

Лазерная доставка и спектральное исследование современного хлоринсодержащего препарата для лечения онихомикоза при лазерном воздействии с длиной волны 450 nm

© А.В. Беликов^{1,2}, Ю.В. Федорова^{1¶}, А.Д. Козлова¹, С.Н. Смирнов¹

¹ Университет ИТМО,
197101 Санкт-Петербург, Россия

² Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова,
197022 Санкт-Петербург, Россия

¶ e-mail: yvsemyashkina@mail.ru

Поступила в редакцию 07.01.2022 г.

В окончательной редакции 07.02.2022 г.

Принята к публикации 23.03.2022 г.

Исследована возможность активной лазерной доставки под ногтевую пластину современного хлоринсодержащего фотосенсибилизирующего препарата Chloderm (Хлодерм, Россия) лазерным излучением с длиной волны 450 nm с целью фотодинамической терапии онихомикоза. В эксперименте *in vitro* исследована последовательная лазерная микропорация ногтевой пластины и активная доставка препарата под ногтевую пластину этим лазерным излучением с интенсивностью до 200 W/cm². Представлены результаты исследования спектров поглощения водного раствора Chloderm в диапазоне 400–900 nm до и после воздействия лазерного излучения с длиной волны 450 nm. Продемонстрировано, что последовательная лазерная микропорация и активная лазерная доставка под ногтевую пластину возможна при интенсивности лазерного излучения, большей чем 178 W/cm². Показано, что максимальные скорость и эффективность абляции ногтевой пластины лазерным излучением с длиной волны 450 nm достигаются при интенсивности 200 W/cm² и составляют 2750 ± 30 μm/s и 1,47 ± 0,05 μm/mJ соответственно. При этом скорость доставки Chloderm под ногтевую пластину составляет 1,15 ± 0,1 mg/s. Показано, что воздействие лазерного излучения с длиной волны 450 nm и интенсивностью 200 W/cm² за время, достаточное для доставки препарата под ногтевую пластину, не изменяет коэффициент экстинкции препарата на длине волны лазерного излучения и незначительно изменяет конформационное состояние Chloderm.

Ключевые слова: лазерная доставка, абляция, коэффициент поглощения, хлоринсодержащий фотосенсибилизирующий препарат, лазерное излучение.

DOI: 10.21883/OS.2022.06.52629.37-22

Введение

Онихомикоз — одно из наиболее распространенных инфекционных заболеваний ногтей, которое возникает из-за чрезмерного роста грибка в ногтевом ложе, приводящего к гиперкератинизации [1]. Онихомикоз поражает 10–40% населения [2,3]. Доступные варианты терапии онихомикоза сталкиваются со значительными препятствиями на пути лечения. Это связано с тем, что лекарства для местного применения не могут проникнуть через ногтевую пластину и достичь ногтевого ложа, а системные противогрибковые препараты обладают побочными эффектами при длительном применении, а также имеют множество противопоказаний. Традиционные методы хирургического лечения онихомикоза весьма болезненны, требуют профессиональной помощи и имеют большой реабилитационный период.

В последние годы для лечения онихомикоза предлагается метод фотодинамической терапии (ФДТ) [1], который является многообещающим методом лечения во многих областях медицины, включая онкологию, урологию, офтальмологию, оториноларингологию, стомато-

логию и прочие [4–8]. Перспективы фотодинамической терапии онихомикоза обсуждаются в работах [9–14], в том числе обращается внимание на необходимость повышения эффективности доставки известных фотодинамических препаратов к ногтевому ложу и поиск новых фотодинамических препаратов и источников света.

Метод фотодинамической терапии заключается в том, что фотосенсибилизирующий препарат проникает в ткани с последующим облучением светом с длиной волны, поглощаемой фотосенсибилизирующим препаратом. При поглощении фотона фотосенсибилизатор претерпевает один или несколько энергетических переходов и обычно оказывается в возбужденном триплетном состоянии. Триплет может участвовать в одноэлектронной реакции окисления–восстановления (фотохимия типа I) с соседней молекулой, производя свободнорадикальные промежуточные соединения, которые могут реагировать с кислородом с образованием пероксирадикалов и различных активных форм кислорода. В качестве альтернативы фотосенсибилизатор в триплетном состоянии может передавать энергию кислороду в основном состоянии (фотохимия типа II), генерируя синглет-

ный молекулярный кислород — высокоактивную форму кислорода, которая вступает в реакцию со многими биологическими молекулами, включая липиды, белки и нуклеиновые кислоты [15].

Выбор фотосенсибилизатора (ФС) играет важную роль в лечении методом ФДТ [16]. В настоящее время оптимальными считаются хлоринсодержащие фотосенсибилизаторы второго поколения на основе хлорина е6 (Ce6) [17–19]. Известно значительное количество экспериментальных работ по исследованию спектрально-люминесцентных свойств хлорина е6 (Ce6) на предмет агрегации и последующего ее влияния на фотофизические свойства фотосенсибилизирующего препарата, что является критически важным моментом с точки зрения ФДТ. Для спектра поглощения Ce6 характерно наличие следующих полос: наиболее интенсивная В-полоса (полоса Core) с пиком на длине волны около 401 nm, которая соответствует двум близко расположенным Vx- и Vy-переходам, Qx 00- и Qx 01-полосы (около 505-510 nm), а также Qu 00-полоса с пиком на длине волны около 664 nm. В-полоса довольно широкая и по основанию простирается от 320 до 480 nm. Известно, что Ce6 в растворе этанола и в щелочном водном растворе находится преимущественно в мономерной форме [20,21]. При фотодинамической терапии в основном используются источники света, длина волны которых попадает в пик Qu 00-полосы, что связано с тем, что свет с этой длиной волны достаточно глубоко проникает в биоткани. Однако это излучение поглощается фотосенсибилизатором не так эффективно, как излучение, попадающее в пик В-полосы. Применение же источников с длиной волны, попадающей в В-полосу, ограничено малой глубиной проникновения их излучения в биоткань. В этой связи использование излучения с длиной волны, попадающей в В-полосу, но не соответствующей ее пику поглощения, позволит подобрать условия, при которых свет будет глубже проникать в биоткань, но при этом поглощение света фотосенсибилизатором будет выше или на том же уровне, как при воздействии света, попадающего в пик Qu 00-полосы. Длина волны 450 nm удовлетворяет перечисленным выше критериям.

Лазерное излучение с длиной волны 450 nm применяется в медицине, в том числе в хирургии, так как эффективно испаряет и коагулирует мягкие ткани, не оказывая существенного термического воздействия на окружающие биоткани [22,23]. Излучение с этой длиной волны перспективно при антимикробной фотодинамической терапии [24]. В дерматологии лазер с длиной волны 450 nm успешно используют для лечения винных пятен [25]. В стоматологии лазерное излучение с длиной волны 450 nm мощностью 1500 mW совместно с перекисью водорода низкой концентрацией используют для отбеливания зубов [26]. Не так давно лазерное излучение с этой длиной волны стали широко применять для внутривенного лазерного облучения крови (ВЛОК) [27]. Также известно, что фототерапия излучением с длиной волны

450 ± 25 nm является эффективным методом лечения новорожденных с конъюгационной желтухой [28,29]. Таким образом, лазерное излучение с длиной волны 450 nm уже применяется и имеет большой потенциал при создании новых биомедицинских технологий, в том числе ФДТ.

Для повышения эффективности доставки местных фармацевтических препаратов, в том числе фотосенсибилизаторов, используют методы, направленные на разрушение ногтевой пластины: химическое полное или частичное удаление ногтевой пластины, ионофорез, сонофорез, низкочастотный ультразвук, механическая и лазерная микропорация [30]. Лазерная микропорация отличается от других методов повышения эффективности доставки минимальной инвазивностью, безболезненностью, улучшенной фармакокинетикой препарата и высокой локальностью [30]. Наиболее перспективными лазерами для микропорации ногтевой пластины являются Er- и CO₂-лазеры из-за их высокоэффективного абляционного действия на поверхностные слои биоткани [31–34].

Доставка лекарств через созданные в результате лазерной микропорации ногтя микроотверстия может быть пассивной или активной, т.е. происходить без или в результате какого-либо внешнего воздействия [33,35]. Однако при пассивной доставке препараты на водной основе не проникают в микропорированную ногтевую пластину из-за высокого коэффициента поверхностного натяжения [36]. Вместе с тем известно, что при активной доставке лазерно-индуцированные гидродинамические процессы могут увеличивать скорость проникновения лекарств в биологические ткани [37,38] в результате генерации волн давления.

Важным вопросом является сохранение свойств лекарственного препарата после его активной лазерной доставки. Известно, что под действием лазерного излучения происходит усиление адреноблокирующих свойств пропранолола, ослабление кардиотонической активности адреналина и добутамина, усиление антиаритмической активности верапамила и лидокаина [39]. Это может быть связано с влиянием лазерного излучения на структуру препаратов, их гидратную оболочку и, следовательно, с изменением взаимодействия веществ с рецепторами [39]. Лазерное излучение может влиять на оптические свойства лекарств, в том числе в результате изменения их конформационного состояния [40,41]. Фотодинамическую эффективность фотосенсибилизирующего препарата также можно связать с его конформационным состоянием и оценить при исследовании спектра поглощения [42,43].

В процессе лазерной доставки и фотодинамической терапии при воздействии света с длиной волны, соответствующей пику поглощения препарата (резонансное воздействие), в результате эффективного фоторазрушения фотосенсибилизатора, а также в результате того, что длина волны пика поглощения хлоринсодержащих фотосенсибилизирующих препаратов при этом сдвигается,

во время облучения поглощение фотосенсибилизатора сильно падает, и существенно снижается фотодинамический эффект [43,44]. Воздействие на фотосенсибилизирующие препараты излучением с длиной волны, лежащей вне пика полосы поглощения, но попадающей в полосу поглощения (нерезонансное воздействие вне пика поглощения, например на длине волны 450 nm), способно ослабить оба вышеперечисленных эффекта и может привести к положительным в смысле сохранения фотодинамической активности препарата последствиям. В связи с этим исследование динамики спектра поглощения фотосенсибилизирующих препаратов при таком нерезонансном воздействии является актуальным. Нерезонансное лазерное воздействие должно в меньшей степени, чем резонансное, приводить к уменьшению поглощения фотосенсибилизирующего препарата на длине волны возбуждения в течение времени воздействия, так как в этом случае процессы фоторазрушения на длине волны возбуждения либо выражены слабо, либо полностью отсутствуют, а разрушение фотосенсибилизатора происходит не только под действием света, но также под действием других факторов (температура, кислотность и пр.). В этом случае в процессе лечения, например, грибкового заболевания в дерматологии для компенсации потери фотодинамической активности препарата потребуются меньшие, чем в случае резонансного воздействия, интенсивности излучения, что позволит избежать ненужной травмы, окружающей место воздействия биоткани при сохранении высокой эффективности фотодинамического действия, т.е. повысит безопасность лечения.

Одним из перспективных современных фотосенсибилизирующих препаратов, основанным на Себ, является Chloderm (Хлодерм, Россия). Динамика спектров поглощения этого препарата при фотодинамическом воздействии светодиоидным излучением с длиной волны 656 ± 10 nm была изучена в работе [44]. Процессы микроперфорации ногтя, доставки Chloderm к ногтевому ложу и ФДТ под действием лазерного излучения с длиной волны 450 nm до сих пор не исследовались, что наряду с перечисленным выше определяет актуальность изучения этих процессов.

Цель настоящей работы состояла в получении новых научных знаний о лазерной доставке современных фотосенсибилизирующих препаратов и ФДТ онихомикоза с помощью лазерного излучения с длиной волны 450 nm. В этой связи в работе выполнено *in vitro* исследование последовательной микропорации ногтевой пластины и активной лазерной доставки под ногтевую пластину современного хлоринсодержащего фотосенсибилизирующего препарата Chloderm лазерным излучением с длиной волны 450 nm, а также проведено исследование спектров экстинкции этого фотосенсибилизирующего препарата до и после воздействия лазерного излучения с интенсивностью, достаточной для микропорации ногтевой пластины.

Материалы и методы

В исследовании *in vitro* использованы фрагменты здоровых ногтевых пластин человека одного добровольца, экстрагированных по мере роста ногтя. Всего было исследовано 20 фрагментов. Перед экспериментами фрагменты механически очищались и промывались дистиллированной водой. Средняя толщина фрагментов составляла 370 ± 20 μ m.

Использован водный раствор фотосенсибилизирующего препарата Chloderm (Хлодерм, Россия). Массовая концентрация (С) Chloderm в воде составляла $C = 0.65\%$.

При исследовании скорости и эффективности лазерной абляции ногтя, а также скорости активной лазерной доставки Chloderm через одиночное микроотверстие использовалось излучение лазера с длиной волны 450 nm. Средняя мощность излучения P составляла 1.24, 1.69 и 1.90 W и была ограничена параметрами используемого лазерного диода. Диаметр лазерного пучка на поверхности ногтевой пластины составлял 1.1 ± 0.1 mm. Таким образом, интенсивность лазерного излучения на поверхности ногтя в эксперименте составляла 131, 178 и 200 W/cm² для перечисленных выше средних мощностей соответственно. Время лазерного воздействия (t) соответствовало 0.04, 0.06, 0.1, 0.15, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 и 1.5 s. Схема экспериментальной установки была аналогична описанной в работах [41,45] и представлена на рис. 1.

На внешней поверхности образца создавалась микроювета из склеенных между собой слоев скотча, ее толщина составляла $h = 100 \pm 10$ μ m, длина и ширина ~ 1.5 mm. Образец ногтевой пластины, в свою очередь, помещался на бумажную подложку, а подложка располагалась на поверхности стеклянной пластины.

На первом этапе (рис. 1, а) микроювета не заполнялась фотосенсибилизирующим препаратом, лазерное излучение фокусировалось на дорсальную поверхность ногтевой пластины. В результате лазерного воздействия с длиной волны 450 nm в ногтевой пластине создавалось микроотверстие. Процесс микропорации ногтевой пластины контролировался с помощью цифрового USB-микроскопа „DTX 50“ (Levenhuk, Inc., США), соединенного с компьютером и размещенного с тыльной стороны бумажной подложки. Момент микропорации соответствовал моменту появления дефекта на тыльной стороне бумажной подложки.

На втором этапе (рис. 1, б) микроювета заполнялась фотосенсибилизирующим препаратом. Сразу после этого осуществлялась его активная доставка в результате лазерного воздействия с длиной волны 450 nm. Момент доставки фотосенсибилизирующего препарата соответствовал моменту окраски бумажной подложки, на которой размещался образец, в цвет препарата и регистрировался цифровым USB-микроскопом. Внешний вид дорсальной стороны ногтевой пластины и обращенной к микроскопу стороны бумажной подложки, на

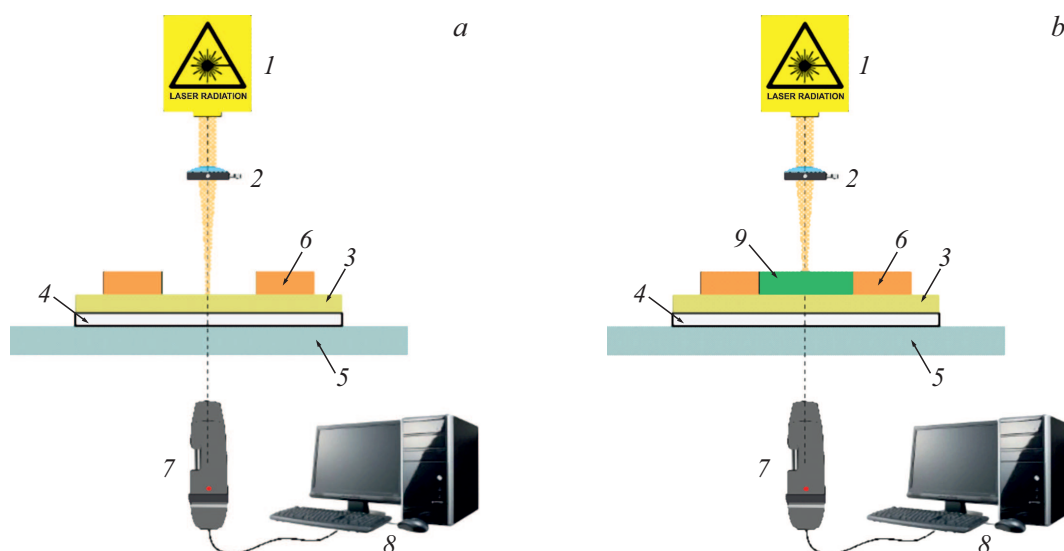


Рис. 1. Схема экспериментальной установки для последовательной микропорации (*a*) и активной лазерной доставки (*b*) Chloderm (Хлодерм, Россия) под ногтевую пластину: 1 — лазер ($\lambda = 450 \text{ nm}$); 2 — линза ($F = 50 \text{ mm}$); 3 — фрагмент ногтевой пластины; 4 — бумажная подложка; 5 — стеклянная пластина; 6 — микроковчег; 7 — цифровой USB-микроскоп DTX 50 (Levenhuk, Inc., США); 8 — компьютер; 9 — водный раствор Chloderm ($C = 0.65\%$).

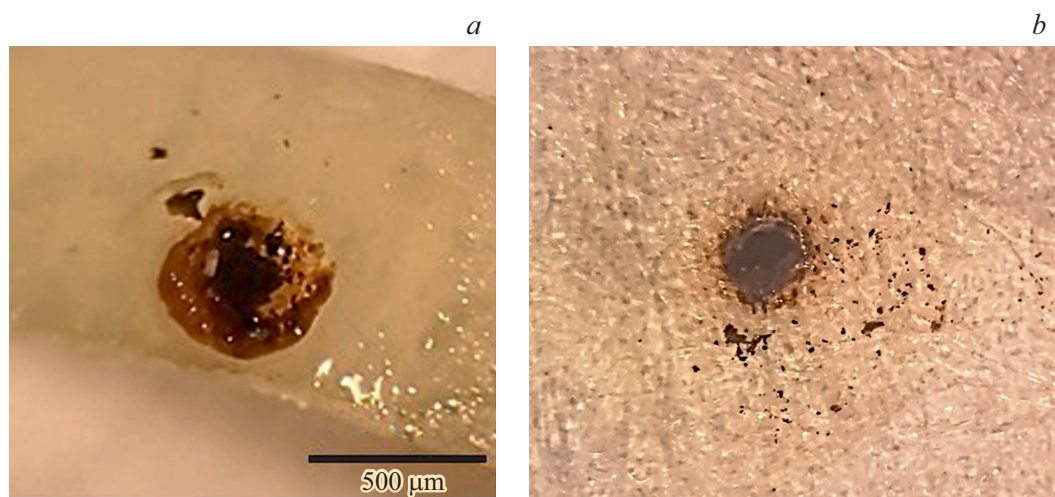


Рис. 2. Типичная фотография дорсальной стороны ногтевой пластины (*a*) и обращенной к микроскопу стороны бумажной подложки, на которой размещался образец ногтевой пластины (*b*) в момент доставки водного раствора Chloderm ($C = 0.65\%$) лазерным излучением с длиной волны 450 nm ($P = 1.90 \text{ W}$, $t = 0.6 \text{ s}$).

которой размещался образец ногтевой пластины в момент доставки водного раствора Chloderm ($C = 0.65\%$), представлен на рис. 2.

В эксперименте определялись скорость и эффективность лазерной абляции ногтевой пластины, время, необходимое для создания сквозного одиночного микроотверстия в ногтевой пластине, и время, необходимое для активной доставки фотосенсибилизирующего препарата, в зависимости от мощности лазерного излучения. Также определялись масса (m_{Chloderm}) фотосенсибилизирующего препарата, проникшего (доставленного) через одиночное отверстие в момент его доставки

под ногтевую пластину, и скорость (V_{Chloderm}) доставки препарата через одиночное микроотверстие. Скорость абляции определялась как отношение глубины кратера в ногтевой пластине ко времени действия лазерного излучения. Эффективность абляции определялась как отношение глубины кратера в ногтевой пластине к энергии, необходимой для его создания. Для оценки глубины кратера фрагмент ногтевой пластины с кратером шлифовался абразивным инструментом вдоль оси кратера, и формировался продольный шлиф кратера, проходящий через ось кратера. Продольный шлиф кратера фотографировался с помощью USB-микроскопа

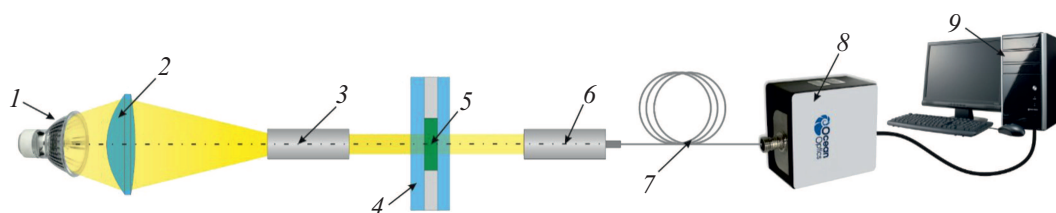


Рис. 3. Схема установки для исследования спектров экстинкции водного раствора Chloderm: 1 — галогеновая лампа (50 W); 2 — фокусирующая линза ($F = 80$ mm); 3 — коллиматор; 4 — кювета; 5 — водный раствор Chloderm; 6 — приемный коллиматор; 7 — волокно спектрометра; 8 — спектрометр SD2000 (Ocean Optics Inc., США); 9 — компьютер.

DTX 50 (Levenhuk, Inc., США), полученное изображение анализировалось в программе CorelDRAW Graphics Suite 2021 (Corel Corporation, Канада), в результате чего определялась глубина кратера.

Скорость микропорации определялась как отношение толщины ногтевой пластины ко времени, необходимому для создания сквозного одиночного микроотверстия в ногтевой пластине. Эффективность микропорации определялась как отношение толщины ногтевой пластины к энергии, необходимой для создания сквозного одиночного микроотверстия в ногтевой пластине. Масса PM_{Chloderm} рассчитывалась по результатам взвешивания бумажной подложки до и после активной лазерной доставки фотосенсибилизирующего препарата и соответствовала разности масс бумажной подложки до и после доставки. Взвешивание проводилось в течение 5–10 s после доставки. При этом учитывалось уменьшение веса бумажной подложки, связанное с формированием в ней микроотверстия после микропорации ногтевой пластины. Вес удаленного при микропорации материала бумажной подложки определялся как разность веса бумажной подложки до и сразу после микропорации. В экспериментах вес удаленного при микропорации материала бумажной подложки составлял от 0.04 до 0.08 mg в зависимости от мощности и времени воздействия лазерного излучения. Скорость доставки V_{Chloderm} определялась как отношение массы PM_{Chloderm} ко времени, необходимому для активной лазерной доставки фотосенсибилизирующего препарата.

Для обнаружения возможных структурных изменений Chloderm в процессе активной лазерной доставки при воздействии лазерным излучением с длиной волны 450 nm было проведено физическое моделирование этого процесса и определены коэффициенты экстинкции фотосенсибилизирующего препарата до и после лазерного воздействия. Спектры экстинкции водного раствора Chloderm регистрировались при помощи спектрометра SD2000 (Ocean Optics Inc., США). Измерения производились относительно двух стеклянных пластин, идентичных стенкам кюветы и прозрачных для света. Схема экспериментальной установки была аналогична описанной в работах [41,46] и показана на рис. 3.

Водный раствор Chloderm ($C = 0.65\%$) полностью заполнял внутреннее пространство кварцевой кюветы,

размеры которого были идентичны параметрам внутреннего пространства микрокюветы, создаваемой на поверхности ногтя при исследовании активной лазерной доставки Chloderm (см. выше). Регистрировался спектр пропускания водного раствора Chloderm до лазерного воздействия. Затем производилось облучение водного раствора Chloderm путем сканирования лазерного излучения с длиной волны 450 nm вдоль поверхности фотодинамического препарата. При этом интенсивность лазерного излучения была максимальной и равной 200 W/cm^2 . Сканирование осуществлялось дискретно от точки к точке, с шагом, равным диаметру лазерного пучка, до тех пор, пока не была облучена вся площадь поверхности препарата. Время лазерного воздействия в одну точку составляло 0.3, 0.4, 0.7 и 0.8 s. Затем облученный водный раствор Chloderm внутри кюветы тщательно (в течение 10 ± 1 s) перемешивался, после чего регистрировался спектр его пропускания после лазерного воздействия. Регистрация спектра занимала 10–15 s.

По полученным спектрам пропускания в соответствии с законом Бугера–Ламберта–Бера рассчитывался спектр экстинкции водного раствора Chloderm до и после лазерного воздействия. В экспериментах исследовались две полосы поглощения: с пиком на длине волны 664 ± 3 nm (Q_y 00-полоса поглощения препарата) и с пиком на длине волны 710 ± 3 nm, которые соответствуют конформационным состояниям Себ в форме мономера и тетрамера соответственно [21]. В работе также оценивался коэффициент экстинкции на длине волны 405 ± 5 nm, соответствующей пику В-полосы поглощения препарата, на длине волны 450 ± 2 nm, соответствующей длине волны лазерного излучения, и на длине волны 507 ± 5 nm, соответствующей пику Q_x 00-полосы поглощения препарата. В работе оценивался коэффициент спектральной трансформации (k_t), равный отношению коэффициента экстинкции Chloderm (μ_t) на длине волны, соответствующей резонансному поглощению мономеров, к коэффициенту экстинкции Chloderm на длине волны, соответствующей резонансному поглощению тетрамеров. Поскольку полученные в эксперименте спектры являлись сложными, с перекрывающимися полосами, для получения истинного k_t производилось разложение спектра на отдельные линии гауссова

профиля, пики которых находились из полученных в эксперименте спектров и соответствовали длинам волн 664 ± 5 nm (мономеры) и 705 ± 5 nm (тетрамеры). Обработка спектров производилась посредством встроенных функций прикладного программного пакета „Origin Pro 2021“ (OriginLab Corporation, США). Если $k_t = 1$, то тетрамеры в равной с мономерами мере присутствуют в растворе, если $k_t > 1$, в растворе в большей мере присутствуют мономеры, а не тетрамеры, и если $k_t < 1$, то в большей мере присутствуют тетрамеры, а не мономеры. Исследовалось изменение k_t в зависимости от времени лазерного воздействия t .

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

Результаты и обсуждение

Зависимости скорости и эффективности абляции ногтевой пластины от времени лазерного воздействия с длиной волны 450 nm при его различной мощности представлены на рис. 4, а и 4, b соответственно.

Видно, что скорость и эффективность абляции уменьшаются с ростом времени лазерного воздействия. Это может быть связано с постепенным отдалением дна кратера от плоскости перетяжки лазерного пучка в течение времени лазерного воздействия, а также с накоплением продуктов лазерного разрушения внутри кратера, которые поглощают излучение. В обоих случаях снижается энергия, достигающая дна кратера. Также следует отметить, что скорость и эффективность абляции ногтевой пластины увеличиваются с ростом мощности лазерного излучения, что очевидно обусловлено увеличением объема ногтевой пластины, внутри которого интенсивность лазерного излучения превышает пороговую для абляции величину.

Максимальная скорость абляции ногтевой пластины излучением с длиной волны 450 nm составила 2750 ± 30 $\mu\text{m/s}$, а эффективность абляции ногтевой пластины — 1.47 ± 0.05 $\mu\text{m/mJ}$ при мощности лазерного излучения $P = 1.90$ W.

Скорость и эффективность абляции здоровой ногтевой пластины излучением CO_2 ($\lambda = 10.6$ μm)-лазера исследовались в работах [47,48], излучением Er:YAG ($\lambda = 2.94$ μm), Ho:YSGG ($\lambda = 2.08$ μm), фемтосекундного Ti:Sapphire ($\lambda = 1.053$ μm)-, XeCl ($\lambda = 0.308$ μm)-лазеров в работе [46], а излучением Er:YLF ($\lambda = 2.81$ μm) в работе [31]. В работе [49] исследовались скорость и эффективность абляции ногтевой пластины, пораженной *T. rubrum* или *T. mentagrophytes*, излучением Er:YAG ($\lambda = 2.94$ μm)-лазера, и было показано, что скорость и эффективность абляции пораженной ногтевой пластины лазерным излучением со-

поставимы с таковыми для здоровой ногтевой пластины. В нашем случае эффективность абляции здоровой ногтевой пластины при лазерном воздействии с длиной волны 450 nm превышает эффективность Ho:YSGG (0.05 $\mu\text{m/mJ}$)- и XeCl (0.03 $\mu\text{m/mJ}$)-лазеров, сопоставима с эффективностью CO_2 (0.55 $\mu\text{m/mJ}$)-, Er:YAG (0.2 – 0.4 $\mu\text{m/mJ}$)- и Ti:Sapphire (1 $\mu\text{m/mJ}$)-лазеров, но уступает эффективности абляции излучением Er:YLF-лазера (4.6 $\mu\text{m/mJ}$), что можно объяснить различием как в поглощении ногтевой пластины на этих длинах волн, так и в пространственно-временных характеристиках лазерного излучения.

Время лазерного воздействия, необходимое для сквозной микропороции ногтевой пластины, в нашем случае составило 0.4, 1.0 и 1.5 s для мощности лазерного излучения 1.90, 1.69 и 1.24 W соответственно.

Зависимость массы $\text{PM}_{\text{Chloderm}}$ водного раствора Chloderm, проникшего через одиночное отверстие в ногтевой пластине в момент его доставки под ногтевую пластину, от времени воздействия при различной мощности лазерного излучения представлена на рис. 5, а. Зависимость скорости (V_{Chloderm}) активной лазерной доставки водного раствора Chloderm от времени воздействия при различной мощности лазерного излучения представлена на рис. 5, b.

Зависимости $\text{PM}_{\text{Chloderm}}$ и V_{Chloderm} приведены только для $P = 1.69$ W и $P = 1.90$ W, так как при $P \leq 1.69$ W доставка не происходила. Видно, что $\text{PM}_{\text{Chloderm}}$ и V_{Chloderm} увеличиваются с ростом времени воздействия лазерного излучения, а также мощности излучения. Это очевидно связано с ростом энергетической экспозиции лазерного излучения.

Максимальная масса $\text{PM}_{\text{Chloderm}} = 0.92 \pm 0.09$ mg и скорость доставки $V_{\text{Chloderm}} = 1.15 \pm 0.10$ mg/s были зарегистрированы при $P = 1.90$ W и $t = 0.8$ s. Минимальное время, необходимое для активной лазерной доставки, наблюдалось при $P = 1.90$ W и соответствовало 0.3 s. В работе [37] исследовались скорость лазерной доставки водного раствора метиленового голубого (МВ) и масса доставленного под ногтевую пластину препарата при воздействии излучением Er:YLF ($\lambda = 2.81$ μm)-лазера. Было показано, что масса доставленного препарата составляет $\text{PM}_{\text{MB}} = 1.04 \pm 0.27$ mg, а скорость доставки $V_{\text{MB}} = 0.26 \pm 0.03$ mg/pulse, что при длительности лазерного импульса $t_p = 270 \pm 10$ μs соответствует $V_{\text{MB}} = 963 \pm 0.03$ mg/s. Очевидно, в нашем случае масса доставленного препарата и скорость доставки существенно меньше, что может быть связано как с различием в вязкости доставляемых лекарств, так и с существенными отличиями в поглощении лекарствами излучения этих лазеров и в импульсной мощности лазерных источников, влияющими на интенсивность протекающих гидродинамических процессов.

Типичные спектры экстинкции водного раствора Chloderm ($C = 0.65\%$) до и после воздействия лазерного излучения с длиной волны 450 nm и мощностью $P = 1.90$ W (интенсивность 200 W/cm²) представлены на

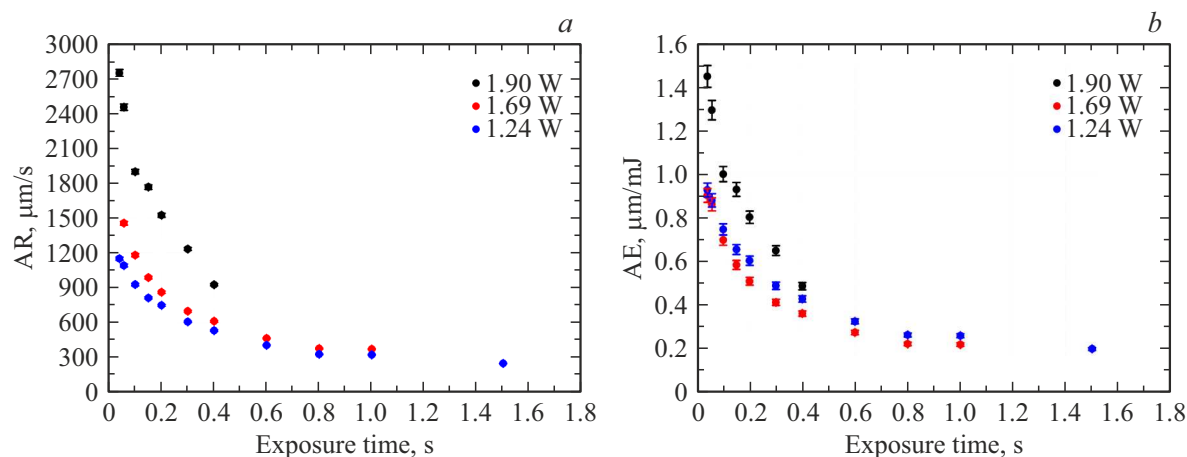


Рис. 4. Зависимость скорости AR (a) и эффективности AE (b) абляции ногтевой пластины от времени воздействия лазерного излучения с длиной волны 450 nm при различной его средней мощности.

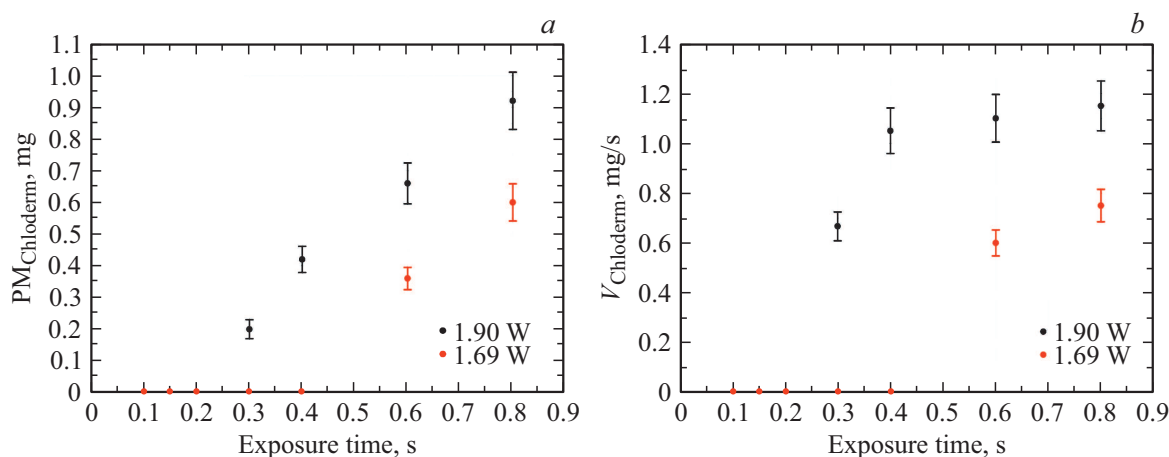


Рис. 5. Зависимость массы $\text{PM}_{\text{Chloderm}}$ (a) и скорости (V_{Chloderm}) активной лазерной доставки (b) водного раствора „Chloderm“ ($C = 0.65\%$) от времени воздействия лазерного излучения с длиной волны 450 nm при различной его средней мощности.

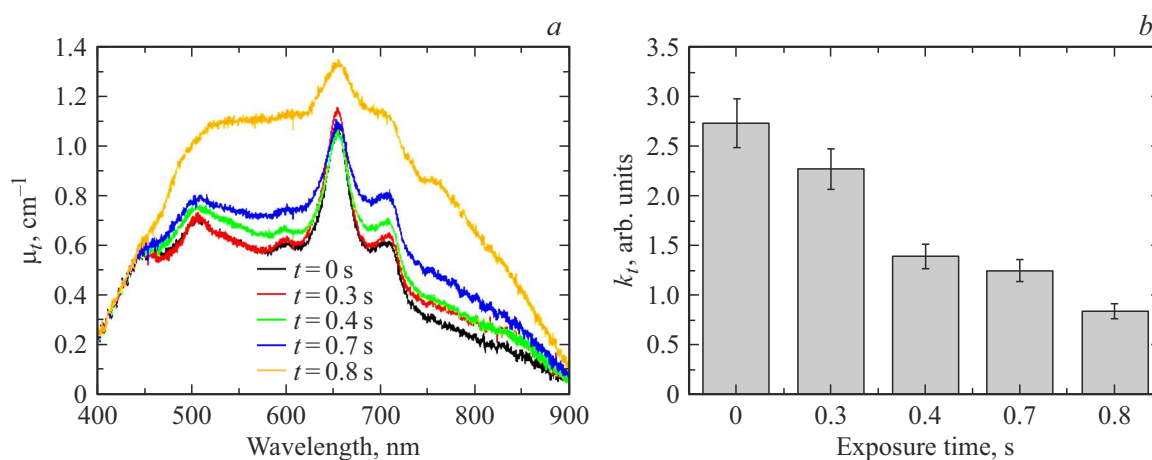


Рис. 6. Типичные спектры экстинкции водного раствора Chloderm ($C = 0.65\%$) до и после лазерного воздействия при различных временах воздействия (a) и коэффициенты трансформации k_t при различном времени лазерного воздействия (b) (μ_t — коэффициент экстинкции, длина волны лазерного излучения 450 nm, средняя мощность $P = 1.90$ W, интенсивность 200 W/cm²).

рис. 6, а. Зависимость коэффициента трансформации k_t от времени лазерного воздействия представлена на рис. 6, б.

До лазерного воздействия коэффициент экстинкции μ_t водного раствора Chloderm на длине волны $405 \pm 2 \text{ nm}$ составлял 0.28 cm^{-1} , на длине волны $450 \pm 5 \text{ nm}$ — 0.59 cm^{-1} , на длине волны $507 \pm 5 \text{ nm}$ — 0.69 cm^{-1} , на длине волны $664 \pm 5 \text{ nm}$ — 0.84 cm^{-1} , а на длине волны $710 \pm 3 \text{ nm}$ — 0.47 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 водном растворе Chloderm в большей мере присутствуют мономеры Себ, а не его тетрамеры.

При воздействии на гель лазерным излучением с длиной волны 450 nm с мощностью 1.90 W (рис. 6, а) в течение времени 0.3, 0.4, 0.7 и 0.8 s коэффициент экстинкции μ_t на длине волны $405 \pm 2 \text{ nm}$ не изменяется; на длине волны $450 \pm 5 \text{ nm}$ не изменяется при времени воздействия 0.3 s и увеличивается до 0.60, 0.60 и 0.64 cm^{-1} при других временах лазерного воздействия; на длине волны $507 \pm 5 \text{ nm}$ увеличивается до 0.72, 0.74, 0.79 и 1.03 cm^{-1} ; на длине волны $664 \pm 3 \text{ nm}$ увеличивается до 0.89 cm^{-1} , 0.88 cm^{-1} , 0.94 cm^{-1} и 1.25 cm^{-1} , а на длине волны $710 \pm 3 \text{ nm}$ увеличивается до 0.51, 0.56, 0.66 и 1.05 cm^{-1} соответственно. Увеличение может быть связано с увеличением концентрации фотосенсибилизатора (Себ) в препарате из-за испарения воды под действием лазерного излучения.

Коэффициент трансформации k_t уменьшается с 2.73 ± 0.25 ($t = 0 \text{ s}$) до 0.83 ± 0.07 ($t = 0.8 \text{ s}$). Это свидетельствует о том, что с ростом t изменяется конформационное состояние водного раствора Chloderm, и количество мономеров хлорина еб уменьшается, что может снизить фотодинамическую активность Chloderm, доставленного к тыльной стороне ногтя. Однако вплоть до $t = 0.7 \text{ s}$ коэффициент трансформации k_t после лазерного воздействия остается большим единицы, что говорит о том, что, как и в исходном растворе, в водном растворе Chloderm после лазерного воздействия с $t \leq 0.7 \text{ s}$ в большей мере присутствуют мономеры Себ, а не его тетрамеры.

Отмеченные в работе изменения в спектре экстинкции фотодинамического препарата вряд ли могут быть связаны с его нагревом в процессе лазерной доставки и последующим остыванием при комнатной температуре. В работе [50] отмечается, что нагрев хлоринсодержащего фотодинамического препарата Revixan (ООО „Ареал“, Россия) может приводить к изменению формы спектра экстинкции этого препарата, изменять его конформационное состояние и приводить к росту концентрации мономеров. Известна также работа [51], в которой исследуется влияние температуры на спектрально-люминесцентные свойства водорастворимого трикарбоцианинового красителя и проверяется стабильность этого соединения при нагревании. Авторы приходят к выводу, что при нагреве в этом соединении концентрация мономеров

увеличивается из-за распада димеров, а коэффициенты поглощения красителя изменяются. В работе [52] изучается эволюция спектров поглощения индотрикарбоцианинового красителя в результате цикла нагрев–охлаждение. Показано, что воздействие температуры приводит к изменению спектров поглощения красителя, а повышение температуры приводит к возрастанию концентрации мономеров за счет распада димеров. В нашем случае концентрация мономеров уменьшается, что в большей степени может быть связано с их фоторазрушением излучением с длиной волны 450 nm .

Следует обратить внимание, что при минимальном времени лазерного воздействия, необходимом для активной лазерной доставки ($t = 0.3 \text{ s}$), k_t изменяется менее чем на 20%, что позволяет говорить о том, что лазерная доставка излучением с длиной волны 450 nm и интенсивностью 200 W/cm^2 (энергетическая экспозиция 60 J/cm^2) незначительно изменяет конформационное состояние водного раствора Chloderm.

Заключение

В условиях *in vitro* исследована возможность последовательной микропорации и активной доставки современного хлоринсодержащего фотосенсибилизирующего препарата Chloderm (Хлодерм, Россия) под ногтевую пластину излучением полупроводникового лазера с длиной волны 450 nm . Продемонстрирована возможность микропорации ногтевой пластины излучением этого лазера и показано, что минимальное время воздействия, необходимое для микропорации ногтевой пластины, составляет 0.4 s. Установлено, что максимальная скорость абляции ногтевой пластины излучением с длиной волны 450 nm составляет $2750 \pm 30 \mu\text{m/s}$, а эффективность абляции — $1.47 \pm 0.05 \mu\text{m/mJ}$. Продемонстрирована возможность активной доставки современного хлоринсодержащего фотосенсибилизирующего препарата Chloderm под ногтевую пластину. Минимальное время воздействия, необходимое для активной доставки водного раствора геля Chloderm, при интенсивности лазерного излучения равной 200 W/cm^2 составляет 0.3 s. Показано, что скорость активной лазерной доставки водного раствора Chloderm излучением с длиной волны 450 nm достигает $1.15 \pm 0.10 \text{ mg/s}$. Впервые в эксперименте *in vitro* продемонстрировано, что с помощью лазерного излучения с длиной волны 450 nm и мощностью $P \geq 1.69 \text{ W}$ (интенсивность $\geq 178 \text{ W/cm}^2$) можно осуществить последовательно микропорацию ногтевой пластины со средней толщиной $350 \pm 20 \mu\text{m}$ и активную лазерную доставку водного раствора Chloderm ($C = 0.65\%$) с толщиной слоя $h = 100 \mu\text{m}$.

Исследованы спектры экстинкции водного раствора Chloderm до и после активной лазерной доставки. Показано, что лазерная доставка с длиной волны 450 nm не изменяет коэффициент экстинкции препарата на длине волны лазерного излучения и незначительно изменяет его конформационное состояние. ФДТ активность

Chloderm после лазерной доставки излучением с длиной волны 450 nm нуждается в дальнейшем исследовании на культурах грибов, приводящих к онихомикозу.

Благодарности

Авторы выражают благодарность профессору М.Л. Гельфонду (НМИЦ Онкологии им. Н.Н. Петрова) за предоставленные образцы современных хлоринсодержащих фотосенсибилизирующих препаратов.

Финансирование работы

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-25-00468).

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] A.K. Bhatta, U. Keyal, X.L. Wang. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, **15**, 228 (2016). DOI: 10.1016/j.pdpdt.2016.07.010
- [2] P. Rich, R.K. Scher. *An atlas of diseases of the nail* (CRC Press, Boca Raton, 2003). ISBN: 1135384800, 9781135384807
- [3] B.E. Elewski. American J. Clinical Dermatology, **1** (1), 19 (2000). DOI: 10.2165/00128071-200001010-00002
- [4] A. Kulichenko, D.S. Farrakhova, D.V. Yakovlev, Y.S. Maklygina, A.A. Shiryaev, V.B. Loschenov. J. Phys.: Conference Series, **2058** (1), 012021 (2021). DOI: 10.1088/1742-6596/2058/1/012021
- [5] G. Bozzini, P. Colin, N. Betrouni, P. Nevoux, A. Ouzzane, P. Puech, A. Villers, S. Mordon. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, **9** (3), 261 (2012). DOI: 10.1016/j.pdpdt.2012.01.005
- [6] K. Kalka, H. Merk, H. Mukhtar. J. American Academy of Dermatology, **42** (3), 389 (2000). DOI: 10.1016/S0190-9622(00)90209-3
- [7] N.M. Bressler, S.B. Bressler. Investigative Ophthalmology & Visual Science, **41** (3), 624 (2000).
- [8] A. Stájer, S. Kajári, M. Gajdács, A. Musah-Eroje, Z. Baráth. Dentistry J., **8** (2), 43 (2020). DOI: 10.3390/dj8020043
- [9] A.K. Bhatta, U. Keyal, X.L. Wang. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, **15**, 228 (2016). DOI: 10.1016/j.pdpdt.2016.07.010
- [10] C. Aspiroz, A. Rezusta, P. Paz-Cristóbal, F. Domínguez-Luzón, Y. Gilaberte. Revista Iberoamericana de Micología, **28** (4), 191 (2011). DOI: 10.1016/j.riam.2011.03.004
- [11] B.M. Piraccini, G. Rech, A. Tosti. J. American Academy of Dermatology, **59** (5), S75 (2008). DOI: 10.1016/j.jaad.2008.06.015
- [12] B.J. Simmons, R.D. Griffith, L.A. Falto-Aizpurua, K. Nouri. J. European Academy of Dermatology and Venereology, **29** (7), 1275 (2015). DOI: 10.1111/jdv.12950
- [13] A.K. Bhatta, U. Keyal, X. Wang, E. Gellén. Lasers in Medical Science, **32** (2), 469 (2017). DOI: 10.1007/s10103-016-2110-9
- [14] D. Watanabe, C. Kawamura, Y. Masuda, Y. Akita, Y. Tamada, Y. Matsumoto. Archives of Dermatology, **144** (1), 19 (2008). DOI: 10.1001/archdermatol.2007.17
- [15] J. Usuda, H. Kato, T. Okunaka, K. Furukawa, H. Tsutsui, K. Yamada, T. Hirano. J. Thoracic Oncology, **1** (5), 489 (2006). DOI: 10.1016/S1556-0864(15)31616-6
- [16] X. Zhao, J. Liu, J. Fan, H. Chao, X. Peng. Chem. Soc. Rev., **50**, 4185 (2021). DOI: 10.1039/D0CS00173B
- [17] A. Al-Ahmad, A. Walankiewicz, E. Hellwig, M. Follo, C. Tennert, A. Wittmer, L. Karygianni. Frontiers in Microbiology, **7**, 1900 (2016). DOI: 10.3389/fmicb.2016.01900
- [18] J.H. Kim, C.S. Han, S.N. Chun, M.Y. Lee. Toxicology and Environmental Health Sciences, **6** (3), 170 (2014). DOI: 10.1007/s13530-014-0202-0
- [19] J.C. Carmello, L.N. Dovigo, E.G. Mima, J.H. Jorge, C.A. de Souza Costa, V.S. Bagnato, A.C. Pavarina. Photochemical & Photobiological Sciences, **14** (7), 1319 (2015). DOI: 10.1039/C4PP00368C
- [20] H.A. Isakau, M.V. Parkhats, V.N. Knyuksho, B.M. Dzhagarov, E.P. Petrov, P.T. Petrov. J. Photochemistry and Photobiology B: Biology, **92** (3), 165 (2008). DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2008.06.004
- [21] Е.В. Кунделев. *Круговой дихроизм в оптических спектрах агрегатов тетрапиррольных молекул и комплексов квантовая точка-молекула*. Автореф. канд. дис. (Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, СПб., 2017).
- [22] D.L. Jiang, Z. Yang, G.X. Liu, K. Wu, J. Fan, D. Wu, D. He. Lasers in Medical Science, **34** (4), 807 (2019). DOI: 10.1007/s10103-018-2668-5
- [23] C. Fornaini, J.P. Rocca, E. Merigo. World J. Clinical Cases, **4** (9), 253 (2016). DOI: 10.12998/wjcc.v4.i9.253
- [24] S. Dewi-Astuty, S. Dyah-Astuty, A. Bak,ir, J. Physics: Conference Series, **979** (1), 012077 (2018). DOI: 10.1088/1742-6596/979/1/012077
- [25] J. Szymańczyk, W. Trzeciakowski, Y. Ivonyak, P. Tuchowski, J. Szymańczyk. J. Clinical Medicine, **10** (6), 1258 (2021). DOI: 10.3390/jcm10061258
- [26] P. Vildósola, J. Bottner, F. Avalos, I. Godoy, J. Martín, E. Fernández. J. Esthetic and Restorative Dentistry, **29** (5), 339 (2017). DOI: 10.1111/jerd.12318
- [27] N.K. Khoo, A. Iravani, M. Arjmand, F. Vahabi, M. Lajevardi, S.M. Akrami, Z.A. Zamani. Lasers in Medical Science, **28** (6), 1527 (2013). DOI: 10.1007/s10103-012-1247-4
- [28] T.W.R. Hansen, M.J. Maisels, F. Ebbesen, H.J. Vreman, D.K. Stevenson, R.J. Wong, V.K. Bhutani. J. Perinatology, **40** (2), 180 (2020). DOI: 10.1038/s41372-019-0439-1
- [29] K. Mreihil, P. Madsen, B. Nakstad, J.Š. Benth, F. Ebbesen, T.W.R. Hansen. Pediatric Research, **78** (1), 56 (2015). DOI: 10.1038/pr.2015.61
- [30] S. Murdan. Expert Opinion on Drug Delivery, **5** (11), 1267 (2008).
- [31] A.V. Belikov, A.N. Sergeev, S.N. Smirnov, A.D. Tavalinskaya. Frontiers of Optoelectronics, **10** (3), 299 (2017). DOI: 10.1007/s12200-017-0719-3
- [32] J. Neev, J. Stuart Nelson, M. Critelli, J.L. McCullough, E. Cheung, W.A. Carrasco, B.C. Stuart. Lasers in Surgery and Medicine, **21** (2), 186 (1997).

- [33] M.T. Tsai, T.Y. Tsai, S.C. Shen, C.Y. Ng, Y.J. Lee, J.D. Lee, C.H. Yang. *Sensors (Basel)*, **16** (12), 2111 (2016). DOI: 10.3390/s16122111
- [34] O.O.D. Morais, I.M.C. Costa, C.M. Gomes, D.H. Shinzato, G.M.C. Ayres, R.M. Cardoso. *An Bras Dermatol.*, **88** (5), 847 (2013). DOI: 10.1590/abd1806-4841.20131932
- [35] A.V. Belikov, A.D. Tavalinskaya, S.N. Smirnov, A.N. Sergeev. *Biomedical Optics Express*, **10** (7), 3232 (2019). DOI: 10.1364/BOE.10.003232
- [36] A.V. Belikov, A.V. Skrypnik, A.N. Sergeev, S.N. Smirnov, A.D. Tavalinskaya. In: *Saratov Fall Meeting 2017: Optical Technologies in Biophysics and Medicine XIX* (International Society for Optics and Photonics, 2018), **10716**, p. 107160X.
- [37] A.V. Belikov, A.V. Skrypnik, K.V. Shatilova, V.V. Tuchin. *Lasers Surg. Med.*, **47** (9), 723 (2015). DOI: 10.1002/lsm.22417
- [38] A.G. Doukas, N. Kollias. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **56** (5), 559 (2004). DOI: 10.1016/j.addr.2003.10.031Get
- [39] С.В. Ревенко. *Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на действие некоторых кардиотропных средств*. Автореф. канд. дис. (Курский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, Курск, 2004).
- [40] G. Pradeep, S. Cyriac, S. Ramkumar, C.S. Kartha. *Japanese J. Appl. Phys.*, **39** (1R), 137 (2000).
- [41] A.V. Belikov, A.D. Tavalinskaya, S.N. Smirnov. *Lasers in Surgery and Medicine*, **53** (8), 1122 (2021). DOI: 10.1002/lsm.23379
- [42] M.Q. Mesquita, C.J. Dias, S. Gamelas, M. Fardilha, M.G. Neves, M.A.F. Faustino. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, **90** (1), 1101 (2018). DOI: 10.1590/0001-3765201720170800
- [43] M.T. Jarvi, M.S. Patterson, B.C. Wilson. *Biophysical J.*, **102** (3), 661 (2012). DOI: 10.1016/j.bpj.2011.12.043
- [44] A.V. Беликов, Ю.В. Семьяшкина, С.Н. Смирнов, А.Д. Тавалинская. *Опт. и спектр.*, **128** (7), 972 (2020). DOI: 10.21883/OS.2020.07.49570.55-20 [A.V. Belikov, Yu.V. Semyashkina, S.N. Smirnov, A.D. Tavalinskaya. *Opt. Spectrosc.*, **128**, 980 (2020). DOI: 10.1134/S0030400X20070024.
- [45] J. Neev, J. Stuart Nelson, M. Critelli, J.L. McCullough, E. Cheung, W.A. Carrasco, B.C. Stuart. *Lasers in Surgery and Medicine: The Official J. American Society for Laser Medicine and Surgery*, **21** (2), 186 (1997).
- [46] A.V. Беликов, С.Н. Смирнов, А.Д. Тавалинская. *Опт. и спектр.*, **129** (6), 698 (2021). DOI: 10.21883/OS.2021.06.50979.6-21
- [47] M.T. Tsai, T.Y. Tsai, S.C. Shen, C.Y. Ng, Y.J. Lee, J.D. Lee, C.H. Yang. *Sensors*, **16** (12), 2111 (2016). DOI: 10.3390/s16122111
- [48] E.H. Lim, H.R. Kim, Y.O. Park, P. Lee, Y.J. Seo, C.D. Kim, J.H. Lee, M. Im. *J. Am. Acad. Dermatol.*, **70** (5), 186 (2014). DOI: 10.1016/j.jaad.2014.01.893
- [49] O.O. Morais, G.M. Gomez, G.M.C. Ayres, I.M.C. Costa, D.H. Shinzato, R.M. Cardoso. *An Bras Dermatol.*, **88** (5), 847 (2013). DOI: 10.1590/abd1806-4841.20131932
- [50] A.V. Беликов, С.Н. Смирнов, А.Д. Тавалинская. *Опт. и спектр.*, **129** (6), 698 (2021). DOI: 10.21883/OS.2021.06.50979.6-21
- [51] Т.И. Ермилова, Д.С. Тарасов. В сб.: *Сборник работ 69-й научной конференции студентов и аспирантов Белорусского государственного университета 14-17 мая 2012 г.*, (Изд. центр БГУ, Минск, 2013), I, 126.
- [52] Н.В. Белько, М.П. Самцов, А.П. Луговский. *Журн. Белорусского государственного университета. Физика*, **2**, 19 (2020). DOI: 10.33581/2520-2243-2020-2-19-27