

Лазерная доставка и спектральное исследование хлоринсодержащего препарата для лечения онихомикоза при последовательном лазерном ($\lambda = 2819 \text{ nm}$) и фотодинамическом ($\lambda = 656 \pm 10 \text{ nm}$) воздействии

© А.В. Беликов, С.Н. Смирнов, А.Д. Тавалинская[¶]

Университет ИТМО,
197101 Санкт-Петербург, Россия

[¶] e-mail: ntavalin@gmail.com

Поступила в редакцию 22.12.2020 г.

В окончательной редакции 19.01.2021 г.

Принята к публикации 26.02.2021 г.

Впервые исследована и продемонстрирована возможность двухэтапной активной лазерной доставки современного хлоринсодержащего фотодинамического препарата под ногтевую пластину с целью фотодинамической терапии онихомикоза. Исследованы спектры экстинкции фотодинамического препарата „Revixan“ (ООО „Ареал“, Россия) при различной температуре, а также до и после воздействия на него излучения Er:YLF-лазера с длиной волны 2810 nm и фотодинамического светодиодного излучения с длиной волны 656–10 nm. Показано, что после нагрева и лазерного воздействия количество мономеров в хлоринсодержащем фотодинамическом препарате увеличивается, а после фотодинамического воздействия уменьшается, что может влиять на эффективность фотодинамической терапии онихомикоза.

Ключевые слова: лазерная доставка лекарств, лазерная микропорация, онихомикоз, коэффициент экстинкции, состояние.

DOI: 10.21883/OS.2021.06.50979.6-21

Введение

Заболевания ногтей, особенно грибковые инфекции (онихомикоз), трудно поддаются лечению [1]. Пероральная доставка лекарств остается наиболее популярным и удобным способом доставки при лечении онихомикоза [2]. Однако при таком способе доставки лекарство может негативно повлиять на желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) и печень, прежде чем попасть в системный кровоток. Местная доставка лекарств в значительной степени позволяет избежать этих проблем, но обладает очень низкой эффективностью прежде всего из-за чрезвычайно малой проницаемости ногтевой пластины. Кроме того, составы для местной доставки, как правило, после нанесения на ноготь быстро теряют молекулярно-диффундирующую форму из-за быстрого испарения растворителя, что также ограничивает глубину проникновения лекарства в ноготь [3,4].

Для увеличения эффективности доставки местных фармацевтических препаратов используется множество методов, в том числе лазерные. Использование лазерного излучения для микропорации ногтя является эффективным методом повышения его проницаемости для увеличения эффективности местной доставки лекарств. Лазерная микропорация отличается от других методов минимальной инвазивностью и улучшенной фармакокинетикой препарата [5]. Возможными механизмами, приводящими к разрушению ногтевой пластины при микропорации, могут быть прямая лазерная абляция,

а также фотомеханический и фототермический эффекты [6]. Наиболее перспективными лазерами для микропорации ногтевой пластины являются Er- и CO₂-лазеры из-за их высокоэффективного абляционного воздействия на поверхностные слои биологической ткани [7–10].

Доставка лекарств в микропорированную ногтевую пластину может быть пассивной или активной, т.е. происходить без или в результате какого-либо внешнего воздействия. Препараты на водной основе при пассивной доставке демонстрируют низкую скорость проникновения в ногтевую пластину из-за высокого коэффициента поверхностного натяжения [11]. Скорость проникновения препаратов на водной основе может быть существенно увеличена при активной лазерной доставке, например за счет действия лазерно-индуцированных гидродинамических процессов [12].

В современной научной литературе вопросы микропорации и активной лазерной доставки лекарств рассматриваются в основном отдельно друг от друга, и лекарство размещается на поверхности ногтевой пластины после ее микропорации [8,13]. Такая последовательность действий усложняет процедуру и увеличивает время обработки. В нашей работе использован новый двухэтапный метод активной лазерной доставки лекарств (dual-stage method for active laser drug delivery — DSLADD), который включает последовательно микропорацию ногтя с помощью излучения Er:YLF-лазера ($\lambda = 2810 \text{ nm}$) через слой лекарства, нанесенного на

поверхность ногтя (этап 1), и воздействие на этот слой излучением того же лазера для доставки лекарства под ногтевую пластину (этап 2) [14].

Выбор Er:YLF-лазера для доставки связан с тем, что его излучение очень эффективно поглощается водой, содержащейся в биоткани и лекарстве [15]. Высокий коэффициент поглощения обеспечивает эффективное преобразование лазерной энергии в механическую, что выражается в генерации акустических волн, ведущих к доставке [16,17].

В настоящее время для лечения онихомикоза доступны несколько местных противогрибковых препаратов, в том числе тербинафин, итраконазол, эфинаконазол, таваборол, циклопирокс и пр. [18]. Разрабатываются новые лекарственные препараты местного действия с улучшенной фунгицидной активностью и быстрым проникновением, к которым можно отнести луликоназол (новая форма азола), TDT-067 (новая форма тербинафина в трансферсоне — искусственной везикуле, предназначенной для целевой доставки лекарств), циклопирокс 8% гидролакер (новый водорастворимый лаковый состав циклопирокса 8% для трансунгальной доставки циклопирокса) и др. [18–20]. Новыми местными лекарственными средствами для лечения онихомикоза также являются фотодинамические препараты. Эти препараты содержат фотосенсибилизаторы (ФС), которые активируются светом, что приводит к повреждению клеточных структур и апоптозу. ФС разделены на поколения и отличаются по механизму воздействия, эффективности и пр. [21,22]. В настоящее время активно ведется поиск новых эффективных ФС в различных классах органических красителей, прежде всего среди порфиринов и их синтетических аналогов [23,24]. Хлорины (дигидропорфирины) характеризуются сильным возрастанием интенсивности длинноволновой полосы поглощения света и ее смещением в красную область спектра по сравнению с порфиринами. Среди хлоринов следует отметить водорастворимые моно-L-аспартилхлорин еб и другие различные формы хлорина еб, а также синтетические хлорины. Хлорин еб является мощным ФС с полосой поглощения, лежащей в красной области спектра [25]. При фотодинамическом световом воздействии с длиной волны 600–700 нм на содержащие этот ФС клетки происходит фотохимическая реакция, при которой генерируются активная форма кислорода и свободные радикалы из внутриклеточного субстрата, что в итоге поражает грибковые клетки и улучшает механизм регенерации клеточных структур [26,27]. Современным эффективным хлоринсодержащим фотодинамическим препаратом для лечения дерматологических заболеваний, в том числе онихомикоза, является гель „Revixan“ (ООО „Ареал“, Россия) [28]. Состояние препарата в форме геля облегчает процесс его нанесения на поверхность ногтя. Активным агентом геля является трисмеглуминовая соль хлорина еб, полученная путем извлечения хлорофилла „А“ из морской микроводоросли и его последующей

химической трансформации по оригинальной технологии [29]. При фотодинамическом воздействии пик полосы поглощения „Revixan“ сдвигается в ИК область, а его поглощение в диапазоне 600–700 нм уменьшается [30]. Очевидно, что эффективность местных лекарственных препаратов, в том числе фотодинамических, ограничена малой проникаемостью ногтевой пластины и может быть повышена за счет лазерной микропорации ногтя. К сожалению, возможность активной Er:YLF-лазерной доставки геля „Revixan“ под ногтевую пластину в литературе до сих пор не обсуждалась.

Важным вопросом является сохранение свойств лекарственного препарата после активной лазерной доставки. Свойства доставляемого лекарства могут изменяться в результате воздействия на него как самого лазерного излучения, так и в результате стимулированных этим воздействием эффектов, в том числе нагрева [14,31]. Очевидно, что анализ спектра экстинкции лекарственного препарата до и после лазерного воздействия позволяет оценить возможность и масштаб этих изменений. К сожалению, состояние геля „Revixan“ после Er:YLF-лазерного воздействия, а также после последовательного Er:YLF-лазерного и фотодинамического воздействий в литературе не описано.

Таким образом, целью работы являлось исследование возможности доставки геля „Revixan“ под ногтевую пластину двухэтапным методом активной лазерной доставки лекарств (DSLADD) и спектральное исследование геля „Revixan“ при различной температуре, а также до и после воздействия излучения Er:YLF-лазера с длиной волны 2810 нм и фотодинамического воздействия с длиной волны 656 ± 10 нм с целью определения возможных структурных изменений геля „Revixan“ при активной лазерной доставке.

Материалы и методы

В исследовании *in vitro* использованы фрагменты экстрагированных здоровых ногтевых пластин человека от одного добровольца. Размер каждого образца ногтевой пластины был близок к 2.0×2.0 мм. За две недели ногти на руках добровольца вырастали на 2–2.5 мм. Каждые две недели выросшие на всех десяти пальцах рук ногти срезались, и из них формировалось 10–20 образцов с вышеуказанным размером. Таким образом, за два месяца было собрано и исследовано 60 образцов. Перед экспериментами образцы механически очищались и промывались дистиллированной водой. Средняя толщина образцов биоткани составляла 320 ± 20 мкм.

Для микроперфорации и активной лазерной доставки геля „Revixan“ через одиночное микроотверстие в ногтевой пластине в условиях *in vitro* использовалось сфокусированное излучение Er:YLF-лазера ($\lambda = 2810$ нм). Диаметр лазерного пучка на поверхности ногтевой пластины составлял 220 ± 10 мкм. Схема экспериментальной установки представлена на рис. 1.

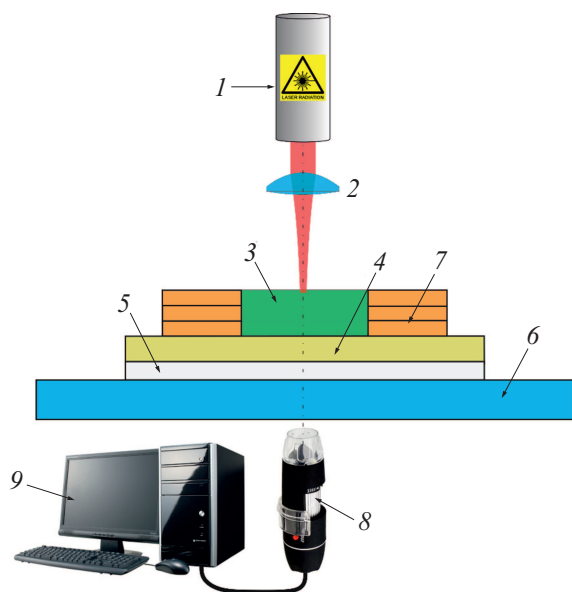


Рис. 1. Схема экспериментальной установки для исследования возможности доставки геля „Revixan“ под ногтевую пластину двухэтапным методом активной лазерной доставки лекарств (DSLADD): 1 — Er:YLF-лазер, 2 — линза ($F = 50$ mm); 3 — гель „Revixan“, 4 — образец ногтевой пластины, 5 — бумажная подложка, 6 — стеклянная пластина, 7 — микроцветок, 8 — цифровой USB-микроскоп „DTX 50“ (Levenhuk, Inc., США), 9 — компьютер.

На внешней поверхности образца создавалась микроцветок из склеенных между собой слоев скотча 3M 300LSE 93010LE („GreenSpark“, Россия) с толщиной $100 \pm 10 \mu\text{m}$. Каждый слой содержал сквозное отверстие квадратной формы со стороной порядка 1.5 mm. При нанесении слоя (слоев) клейкой ленты со сквозным отверстием на поверхность ногтевой пластины образовывалось внутреннее пространство цветка, в которое помещали гель „Revixan“. В результате был сформирован слой раствора толщиной h , кратный толщине одного слоя скотча.

Излучение Er:YLF-лазера фокусировалось на внешней поверхности образца ногтевой пластины линзой с фокусным расстоянием 50 mm. Образец ногтевой пластины, в свою очередь, помещался на бумажную подложку, а подложка располагалась на поверхности стеклянной пластины. С тыльной стороны бумажной подложки был размещен цифровой USB-микроскоп „DTX 50“ (Levenhuk, Inc., США), соединенный с компьютером.

Энергия лазерного импульса (E) составляла 4.0 mJ при частоте повторения импульсов $f = 30$ Hz и была ограничена конструктивными особенностями лазерной системы. Длительность импульса излучения Er:YLF-лазера составляла $270 \pm 10 \mu\text{s}$ (по основанию). Микроотверстия в ногтевой пластине создавались в результате лазерного воздействия (этап 1) через слой геля „Revixan“ толщиной h от $100 \pm 10 \mu\text{m}$ до $400 \pm 40 \mu\text{m}$ с концентрацией C от 0.001 до 100% . Концентрация менее

100% была получена путем разбавления геля „Revixan“ в дистиллированной воде в массовом соотношении. Сразу после микропорации осуществлялась активная доставка ФС (этап 2), для чего ногтевая пластина с нанесенным слоем геля „Revixan“ подвергалась воздействию импульсов излучения Er:YLF-лазера с параметрами, идентичными параметрам для микропорации.

Регистрировалось количество лазерных импульсов (N_1), необходимое на этапе 1 для создания сквозного одиночного микроотверстия в ногтевой пластине, и количество лазерных импульсов (N_2), необходимое на этапе 2 для активной доставки геля „Revixan“ в зависимости от толщины слоя h , энергии лазерного импульса и концентрации геля „Revixan“. Момент доставки соответствовал моменту окраски бумажной подложки, на которой размещался образец, и контролировался при помощи USB-микроскопа.

Средние значения N_1 и N_2 получались в результате усреднения по пяти измерениям на каждом из трех образцов ногтя при фиксированных h и C .

В эксперименте также была получена зависимость коэффициента экстинкции геля „Revixan“ на длине волны излучения Er:YLF-лазера от концентрации C геля в водном растворе. Схема экспериментальной установки для исследования коэффициента экстинкции геля „Revixan“ представлена на рис. 2. Энергия лазерного излучения регистрировалась до и после прохождения лазерного излучения через кварцевую кювету с гелем. Толщина слоя геля или его водного раствора составляла $30 \pm 5 \mu\text{m}$. Энергия лазерного импульса на входе в кювету составляла 5.2 ± 0.1 mJ, диаметр лазерного пятна — 2.0 ± 0.1 mm. Измерения производились относительно двух кварцевых пластин, идентичных стенкам кюветы. По полученным значениям пропускания в соответствии с законом Бугера–Ламберта–Бера рассчитывался коэффициент экстинкции геля „Revixan“.

Средние значения коэффициента экстинкции геля „Revixan“ и его водного раствора на длине волны излучения Er:YLF-лазера для каждой концентрации C получались в результате усреднения по десяти измерениям на трех образцах геля.

В эксперименте также изучалось влияние параметров излучения Er:YLF-лазера на конформационное состоя-

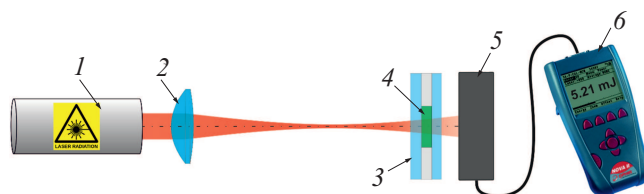


Рис. 2. Схема экспериментальной установки для исследования коэффициента экстинкции геля „Revixan“: 1 — Er:YLF-лазер; 2 — фокусирующая линза ($F = 50$ mm); 3 — кварцевая кювета; 4 — гель „Revixan“; 5 — измерительная головка „PE50BF-C“ (Ophir Optronics Ltd., Израиль); 6 — измеритель энергии „Nova II“ (Ophir Optronics Ltd., Израиль).

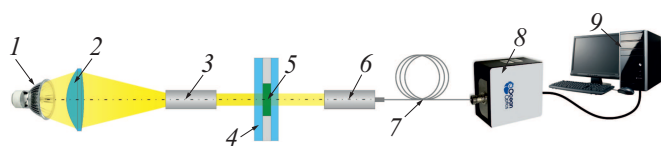


Рис. 3. Схема установки для исследования спектров экстинкции геля „Revixan“: 1 — галогеновая лампа (50 W); 2 — фокусирующая линза ($F = 80 \text{ mm}$); 3 — коллиматор; 4 — кварцевая кювета; 5 — гель „Revixan“; 6 — приемный коллиматор; 7 — волокно спектрометра; 8 — спектрометр; 9 — компьютер.

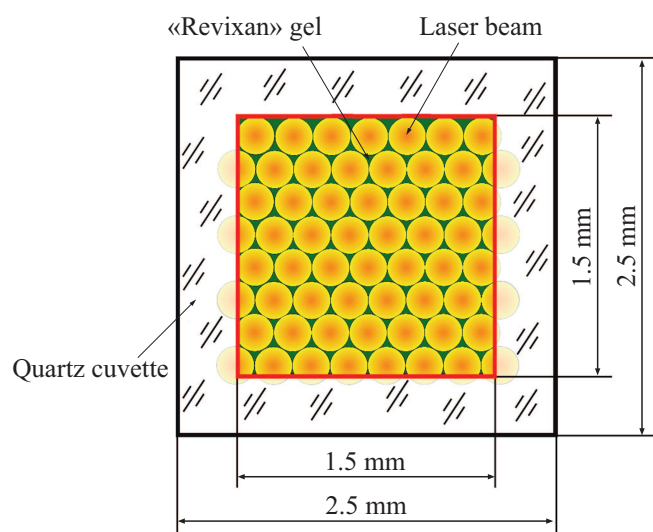


Рис. 4. Схема, поясняющая моделирование процесса двухэтапной активной лазерной доставки геля „Revixan“ излучением Er:YLF-лазера.

ние геля „Revixan“, которое было оценено по спектрам экстинкции раствора в диапазоне длин волн 400–900 nm.

Спектры экстинкции регистрировались при помощи спектрометра SD2000 (Ocean Optics Inc., США). Гель помещался внутрь кварцевой кюветы. Измерения производились относительно двух кварцевых пластин, идентичных стенкам кюветы. В качестве источника излучения использовалась галогеновая лампа мощностью 50 W („Sholtz“, Германия). Схема экспериментальной установки показана на рис. 3.

Для выяснения возможных структурных изменений молекул геля „Revixan“ в процессе воздействия излучением Er:YLF-лазера при двухэтапной активной лазерной доставке было проведено физическое моделирование этого процесса. Гель „Revixan“ ($C = 100\%$) полностью заполнял внутреннее пространство кварцевой кюветы, параметры которой были аналогичны параметрам микрокюветы, создаваемой на поверхности ногтя при исследовании возможности двухэтапной активной лазерной доставки геля (см. выше): толщина внутреннего пространства кюветы составляла $100 \pm 10 \mu\text{m}$, длина и ширина $\sim 1.5 \text{ mm}$. Регистрировался спектр пропускания геля „Revixan“ до лазерного воздействия. Затем произ-

водилось облучение геля путем сканирования излучения Er:YLF-лазера вдоль его поверхности. Сканирование осуществлялось дискретно от точки к точке. Точки заполняли по длине и ширине все внутреннее пространство кюветы (рис. 3). Расстояние между центрами точек соответствовало диаметру лазерного пучка, а их количество $N_s = 60$. Количество лазерных импульсов (N) в одну точку достигало 200 и, в частности, было равным количеству лазерных импульсов, необходимых для микроперфорации и активной доставки геля „Revixan“ с $h = 100 \pm 10 \mu\text{m}$ и $C = 100\%$ ($N = N_1 + N_2 = 45$). После этого гель тщательно (в течение 60 s) перемешивался внутри кюветы, и далее регистрировался спектр его пропускания после лазерного воздействия.

По полученным спектрам пропускания в соответствии с законом Бугера–Ламберта–Бера рассчитывался спектр экстинкции геля „Revixan“ до и после Er:YLF-лазерного воздействия. В экспериментах исследовались две полосы поглощения с пиками на длинах волн 664 ± 3 и $710 \pm 3 \text{ nm}$, которые соответствуют конформационным состояниям хлорина еб в форме мономера и тетрамера соответственно [32]. Также в работе оценивался коэффициент спектральной трансформации (k_t), равный отношению коэффициентов экстинкции μ_t геля „Revixan“ на длинах волн 664 ± 3 и $710 \pm 3 \text{ nm}$. Исследовалось изменение k_t в зависимости от количества лазерных импульсов (N).

Известно, что фотодинамическое воздействие света приводит к фоторазрушению ФС, в результате чего уменьшается его поглощение на длине волны возбуждающего света и способность к образованию синглетного кислорода [30,33–35]. Исследование процесса фоторазрушения ФС при фотодинамическом воздействии света после лазерной доставки весьма актуально, так как может предоставить информацию о его состоянии и позволить более точно оценить эффективность фотодинамической терапии.

Для фотодинамического воздействия в исследовании использовался светодиодный аппарат для предельно высокоинтенсивной фотодинамической терапии „LED Forester 660“ („НЕЛА“, Россия) с длиной волны излучения $656 \pm 10 \text{ nm}$ и интенсивностью излучения до $180 \pm 20 \text{ mW/cm}^2$, ограниченной эффектом гипертермии кожи [36–39]. Время воздействия составляло 10 min. Исследовался спектр экстинкции геля „Revixan“ ($C = 100\%$) до и после лазерного (при $N_s = 60$ и $N = 45$) и фотодинамического воздействий.

Также было исследовано влияние температуры на структурные изменения геля „Revixan“. Кварцевая кювета с гелем „Revixan“ ($C = 100\%$) размещалась на нагревателе, который обеспечивал стабилизацию его температуры на заданном уровне. Гель „Revixan“ нагревался до $T = 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90$ и 100°C . Контроль температуры осуществлялся при помощи термомпары „Rexant К-1 (13-3048)“ (ООО „Рексант-Электро“, Россия), размещенной в кювете с гелем. Исследовались

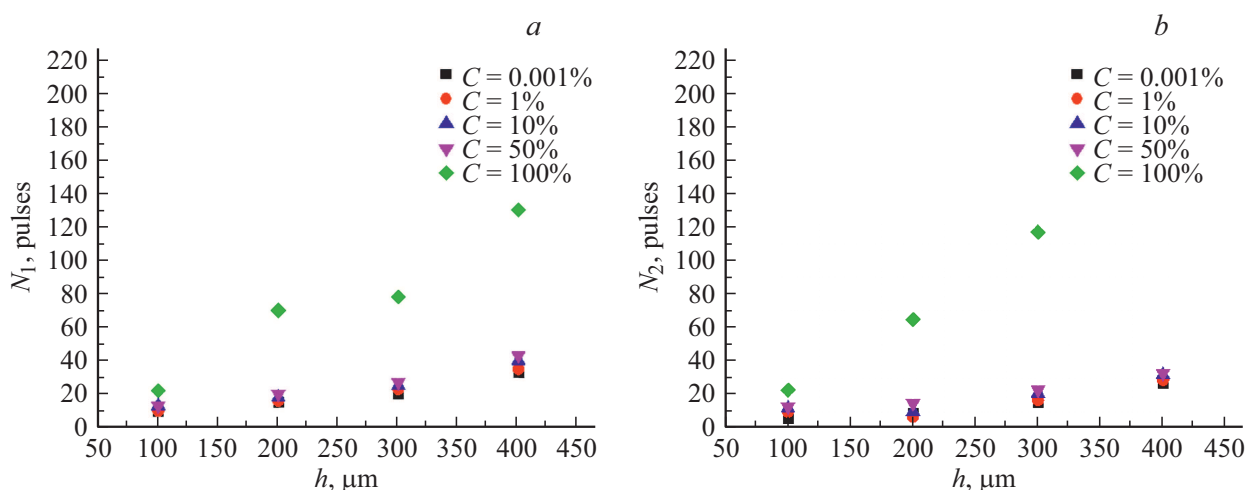


Рис. 5. Зависимость количества лазерных импульсов (N_1), необходимого для создания сквозного одиночного микроотверстия в ногтевой пластине через слой геля „Revixan“ (a), и количества лазерных импульсов (N_2), необходимого для активной лазерной доставки геля „Revixan“ к тыльной стороне ногтевой пластины (b), от толщины нанесенного слоя геля h при различной его концентрации C в водном растворе (Er:YLF-лазер, $\lambda = 2810$ nm, $E = 4$ mJ).

спектры экстинкции и коэффициенты трансформации k , геля при различных температурах.

Каждый спектр экстинкции получался в результате усреднения по измерениям спектра пропускания десяти образцов геля, помещенных внутрь кюветы.

Статистическая обработка данных, полученных в экспериментах, заключалась в определении средних значений и стандартного отклонения измеренных величин и проводилась в программном комплексе „STATGRAPHICS Plus 5.0“ (Statistical Graphics Corp., США).

Результаты и обсуждение

В эксперименте *in vitro* впервые продемонстрировано, что с помощью сфокусированного до 220 ± 10 μm излучения Er:YLF-лазера с энергией $E = 4$ mJ можно осуществить двухэтапную активную лазерную доставку ФС-геля „Revixan“ с толщиной слоя h до 300 μm включительно при концентрациях геля в водном растворе вплоть до $C = 100\%$ и с толщиной слоя $h = 400$ μm при концентрациях до $C = 50\%$. Зависимость количества лазерных импульсов (N_1), необходимого для создания сквозного одиночного микроотверстия в ногтевой пластине через слой геля (этап 1), от толщины этого слоя h и концентрации C представлена на рис. 5, a. Зависимость количества лазерных импульсов (N_2), необходимого для активной лазерной доставки геля „Revixan“ к тыльной стороне ногтевой пластины (этап 2), от толщины нанесенного слоя геля h и его концентрации представлена на рис. 5, b.

Количество лазерных импульсов (N_1) увеличивается при увеличении концентрации геля „Revixan“ и толщи-

ны его слоя. Минимальное $N_1 = 10$ наблюдается при $h = 100 \pm 10$ μm и $C = 0.001\%$.

Количество лазерных импульсов (N_2) зависит от концентрации геля „Revixan“ и толщины его слоя. Активная лазерная доставка геля „Revixan“ на 2-м этапе наблюдалась для всех концентраций C и толщин h , кроме случая $C = 100\%$ при $h = 400 \pm 40$ μm . При $C = 0.001, 50$ и 100% увеличение h до 300 μm включительно приводит к увеличению количества лазерных импульсов (N_2), необходимых для активной лазерной доставки геля. Для $C = 1$ и 10% увеличение h до 200 μm включительно приводит к уменьшению количества лазерных импульсов (N_2), необходимых для активной лазерной доставки геля „Revixan“. Дальнейшее увеличение h до 400 μm включительно для всех C приводит к увеличению N_2 . Минимальное $N_2 = 6$ наблюдалось при $h = 100 \pm 10$ μm и $C = 0.001\%$.

Коэффициент экстинкции μ_t геля „Revixan“ на длине волны 2810 nm зависит от концентрации геля в водном растворе (рис. 6). Видно, что с ростом концентрации геля в водном растворе коэффициент экстинкции падает, что связано с уменьшением поглощения водой. При концентрациях 0.001, 1, 10, 50 и 100% коэффициент экстинкции μ_t составляет 1666 ± 183 , 1322 ± 145 , 1101 ± 99 , 886 ± 71 и 634 ± 46 cm^{-1} соответственно. Нелинейность зависимости коэффициента экстинкции μ_t от концентрации C может быть связана с высокой погрешностью определения величины светового потока при низких концентрациях геля „Revixan“ в воде.

Можно предположить, что с этим эффектом связано увеличение требующихся для двухэтапной активной лазерной доставки N_1 и N_2 , которое мы наблюдаем при увеличении концентрации C (рис. 5).

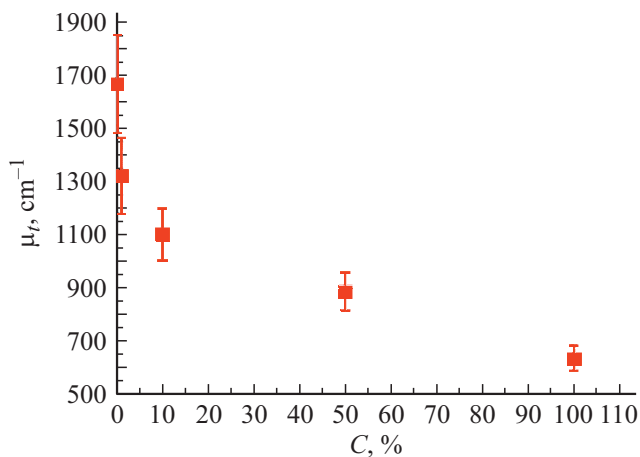


Рис. 6. Зависимость коэффициента экстинкции μ_t геля „Revixan“ на длине волны 2810 nm от его концентрации C в водном растворе.

Спектры экстинкции геля „Revixan“ ($C = 100\%$) до и после воздействия излучения Er:YLF-лазера с энергией $E = 4 \text{ mJ}$ представлены на рис. 7.

До лазерного воздействия коэффициент экстинкции μ_t на длине волны $664 \pm 5 \text{ nm}$ составлял $159.1 \pm 3.2 \text{ cm}^{-1}$, а на длине волны $710 \pm 3 \text{ nm}$ — $105.2 \pm 2.1 \text{ cm}^{-1}$. Тот факт, что коэффициент экстинкции на длине волны $664 \pm 3 \text{ nm}$ превышает коэффициент μ_t на длине волны $710 \pm 3 \text{ nm}$ говорит о том, что в исходном геле „Revixan“ в большей мере присутствуют мономеры хлорина еб, а не его тетрамеры.

При воздействии на гель излучения Er:YLF-лазера с энергией 4 mJ (рис. 7, а) после 45, 70, 100, 135 и 200 импульсов коэффициент экстинкции μ_t на длине волны $664 \pm 3 \text{ nm}$ увеличился до 349.7 ± 7.0 , 426.1 ± 8.5 , 521.0 ± 10.4 , 590.7 ± 11.8 и $721.8 \pm 14.4 \text{ cm}^{-1}$, а на длине волны $710 \pm 3 \text{ nm}$ увеличился до 226.1 ± 4.5 , 248.8 ± 5.0 , 276.6 ± 5.5 , 295.6 ± 5.9 и $418.3 \pm 8.3 \text{ cm}^{-1}$ соответственно. Это может быть связано с увеличением концентрации ФС (хлорин еб) в препарате из-за испарения вещества матрицы в геле под действием лазерного излучения.

Зависимость коэффициента трансформации k_t от количества воздействующих на гель „Revixan“ импульсов Er:YLF-лазера с $E = 4 \text{ mJ}$ представлена на рис. 7, б. До $N = 135$ импульсов включительно коэффициент трансформации k_t увеличивается с 1.51 ± 0.06 ($N = 0$) до 2.00 ± 0.08 ($N = 135$), а после — уменьшается до 1.73 ± 0.07 ($N = 200$). Это свидетельствует о том, что изменяется конформационное состояние геля „Revixan“, и количество мономеров хлорина еб сначала увеличивается, а затем уменьшается. Изменение может быть связано с изменением pH геля, так как от pH зависит полимеризация хлорина еб [32]. Из ранее проведенных исследований известно, что от pH зависит состояние протонирования карбоксильных групп хлорина еб, и, как следствие, может меняться состояние межмолекулярной

агрегации молекул хлорина между собой [40,41]. Агрегация хлорина еб происходит при переходе от щелочного к кислому водному раствору. Уменьшение числа мономеров хлорина еб и агрегация мономеров приводит к существенному падению квантового выхода синглетного кислорода и снижению эффективности фотодинамической терапии [32,40–42]. В наших экспериментах k_t после воздействия излучения Er:YLF-лазера всегда превышал k_t исходного геля, т.е. излучение YLF:Er-лазера с параметрами, достаточными для двухэтапной активной лазерной доставки геля „Revixan“ под ногтевую пластину, влияет на форму спектра экстинкции геля, и при этом наблюдается увеличение числа мономеров хлорина еб в нем. В этом случае можно ожидать, что гель „Revixan“ после воздействия Er:YLF-лазерного излучения с $E = 4 \text{ mJ}$ за счет роста доли мономеров будет обладать большей, чем гель в исходном состоянии, фотодинамической активностью.

Спектры геля „Revixan“ до и после нагрева, а также зависимость коэффициентов трансформации k_t от температуры представлены на рис. 8, а и 8, б соответственно.

Нагрев геля „Revixan“ с 25 до 100°C влияет на форму его спектра экстинкции. Коэффициент экстинкции μ_t на длине волны $664 \pm 3 \text{ nm}$ увеличился относительно исходного незначительно — до $178.9 \pm 3.6 \text{ cm}^{-1}$, а на длине волны $710 \pm 3 \text{ nm}$ уменьшился до $81.2 \pm 1.7 \text{ cm}^{-1}$. При этом коэффициент трансформации k_t экспоненциально увеличивается до 2.2 ± 0.09 , что может быть связано с увеличением числа мономеров хлорина еб в геле. Таким образом, увеличение числа мономеров хлорина еб в геле „Revixan“ при Er:YLF-лазерном воздействии можно связать с нагревом геля. Последующее уменьшение при N более 135 импульсов Er:YLF-лазера может быть связано с увеличением температуры выше 100°C и достижением температуры разрушения молекул геля.

Спектры экстинкции геля „Revixan“ и его коэффициенты трансформации k_t до и после Er:YLF-лазерного и фотодинамического воздействий с длиной волны $656 \pm 10 \text{ nm}$ представлены на рис. 9, а и 9, б соответственно.

Последовательное воздействие излучения Er:YLF-лазера ($N = 45$) с энергией 4 mJ и излучения с длиной волны $656 \pm 10 \text{ nm}$ и интенсивностью $180 \pm 20 \text{ mW/cm}^2$ в течение 10 min приводит к изменению спектра экстинкции геля „Revixan“: коэффициент экстинкции μ_t на длине волны $664 \pm 3 \text{ nm}$ уменьшается относительно исходного до $189.0 \pm 3.78 \text{ cm}^{-1}$, а на длине волны $710 \pm 3 \text{ nm}$ — до $143.9 \pm 2.9 \text{ cm}^{-1}$. При этом коэффициент трансформации k_t уменьшается с соответствующего исходному состоянию геля $k_t = 1.51$ до $k_t = 1.31$. Уменьшение поглощения геля „Revixan“ и коэффициента трансформации k_t в этом случае может быть вызвано фоторазрушением хлорина еб, в особенности его мономеров, под действием излучения с длиной волны $656 \pm 10 \text{ nm}$.

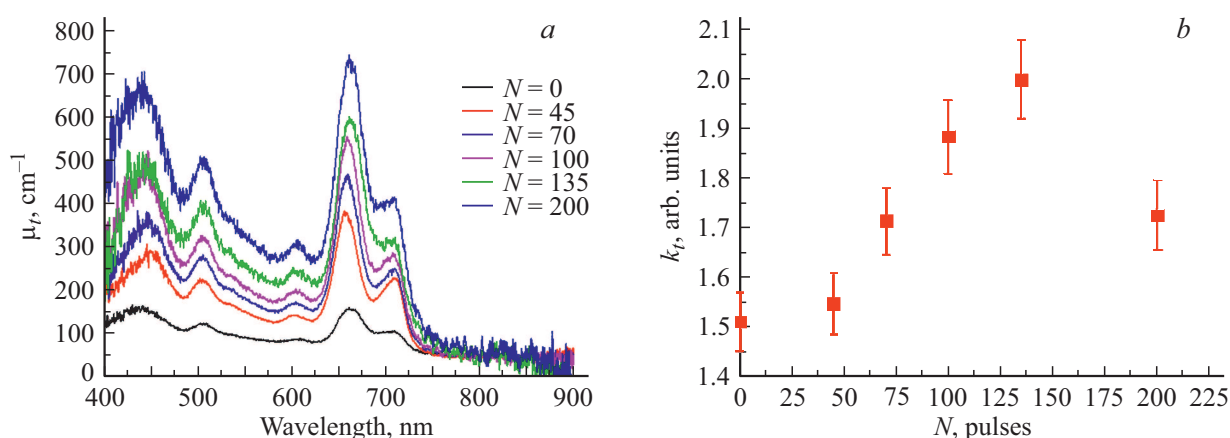


Рис. 7. Спектры экстинкции геля „Revixan“ ($C = 100\%$) до и после воздействия $N = 45, 70, 100, 135, 200$ импульсов излучения Er:YLF-лазера с энергией 4 мДж (а) и зависимость коэффициента трансформации k_t от N (б).

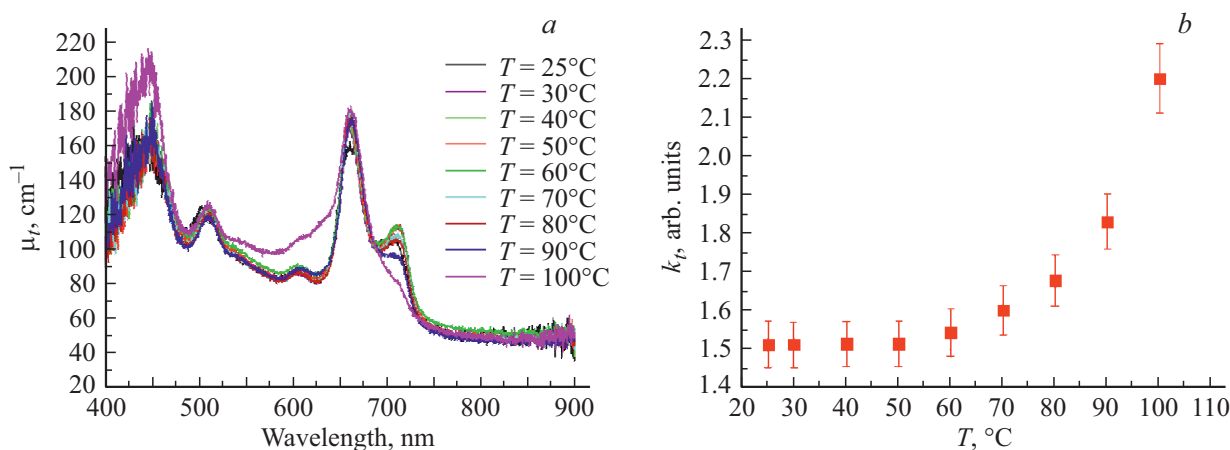


Рис. 8. Спектры экстинкции геля „Revixan“ ($C = 100\%$) при $T = 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90$ и 100°C (а), зависимость коэффициента трансформации k_t от температуры (б).

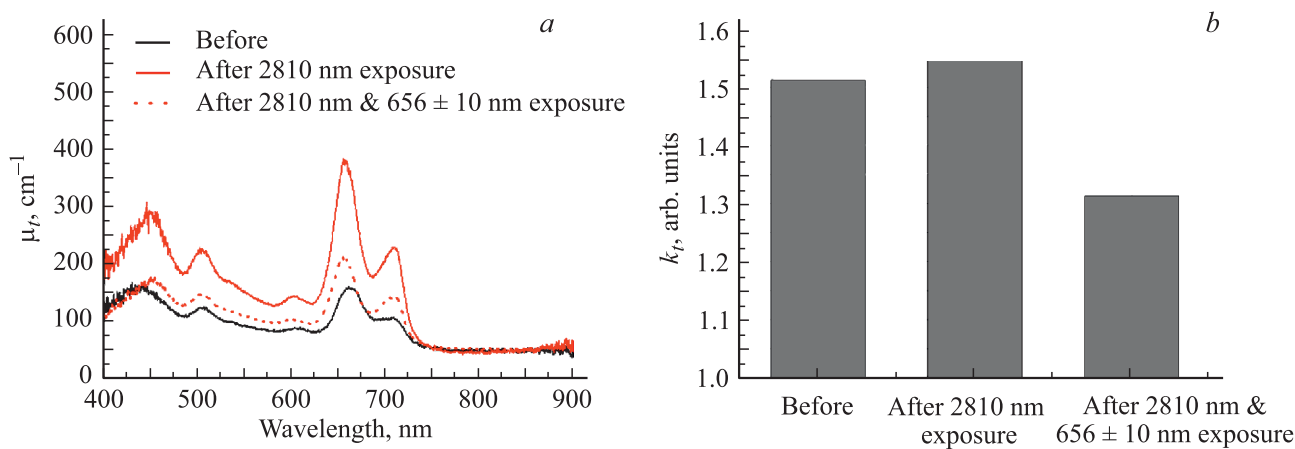


Рис. 9. Спектры экстинкции (а) и коэффициенты трансформации k_t (б) геля „Revixan“ ($C = 100\%$) до и после воздействия импульсов излучения Er:YLF ($\lambda = 2810$ нм)-лазера с энергией 4 мДж, а также после последовательного воздействия импульсов излучения Er:YLF-лазера с энергией 4 мДж и фотодинамического воздействия с длиной волны 656 ± 10 нм и интенсивностью 180 ± 20 мВт/см² в течение 10 мин.

Заключение

Впервые в условиях *in vitro* исследована и продемонстрирована возможность двухэтапной активной Er:YLF-лазерной доставки под ногтевую пластину современного хлоринсодержащего фотодинамического препарата для лечения онихомикоза. Исследован гель „Revixan“ (ООО „Ареал“, Россия) и его водные растворы. Показано, что возможность доставки зависит от концентрации препарата в водном растворе, толщины слоя препарата, энергии и количества приложенных лазерных импульсов. Минимальное количество лазерных импульсов с энергией $E = 4 \text{ mJ}$, необходимых для перфорации ногтевой пластины (N_1) и активной доставки геля под ногтевую пластину (N_2), составляет $N_1 = 10$ и $N_2 = 6$ соответственно и наблюдается при $C = 0.001\%$ и толщине слоя препарата, размещенного на поверхности ногтевой пластины, $h = 100 \pm 10 \mu\text{m}$.

Исследованы спектры экстинкции геля „Revixan“ при различной температуре. Нагрев геля с 25 до 100°C изменяет форму его спектра экстинкции. При этом коэффициент трансформации k_t экспоненциально увеличивается и при 100°C достигает 2.2 ± 0.07 , что может быть связано с увеличением числа мономеров хлорина еб в геле.

Впервые исследованы спектры экстинкции геля „Revixan“ после воздействия излучения Er:YLF-лазера. Лазерное воздействие приводит к увеличению коэффициента экстинкции геля в полосах поглощения на длинах волн $664 \pm 5 \text{ nm}$ (мономеры) и $710 \pm 3 \text{ nm}$ (тетрамеры). При этом до $N = 135$ импульсов включительно коэффициент трансформации k_t увеличивается с 1.51 ± 0.06 ($N = 0$) до 2.00 ± 0.08 ($N = 135$), а после — уменьшается до 1.73 ± 0.07 ($N = 200$). Это свидетельствует о том, что изменяется конформационное состояние геля „Revixan“, и количество мономеров хлорина еб сначала увеличивается, а затем уменьшается. Это изменение может быть связано с изменением pH геля и его нагревом.

Впервые исследованы спектры экстинкции геля „Revixan“ после последовательного воздействия излучения Er:YLF-лазера с длиной волны 2810 nm и фотодинамического воздействия с длиной волны $656 \pm 10 \text{ nm}$. Такое воздействие приводит к снижению коэффициента экстинкции в полосах поглощения геля и уменьшению коэффициента трансформации k_t ниже исходного ($k_t = 1.51 \pm 0.06$) и может быть вызвано фоторазрушением хлорина еб под действием излучения с длиной волны $656 \pm 10 \text{ nm}$.

Результаты исследования могут быть полезны при разработке оптических систем для фотодинамической терапии онихомикоза.

Соблюдение этических стандартов

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическими стандартами

институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Благодарности

Работа выполнена в рамках программы повышения конкурентоспособности Университета ИТМО среди ведущих мировых научно-образовательных центров на 2013–2020 гг. (программа „5 в 100“, грант 08-08). Авторы выражают благодарность проф. М.Л. Гельфонду (НМИЦ Онкологии им. Н.Н. Петрова) за предоставленные образцы современных хлоринсодержащих ФС-препаратов.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] Lawry M., Rich P. // *Curr. Probl. Dermatol.* 1999. V. 11. P. 161–208. doi 10.1016/S1040-0486(99)90001-7
- [2] Ahadian S. et al. // *Advanced Drug Delivery Rev.* 2020. doi 10.1016/j.addr.2020.07.012
- [3] Wang J.C.T., Sun Y. // *Cosmet. Sci.* 1999. V. 50. P. 71–76.
- [4] Vanstone S. et al. // *J. Controlled Release.* 2017. V. 268. P. 72–77. doi 10.1016/j.jconrel.2017.10.014
- [5] Murdan S. // *Expert Opinion on Drug Delivery.* 2008. V. 5. N 11. P. 1267–1282. doi 10.1517/17425240802497218
- [6] Lin C.H., Aljuffali I.A., Fang J.Y. // *Expert Opinion on Drug Delivery.* 2014. V. 11. N 4. P. 599–614. doi 10.1517/17425247.2014.885501
- [7] Belikov A.V., Sergeev A.N., Smirnov S.N., Tavalinskaya A.D. // *Frontiers of Optoelectronics.* 2017. V. 10. N 3. P. 299–307. doi 10.1007/s12200-017-0719-3
- [8] Tsai M.T. et al. // *Sensors.* 2016. V. 16. N 12. P. 2111. doi 10.3390/s16122111
- [9] Morais O.O.D. et al. // *Anais Brasileiros de Dermatologia.* 2013. V. 88. N 5. P. 847–849. doi 10.1590/abd1806-4841.20131932
- [10] Ortner V.K., Holmes J., Haedersdal M., Philipsen P.A. // *Lasers Surg. Med.* 2020. doi 10.1002/lsm.23304
- [11] Belikov A.V., Skrypnik A.V., Sergeev A.N., Smirnov S.N., Tavalinskaya A.D. // *Proc. SPIE.* 2018. P. 10716:107160X. doi 10.1117/12.2309503
- [12] Belikov A.V., Tavalinskaya A.D., Smirnov S.N., Sergeev A.N. // *J. Biomed. Photonics & Engineering.* 2019. V. 5. N 1. P. 010305. <https://cyberleninka.ru/article/n/application-of-yb-er-glass-laser-radiation-for-active-drug-delivery-at-the-treatment-of-onychomycosis>
- [13] Жапов В.П. Патент РФ № 2224556С2, 2001.
- [14] Belikov A.V., Tavalinskaya A.D., Smirnov S.N. // *Lasers Surg. Med.* 2020. doi 10.1002/lsm.23379
- [15] Hale G., Querry M. // *Appl. Optics.* 1973. V. 12. N 3. P. 555. doi 10.1364/AO.12.000555

- [16] *Pushkin A.V. et al.* // Laser Physics Letters. 2018. V. 15. N 6. P. 065401. doi 10.1088/1612-202X/aaba4e
- [17] *Sigrist M.W., Kneubuhl F.K.* // J. Acoustical Society of America. 1978. V. 64. N 6. P. 1652–1663. doi 10.1121/1.382132
- [18] *Gupta A.K., Stec N.* // Expert Opinion on Emerging Drugs. 2019. V. 24. N 4. P. 213–220. doi 10.1080/14728214.2019.1685493
- [19] *Kawa N. et al.* // J. Clinical and Aesthetic Dermatology. 2019. V. 12. N 10. P. 29. PMID: 32038746
- [20] *Yikas A. et al.* // AAPS PharmSciTech. 2020. V. 21. N 2. P. 67. doi 10.1208/s12249-019-1591-9
- [21] *Поняев А.И., Глухова Я.С., Черных Я.С.* // Изв. СПб. гос. технологического института (технического университета). 2017. № 41. С. 71–78.
- [22] *Allison R.R. et al.* // Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. 2004. V. 1. N 1. P. 27–42. doi 10.1016/S1572-1000(04)00007-9
- [23] *Филипова Н.И. и др.* // Информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии. 2018. С. 221–225.
- [24] *Ланина В.А. и др.* // Журн. прикладной спект. 2016. Т. 83. № 3. С. 347–353.
- [25] *Al-Ahmad A. et al.* // Frontiers in Microbiology. 2016. V. 7. P. 1900. doi 10.3389/fmicb.2016.01900
- [26] *Kim J.H. et al.* // Toxicology and Environmental Health Sciences. 2014. V. 6. N 3. P. 170–175. doi 10.1007/s13530-014-0202-0
- [27] *Carmello J.C. et al.* // Photochemical & Photobiological Sciences. 2015. V. 14. N 7. P. 1319–1328. doi 10.1039/C4PP00368C
- [28] [Электронный ресурс] Режим доступа: <http://revixan-beauty.ru/>
- [29] *Батомункуев А.В., Ашмаров В.В., Дауэ С.С.* Патент РФ № 2568597, 2014.
- [30] *Belikov A.V. et al.* // Opt. Spectrosc. 2020. V. 128. N 7. P. 980–988. doi 10.1134/S0030400X20070024
- [31] *Pradeep G., Cyriac S., Ramkumar S., Kartha C.S.O.* // Jpn. J. Appl. Phys. 2000. V. 39. N 1R. P. 137.
- [32] *Кунделев Е.В.* Круговой дихроизм в оптических спектрах агрегатов тетрапиррольных молекул и комплексов квантовая точка-молекула. Автореф. канд. дис. 2018.
- [33] *Menezes P.F.C. et al.* // Laser Physics. 2004. V. 14. N 9. P. 1214–1218.
- [34] *Ferreira J. et al.* // Laser Phys. Lett. 2008. V. 5. N 2. P. 156–161. doi 10.1002/lapl.200710099
- [35] *Hadjur C. et al.* // J. Photochemistry and Photobiology B: Biology. 1998. V. 45. N 2–3. P. 170–178.
- [36] *Belikov A.V. et al.* // Saratov Fall Meeting 2018: Optical and Nano-Technologies for Biology and Medicine. International Society for Optics and Photonics. 2019. V. 11065. P. 1106517. doi 10.1117/12.2532343
- [37] *Waldow S.M., Dougherty T.J.* // Radiation Research. 1984. V. 97. N 2. P. 380–385. doi 10.2307/3576288
- [38] *Berns M.W., Coffey J., Wile A.G.* // Lasers in Surgery and Medicine. 1984. V. 4. N 1. P. 87–92. doi 10.1002/lsm.1900040112
- [39] *Булгакова Н.Н., Шугайлов И.А.* // Инновационная стоматология. 2012. № 1. P. 14–23.
- [40] *Cunderlikova B., Gangeskar L., Moan J.* // J. Photochemistry and Photobiology B: Biology. 1999. V. 53. N 1. P. 81–90. doi 10.1016/S1011-1344(99)00130-X
- [41] *Isakau H., Parkhats M., Knyukshto V. et al.* // J. Photochemistry and Photobiology B: Biology. 2008. V. 92. N 3. P. 165–174. doi 10.1016/j.jphotobiol.2008.06.004
- [42] *Dadadzhyanov D., Martynenko I., Orlova A. et al.* // Opt. Spectrosc. 2015. V. 119. N 5. P. 738–743. doi 10.1134/S0030400X15110053