.016	0.244	0.000	0.000	0.009	0.947	0.000	0.000	0.016	0.411	0.000	0.000	0.000	0.001	0.023	0.000
B100%	0.000	0.000	1.000		0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.076	0.000	0.000	0.043	0.740	0.000	0.000	0.068	0.740	0.000	0.000	0.002	0.005	0.005	0.005
G10%	1.000	0.634	0.000	0.000		0.000	0.012	0.000	1.000	0.689	0.189	0.007	1.000	0.000	0.000	1.000	0.030	0.000	0.000	1.000	0.005	0.000	0.000	1.000	0.061	0.000	0.000	0.000	0.000
G50%	0.000	0.914	0.000	0.000	0.000		1.000	0.000	0.000	0.885	0.999	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	1.000	0.000	0.000	1.000	1.000	0.689	0.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000
G80%	0.012	1.000	0.000	0.000	0.012	1.000		0.000	0.012	1.000	1.000	1.000	0.012	0.000	0.000	0.012	1.000	0.914	0.000	0.012	1.000	0.850	0.117	0.012	1.000	1.000	0.998	0.000	0.000
G100%	0.000	0.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.014	0.225	0.000	0.000	0.011	0.937	0.000	0.000	0.018	0.438	0.000	0.000	0.000	0.001	0.020	0.000
R10%	1.000	0.634	0.000	0.000	1.000	0.000	0.012	0.000		0.689	0.189	0.007	1.000	0.000	0.000	1.000	0.030	0.000	0.000	1.000	0.005	0.000	0.000	1.000	0.061	0.000	0.000	0.000	0.000
R50%	0.689	1.000	0.000	0.000	0.689	0.885	1.000	0.000	0.689		1.000	0.999	0.689	0.000	0.000	0.689	1.000	0.049	0.000	0.689	0.998	0.030	0.689	1.000	0.384	0.265	0.000	0.000	0.000
R80%	0.189	1.000	0.000	0.000	0.189	0.999	1.000	0.000	0.189	1.000		1.000	0.189	0.000	0.000	0.189	1.000	0.334	0.000	0.189	1.000	0.244	0.006	0.189	1.000	0.885	0.788	0.000	0.000
R100%	0.007	1.000	0.000	0.000	0.007	1.000	1.000	0.000	0.007	0.999	1.000		0.007	0.000	0.000	0.007	1.000	0.956	0.000	0.007	1.000	0.914	0.172	0.007	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000
RGB10%	1.000	0.634	0.000	0.000	1.000	0.000	0.012	0.000	1.000	0.689	0.189	0.007		0.000	0.000	1.000	0.030	0.000	0.000	1.000	0.005	0.000	0.000	1.000	0.061	0.000	0.000	0.000	0.000
RGB50%	0.000	0.000	0.016	0.003	0.000	0.000	0.000	0.014	0.000	0.000	0.000	0.000		1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
RGB80%	0.000	0.000	0.244	0.076	0.000	0.000	0.000	0.225	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000		0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
BG10%	1.000	0.634	0.000	0.000	1.000	0.000	0.012	0.000	1.000	0.689	0.189	0.007	1.000	0.000	0.000		0.030	0.000	0.000	1.000	0.005	0.000	0.000	1.000	0.061	0.000	0.000	0.000	0.000
BG50%	0.030	1.000	0.000	0.000	0.030	1.000	1.000	0.000	0.030	1.000	1.000	1.000	0.030	0.000	0.000	0.030		0.788	0.000	0.030	1.000	0.689	0.055	0.030	1.000	0.997	0.988	0.000	0.000
BG80%	0.000	0.061	0.009	0.043	0.000	1.000	0.914	0.011	0.000	0.049	0.334	0.956	0.000	0.000	0.000	0.000	0.788		0.000	0.000	0.970	1.000	1.000	0.000	0.634	1.000	1.000	0.000	0.000
BG100%	0.000	0.000	0.947	0.740	0.000	0.000	0.000	0.937	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.990	1.000	0.000	0.000	0.000		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.996	0.000
BR10%	1.000	0.634	0.000	0.000	1.000	0.000	0.012	0.000	1.000	0.689	0.189	0.007	1.000	0.000	0.000	1.000	0.030	0.000	0.000		0.005	0.000	0.000	1.000	0.061	0.000	0.000	0.000	0.000
BR50%	0.005	0.999	0.000	0.000	0.005	1.000	1.000	0.000	0.005	0.998	1.000	1.000	0.005	0.000	0.000	0.005	1.000	0.970	0.000	0.005		0.937	0.206	0.005	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000
BR80%	0.000	0.038	0.016	0.068	0.000	1.000	0.850	0.018	0.000	0.030	0.244	0.914	0.000	0.000	0.000	0.000	0.689	1.000	0.000	0.000	0.937		1.000	0.000	0.521	1.000	1.000	0.000	0.000
BR100%	0.000	0.000	0.411	0.740	0.000	0.689	0.117	0.438	0.000	0.000	0.006	0.172	0.000	0.000	0.000	0.000	0.055	1.000	0.000	0.000	0.206	1.000		0.000	0.026	0.984	0.996	0.000	0.000
GR10%	1.000	0.634	0.000	0.000	1.000	0.000	0.012	0.000	1.000	0.689	0.189	0.007	1.000	0.000	0.000	1.000	0.030	0.000	0.000	1.000	0.005	0.000	0.000		0.061	0.000	0.000	0.000	0.000
GR50%	0.061	1.000	0.000	0.000	0.061	1.000	1.000	0.000	0.061	1.000	1.000	1.000	0.061	0.000	0.000	0.061	1.000	0.634	0.000	0.061	1.000	0.521	0.026	0.061		0.984	0.956	0.000	0.000
GR80%	0.000	0.438	0.000	0.002	0.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.384	0.885	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.997	1.000	0.000	0.000	1.000	1.000	0.984	0.000	0.984		1.000	0.000	0.000
GR100%	0.000	0.310	0.001	0.005	0.000	1.000	0.998	0.001	0.000	0.265	0.788	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.988	1.000	0.000	0.000	1.000	1.000	0.996	0.000	0.956	1.000		0.000	0.000
RGB100%	0.000	0.000	0.023	0.005	0.000	0.000	0.000	0.020	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.996	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000



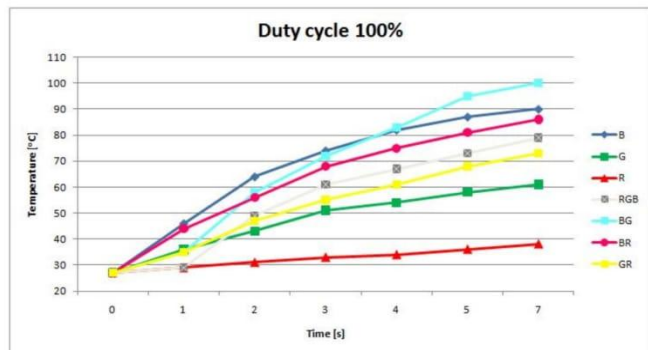
A.



B.



C.



D.

**Figure A1.** Increase of temperature in time during irradiation for (A) 10%, (B) 50%, (C) 80% and (D) 100% duty cycles. B, 450 nm; G, 520 nm; R, 640 nm; RGB, 450 + 520 + 640 nm; BG, 450 + 520 nm; BR, 450 + 640 nm; GR, 520 + 640 nm.

## References

1. Tunç, S.K.; Yayli, N.Z.; Talmac, A.C.; Feslihan, E.; Akbal, D. Clinical comparison of the use of ER,CR:YSGG and diode lasers in second stage implants surgery. *Saudi Med J.* **2019**, *40*, 490–498. [\[CrossRef\]](#)
2. Monteiro, L.; Delgado, M.-L.; Garcês, F.; Machado, M.; Ferreira, F.; Martins, M.; Salazar, F.; Pacheco, J.-J. A histological evaluation of the surgical margins from human oral fibrous-epithelial lesions excised with CO2 laser, Diode laser, Er:YAG laser, Nd:YAG laser, electrosurgical scalpel and cold scalpel. *Med. Oral Patol. Oral y Cir. Bucal* **2019**, *24*, e271–e280. [\[CrossRef\]](#)
3. Al-Majmaie, R.; Al-Rubeai, M.; Rice, J.H.; Kennedy, E.; Zerulla, D. AFM-based bivariate morphological discrimination of apoptosis induced by photodynamic therapy using photosensitizer-functionalized gold nanoparticles. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 82983–82991. [\[CrossRef\]](#)
4. Lim, H.-S. Development and optimization of a diode laser for photodynamic therapy. *Laser Ther.* **2011**, *20*, 195–203. [\[CrossRef\]](#)
5. Khalkhal, E.; Razzaghi, M.; Rostami-Nejad, M.; Rezaei-Tavirani, M.; Beigvandi, H.H.; Tavirani, M.R. Evaluation of Laser Effects on the Human Body After Laser Therapy. *J. Lasers Med. Sci.* **2020**, *11*, 91–97. [\[CrossRef\]](#)
6. Alster, T.S.; Husain, Z. The role of lasers and intense pulsed light technology in dermatology. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* **2016**, *9*, 29–40. [\[CrossRef\]](#)
7. Najeeb, S.; Khurshid, Z.; Zafar, M.S.; Ajlal, S. Applications of Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation (Lasers) for Restorative Dentistry. *Med. Princ. Pr.* **2016**, *25*, 201–211. [\[CrossRef\]](#)
8. Goel, A.; A, G. Clinical applications of Q-switched NdYAG laser. *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.* **2008**, *74*, 682. [\[CrossRef\]](#)
9. Yates, B.; Que, S.K.T.; D'Souza, L.; Suchecki, J.; Finch, J. Laser treatment of periocular skin conditions. *Clin. Dermatol.* **2015**, *33*, 197–206. [\[CrossRef\]](#)
10. Cobb, C.M. Lasers in Periodontics: A Review of the Literature. *J. Periodontol.* **2006**, *77*, 545–564. [\[CrossRef\]](#)
11. Lee, H.C.; Childs, J.; Chung, K.Y.; Park, J.; Hong, J.; Bin Cho, S. Pattern analysis of 532- and 1,064-nm picosecond-domain laser-induced immediate tissue reactions in ex vivo pigmented micropig skin. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 4186. [\[CrossRef\]](#)
12. Namour, M.; El Mobadder, M.; Magnin, D.; Peremans, A.; Verspecht, T.; Teughels, W.; Lamard, L.; Nammour, S.; Rompen, E.; Mobadder, E. Q-Switch Nd:YAG Laser-Assisted Decontamination of Implant Surface. *Dent. J.* **2019**, *7*, 99. [\[CrossRef\]](#)
13. Namour, M.; Verspecht, T.; El Mobadder, M.; Teughels, W.; Peremans, A.; Nammour, S.; Rompen, E. Q-Switch Nd:YAG Laser-Assisted Elimination of Multi-Species Biofilm on Titanium Surfaces. *Materials* **2020**, *13*, 1573. [\[CrossRef\]](#)
14. Barua, S. Laser-tissue interaction in tattoo removal by Q-switched lasers. *J. Cutan. Aesthetic Surg.* **2015**, *8*, 5–8. [\[CrossRef\]](#)
15. Cencic, B.; Lukac, M.; Marincek, M.; Vizintin, Z. High Fluence, High Beam Quality Q-Switched Nd:YAG Laser with Optoflex Delivery System for Treating Benign Pigmented Lesions and Tattoos. *J. Laser Health Acad.* **2010**, *1*, 9–18.
16. Ivonyak, Y.; Piechal, B.; Mrozowicz, M.; Bercha, A.; Trzeciakowski, W. Note: Coupling of multiple laser diodes into a multi-mode fiber. *Rev. Sci. Instrum.* **2014**, *85*, 36106. [\[CrossRef\]](#)
17. Fekrazad, R.; Asefi, S.; Eslaminejad, M.B.; Taghiyar, L.; Bordbar, S.; Hamblin, M.R. Photobiomodulation with single and combination laser wavelengths on bone marrow mesenchymal stem cells: proliferation and differentiation to bone or cartilage. *Lasers Med. Sci.* **2019**, *34*, 115–126. [\[CrossRef\]](#)
18. Fornaini, C.; Merigo, E.; Vescovi, P.; Bonanini, M.; Antonietti, W.; Leoci, L.; Lagori, G.; Meleti, M. Different laser wavelengths comparison in the second-stage implant surgery: an ex vivo study. *Lasers Med. Sci.* **2014**, *30*, 1631–1639. [\[CrossRef\]](#)
19. Romeo, U.; Del Vecchio, A.; Russo, C.; Palaia, G.; Gaimari, G.; Arnabat-Dominguez, J.; España, A.-J.; Palaia, G. Laser treatment of 13 benign oral vascular lesions by three different surgical techniques. *Med. Oral Patol. Oral y Cir. Bucal* **2013**, *18*, e279–e284. [\[CrossRef\]](#)
20. Kamalski, D.M.; Wegner, I.; Tange, R.A.; Vincent, R.; Stegeman, I.; Van Der Heijden, G.J.M.; Grolman, W. Outcomes of Different Laser Types in Laser-assisted Stapedotomy. *Otol. Neurotol.* **2014**, *35*, 1046–1051. [\[CrossRef\]](#)



21. Anderson, R.R.; Parrish, J.A. Selective photothermolysis: precise microsurgery by selective absorption of pulsed radiation. *Science* **1983**, *220*, 524–527. [[CrossRef](#)]
22. Li, D.; Wang, G.; He, Y.; Kelly, K.; Wu, W.; Wang, Y.; Ying, Z. A two-temperature model for selective photothermolysis laser treatment of port wine stains. *Appl. Therm. Eng.* **2013**, *59*, 41–51. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Bodendorf, M.O.; Grunewald, S.; Wetzig, T.; Simon, J.C.; Paasch, U. Fractional laser skin therapy. *J. Dtsch. Dermatol. Ges.* **2009**, *7*, 301–308. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Kasai, K. Picosecond Laser Treatment for Tattoos and Benign Cutaneous Pigmented Lesions (Secondary publication). *Laser Ther.* **2017**, *26*, 274–281. [[CrossRef](#)]
25. Belikov, A.; Skrypnik, A.V. Soft tissue cutting efficiency by 980 nm laser with carbon-, erbium-, and titanium-doped optothermal fiber converters. *Lasers Surg. Med.* **2019**, *51*, 185–200. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Martelli, F.S.; De Leo, A.; Zinno, S. *Laser in Odontostomatologia – Applicazioni Cliniche*; Elsevier Masson: Paris, France, 2000; pp. 59–72. (In Italian)
27. Matys, J.; Grzech-Leśniak, K.; Flieger, R.; Dominiak, M. Assessment of an Impact of a Diode Laser Mode with Wavelength of 980 nm on a Temperature Rise Measured by Means of k-02 Thermocouple: Preliminary Results. *Dent. Med Probl.* **2016**, *53*, 345–351. [[CrossRef](#)]
28. Fornaini, C.; Merigo, E.; Sozzi, M.; Rocca, J.-P.; Poli, F.; Selleri, S.; Cucinotta, A. Four different diode lasers comparison on soft tissues surgery: a preliminary ex vivo study. *Laser Ther.* **2016**, *25*, 105–114. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Meesters, A.A.; Pitassi, L.H.U.; Campos, V.; Wolkerstorfer, A.; Dierickx, C.C. Transcutaneous laser treatment of leg veins. *Lasers Med. Sci.* **2013**, *29*, 481–492. [[CrossRef](#)]
30. Romeo, U.; Del Vecchio, A.; Ripari, F.; Palaia, G.; Chiappafreddo, C.; Tenore, G.; Visca, P. Effects of different laser devices on oral soft tissues: in vitro experience. *J. Oral Laser Appl.* **2007**, *7*, 155–159.
31. Azevedo, A.-S.; Monteiro, L.S.; Ferreira, F.; Delgado, M.L.; Garcês, F.; Carreira, S.; Martins, M.; Suarez-Quintanilla, J. In vitro histological evaluation of the surgical margins made by different laser wavelengths in tongue tissues. *J. Clin. Exp. Dent.* **2016**, *8*, e388–e396. [[CrossRef](#)]
32. Omi, T.; Numano, K. The Role of the CO<sub>2</sub> Laser and Fractional CO<sub>2</sub> Laser in Dermatology. *Laser Ther.* **2014**, *23*, 49–60. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Palaia, G.; Pergolini, D.; D’Alessandro, L.; Carletti, R.; Del Vecchio, A.; Tenore, G.; Di Gioia, C.R.T.; Romeo, U. Histological Effects of an Innovative 445 Nm Blue Laser During Oral Soft Tissue Biopsy. *Int. J. Environ. Res. Public Heal.* **2020**, *17*, 2651. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Cadavid, A.M.H.; De Campos, W.G.; Aranha, A.C.C.; Lemos-Junior, C.A. Efficacy of Photocoagulation of Vascular Malformations in the Oral Mucosa Using Nd. *J. Craniofacial Surg.* **2018**, *29*, e614–e617. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Azma, E.; Razaghi, M. Laser Treatment of Oral and Maxillofacial Hemangioma. *J. Lasers Med. Sci.* **2018**, *9*, 228–232. [[CrossRef](#)]
36. Bacci, C.; Sacchetto, L.; Zanette, G.; Sivoilella, S. Diode laser to treat small oral vascular malformations: A prospective case series study. *Lasers Surg. Med.* **2018**, *50*, 111–116. [[CrossRef](#)]

**Publisher’s Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Article

# Application of Fractal Dimension and Texture Analysis to Evaluate the Effectiveness of Treatment of a Venous Lake in the Oral Mucosa Using a 980 nm Diode Laser—A Preliminary Study

Mateusz Trafalski <sup>1</sup>, Marcin Kozakiewicz <sup>2</sup>  and Kamil Jurczyszyn <sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup> Department of Dental Surgery, Wrocław Medical University, Krakowska 26, 50-425 Wrocław, Poland; mateusz.trafalski@umed.wroc.pl

<sup>2</sup> Department of Maxillofacial Surgery, Medical University of Lodz, 113 S. Żeromski Street, 90-549 Lodz, Poland; marcin.kozakiewicz@umed.lodz.pl

\* Correspondence: kamil.jurczyszyn@umed.wroc.pl



**Citation:** Trafalski, M.; Kozakiewicz, M.; Jurczyszyn, K. Application of Fractal Dimension and Texture Analysis to Evaluate the Effectiveness of Treatment of a Venous Lake in the Oral Mucosa Using a 980 nm Diode Laser—A Preliminary Study. *Materials* **2021**, *14*, 4140. <https://doi.org/10.3390/ma14154140>

Academic Editor: Eugenio Velasco-Ortega

Received: 30 June 2021

Accepted: 22 July 2021

Published: 25 July 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Venous lake (VL) is a common lesion resulting from the enlargement of thin-walled veins surrounded by a thick wall of fibrous tissue. Photocoagulation is becoming one of the basic methods for treating small vascular lesions. The aim of this study was an application of texture analysis (TA) and fractal dimension analysis (FDA) to evaluate VL treatment. Twenty-three VLs were included in the study. We used a 980 nm diode laser, 6 W, 100 ms pulse mode with a 50% duty cycle. The total dose of energy was in a range from 80 J to 600 J. We used the difference of intensity algorithm for FDA and microcontrast and a co-occurrence matrix for TA. A complete therapeutic effect was achieved in 83%, and in 9%, scar formation was observed after three months. No healing was observed in 4%, and there was partial healing in 4%. No differences in FD were observed between the lesions after three months and the healthy mucosa. The fractal dimension and microcontrast of a vascular lesion are mutually coupled. FDA and TA is a useful and objective method of assessing treatment effects for venous lakes. The non-contact mode of the 980 nm diode laser is an effective and safe method for treating a VL.

**Keywords:** venous lake (VL); diode laser 980 nm; texture analysis; fractal dimension analysis; laser surgery

## 1. Introduction

A venous lake (VL) is a common lesion resulting from the enlargement of thin-walled veins surrounded by a thick wall of fibrous tissue [1]. In 1956, Bean and Walsh described these lesions as being soft, easily compressible and arising in sun-exposed areas (ears, face, hands, lips), especially in older people [2]. They are also present on the oral mucosa, the red zone of the lip and the ventral surface of the tongue. In the oral cavity, they appear as non-painful, soft, non-bloody, well-demarcated, dark blue or purple papules, 2–10 mm in diameter and showing a positive diaphoresis test [3]. Another name, senile haemangioma or lip varices, can also be found in the literature [4]. The mechanism of their formation is not fully explained, but age is the most likely factor, as they are most common in older people over 50 years of age. If they do not cause aesthetic problems or are not a source of bleeding, no treatment is necessary. However, they can have a negative impact on quality of life, mainly due to aesthetic concerns or fear of malignancy, which lead patients to seek specialist help. Contemporary methods of treatment of these lesions include surgical excision, cryosurgery using liquid nitrogen, electrocoagulation, coagulation with infrared light, photocoagulation and sclerotherapy [5–8]. If the location of these lesions includes aesthetically sensitive areas, this poses additional requirements for the therapeutic option. This involves the selection of the least invasive method, which will not leave scars or discolouration and has a range not exceeding the borders of pathological

changes for the given case. The absorption spectrum for the haemoglobin contained in the blood found in the lumen of vascular lesions covers two spectral regions, 410–600 nm and 800 nm–1100 nm [9]. By selecting the right laser device, such lesions can be selectively treated. Therefore, photocoagulation is becoming one of the basic methods for treating small vascular lesions in the oral area.

Clinical evaluation of the efficacy of treatment of superficial VL is relatively simple. Their characteristic round or oval shape, clear demarcation from the substrate and dark colour make monitoring the progress of treatment easier. Therefore, the response to treatment, or lack thereof, is clearly observable. However, macroscopically, it is difficult to assess whether the cured area is similar in appearance to the normal mucosa. By using texture analysis (TA) and fractal dimension analysis (FDA) to evaluate the efficacy of VL treatment, the results of our study became more objective.

Fractal dimension analysis (FDA) is used in the estimation of complex, irregular shapes. In medicine, FDA is useful during analyses of positron emission tomography, radiographic images, computed tomography and magnetic resonance images [10–13]. Euclidean geometry may fail in the analysis of complicated shapes. Using classical Euclidean geometry on a daily basis, we are used to the fact that the number of dimensions that an object possesses is an integer. Thus, a point has zero dimensions; a segment has one dimension, which is its length; an item on a plane has two dimensions, length and width; and a 3D item has height, width and length. However, fractals are shapes that go beyond the rules of classical geometry. Their dimensions are not integers. Another surprising feature of fractals is their self-similarity. This is a feature that manifests itself in the fact that fractals can be enlarged without limit and that subsequent details of their structure are similar to the initial shape. In everyday life, we are confronted with numerous natural creations that can be roughly described as fractals, e.g., networks of blood vessels or nerves. There are a number of mathematical methods for calculating fractal dimension—in our study, we used a modified box counting method that allowed analysis of grayscale images.

Another mathematical image analysis that we used in our study was texture analysis (TA). Every digital image consists of pixels. Each pixel is characterised by two features: coordinates and colour/brightness. Digital colour images produced by typical cameras have a colour depth of 24 bits. This means that three components (responsible for red, green and blue) are needed to describe a coloured pixel. Each element can be in one of 256 ( $2^8$ ) brightness levels. The pixels form a fine image structure called a texture. A texture is a set of repeating graphic patterns characterised by brightness, entropy, smoothness, uniformity, roughness, granularity, randomness or linearity [14]. TA offers the possibility of surface analysis. Texture analysis is widely applied to magnetic resonance images, computed tomography and X-ray images [15–18].

The first aim of the study was to investigate the efficacy of oral mucous venous lake lesion treatment, using a 980 nm diode laser. The second goal of the study was the application of texture and fractal dimension analysis in the assessment of the effectiveness of treatment of these lesions. We did not find more studies in the literature about the application of fractal dimension and texture analysis in cases of treatment evaluations of venous lake lesions.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Patients and Lesions

Twenty-three VL lesions in 23 patients (12 women and 11 men) were included in the study. The mean age was 66 years ( $SD = 14$ ). The youngest patient was 36, and the oldest was 87 years old. The mean age for women was 66, and for men, it was 64 years. The most common location of VL was the lip, and the rarest location was the tongue. The number of cases for the lip was 11; for the corner of the mouth, it was 6; for the cheek, it was 4; and for the tongue, it was 2. Patients suffering from cancer or undergoing radiotherapy or chemotherapy for head and neck cancer, undergoing immunosuppression or with congenital tumours and venous malformation were excluded from the project. The project

was approved by the Bioethics Committee at the Medical University of Wrocław, approval number KB—805/2019 (2 December 2019) and regulatory number CWN UMED: BW-110. The diagnosis was based on a thorough history and examination. The circumstances and the time elapsed since the appearance of the lesion, the accompanying symptoms, the growth dynamics, the appearance of the lesion and the symptom of the diascopy were all taken into account. The patient underwent a physical examination and anamnesis before the treatment with follow-up visits at 7, 14 and 90 days after the treatment. During each visit, the lesion was measured with a graduated periodontal probe, and photographic documentation was taken. The complete absence of a lesion or a slightly lighter mucosa (scar) at the site of the treatment were considered criteria for remission. If there was no healing 3 months after the procedure, a repeat procedure was performed with the same frequency of follow-up visits.

### 2.2. Laser Procedure

Before the procedure, the mucosa was superficially anaesthetised with 10% lidocaine (Lidocain-Egis solution 10%, Delfarma, Łódź, Poland), using an occlusive dressing (soaked surgical gauze) placed on the mucosa for 5 min. The operator as well as the patient wore safety goggles during the procedure. The procedure was performed using a 980 nm diode laser (Lasotronix Smart M, Piaseczno, Poland). The optical fibre diameter was 400  $\mu\text{m}$ , power 6 W and illumination in 100 ms pulse mode with a 50% duty cycle. The total dose of energy emitted during the treatment depended on the size of the lesion and ranged from 80 J to 600 J. The irradiation was carried out in non-contact mode through a 1 mm thick transparent microscope slide. The slide was applied to the lesion with slight pressure in order to reduce its vertical dimension and thus, better penetrate the laser beam deep into the tissue. The transparency of the glass was 90%. The Power and Energy Meter PM100USB, Thorlabs Inc, Newton, NJ, United States was used to assess this parameter. Therefore, 90% of the energy emitted by the device was transferred to the tissue, and the remaining 10% was scattered and reflected by the glass. The tip of the fibre optic was then applied at right angles to the lesion surface, and the laser device was activated. The procedure was carried out until slight convergence was achieved at the exposure site, and then, the tip was moved alongside. Once slight convergence of the entire lesion surface was achieved, the procedure was completed. Perioperative pain was determined using the NRS (numerical rating scale), which contained 10 levels of pain severity, where 1 was minimal pain and 10 was unbearable pain. Intraoperative pain intensity averaged 4.76. Only in three cases was the pain so severe that infiltration anaesthesia had to be performed using 4% articaine with norepinephrine 1:200,000 (Septodont, Saint-Maur-des-Fossés, France). The lesions were left to heal on their own. It was recommended to avoid irritation of the treated area and not to eat hot and spicy food. No patient required analgesics, and in all cases, the healing progressed without complications.

### 2.3. Taking Images

All images were taken with the camera of a Samsung S9 mobile phone (Samsung Electronics, Seoul, South Korea) in RAW format to reduce the effects of sharpening and denoising algorithms. All images were taken from the same distance (45 cm), and the optical axis of the camera was perpendicular to the lesion surface. The focus point was locked at 45 cm for repeatability. Depending on the lesion area, a region of interest (ROI) of 50  $\times$  50, 100  $\times$  100 or 150  $\times$  150 pixels was determined. All ROI images were converted to 8-bit greyscale bitmaps.

All graphic operations were performed using GIMP version 2.10.24 (GNU Image Manipulation Program—[www.gimp.org](http://www.gimp.org) (accessed on 3 May 2021), free and open source license).

### 2.4. Measurement of Lesion Surfaces

Imagine J software, version 1.53e (open source licence, <https://imagej.nih.gov>—accessed on 3 May 2021) was used to measure the lesion area. A periodontal probe with a millimetre

scale, applied next to the treated area, served as a mapping scale for calculating the lesion area. Calculations were performed before treatment and at 3 months after treatment in cases where no or an incomplete response was observed. The mean area of the treated lesions was 38 mm<sup>2</sup> (SD = 48). The smallest lesion subjected to treatment was 10 mm<sup>2</sup>, and the largest was 220 mm<sup>2</sup>.

### 2.5. Fractal Dimension Analysis

Fractal dimension analysis was performed in each case before lesion treatment as well as at 7 days and at 3 months after treatment. The control group consisted of normal mucosa. ROIs of reference mucosa were taken 3 months after surgery from the same location as the examined lesion. The ROI was dependent on the size of the lesion. Three ROIs were used in the study: 50 × 50, 100 × 100 and 150 × 150 pixels, with images taken 3 months after surgery from the same location as the lesion; e.g., if the lesion was in the control lip, the ROI was taken from the healthy lip area. All fractal analysis was performed in ImageJ version 1.53e (Image Processing and Analysis in Java—Wayne Rasband and contributors, National Institutes of Health, USA, public domain license, <https://imagej.nih.gov/ij/>, accessed on 3 May 2021) and plugin FracLac version 2.5 (Charles Sturt University, Australia, public domain license).

In our research, we decided to use a modified box counting method algorithm that allowed for the analysis of 8- or 16-bit monochrome images. For greyscale images, FracLac offers three options for FD (fractal dimension) analysis. One of these options is intensity difference, which we applied in our study. The analysed image was divided into boxes as in the box counting method. The difference between the maximum pixel intensity and the minimum pixel intensity was counted in each box ( $\delta I_{i,j,\epsilon}$ , where  $i, j$  denotes the position of the analysed box in the scale  $\epsilon$ ):

$$\delta I_{i,j,\epsilon} = \text{maximum pixel intensity}_{i,j,\epsilon} - \text{minimum pixel intensity}_{i,j,\epsilon}$$

In the next step, 1 is added to the intensity difference to prevent 0 value:

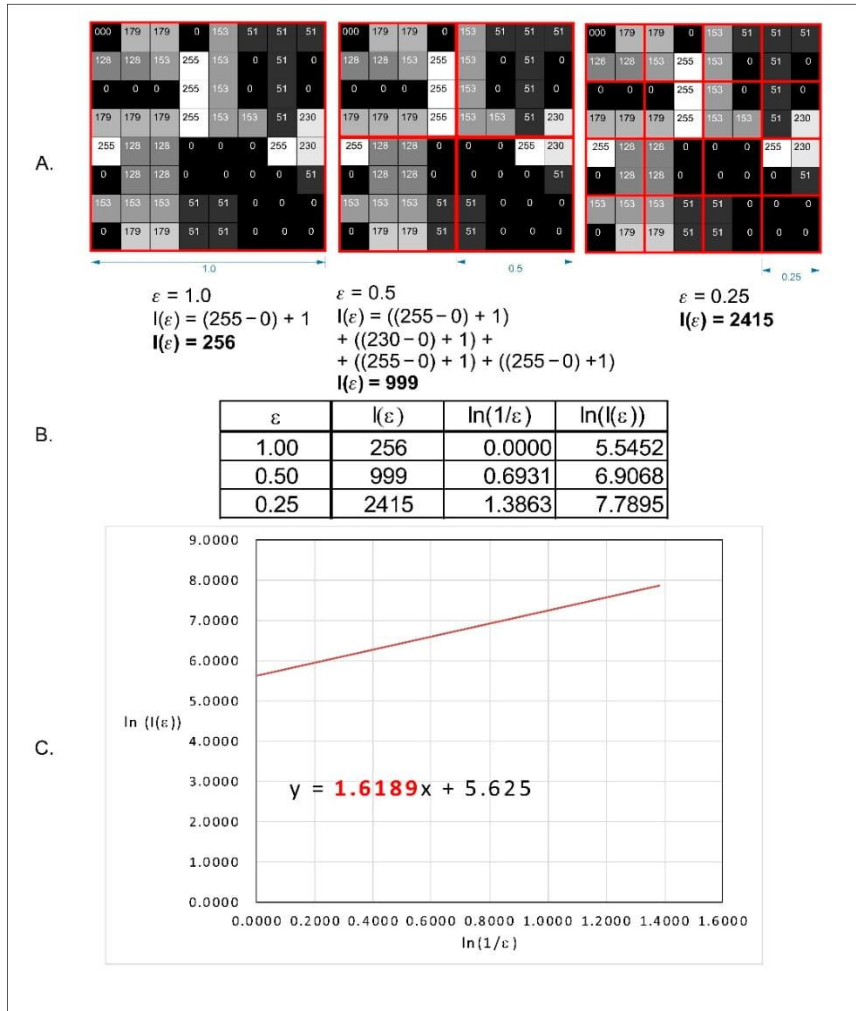
$$I_{i,j,\epsilon} = \delta I_{i,j,\epsilon} + 1$$

Finally, the fractal dimension of the intensity difference is described by the following formula:

$$D \text{ Idiff} = \lim_{\epsilon \rightarrow 0} \frac{\ln(I_\epsilon)}{\ln\left(\frac{1}{\epsilon}\right)}$$

where  $D \text{ Idiff}$ —difference intensity fractal dimension,  $I_\epsilon = \Sigma[1\delta I_{i,j,\epsilon} + 1]$  and  $\epsilon$ —box scale.

All operations are shown in Figure 1.



**Figure 1.** Graphical interpretation of the intensity difference algorithm of the fractal dimension calculation. (A) An example of a greyscale 8-bit image; the numbers in squares represent the intensity level of each pixel: 0, black and 255, white. The red squares represent the scale— $\epsilon$ . (B) The values of the intensity difference for each step of scale reduction ( $\epsilon$ ). (C) A straight line drawn through the points from table B on the x–y chart in a natural logarithmic scale. The slope factor of this straight line is a value fractal dimension counted by the intensity difference algorithm.

### 2.6. Texture Analysis

The texture of oral mucosa was evaluated using features derived from a co-occurrence matrix [19,20]. The regions of interest (ROIs) were normalized ( $\mu \pm 3\sigma$ ) to share the same average ( $\mu$ ) and standard deviation ( $\sigma$ ) of optical density within the ROIs. Selected image texture features (entropy and difference entropy (DifEntr) from the co-occurrence matrix; a good short- and long-run emphasis moment from the run length matrix) in ROIs were calculated for each composite material tested:

$$\text{DifEntr} = - \sum_{i=1}^{N_g} p_{x-y}(i) \log(p_{x-y}(i)) \tag{1}$$

$$\text{Contrast} = \sum_{|i-j|=0}^{N_g-1} (|i-j|)^2 \sum_{i=1}^{N_g} \sum_{j=1}^{N_g} p(i,j) \quad (2)$$

where  $\Sigma$  is the sum,  $N_g$  is the number of optical density levels in the radiograph,  $i$  and  $j$  are the optical density of pixels that are 5 pixels away from one another,  $p$  is probability and  $\log$  is the common logarithm. The equation was a measure of microcontrast because the image was sampled at distances of 5 pixels.

### 2.7. Statistical Analysis

Statistica version 13.3 (StatSoft, Krakow, Poland) was used to perform all statistical tests. A statistical significance level of 0.05 was assumed. The Shapiro–Wilk test was applied to confirm the normality of the distribution. Parametric tests were carried out due to the normality of the distribution. Analysis of variance (ANOVA) and post hoc least significant difference were used to show differences in fractal dimensions between normal mucosa and lesions before treatment as well as at 7 days and at 3 months after treatment. A correlation matrix was used to assess the FD correlation between the measured area and the fractal dimension before and after lesion treatment.

We calculated the power of all applied statistical tests on the basis of sample size ( $n = 23$ ). At a level of alpha of 0.05, the powers of tests in these conditions were 0.71 (for difference entropy), 0.88 (FD) and 0.94 (microcontrast).

### 3. Results

A complete therapeutic effect without scar formation was achieved in 83% (19 lesions). In 9% (two cases), scar formation was observed after three months. No healing was observed in 4% (1 case) and partial healing (reduction in lesion size) in 4% (1 case). An example of total response treatment is shown on Figure 2.



**Figure 2.** Application of a diode laser, 980 nm, in the treatment of a venous lake of the lower lip. (a) The appearance of lesions before treatment, (b) the appearance immediately after applying laser application, (c) 7 days after treatment (d) 3 months after treatment.

The overall results of the surface area and fractal dimension values are shown in Table 1. The mean lesion size was  $38 \text{ mm}^2$ ; it was significant that the standard deviation was very high ( $48 \text{ mm}^2$ ). The smallest lesion had an area of  $10 \text{ mm}^2$ , and it was located

in the cheek region, and the largest lesion had an area of 220 mm<sup>2</sup> and was located in the lip region. The fractal dimension (FD) was smaller for the lesion before treatment (1.359) and 1 week after treatment (1.354) than for the lesion 3 months after treatment (1.440). The results of the post hoc ANOVA (least significant difference) test are shown in Table 2. There were no statistical differences between FDs of lesions before and 7 days after laser treatment. It should be noted that our results showed statistical differences between the changes in FDs before treatment and 3 months after treatment. No statistically significant differences were observed between the lesion after three months and the healthy mucosa, confirming that fractal dimension analysis was a useful method to objectively assess the treatment effect.

**Table 1.** Mean values and standard deviations (SD) of lesion areas and fractal dimension (FD) values before treatment, 7 days after treatment, 3 months after treatment and with normal mucosa.

Number of Lesions	Surface (mm <sup>2</sup> )	FD Value				
		Before Treatment	7 Days After	3 Months After	Normal Mucosa	
23	Mean	38	1.359	1.354	1.440	1.500
	SD	48	0.095	0.087	0.155	0.135

**Table 2.** Post hoc ANOVA results (least significant difference) for comparison of FD values of lesions before treatment, lesions at 7 days and at 3 months after treatment and normal (healthy) mucosa. (bold and underline font—statistically significant differences, *p* < 0.05).

vs.	FD Value			
	Before Treatment	7 Days After	3 Months After	Normal Mucosa
Before treatment		0.892209	<b><u>0.026944</u></b>	<b><u>0.000162</u></b>
7 days after	0.892209		<b><u>0.019182</u></b>	<b><u>0.000099</u></b>
3 months after	<b><u>0.026944</u></b>	<b><u>0.019182</u></b>		0.094181
Normal mucosa	<b><u>0.000162</u></b>	<b><u>0.000099</u></b>	0.094181	

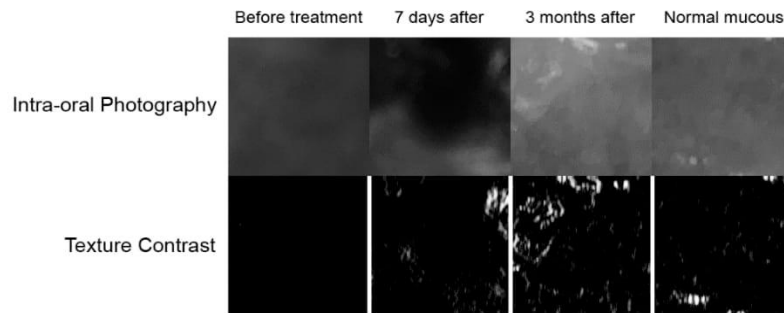
The results did not confirm the linear correlation between the area and the fractal dimension of the lesion before treatment (Pearson coefficient, *r* = 0.154).

Digital texture analysis is shown in Figure 3. The treated vascular lesions resulted in decreased colour contrasts in the oral mucosa (*p* < 0.001). Both the lesion image and the condition 7 days after treatment have reduced contrast. As a result of the treatment (after 3 months), the texture of the mucosa image was restored to normal (Table 3 and Figure 4). When examining difference entropy as a measure of random patterns in texture, no change in the treatment process was observed.

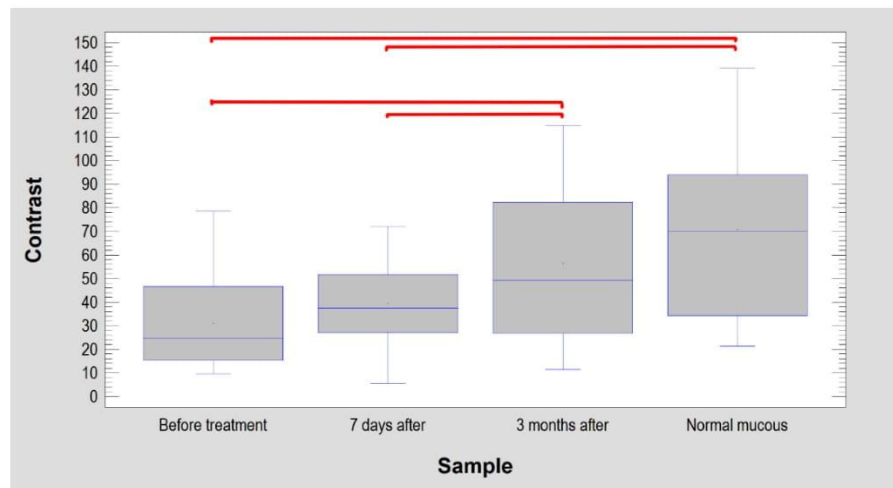
**Table 3.** Mean values of microcontrast and difference entropy of normal mucous, lesions before treatment, 7 days after treatment and 3 months after treatment.

Texture Feature	Before Treatment	7 Days After	3 Months After	Normal Mucous	Note
Microcontrast	31 ± 19	40 ± 18	57 ± 32	71 ± 35	<i>p</i> < 0.0001
Difference Entropy	1.00 ± 0.11	1.04 ± 0.15	1.08 ± 0.12	1.03 ± 0.15	<i>p</i> = 0.1773



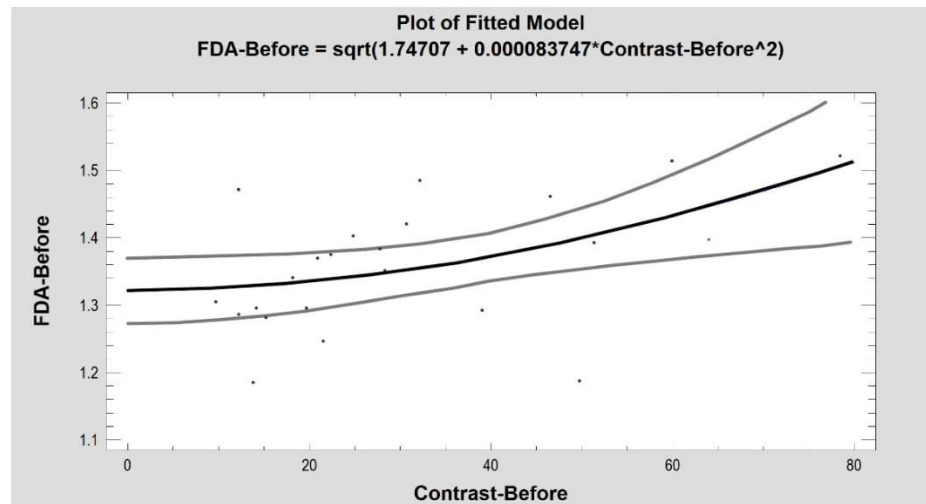


**Figure 3.** Digital texture analysis: The top row of images represents treatment documentation captured with a digital camera. These are black and white photographs. Below the bottom row of images are presented maps of intensity of the texture feature under study. In white in these maps are marked areas of high microcontrast detection. Conversely, black areas indicate low intensity of the contrast feature. Healing is characterized by the appearance of scattered areas of high microcontrast.



**Figure 4.** Texture contrast findings in oral mucosal images. The lesion had significantly lower contrast than normal mucosa (similar site condition 7 days after treatment). After 3 months, the treated site achieved texture features that were the same as the intact mucosa. The horizontal lines in the boxes indicate the median. Red brackets show groups with statistically significant differences ( $p < 0.0001$ ).

The FD was moderately strongly related with texture microcontrast in images of the pathological lesion (Figure 5), the 3-month healing effect and of healthy oral mucosa (before treatment:  $R^2 = 26\%$ , correlation coefficient = 0.51,  $p < 0.05$ ; 3 months after:  $R^2 = 30\%$ , correlation coefficient = 0.55,  $p < 0.01$ ; control:  $R^2 = 27\%$ , correlation coefficient = 0.52,  $p < 0.05$ ). The image of the healing wound on the seventh postoperative day alone did not reveal an association of the FD with the contrast ( $R^2 = 2.7\%$ ,  $CC = 0.16$ ,  $p = 0.45$ ).



**Figure 5.** The fractal dimension and microcontrast of a vascular lesion are mutually coupled ( $p < 0.05$ ). Grey lines indicate confidence limits.

#### 4. Discussion

VL is most often not accompanied by distressing symptoms and is usually not a problem for patients. This is why few of them see a doctor regarding this condition. Aesthetic reasons or possible bleeding that may result from mechanical trauma to these lesions are two of the main factors that lead patients to seek help [6]. It is therefore difficult to establish the prevalence of VL in the population. Meeni et al., in their study, stated that the mean age of patients treated for VL was 76.7 years [21], Cebeci et al. reported 62.1 years [22] and Azewedo et al., 55 years [23]. In our study, the mean age was 66 years, which confirmed the literature stating that these types of lesions appear at an older age. Gender predilections are also difficult to establish. Voynov et al. [24] indicated a higher prevalence of VL in men with an M:F ratio of 4:1, Menni et al. [21] reported M:F—1.48:1 while Azewedo et al. [23] reported M:F—0.7:1. Our findings showed that the frequency of VL was similar in both sexes with a slight female predominance and M:F—0.91:1.

800–980 nm diode lasers are often used to treat superficial vascular lesions in the oral area, as they are a safe and effective therapeutic method [23–25]. The non-contact application of the 980 nm diode laser is highly effective in treating these lesions due to the high absorption of this wavelength by haemoglobin, whose absorption spectra are between 410 and 600 nm and 800 nm and 1100 nm [9]. As a result of this process, the energy of the laser beam is converted into heat and causes coagulation of proteins and obliteration of pathological blood vessels. In addition, the heat generated during absorption of the laser light energy causes photocoagulation of well-vascularised tissues to a depth of 7–10 mm [6]. This makes this type of device very suitable for treating vascular surface lesions. Our results are consistent with the literature, which reports that the transmucosal application of lasers is associated with a low incidence of complications such as bleeding and oedema and is characterised by low peri- and postoperative pain [26–28]. The non-contact application of lasers also includes a spot irradiation technique called the “Leopard technique”, which involves irradiating the vascular lesion with a distance of several millimetres between the irradiated areas. This prevents excessive heat accumulation and minimises epithelial damage, resulting in better healing. In addition, the occurrence of complications such as pain, excessive swelling, ulceration or scarring is reduced. However, this type of approach may require multiple treatment sessions, as confirmed by the study of Miyazaki et al., who used this technique as well as the Nd:YAG—1064 nm laser (VersaPulse Holmium/Nd-YAG Laser Dual Wavelength model; Lumenis, Ltd., Yokneam, Israel) to treat venous malformation in the oral cavity [29]. This mode of irradiation can be used

alone or in combination with other techniques, especially in cases of large or deeper-lying vascular lesions.

Established therapeutic approaches for VL include, among others, photocoagulation using various laser devices such as a diode laser (800 nm–980 nm), a CO<sub>2</sub> laser—10,800 nm, a neodymium-doped yttrium aluminium garnet laser (Nd:YAG) (1064 nm), an alexandrite laser (755 nm) or a potassium titanyl phosphate laser (KTP)—532 nm [23,30–33].

The study of Nammour et al., using four laser devices including a CO<sub>2</sub> laser (10.600 nm) (Smart US20 D Laser, High Tech Laser, Herzele, Belgium), a continuous wave (CW) at 1 W power, a diode laser at 980 nm (Smart M Pro, Lasotronix, Poland), a 4 W, CV, Nd:YAG 1064 nm (Fidelus Plus, Fotona Medical Laser, Ljubljana, Slovenia) in pulsed mode (PM) at 15 Hz and an Er,Cr:YSGG 2790 nm (Waterlase, Biolase, Inc., Foothill Ranch, CA, USA) at 0.25 W and 20 Hz for the treatment of vascular lesions in the oral area, confirming their high efficacy regardless of the wavelength or treatment procedure used [34]. They reported no significant differences in aesthetic healing 6 months after treatment. No recurrences were observed with CO<sub>2</sub> and Er,Cr:YSGG lasers as opposed to diode and Nd:YAG lasers, which were 11% and 0.9%, respectively. However, in the case of the Er,Cr:YSGG laser and the CO<sub>2</sub> laser, invasive methods consisting of excision and vaporisation of the lesion were also used. The other two lasers were minimally invasive and non-contact methods such as in our study. Our observations showed that we obtained a similar result in cases of absent or incomplete healing of lesions, which were only 8% among all cases.

Voynov et al., conducting a study using a 980 nm diode laser (LiteMed-ics<sup>®</sup>, Italy), 2–3 W, CW, in non-contact mode, reported that they achieved complete healing of the VL in all treated—35 patients over a period of 2–4 weeks [24]. Furthermore, in no case did they observe scar formation, hypopigmentation or hyperpigmentation or mucosal atrophy, which was in contradiction with our results. Similar results were reported by Azevedo et al. using an 808 nm diode laser (Lasering 808, Milan, Italy), 2–3 W, CV, in non-contact mode for the treatment of VL, where they obtained a complete response in all 17 cases over a period of 2–3 weeks [23]. It took only one therapy session to achieve this result. Different results were reported by Bacci et al., who conducted a study on VL and venous malformation using an 830 nm diode laser (Opus 10, Sharplan Laser Industries, Ltd., Tel-Aviv, Israel), 1.6 W, in continuous mode [35]. After 30 days, complete healing was achieved in 74.5% and after one year, in 81.3%. Only 6.7% of patients required a repeat therapy session and 3.3%, three sessions. Their results were in line with our observations, where in 4% of cases, no improvement was obtained, and one patient required an additional therapy session, also representing 4% of the subjects. Our results were similar in that 4% needed another therapy session.

Romeo et al. conducted a study using a KTP 532 nm (DEKA, Florence, Italy), 2.5 W, CV laser and a GaAlAs diode laser (Laser Innovation, Castelgandolfo, Italy, 808 nm) to treat benign vascular lesions in the oral area [27]. With the KTP laser, three techniques were used: irradiation using a non-contact technique applying a microscope slide to the mucosa, irradiation by placing an optical fibre inside the lesion and using the laser to cut out lesions. The 808 nm diode laser was only used to irradiate the inside of the lesion. In all 13 cases, they reported complete healing, and only 1 patient required a repeat procedure. Only superficial anaesthesia with lidocaine cream was used for a period of 10 min before the procedure itself. Among all the methods used, patients reported an intraoperative NRS score of −1.92 and in the case of transscleral photocoagulation using a basic slide, 1.77. In our study, the intraoperative NRS score was 4.76. Therefore, non-contact VL treatment can be considered minimally invasive and safe, accompanied by moderate pain.

The application of no-contact mode through a transparent microscope slide reduces the vertical dimension of lesion and enables better penetration of the laser beam deep into the tissue. This procedure increases light penetration, but still, the main limitation of any laser procedure is the depth of beam penetration.

In previous studies, we applied the FDA when analysing the efficacy of oral leukoplakia treatment. In that study, we used the classical box counting method to estimate the

count up fractal dimension. This method has one major drawback, in that it requires 1-bit images as source material for analysis. Converting a colour image to a single-bit image is a process in which some of the analysed details are lost. We showed that the FD of oral leukoplakia was significantly lower than that of healthy mucosa with no statistical differences between the treated lesion and healthy mucosa [36]. In the aforementioned study, the FD of the examined lesion was lower than that of the reference mucosa, and after treatment, it was close to that of the normal mucosa, as in our study. These results confirmed our previous observations that FD was a useful method to objectively describe post-treatment lesions compared to healthy mucosa. Lucchese et al. investigated the fractal dimension of the capillary pattern of the oral lichen planus. They showed that the erosive form of oral lichen planus had a higher FD value (1.167) compared to healthy control mucosa (1.123) [37]. Iqbal et al. demonstrated that the fractal dimension of oral leukoplakia with dysplastic lesions was significantly greater than that of non-dysplastic lesions [38]. Goutzanis et al. studied the vascular pattern of oral cancer in histological sections. Their study showed that cancer vessels had a higher FD value than normal mucosa [13].

Although DifEntr is a frequently used texture feature in medical image recognition, it did not perform well in observing the healing process of vascular lesions ( $p = 0.1773$ ). It is reasonable to assume that this was due to the structured shape of the vascular lesions and the low stochastic components in their images (low measures of chaos such as entropy in texture) [39–45].

On the other hand, the microcontrast of the texture (variable: contrast) presented in the photographic images in this study gave full agreement with clinical observation and fractal analysis ( $p < 0.05$ ). It can be speculated that relatively large venous lacunae significantly affect the image structure. They lower the overall ROI contrast, which increases with healing. Finally, the microcontrast of the treated site reaches the level of normal oral mucosa. The fit of this feature to the lesions studied here is not surprising. Similar features derived from the co-occurrence matrix (sum of average) have already proven successful in oral surgery [46–48]. The contrast feature analysis of the structure recorded in the vascular lesion photographs used in this study revealed microstructures of keratinized epithelium. This was due to good visibility of the whitish structures of the superficial layer of the epithelium. They increased the value of the microcontrast parameter. The anatomically/histologically structured epithelial lining is also important. This stroma in a vascular lesion is simply the contents of the vascular malformation contrary to control sites, where the epithelium lies on collagen-structured connective tissue. The authors see in these conditions an explanation for the obtained results of the texture analysis.

## 5. Conclusions

1. Fractal dimension and texture analysis was a useful and objective method for assessing the treatment effects on venous lake lesions treated with diode lasers;
2. The fractal dimension and microcontrast of a vascular lesion were mutually coupled;
3. Fractal dimensions of the venous lakes were significantly lower than healthy mucosa. There was no statistical difference between the FDs of healthy mucosa and the lesions 3 months after treatment.
4. The venous lake lesions had significantly lower contrast than normal mucosa (similar site conditions 7 days after treatment). After 3 months, the treated site achieved texture features that were the same as the intact mucosa.
5. The non-contact mode of the 980 nm diode laser was an effective and safe method of treating a venous lake.

**Author Contributions:** Conceptualization, K.J. and M.K.; methodology, K.J.; software, K.J. and M.K.; validation, M.T., M.K. and K.J.; formal analysis, M.T. and K.J.; investigation, M.T. and K.J.; resources, M.T., M.K. and K.J.; data curation, M.T.; writing—original draft preparation, M.T., M.K. and K.J.; writing—review and editing, M.T. and K.J.; visualization, K.J.; supervision, K.J.; project administration, K.J.; funding acquisition, M.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by Medical University of Lodz Grant Numbers 503-1-138-01-503-51-001-17, 503-1-138-01-503-51-001-18 and 503-1-138-01-503-51-001-19-00.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Bioethics Committee at the Medical University of Wrocław, Approval Number KB—805/2019 No CWN UMED: BW—110.

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study. Written informed consent has been obtained from the patients to publish this paper.

**Data Availability Statement:** Data are available from the authors at mateusz.trafalski@umed.wroc.pl, kamil.jurczynszyn@umed.wroc.pl.

**Acknowledgments:** Marzena Dominiak, Vice Rector of Development Strategy, Wrocław Medical University, FDI Edu Committee, President of Polish Dental Association.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Alcalay, J.; Sandbank, M. The ultrastructure of cutaneous venous lakes. *Int. J. Dermatol.* **1987**, *26*, 645–646. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Bean, W.B.; Walsh, J.R. Venous lakes. *AMA Arch. Dermatol.* **1956**, *74*, 459–463. [[CrossRef](#)]
- Migliari, D.; Vieira, R.R.; Nakajima, E.K.; Azevedo, L.H. Successful Management of Lip and Oral Venous Varices by Photocoagulation with Nd:YAG Laser. *J. Contemp. Dent. Pract.* **2015**, *16*, 723–726. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Tobouti, L.T.; Olegário, I.; de Sousa, S.C. Benign vascular lesions of the lips: Diagnostic approach. *J. Cutan. Pathol.* **2017**, *44*, 451–455. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Suhonen, R.; Kuflik, E.G. Venous lakes treated by liquid nitrogen cryosurgery. *Br. J. Dermatol.* **1997**, *137*, 1018–1019. [[CrossRef](#)]
- Mlacker, S.; Shah, V.V.; Aldahan, A.S.; McNamara, C.A.; Kamath, P.; Nouri, K. Laser and light-based treatments of venous lakes: A literature review. *Lasers Med. Sci.* **2016**, *31*, 1511–1519. [[CrossRef](#)]
- Ah-Weng, A.; Natarajan, S.; Velangi, S.; Langtry, J.A. Venous lakes of the vermilion lip treated by infrared coagulation. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* **2004**, *42*, 251–253. [[CrossRef](#)]
- Poonia, K.; Kumar, A.; Thami, G.P. Intralesional radiofrequency treatment for venous lake. *Int. J. Dermatol.* **2019**, *58*, 854–855. [[CrossRef](#)]
- Khalkhal, E.; Razzaghi, M.; Rostami-Neja, M.; Rezaei-Tavirani, M.; Beigvand, H.H.; Tavirani, M.R. Evaluation of Laser Effects on the Human Body after Laser Therapy. *J. Lasers Med. Sci.* **2020**, *11*, 91–97. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Chaber, R.; Łasecki, M.; Kuczyński, K.; Cebryk, R.; Kwaśnicka, J.; Olchowcy, C.; Łach, K.; Pogodajny, Z.; Koptiuk, O.; Olchowcy, A.; et al. Hounsfield units and fractal dimension (test HUFRA) for determining PET positive/negative lymph nodes in pediatric Hodgkin's lymphoma patients. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0229859. [[CrossRef](#)]
- Irie, M.S.; Rabelo, G.D.; Spin-Neto, R.; Dechichi, P.; Borges, J.S.; Soares, P.B.F. Use of Micro-Computed Tomography for Bone Evaluation in Dentistry. *Braz. Dent. J.* **2018**, *29*, 227–238. [[CrossRef](#)]
- Southard, T.E.; Southard, K.A.; Jakobsen, J.R.; Hillis, S.L.; Najim, C.A.T.; Southard, E.; Southard, K.A.; Jakobsen, J.R.; Hillis, S.L.; Najim, C.A. Fractal dimension in radiographic analysis of alveolar process bone. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endodontol.* **1996**, *82*, 569–576. [[CrossRef](#)]
- Goutzanis, L.P.; Papadogeorgakis, N.; Pavlopoulos, P.M.; Petsinis, V.; Plochoras, I.; Eleftheriadis, E.; Pantelidaki, A.; Patsouris, E.; Alexandridis, C. Vascular fractal dimension and total vascular area in the study of oral cancer. *Head Neck* **2009**, *31*, 298–307. [[CrossRef](#)]
- Materka, A. What is the texture. In *Texture Analysis for Magnetic Resonance Imaging*; Hajek, M., Dezortova, M., Materka, A., Lerski, R., Eds.; Med4publishing: Prague, Czech Republic, 2006; pp. 7–41. ISBN 80-903660-0-7. (EU COST, Action B21).
- Lubner, M.G.; Smith, A.D.; Sandrasegaran, K.; Sahani, D.V.; Pickhardt, P.J. CT Texture Analysis: Definitions, Applications, Biologic Correlates, and Challenges. *Radiographics* **2017**, *37*, 1483–1503. [[CrossRef](#)]
- Guo, C.; Zhuge, X.; Wang, Q.; Xiao, W.; Wang, Z.; Wang, Z.; Feng, Z.; Chen, X. The differentiation of pancreatic neuroendocrine carcinoma from pancreatic ductal adenocarcinoma: The values of CT imaging features and texture analysis. *Cancer Imaging* **2018**, *18*, 37. [[CrossRef](#)]
- Wu, M.; Krishna, S.; Thornhill, R.E.; Flood, T.A.; McInnes, M.D.F.; Schieda, N. Transition zone prostate cancer: Logistic regression and machine-learning models of quantitative ADC, shape and texture features are highly accurate for diagnosis. *J. Magn. Reson. Imaging* **2019**, *50*, 940–95030. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Li, Z.; Yu, L.; Wang, X.; Yu, H.; Gao, Y.; Ren, Y.; Wang, G.; Zhou, X. Diagnostic Performance of Mammographic Texture Analysis in the Differential Diagnosis of Benign and Malignant Breast Tumors. *Clin. Breast Cancer* **2018**, *18*, e621–e627. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Haralick, R.M. Statistical and structural approaches to texture. *Proc. IEEE* **1979**, *67*, 786–804. [[CrossRef](#)]
- Materka, A.; Strzelecki, M. *Texture Analysis Methods—A Review*; COST B11 Report; Institute of Electronics, Technical University of Lodz: Brussels, Belgium, 1998.

21. Menni, S.; Marconi, M.; Boccardi, D.; Betti, R. Venous lakes of the lips: Prevalence and associated factors. *Acta Derm. Venereol.* **2014**, *94*, 74–75. [[CrossRef](#)]
22. Cebeci, D.; Karasel, S.; Yaşarc, S. Venous Lakes of the Lips Successfully Treated with a Sclerosing Agent 1% polidocanol: Analysis of 25 report cases. *Int. J. Surg. Case Rep.* **2021**, *78*, 265–269. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Azevedo, L.H.; Galletta, V.C.; Eduardo, C.D.P.; Migliari, D.A. Venous Lake of the Lips Treated Using Photocoagulation with High-Intensity Diode Laser. *Photomed. Laser Surg.* **2010**, *28*, 263–265. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Voynov, P.P.; Tomov, G.T.; Mateva, N.G. Minimal Invasive Approach for Lips Venous Lake Treatment by 980 nm Diode Laser with Emphasis on the Aesthetic Results. A Clinical Series. *Folia Med.* **2016**, *58*, 101–107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Wall, T.L. Current Concepts: Laser Treatment of Adult Vascular Lesions. *Semin. Plast. Surg.* **2007**, *21*, 147–158. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Eivazi, B.; Wiegand, S.; Teymoortash, A.; Neff, A.; Werner, J.A. Laser treatment of mucosal venous malformations of the upper aerodigestive tract in 50 patients. *Lasers Med. Sci.* **2010**, *25*, 571–576. [[CrossRef](#)]
27. Romeo, U.; Del Vecchio, A.; Russo, C.; Palaia, G.; Gaimari, G.; Arnabat-Dominguez, J.; España, A.J. Laser treatment of 13 benign oral vascular lesions by three different surgical techniques. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal* **2013**, *18*, 279–284. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Asai, T.; Suzuki, H.; Takeuchi, J.; Komori, T. Effectiveness of photocoagulation using an Nd:YAG laser for the treatment of vascular malformations in the oral region. *Photomed. Laser Surg.* **2014**, *32*, 75–80. [[CrossRef](#)]
29. Miyazaki, H.; Ohshiro, T.; Romeo, U.; Noguchi, T.; Maruoka, Y.; Gaimari, G.; Tomov, G.; Wada, Y.; Tanaka, K.; Ohshiro, T.; et al. Retrospective Study on Laser Treatment of Oral Vascular Lesions Using the "Leopard Technique": The Multiple Spot Irradiation Technique with a Single-Pulsed Wave. *Photomed. Laser Surg.* **2018**, *36*, 320–325. [[CrossRef](#)]
30. del Pozo, J.; Peña, C.; García Silva, J.; Goday, J.J.; Fonseca, E. Venous lakes: A report of 32 cases treated by carbon dioxide laser vaporization. *Dermatol. Surg.* **2003**, *29*, 308–331. [[CrossRef](#)]
31. Bekhor, P.S. Long-pulsed Nd:YAG laser treatment of venous lakes: Report of a series of 34 cases. *Dermatol. Surg.* **2006**, *32*, 1151–1154. [[CrossRef](#)]
32. Wang, Z.; Ke, C.; Yang, M.; Lai, M.; Qi, N.; Ke, Y. Analysis of the Curative Effect of Alexandrite Laser in the Treatment of Venous Lake of Lips. *Lasers Surg. Med.* **2020**, *25*. [[CrossRef](#)]
33. Becher, G.L.; Cameron, H.; Moseley, H. Treatment of superficial vascular lesions with the KTP 532-nm laser: Experience with 647 patients. *Lasers Med. Sci.* **2014**, *29*, 267–271. [[CrossRef](#)]
34. Nammour, S.; El Mobadder, M.; Namour, M.; Namour, A.; Arnabat-Dominguez, J.; Grzech-Leśniak, K.; Vanheusden, A.; Vescovi, P. Aesthetic Treatment Outcomes of Capillary Hemangioma, Venous Lake, and Venous Malformation of the Lip Using Different Surgical Procedures and Laser Wavelengths (Nd:YAG, Er,Cr:YSGG, CO<sub>2</sub>, and Diode 980 nm). *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2020**, *17*, 8665. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Bacci, C.; Sacchetto, L.; Zanette, G.; Sivolella, S. Diode laser to treat small oral vascular malformations: A prospective case series study. *Lasers Surg. Med.* **2018**, *50*, 111–116. [[CrossRef](#)]
36. Jurczyszyn, K.; Kozakiewicz, M. Application of texture and fractal dimension analysis to estimate effectiveness of oral leukoplakia treatment using an Er:YAG laser—A prospective study. *Materials* **2020**, *13*, 3614. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Lucchese, A.; Gentile, E.; Capone, G.; De Vico, G.; Serpico, R.; Landini, G. Fractal analysis of mucosal microvascular patterns in oral lichen planus: A preliminary study. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.* **2015**, *120*, 609–615. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Iqbal, J.; Patil, R.; Khanna, V.; Tripathi, A.; Singh, V.; Munshi, M.A.I.; Tiwari, R. Role of fractal analysis in detection of dysplasia in potentially malignant disorders. *J. Fam. Med. Prim. Care* **2020**, *31*, 2448–2453. [[CrossRef](#)]
39. Kozakiewicz, M.; Wach, T. New oral surgery materials for bone reconstruction—Comparison of five bone substitute materials for dentoalveolar augmentation. *Materials* **2020**, *13*, 2935. [[CrossRef](#)]
40. Kozakiewicz, M.; Szymor, P.; Wach, T. Influence of General Mineral Condition on Collagen-Guided Alveolar Crest Augmentation. *Materials* **2020**, *13*, 3649. [[CrossRef](#)]
41. Wach, T.; Kozakiewicz, M. Fast-Versus Slow-Resorbable Calcium Phosphate Bone Substitute Materials—Texture Analysis after 12 Months of Observation. *Materials* **2020**, *13*, 3854. [[CrossRef](#)]
42. Wach, T.; Kozakiewicz, M. Are recent available blended collagen-calcium phosphate better than collagen alone or crystalline calcium phosphate? Radiotextural analysis of a 1-year clinical trial. *Clin. Oral Investig.* **2020**, *25*, 3711–3718. [[CrossRef](#)]
43. Kołaciński, M.; Kozakiewicz, M.; Materka, A. Textural entropy as a potential feature for quantitative assessment of jaw bone healing process. *Arch. Med. Sci.* **2015**, *16*, 78–84. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Hadrowicz, J.; Hadrowicz, P.; Gesing, A.; Kozakiewicz, M. Age Dependent Alteration in Bone Surrounding Dental Implant. *Dent. Med. Probl.* **2014**, *51*, 27–34.
45. Kozakiewicz, M.; Hadrowicz, P.; Hadrowicz, J.; Gesing, A. Can Torque Force During Dental Implant Placement Combined with Bone Mineral Density of Lumbar Spine Be Prediction Factors for Crestal Bone Structure Alterations? *Dent. Med. Probl.* **2014**, *51*, 448–457.
46. Kozakiewicz, M.; Marciniak-Hoffman, A.; Denkowski, M. Long term comparison of application of two betatricalcium phosphates in oral surgery. *Dent. Med. Probl.* **2009**, *46*, 284–388.
47. Kozakiewicz, M.; Marciniak-Hoffman, A.; Olszycki, M. Comparative Analysis of Three Bone Substitute Materials Based on Co-Occurrence Matrix. *Dent. Med. Probl.* **2010**, *47*, 23–29.
48. Kozakiewicz, M.; Dudek, D.; Materka, A. Influence of dental implant design to jaw bone structure. *J. Cran. Maxillofac. Surg.* **2008**, *36* (Suppl. 1), S143. [[CrossRef](#)]

### III. ZAŁĄCZNIKI

#### 1. Informacje o indywidualnym wkładzie współautorów

Wrocław, 16.05.2022

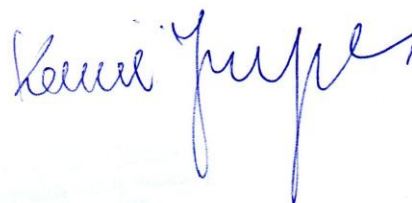
Lek. dent. Mateusz Trafalski  
Katedra i Zakład Chirurgii Stomatologicznej  
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu im. Piastów Śląskich  
Krakowska 26, 50-425 Wrocław

#### OŚWIADCZENIE WNIOSKODAWCY

Oświadczam, że w pracy **Treatment of the facial basal cell carcinoma with the use of photodynamic therapy: A case report**, Mateusz Trafalski, Klaudia Kazubowska, Kamil Jurczyszyn, 2019, Dent Med Porbl., 56(1):105-110, mój udział polegał na: gromadzeniu i analizie danych, zebraniu dokumentacji fotograficznej, pisaniu treści publikacji, zilustrowaniu rycin 1, 2, 3, 4, 5, 6, zebraniu piśmiennictwa.

Podpis

  
lek. dent. Mateusz Trafalski  
specjalista chirurgii stomatologicznej  
2004826



Wrocław, 15.05.2022

Dr n. med. Klaudia Kazubowska - Machnowska  
Akademicka Poliklinika Stomatologiczna  
Stomatologiczne Centrum Transferu Technologii Sp. Z o.o.  
ul. Krakowska 26, 50-425 Wrocław

### OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA

Oświadczam, że w pracy: **Treatment of the facial basal cell carcinoma with the use of photodynamic therapy: A case report**, Mateusz Trafalski, Klaudia Kazubowska, Kamil Jurczyszyn, 2019, Dent Med Porbl., 56(1):105-110, mój udział polegał na: pisaniu tekstu publikacji oraz analizie i interpretacji danych.

Podpis

*Klaudia Kazubowska-Machnowska*

doktor nauk medycznych  
Klaudia Kazubowska-Machnowska  
lekarz dentysta  
3131556

*Kamil Jurczyszyn*

dr hab. Kamil Jurczyszyn  
Leczenie stomatologiczne  
50-425 Wrocław



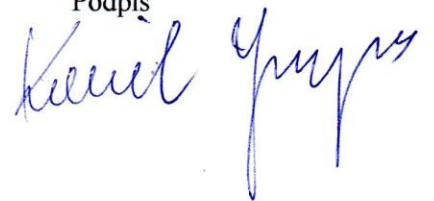
Wrocław, 05.05.2022

Dr hab. n. med. Kamil Jurczyszyn  
Katedra i Zakład Chirurgii Stomatologicznej  
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu  
Krakowska 26, 50-425 Wrocław

#### OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy: **Treatment of the facial basal cell carcinoma with the use of photodynamic therapy: A case report**, Mateusz Trafalski, Klaudia Kazubowska, Kamil Jurczyszyn, 2019, Dent Med Probl., 56(1):105-110, mój udział polegał na: opracowaniu koncepcji projektu, ostatecznej akceptacji artykułu.

Podpis



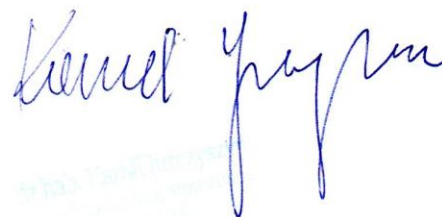
Wrocław, 05.05.2022

Dr hab. n. med. Kamil Jurczyszyn  
Katedra i Zakład Chirurgii Stomatologicznej  
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu  
Krakowska 26, 50-425 Wrocław

#### OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA

Oświadczam, że w pracy **Assessment of Effects of Laser Light Combining Three Wavelengths (450, 520 and 640 nm) on Temperature Increase and Depth of Tissue Lesions in an Ex Vivo Study**, Kamil Jurczyszyn, Witold Trzeciakowski, Zdzisław Woźniak, Piotr Ziółkowski, Mateusz Trafalski, 2020, Materials, 13(23), 5340 [16 s.], mój udział polegał na: przeprowadzeniu badań, opracowaniu koncepcji projektu, pisaniu treści publikacji, nadzorowaniu projektu, metodologii, walidacji, zarządzaniem projektu, wykonywaniu badań, analizie statystycznej wyników badań.

Podpis



Warszawa, 18.05.2022

Prof. dr hab. Witold Trzeciakowski  
Instytut Wysokich Ciśnień Polskiej Akademii Nauk  
ul. Sokołowska 29, 01-142 Warszawa

### OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy **Assessment of Effects of Laser Light Combining Three Wavelengths (450, 520 and 640 nm) on Temperature Increase and Depth of Tissue Lesions in an Ex Vivo Study**, Kamil Jurczyszyn, Witold Trzeciakowski, Zdzisław Woźniak, Piotr Ziółkowski, Mateusz Trafalski, 2020, Materials, 13(23), 5340 [16 s.], mój udział polegał na: udziale w zaprojektowaniu i budowie lasera (numer patentu: 9 223 123, B2; data patentu: 29 grudnia 2015), udostępnieniu lasera do badań, opracowaniu koncepcji projektu, nadzorowaniu projektu.

18/05/2022

Witold Trzeciakowski

Podpis

Kamil Jurczyszyn

dr hab. Kamil Jurczyszyn  
Instytut Wysokich Ciśnień  
01-142 Warszawa

Wrocław, 13.05.2022

Dr n. med. Zdzisław Woźniak  
Katedra i Zakład Patomorfologii  
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu  
ul. Marcinkowskiego 1, 50-368 Wrocław

### OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy **Assessment of Effects of Laser Light Combining Three Wavelengths (450, 520 and 640 nm) on Temperature Increase and Depth of Tissue Lesions in an Ex Vivo Study**, Kamil Jurczyszyn, Witold Trzeciakowski, Zdzisław Woźniak, Piotr Ziółkowski, Mateusz Trafalski, 2020, Materials, 13(23), 5340 [16 s], mój udział polegał na: walidacji projektu oraz ocenie preparatów histopatologicznych.

Podpis

*Zdzisław Woźniak*  
dr n. med. Zdzisław Woźniak  
specjalista dermatolog  
patomorfolog  
5560465  
tel. 505 849 407

*Kamil Jurczyszyn*

dr hab. Kamil Jurczyszyn  
specjalista chirurg stomatologiczny  
1845635

Wrocław, 16.05.2022

Prof. Dr hab. Piotr Ziółkowski  
Katedra i Zakład Patomorfologii  
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu  
ul. Marcinkowskiego 1, 50-368 Wrocław


### OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA

Oświadczam, że w pracy **Assessment of Effects of Laser Light Combining Three Wavelengths (450, 520 and 640 nm) on Temperature Increase and Depth of Tissue Lesions in an Ex Vivo Study**, Kamil Jurczyszyn, Witold Trzeciakowski, Zdzisław Woźniak, Piotr Ziółkowski, Mateusz Trafalski, 2020, *Materials*, 13(23), 5340, [16 s.], mój udział polegał na: nadzorze projektu oraz ocenie preparatów histopatologicznych.

Podpis

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu  
Katedra Patologii Klinicznej i Doświadczalnej  
ZAKŁAD PATOLOGII OGÓLNEJ I DOŚWIADCZALNEJ  
kierownik

prof. dr hab. Piotr Ziółkowski



dr hab. Kamil Jurczyszyn  
specjalista chirurgii onkologicznej  
1845635

Wrocław, 16.05.2022

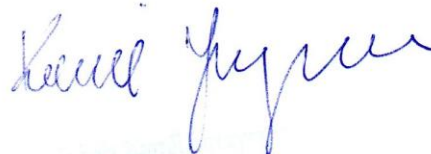
Lek. dent. Mateusz Trafalski  
Katedra i Zakład Chirurgii Stomatologicznej  
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu im. Piastów Śląskich  
Krakowska 26, 50-425 Wrocław

#### OŚWIADCZENIE WNIOSKODAWCY

Oświadczam, że w pracy **Assessment of Effects of Laser Light Combining Three Wavelengths (450, 520 and 640 nm) on Temperature Increase and Depth of Tissue Lesions in an Ex Vivo Study**, Kamil Jurczyszyn, Witold Trzeciakowski, Zdzisław Woźniak, Piotr Ziółkowski, Mateusz Trafalski, 2020, Materials, 13(23), 5340 [16 s.], mój udział polegał na: opracowaniu koncepcji projektu, wykonywaniu badań (wykonywaniu procedur z użyciem lasera, pobieraniu wycinków do dalszej analizy histopatologicznej, analizie danych z kamery termowizyjnej), walidacji projektu, kierowaniu projektem, pisaniu treści publikacji, zilustrowaniu rycin 1, 2, 3, 4, A1 oraz tabeli 1, 2, 3, A1, przeglądzie piśmiennictwa.

Podpis

  
Lek. dent. Mateusz Trafalski  
specjalista chirurgii stomatologicznej  
2004826



Wrocław, 16.05.2022

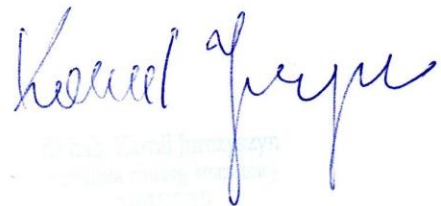
Lek. dent. Mateusz Trafalski  
Katedra i Zakład Chirurgii Stomatologicznej  
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu im. Piastów Śląskich  
Krakowska 26, 50-425 Wrocław

### OŚWIADCZENIE WNIOSKODAWCY

Oświadczam, że w pracy **Application of Fractal Dimension and Texture Analysis to Evaluate the Effectiveness of Treatment of a Venous Lake in the Oral Mucosa Using a 980 nm Diode Laser—A Preliminary Study**, Mateusz Trafalski, Marcin Kozakiewicz, Kamil Jurczyszyn, 2021, *Materials*, 14(15), 4140 [13 s.], mój udział polegał na: opracowaniu koncepcji projektu, przygotowaniu wniosku do Komisji Bioetycznej w celu uzyskania zgody na badania, przeprowadzeniu badań (kwalifikacja pacjentów do badań, wykonanie procedur terapeutycznych z użyciem lasera), gromadzeniu i analizie danych (wykonanie dokumentacji fotograficznej przed leczeniem, w trakcie oraz po leczeniu, przygotowanie wykonanych fotografii do dalszej analizy tekstur oraz wymiaru fraktalnego), walidacji projektu, pisaniu treści publikacji, zilustrowaniu rycin 1,2 oraz tabeli 1, 2, zebraniu piśmiennictwa oraz jego przeglądzie.

Podpis

  
Lek. dent. Mateusz Trafalski  
specjalista chirurgii stomatologicznej  
2004826

  
dr hab. Kamil Jurczyszyn  
specjalista chirurgii stomatologicznej  
2004826

Łódź, 20.05.2022

Prof. dr hab. Marcin Kozakiewicz  
Klinika Chirurgii Szczękowo-Twarzowej  
Uniwersytet Medyczny w Łodzi  
Ul. Zeromskiego 113S, 90-549 Łódź

#### OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA

Oświadczam, że w pracy **Application of Fractal Dimension and Texture Analysis to Evaluate the Effectiveness of Treatment of a Venous Lake in the Oral Mucosa Using a 980 nm Diode Laser—A Preliminary Study**, Mateusz Trafalski, Marcin Kozakiewicz, Kamil Jurczyszyn, 2021, Materials, 14(15), 4140, [13 s.], mój udział polegał na: opracowaniu koncepcji projektu, walidacji projektu, analizie statystycznej wyników badań, zilustrowaniu rycin 3, 4 oraz tabeli 3.

**Marcin  
Kozakiewicz**

Elektronicznie podpisany przez  
Marcin Kozakiewicz  
Data: 2022.05.21 10:22:42  
+02'00'

Podpis



dr hab. Kamil  
specjalista chirurgii  
1845635



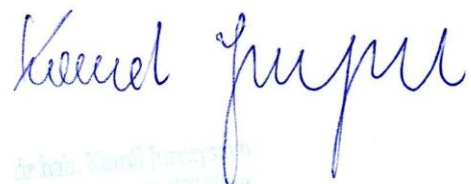
Wrocław, 05.05.2022

Dr hab. n. med. Kamil Jurczyszyn  
Katedra i Zakład Chirurgii Stomatologicznej  
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu  
ul. Krakowska 26, 50-425 Wrocław

#### OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy **Application of Fractal Dimension and Texture Analysis to Evaluate the Effectiveness of Treatment of a Venous Lake in the Oral Mucosa Using a 980 nm Diode Laser—A Preliminary Study**, Mateusz Trafalski, Marcin Kozakiewicz, Kamil Jurczyszyn, 2021, *Materials*, 14(15), 4140 [13 s.], mój udział polegał na: opracowaniu koncepcji projektu, walidacji projektu, metodologii, analizie danych, analizie statystycznej wyników badań.

Podpis



Dr hab. Kamil Jurczyszyn  
Katedra i Zakład Chirurgii Stomatologicznej  
50-425 Wrocław

## 2. *Opinia komisji bioetycznej*

1

KOMISJA BIOETYCZNA  
przy  
Uniwersytecie Medycznym  
we Wrocławiu  
ul. Pasteura 1; 50-367 WROCLAW

### OPINIA KOMISJI BIOETYCZNEJ Nr KB – 805/2019

Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu, powołana zarządzeniem Rektora Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu nr 133/XV R/2017 z dnia 21 grudnia 2017 r. oraz działająca w trybie przewidzianym rozporządzeniem Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. (Dz.U. nr 47, poz. 480) na podstawie ustawy o zawodzie lekarza z dnia 5 grudnia 1996 r. (Dz.U. nr 28 z 1997 r. poz. 152 z późniejszymi zmianami ) w składzie:

prof. dr hab. Jacek Daroszewski (choroby wewnętrzne, endokrynologia, diabetologia)  
prof. dr hab. Krzysztof Grabowski (chirurgia)  
dr Henryk Kaczkowski (chirurgia szczękowa, chirurgia stomatologiczna)  
mgr Irena Knabel-Krzyszowska (farmacja)  
prof. dr hab. Jerzy Liebhart (choroby wewnętrzne, alergologia)  
ks. dr hab. Piotr Mrzygłód, prof. nadzw. (duchowny)  
mgr Luiza Müller (prawo)  
dr hab. Sławomir Sidorowicz (psychiatria)  
prof. dr hab. Leszek Szenborn, (pediatria, choroby zakaźne)  
Danuta Tarkowska (pielęgniarstwo)  
prof. dr hab. Anna Wiela-Hojeńska (farmakologia kliniczna)  
dr hab. Andrzej Wojnar, prof. nadzw. (histopatologia, dermatologia) przedstawiciel  
Dolnośląskiej Izby Lekarskiej)  
dr hab. Jacek Zieliński (filozofia)

pod przewodnictwem

prof. dr hab. Jana Kornafela ( ginekologia i położnictwo, onkologia)

Przestrzegając w działalności zasad Good Clinical Practice oraz zasad Deklaracji Helsińskiej, po zapoznaniu się z projektem badawczym pt.

„Ocena skuteczności leczenia zmian naczyniowych w obrębie błony śluzowej jamy ustnej przy użyciu trzech metod terapeutycznych: fotoablacji przezśluzówkowej, fotoablacji wewnątrz zmiany oraz skleroterapii Aethoxysklerol 3%”

zgłoszonym przez **lek. dent. Mateusza Trafalskiego** zatrudnionego w Katedrze i Zakładzie Chirurgii Stomatologicznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu oraz złożonymi wraz z wnioskiem dokumentami, w tajnym głosowaniu postanowiła wyrazić zgodę na przeprowadzenie badania w Katedrze i Zakładzie Chirurgii Stomatologicznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu pod nadzorem **pod warunkiem zachowania anonimowości uzyskanych danych.**

Uwaga: Badanie to zostało objęte ubezpieczeniem odpowiedzialności cywilnej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu z tytułu prowadzonej działalności:

Pouczenie: W ciągu 14 dni od otrzymania decyzji wnioskodawcy przysługuje prawo odwołania do Komisji Odwoławczej za pośrednictwem Komisji Bioetycznej UM we Wrocławiu

Opinia powyższa dotyczy: projektów badawczych realizowanych poza działalnością statutową

Nr rejestrowy CWN UMW: BW - 110

Opinia jest ważna do dnia 31 grudnia 2022 r. (3 lata)

Wrocław, dnia 2 grudnia 2019 r.  
BW

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu  
KOMISJA BIOETYCZNA  
przewodniczący  
prof. dr hab. Jan Komafel

KOMISJA BIOETYCZNA  
przy  
Uniwersytecie Medycznym  
we Wrocławiu  
ul. Pasteura 1; 50-367 WROCŁAW

OPINIA KOMISJI BIOETYCZNEJ Nr KB – 14/2020

Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu, powołana zarządzeniem Rektora Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu nr 133/XV R/2017 z dnia 21 grudnia 2017 r. oraz działająca w trybie przewidzianym rozporządzeniem Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. (Dz.U. nr 47, poz. 480) na podstawie ustawy o zawodzie lekarza z dnia 5 grudnia 1996 r. (Dz.U. nr 28 z 1997 r. poz. 152 z późniejszymi zmianami ) w składzie:

prof. dr hab. Jacek Daroszewski (choroby wewnętrzne, endokrynologia, diabetologia)  
prof. dr hab. Krzysztof Grabowski (chirurgia)  
dr Henryk Kaczkowski (chirurgia szczękowa, chirurgia stomatologiczna)  
mgr Irena Knabel-Krzyszowska (farmacja)  
prof. dr hab. Jerzy Liebhart (choroby wewnętrzne, alergologia)  
ks. dr hab. Piotr Mrzygłód, prof. nadzw. (duchowny)  
mgr Luiza Müller (prawo)  
dr hab. Sławomir Sidorowicz (psychiatria)  
prof. dr hab. Leszek Szenborn, (pediatria, choroby zakaźne)  
Danuta Tarkowska (pielęgniarstwo)  
prof. dr hab. Anna Wiela-Hojeńska (farmakologia kliniczna)  
dr hab. Andrzej Wojnar, prof. nadzw. (histopatologia, dermatologia) przedstawiciel  
Dolnośląskiej Izby Lekarskiej)  
dr hab. Jacek Zieliński (filozofia)

pod przewodnictwem  
prof. dr hab. Jana Kornafela ( ginekologia i położnictwo, onkologia)

Przestrzegając w działalności zasad Good Clinical Practice oraz zasad Deklaracji Helsińskiej, po zapoznaniu się z wnioskiem zgłoszonym przez **lek. dent. Mateusza Trafalskiego** zatrudnionego w Katedrze i Zakładzie Chirurgii Stomatologicznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu do projektu badawczego pt.

„Ocena skuteczności leczenia zmian naczyniowych w obrębie błony śluzowej jamy ustnej przy użyciu trzech metod terapeutycznych: fotoablacji przezśluzówkowej, fotoablacji wewnątrz zmiany oraz skleroterapii Aethoxysklerol 3%”

w tajnym głosowaniu postanowiła wyrazić zgodę na:

- dodanie do projektu metody badawczej o nazwie „fotokoagulacja techniką Leopard,
- zmianę formalną nazwy dwóch metod wymienionych we wniosku:  
z: „fotoablacja wewnątrz zmiany” na: „fotokoagulacja wewnątrz zmiany,  
oraz  
z: fotoablacja przezśluzówkowa” na: „fotokoagulacja przezśluzówkowa”.

Po wprowadzeniu dodatkowej metody badawczej następuje **zmiana tytułu projektu na:**

„Ocena skuteczności leczenia zmian naczyniowych w obrębie błony śluzowej jamy ustnej przy użyciu czterech metod terapeutycznych: fotokoagulacji przezśluzówkowej, fotokoagulacji wewnątrz zmiany, fotokoagulacji metodą Leopard oraz skleroterapii Aethoxysklerol 3%”

Badanie prowadzone jest w Katedrze i Zakładzie Chirurgii Stomatologicznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu **pod warunkiem zachowania anonimowości uzyskanych danych.**

Uwaga: Badanie to zostało objęte ubezpieczeniem odpowiedzialności cywilnej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu z tytułu prowadzonej działalności:

Pouczenie: W ciągu 14 dni od otrzymania decyzji wnioskodawcy przysługuje prawo odwołania do Komisji Odwoławczej za pośrednictwem Komisji Bioetycznej UM we Wrocławiu

Opinia powyższa dotyczy: projektów badawczych realizowanych poza działalnością statutową

Nr rejestrowy CWN UMW: BW - 110

Opinia jest ważna do dnia 31 grudnia 2022 r. (3 lata)

Projekt otrzymał opinie komisji nr: KB – 805/2019

Wrocław, dnia 16 stycznia 2020 r.  
BW

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu  
KOMISJA BIOETYCZNA  
przewodniczący  
prof. dr hab. Jan Kornafel

#### **IV. WYKAZ PUBLIKACJI I STRESZCZEŃ ZJAZDOWYCH AUTORA**

##### **1. Publikacje w czasopiśmie naukowym posiadającym Impact Factor**

1. Assessment of effects of laser light combining three wavelengths (450, 520 and 640 nm) on temperature increase and depth of tissue lesions in an ex vivo study. [AUT. KORESP.] KAMIL JURCZYSZYN, [AUT.] WITOLD TRZECIAKOWSKI, ZDZISŁAW WOŹNIAK, PIOTR ZIÓŁKOWSKI, MATEUSZ TRAFALSKI. Materials 2020 Vol.13 no.23 art.5340 [16 s.], ryc., tab., bibliogr. 36 poz., summ. DOI: 10.3390/ma13235340

IF: 3,623, Pkt. MNiSW/KBN: 140

2. Application of fractal dimension and texture analysis to evaluate the effectiveness of treatment of a venous lake in the oral mucosa using a 980 nm diode laser - a preliminary study. [AUT.] MATEUSZ TRAFALSKI, MARCIN KOZAKIEWICZ, [AUT. KORESP.] KAMIL JURCZYSZYN. Materials 2021 Vol.14 no.15 art.4140 [13 s.], ryc., tab., bibliogr. 48 poz., summ. DOI: 10.3390/ma14154140

IF: 3,623, Pkt. MNiSW/KBN: 140

##### **2. Publikacje w czasopiśmie naukowym nieposiadającym Impact Factor**

1. Treatment of the facial basal cell carcinoma with the use of photodynamic therapy: a case report. MATEUSZ TRAFALSKI, KLAUDIA KAZUBOWSKA, KAMIL JURCZYSZYN. Dent.Med.Probl. 2019 Vol.56 no.1 s.105-110, ryc., bibliogr. 26 poz., summ. DOI: 10.17219/dmp/100507

Pkt. MNiSW/KBN: 70

### 3. Streszczenia zjazdowe

1. Leczenie naczyniaka błony śluzowej policzka przy użyciu lasera diodowego Lasotronix - opis przypadku. [AUT.] MATEUSZ TRAFALSKI, OLGA SZACHNOWSKA. W: IX Sympozjum "Współczesna myśl techniczna w naukach medycznych i biologicznych". Wrocław, 22-23 czerwca 2018 r. Materiały konferencyjne Wrocław 2018, Oddział Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu, s.137-138, bibliogr. 1 poz, 978-83-942714-8-0.

2. Postępowanie rehabilitacyjne u dzieci z porażeniem nerwu twarzowego, hospitalizowanych w Oddziale Rehabilitacji Dziecięcej (The process of rehabilitation in children with facial nerve paralysis, hospitalized in Department of Pediatric Rehabilitation). [AUT.] AGATA TRAFALSKA, MATEUSZ TRAFALSKI, WOJCIECH BOROWICZ, ANNA MARIA CHOIŃSKA, EWA GIEYSZTOR. W: Międzynarodowy Dzień Inwalidy - XXIV-edycja "Życie bez bólu. Zdrowe dzieci - zdrowa Europa". Zgorzelec, 15-17 marca 2018 roku. Streszczenia [CD-ROM] Zgorzelec 2018, "Obrzeża" Oficyna Wydawnicza, s.231-232 poz.199, 978-83-88380-76-1.

3. Wpływ czynników socjodemograficznych na jakość życia pacjentów z Zespołem Post (Polio Influence of sociodemographic factors on quality of life of patients with Post Polio Syndrome). [AUT.] WOJCIECH BOROWICZ, AGATA TRAFALSKA, MATEUSZ TRAFALSKI, LESZEK SZENBORN. W: Międzynarodowy Dzień Inwalidy - XXIV-edycja "Życie bez bólu. Zdrowe dzieci - zdrowa Europa". Zgorzelec, 15-17 marca 2018 roku. Streszczenia [CD-ROM] Zgorzelec 2018, "Obrzeża" Oficyna Wydawnicza, s.166 poz.140, 978-83-88380-76-1.

4. Korelacje między występowaniem dolegliwości bólowych kręgosłupa a stylem życia współczesnych nastolatków. [AUT.] AGATA TRAFALSKA, ANNA KRZESIŃSKA-NOWACKA, MATEUSZ TRAFALSKI, MAGDALENA KAZIMIERSKA-ZAJĄC. W: X Sympozjum "Współczesna myśl techniczna w naukach medycznych i biologicznych". Wrocław, 14-15 czerwca 2019 r. Materiały konferencyjne Wrocław 2019, Oddział Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu, s.125-127, bibliogr. 10 poz, 978-83-942714-9-7.

5. Użycie lasera biostymulacyjnego w leczeniu porażenia nerwu bródkowego o podłożu zapalnym - opis przypadku (The use of biostimulating laser in the treatment of mental nerve's paralysis with inflammatory nature - a case report). [AUT.] MATEUSZ TRAFALSKI, AGNIESZKA KUKAWCZYŃSKA-CHWAŁEK, AGATA TRAFALSKA, WOJCIECH BOROWICZ. W: Międzynarodowy Dzień Inwalidy - XXV-edycja "Życie bez bólu. Zdrowe dzieci - zdrowa Europa : wielka nauka dla małych pacjentów". Zgorzelec 28-30 marca 2019 roku. Streszczenia Zgorzelec 2019, "Obrzeża" Oficyna Wydawnicza, s.240-241 poz.P75,216, 978-83-88380-77-8.

6. Zniekształcenia ułożeniowe głowy - kompleksowe postępowanie terapeutyczne (Head deformities - comprehensive therapeutic treatment). [AUT.] AGATA TRAFALSKA, ANNA KRZESIŃSKA-NOWACKA, MATEUSZ TRAFALSKI, MAGDALENA KAZIMIERSKA-ZAJĄC, WOJCIECH BOROWICZ. W: Międzynarodowy Dzień Inwalidy - XXV-edycja "Życie bez bólu. Zdrowe dzieci - zdrowa Europa : wielka nauka dla małych pacjentów". Zgorzelec 28-30 marca 2019 roku. Streszczenia Zgorzelec 2019, "Obrzeża" Oficyna Wydawnicza, s.238-239 poz.P74,215, 978-83-88380-77-8.