

# POSOUZENÍ VHODNOSTI POUŽITÍ EXCIMEROVÉHO LASERU K LÉČENÍ ONYCHOMYKÓZY

Jaroslava Kyplová<sup>1</sup>, Jana Urzová<sup>2</sup>, Jan Mikšovský<sup>2</sup>, Karel Dušek<sup>1</sup>, Lenka Bauerová<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Ústav biofyziky a informatiky 1. LF UK Praha, <sup>2</sup>Fakulta biomedicínského inženýrství ČVUT Praha,

<sup>3</sup>Ústav patologie 1. LF UK a VFN Praha

## Souhrn

Jelikož je známo, že UV-C záření ničí plísňe, chtěli jsme ověřit hypotézu, že by se využití excimerového laseru mohlo stát alternativní metodou k léčení onychomykózy – plísňe nehtů. Cílem 1. etapy této práce bylo určit transmisí, reflexi a absorpci nehtů. V další etapě se věnujeme ozařování plísni a posledním úkolem je stanovit, zda lze určit parametry záření (celková dávka, dávka na jeden pulz, opakovací frekvence, počet pulzů), pro které bude likvidace plísni nejúčinnější, ale nepoškodí se nehet a měkká tkáň pod ním. Z výsledků měření vyplývá, že UV-C záření neprochází nehtem v takové míře, aby mohlo poškodit měkkou tkáň pod ním a plísňe jsou ničeny aplikací již malých dávek záření excimerového laseru. Stanovení parametrů modu-  
lace laserového záření pro léčbu onychomykozy vyžaduje rozsáhlejší a dlouhodobější měření.

## Klíčová slova

excimerový laser, UV-C záření, nehty, onychomykoza

## ASSESSMENT OF SUITABILITY OF EXCIMER LASER IN TREATING ONYCHOMYCOSIS

### Abstract

It is known that UV-C radiation kills fungus and so we wanted to verify the hypothesis that the use of Excimer laser could be an alternative method for treating onychomycosis – nail fungus. The aim of the first stage of this work was to determine the transmission, reflection and absorption of nails. In the following stage we focused on irradiation of fungi. Our final task is to assess whether it is possible to determine the parameters of radiation (a total dose, a dose per pulse frequency, a repetition rate, a number of pulses) for which the elimination of fungi would be the most effective but without damaging the nail and soft tissue underneath it. The results so far have showed that UV-C radiation does not pass through a fingernail to such an extent that it could damage the soft tissue beneath it. Fungi are destroyed by application of only small doses of radiation using the Excimer laser. To determine the modulation parameters of the Excimer laser radiation for the treatment of onychomycosis will require additional measurements.

### Keywords

excimer laser, UV-C radiation, nails, onychomycosis

## Úvod

Onychomykózu, způsobují různé druhy parazitických hub, plísně nebo kvasinky. Houby se živí keratinem, což je tkáň tvořící nehet, postupně jím prorůstají a rozkládají ho. Uvádí se, že touto chorobou je postiženo 8 % obyvatelstva.

Mezi hlavní příčiny onemocnění patří: nošení uzavřeného a neprodyšného obuvi z nevhodných materiálů, hromadné využívání plaveckých bazénů, traumatizace nohy při delší námaze, některá onemocnění, zvláště cukrovka a cévní onemocnění, ale i obezita, zvýšené pocení nohou, hlavně v letním období, širší užívání antibiotik a kortikosteroidů.

Léčba je lokální, systémová (perorální) při těžším postižení nebo kombinovaná, ale vždy dlouhodobá a problematická. Volba se řídí rozsahem klinického postižení: lokální léčba antimykotickými (AM) roztoky má šanci jen tehdy, je-li postiženo maximálně 30 % nehtové ploténky, AM lak lze použít až do rozsahu 50 % nehtové ploténky. Při změnách zasahujících 50–90 % nehtové ploténky lokální léčba zpravidla selhává. Pokud viditelné změny zasahují až k zadnímu nehtovému valu, znamená to, že mykotická infekce (která ve skutečnosti sahá ještě o 3–5 mm dál než viditelné změny) již postihla nehtovou matrix. Tato skutečnost je jednoznačnou indikací pro léčbu perorální, popřípadě kombinovanou.

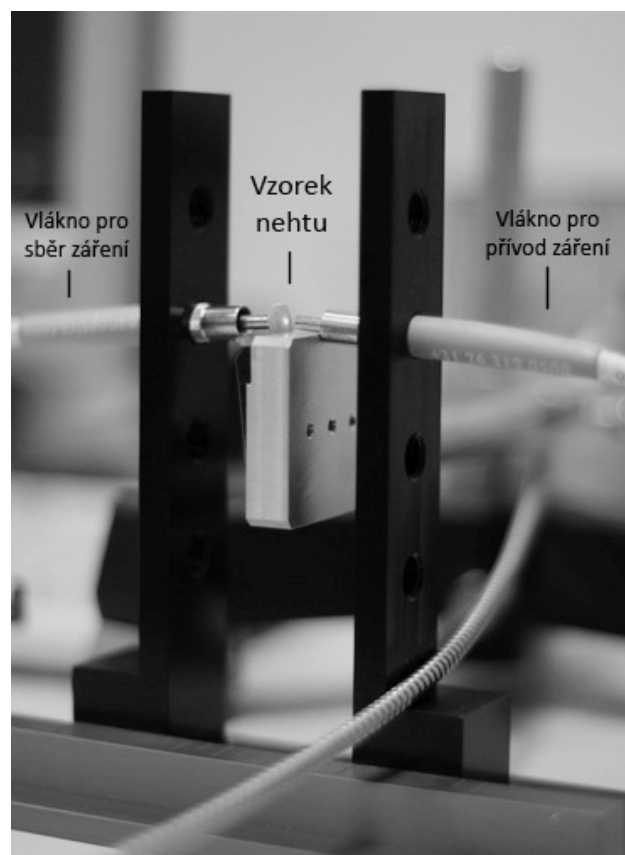
Lokální léčba sice organismus pacienta nezatěžuje, klade však vysoké nároky na pacientovu součinnost. Před samotným podáváním medikamentů je potřeba odstranit všechny viditelně změněné části nehtů (vystříháním, zbrúšením nebo chemickou ablací) a pak svědomitě ošetřování až do úplného klinického zhojení. Proces léčby může trvat řadu měsíců. Pacient musí po celou tuto dobu aplikovat dvakrát denně AM roztok, nebo dvakrát týdně AM lak. AM krémy jsou k léčbě nehtů nevhodné, jelikož krém se z povrchu nehtu rychle setře, takže účinná látka nestačí difundovat do keratinu. Roztok naproti tomu prosákne do štěrbin v narušeném nehtu, pod nehtovou ploténku i pod nehtové valy. AM lak ještě navíc po zaschnutí vytvoří okluzivní (uzavírající) film, což difuzi účinné látky dále podpoří. Při systémové (celkové) léčbě se AM po podání ústy dostávají z krve do nehtového lůžka, odkud působí. Jestliže je hladina AM dostatečná, původce se nemůže množit a ničit další části nehtu. Tvoří se nový zdravý nehet, který posunuje napadenou část. Celková AM je nutné užívat denně, nebo v měsíčních cyklech. Ovšem systémová léčba s sebou nese celou řadu nežádoucích účinků a má i řadu kontraindikací.

Záření s vlnovou délkou menší než 300 nm je extrémně efektivní v ničení mikroorganismů. Nejvíce sterilizující je UVC záření na vlnové délce 253,7 nm. Těto oblasti říkáme germicidní. UVC má velmi malou schopnost penetrace a nepronikne dále, než k mrtvým buňkám pokožky. Germicidní UV záření nezabíjí buňky přímo. Poškozuje jejich DNA a buňky se pak stanou sterilními.

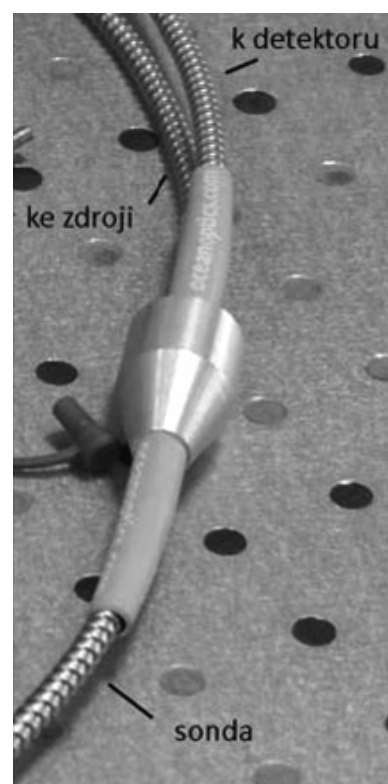
Aktivní prostředí excimerového laseru je tvořeno specifickým druhem molekul – tzv. dimery. Většina excimerových laserů září v UV oblasti. Mají minimální absorpční hloubku ve tkáni, umožňují odstraňování mikroskopických vrstev tkání s minimálním poškozením okolí. V našem experimentu jsme použili excimerový laser s vlnovou délkou 248 nm (s krypton – fluorovou náplní).

## Metody

Jako zdroj UV záření byl použit vláknový spektrofotometr od firmy Ocean Optics. Jedná se o model DH2000. Tento přístroj vysílá elektromagnetické záření na vlnových délkách 220–1050 nm. Sestává ze dvou zdrojů. Jednoho deuteriového zářícího na vlnových délkách 220–400 nm a druhého halogenového zářícího na vlnových délkách 300–1050 nm. Bude použit ke stanovení transmisních a absorpčních a reflexních vlastností tkáně nehtu. Úkolem bylo určit transmisí, reflexi a absorpci nehtů. K samotnému měření parametrů nehtů jsme použili čtyři vzorky. První dva vzorky pocházely z palce dolní končetiny, druhé dva pak z palce horní končetiny. Každý z nich měl různou tloušťku, kterou bylo potřeba zohlednit při analýze výsledků. Nehty byly před měřeními očištěny jednak mechanicky a jednak v ultrazvukové lázni. Po sestavení aparatury pro měření transmise (viz obrázek 1) jsme provedli referenční měření bez vzorku.



Obr. 1: Sestava pro měření transmittance nehtu



Obr. 2: Sonda použitá k měření reflexe nehtů

Pro zjištění reflexe bylo použito stejného vybavení jako v předchozím experimentu. Jediný rozdíl byl v optickém kabelu, který je uzpůsobený pro sběr odraženého záření (viz obrázek 2).

Sledování tepelné odezvy proběhlo na KrF (krypton-fluor) excimerovém laseru COMPEX F 205 Pro, Lambda Physik, který září na vlnové délce 248 nm. Rozložení tepla snímala termokamera Fluke Ti 50 od firmy Ahlborn. Vzorek nehtu jsme umístili oboustrannou lepicí páskou na kus kartonu. Laserový paprsek byl zúžen clonou na průměr 4 mm. Na laseru byla nastavena hodnota energie 188 mJ. Délka pulzu laseru je fixní – 25 ns. Vzhledem k tomu, že termokamera nemá snímání synchronizované s laserem, bylo nastaveno intervalové snímání s frekvencí 20 Hz a laser jsme spouštěli ručně s co nejvyšší frekvencí, abychom se některým pokusem co nejvíce přiblížili stavu nehtu po dopadu laserového paprsku. Toto řešení není ideální, nicméně pro zjištění, zda došlo k záhřevu nehtu, tento experiment postačil.

Energie laseru (E): 188 mJ

Účinná plocha paprsku (S): 0,126 cm<sup>2</sup>

Hustota energie:

$$\omega = E \cdot S$$

$$\omega = 188 \cdot 0,126$$

$$\omega = 23,7 \text{ mJ/cm}^2$$

## Ozařování plísní

Další etapa se zabývala ozařováním plísní excimerovým laserem 248 nm.

### Použité vybavení:

HW:

Laser Lambda Physik Compex Pro 248nm

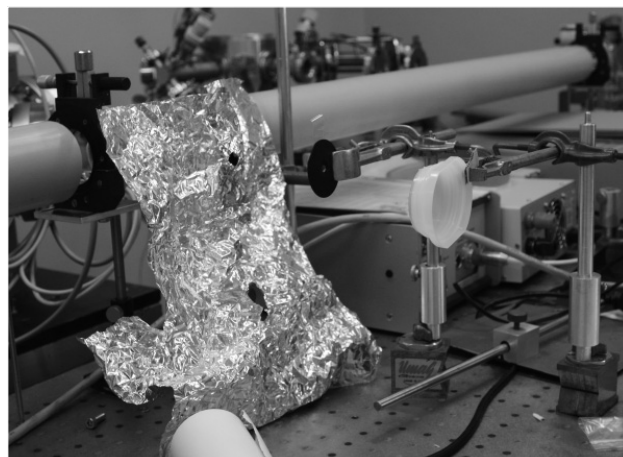
Detektor

fotoaparát DSLR Sony A200 + makro objektiv Tamron 90/2.8

SW:

ACD See Pro 3.0

Ozařované vzorky byly umístěny na optický stůl pomocí stojanu. Těsně před započítím ozařování bylo odkryto krycí víčko Petriho misky s plísní *Trichopfyton rubrum*. Experimentální uspořádání bylo standartní pro podobné pokusy, použili jsme kruhovou clonku o průměru 0,5 cm tj. 0,196 cm<sup>2</sup>. Ozařovaný vzorek plísně byl umístěn co nejbližší za clonku (dotykové umístění není možné z důvodu parametrů vzorku) tak, aby nedocházelo k ozáření rozptýleným zářením. Energie v pulzu byla měněna v intervalu od 3,4 mJ do 7,2 mJ (vyšší hodnoty už prokazatelně způsobují nepřiměřené zahřátí tkáně), tomu odpovídající hustota energie se pohybuje v intervalu 17,3 mJ/cm<sup>2</sup> – 36,7 mJ/cm<sup>2</sup>, opakovací frekvence byla zvolena 10 Hz a počet pulzů jsme zvolili pro každou hodnotu energie 200, 500 a 1000. Po ozáření vznikla kruhová stopa, kterou jsme hodnotili okem



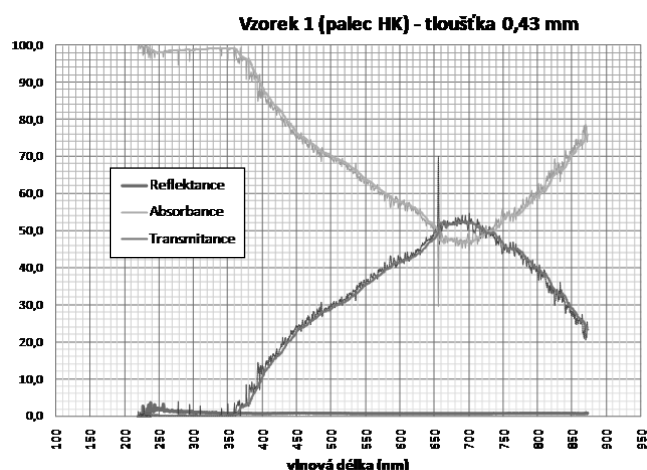
Obr. 3: Sestava pro ozařování plísní

i mikroskopicky a sledovali v průběhu měsíce, zda nedojde k opětovnému nežádoucímu růstu plísně.

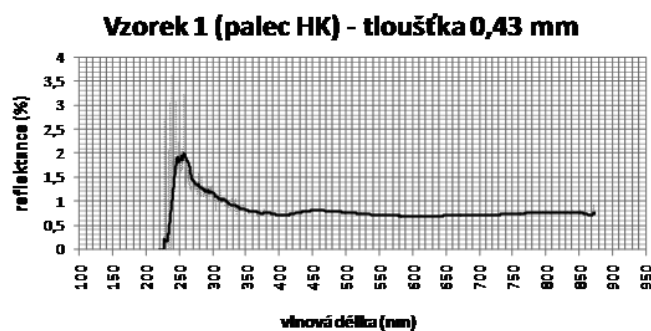
Celá sestava je na obrázku 3.

## Hledání ablačních prahů na vzorku lidské tkáně

Na vypreparované, čerstvě zmrazené lidské kůži jsme se snažili stanovit ablační prahy. Před ozařováním a po ozařování jsme pořídili detailní fotografie tkáně. Parametry byly stejné po celou dobu pokusu: kruhová stopa průměru 2,6 mm tj. 5,31 mm<sup>2</sup>; opakovací frekvence 10 Hz.



Obr. 4: Reflexe, absorpce a transmise vzorku nehtu



Obr. 5: Reflektivita nehtů pro různé vlnové délky

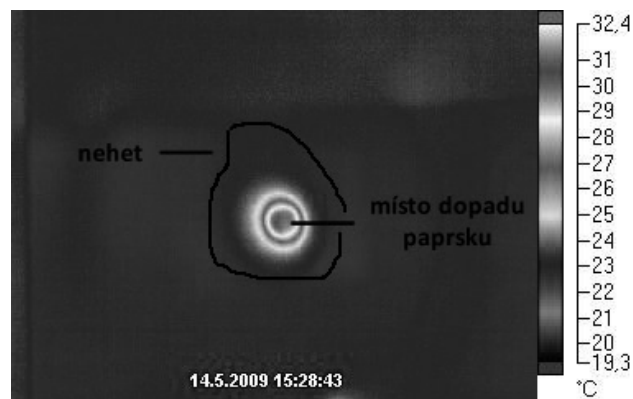
## Výsledky

Reflexe, absorpce a transmise vzorku nehtu je znázorněna na následujících grafech (obr. 4,5).

Z grafu vyčteme skutečnost, že reflexe je v celém spektru vyzařovaném zdrojem nízká. Pohybuje se kolem 1%. Jelikož jsme změřili jak transmissi, tak i reflexi, můžeme podle vzorce  $A = 100 - T - R$  [%] dopočítat hodnotu absorpce, kde A je absorpce, T je transmise a R je reflektivita. Všechny veličiny jsou uváděny v procentech.

Z výsledků měření transmise vyplývá, že nehty nepropouští záření nižší vlnové délky než cca 400 nm. Z výsledků experimentu plyne důležitý poznatek, že při ozařování nehtů laserem v UV oblasti (přesněji UV-C) se nemusíme obávat, že UV záření projde dál do kůže, kde by mohlo působit nežádoucí tepelné, biochemické či fotofyzikální účinky. Reflexe je v celém spektru vyzařovaném zdrojem nízká. Pohybuje se kolem 1%.

## Ověření absorpce UVC záření termokamerou



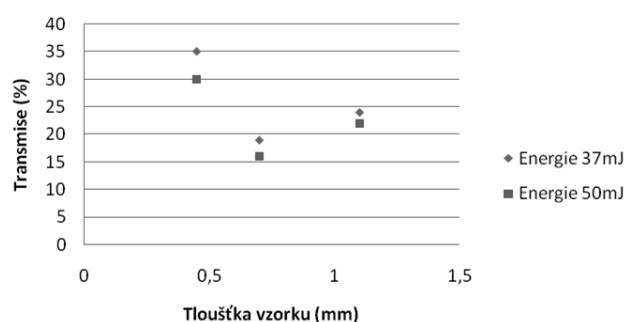
Obr. 6: Rozložení tepla po ozáření laserem

## Měření transmise nehtů pro oblast 248 nm za použití vysokovýkonového KrF laseru v pulsním režimu

Tab. 1: Měření transmise nehtů

Číslo vzorku	1		2		3	
Tloušťka [mm]	1,1		0,7		0,45	
Energie před dopadem [mJ]	37	50	37	50	37	50
Energie prošla vzorkem [mJ]	9	11	7	8	13	15
Transmise [%]	24	22	19	16	35	30

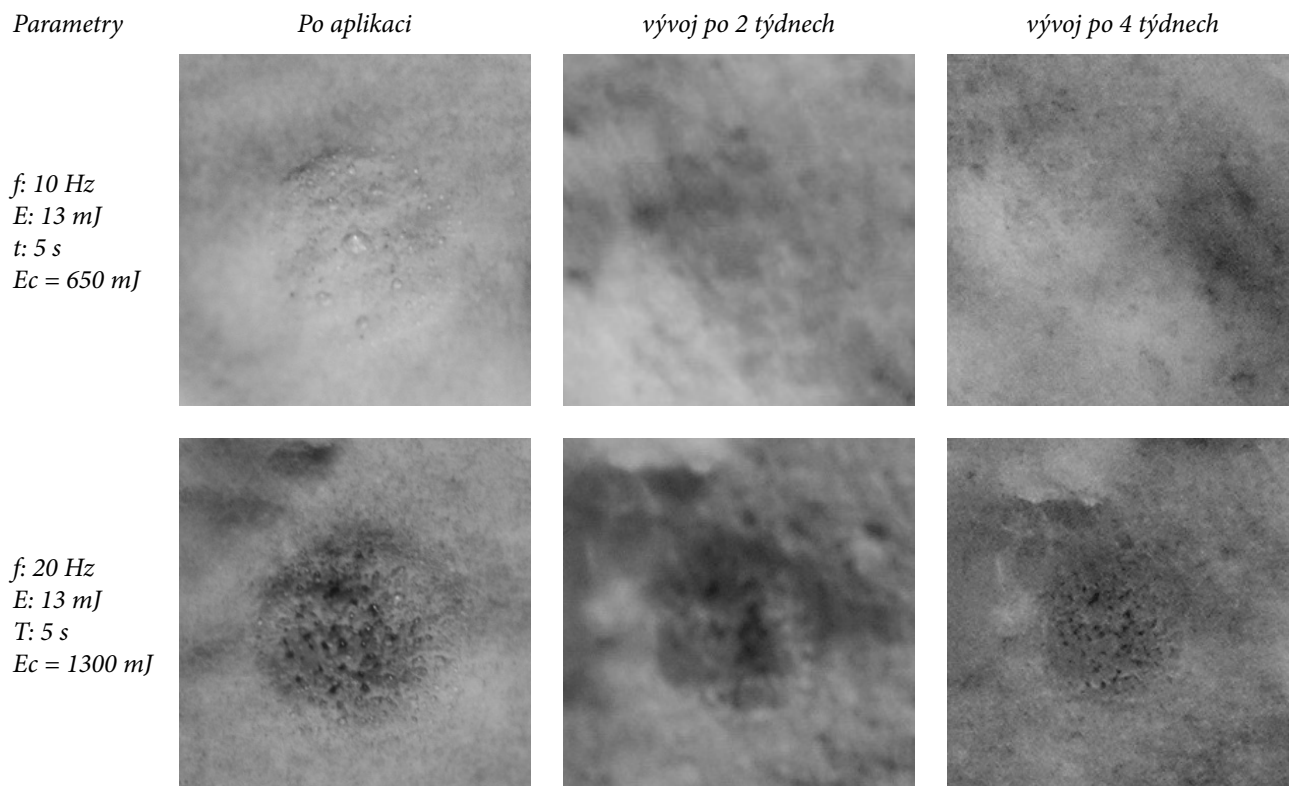
## Graf transmise



Obr. 7: Graf Transmise

## Hodnocení ozařování plísňí

Zjistili jsme a následně ověřili, že plísně jsou prokazatelně ničeny už při minimálních použitých hodnotách (energie v pulzu 3,4 mJ a hustota energie 17,4 mJ/cm<sup>2</sup>) a k jejich opětovnému růstu nedochází. Pro počty pulzů 500 a 1000



Obr. 8: Příklad fotografií vzorků plísně ozařovaných vyššími hodnotami, kdy dochází k okamžité destrukci vzorků plísně

Tab. 2: Vyhodnocení tepelné odezvy ozařované tkáně

(Stopy byly vyhodnocovány pomocí oka a lupy. V tabulce zmiňovaný „dým“ bude pravděpodobně způsoben prahovou ablací povrchových vrstev, zda je případně způsoben tepelným účinkem, je třeba ověřit v budoucnu.)

Test číslo	Energie v pulzu [mJ]	Hustota energie [J/cm <sup>2</sup> ]	Počet pulzů	Projevy	Napětí orientační hodnota [kV]
1	4,5	0,85	200	Bez poškození	18
2	7,5	1,42	200	Velmi slabý dým v pozdější fázi a velmi slabá stopa	22
3	9,7	1,83	200	Dým po celou dobu a viditelná, ale slabá stopa	26
4	7,5	1,42	1000	Občasný slabý dým, slabá stopa	22
5	6,4	1,20	1000	Nezřetelná stopa (místně „lesklejší“)	20

je zničení průkazné už při pohledu pouhým okem, nižší počet pulzů (tj. 200) je podle našeho odhadu hodnotou, kdy pravděpodobně dojde ke zničení, nicméně jako průkazné limitní hodnoty je nutné ověření pro další vzorky plísni. Při našich experimentech byly plísně zničeny už při těchto hodnotách. Následné experimenty budou zaměřeny na zkoumání chování plísni po ozáření 200 až 500 pulzů o uvedené energii a hustotě výkonu.

Součástí dalších experimentů bude i porovnání reakce tkáně pro tyto počty pulzů. Vzhledem k poměrně malé stopě v porovnání s velikostí nehtu bude v medicínské praxi nutné buď zvětšit stopu nebo, což považujeme za vhodněj-

ší, posouvání stopy ve dvou směrech, v tomto případě by bylo možné použít nižší počet pulzů pro jednotlivá ozáření a stopy navzájem překrývat.

### Hodnocení tepelné odezvy ozařované tkáně

Byly použity následující parametry excimerového laseru: kruhová stopa průměru 2,6 mm tj. 5,31 mm<sup>2</sup>; opakovací frekvence 10 Hz (viz. tabulka 2).

## Diskuze

Nehty napadené plísní se značně liší svou strukturou a tloušťkou, abychom získali dostatečné množství informací, bude nutné proměřit co nejvíce vzorků o různé tloušťce a také nehty v různém stupni poškození onychomykozou. Dále je nutné zjistit v dalších měřeních, při jakých parametrech by mohlo dojít při ozařování k poškození kůže.

Doposavadní výsledky ozařování plísní svědčí o potřebě skutečně malé dávky k likvidaci samotné plísně, což je příznivé vzhledem k faktu, že nesmíme poškodit měkkou tkáň pod nehtem. Cílem dílčího pokusu ozařování laserovým paprskem bylo určení limitů laserového záření pro ničení plísní. Jak bylo zjištěno a ověřeno předchozími experimenty, plísně reagují na ozařování vlnovými délkami v oblasti UV záření pozitivně a už záření o poměrně malých výkonech je spolehlivě ničí. Nicméně pro medicínské aplikace je nutné znát minimální hodnoty potřebné k jejich úplnému zničení, které v laboratorních podmínkách při experimentech zaměřených na pouhé zničení plísní není nutné znát. Při hledání mezních hodnot je potřeba zohlednit jednak to, že vysílané záření je značně absorbováno nehtem, relevantní parametry nehtů byly zkoumány při předchozích experimentech, jednak to, že prošlé záření je absorbováno tkání pod nehtem, nikoliv pouze plísněmi a dochází tedy ke vzniku tepla, přičemž přesáhnou hodnoty teploty 40 °C je nežádoucí. Při našem experimentu jsme se zaměřili na určení takové hodnoty prošlého záření, které zajistí zničení plísní, ale při které nedojde k přílišnému zvýšení teploty tkáně.

## Závěr

Z výsledků měření transmise vyplývá, že nehty nepropouští záření nižší vlnové délky než cca 400 nm. Reflexe je v celém spektru vyzařovaném zdrojem nízká. Pohybuje se kolem 1 %.

Měření transmise nehtů pro oblast 248 nm za použití vysokovýkonového KrF laseru v pulsním režimu ukázalo, že procento transmise závisí na tloušťce nehtu, tedy u silnějších nehtů je procentuálně menší. Energie prošlá vzorkem je velmi malá.

Zjistili jsme a následně ověřili, že plísně jsou prokazatelně ničeny už při minimálních použitých hodnotách (energie v pulzu 3,4 mJ a hustota energie 17,4 mJ/cm<sup>2</sup>) a k jejich opětovnému růstu nedochází. Pro počty pulzů 500 a 1000 je zničení průkazné už při pohledu pouhým okem, nižší počet pulzů (tj. 200) je podle našeho odhadu hodnotou, kdy pravděpodobně dojde ke zničení, nicméně jako průkazné limitní hodnoty je nutné ověření pro další vzorky plísní.

## Literatura

1. Goldman, L., Rockwell, R.J.: Lasers in medicine. Ronald Wayne. [s.l.]: CRCpress, 2002, 400 s.
2. Krutmann, J., Hönigsmann, H., Elmets, C. A.: Dermatological phototherapy and photodiagnosics methods. 2nd edition. Berlin: Springer, 2009, 447 s.
3. Záruba, F.: Dermatovenerologie, 1. vyd. Praha: Science Press, 1994, 247 s, ISBN 80-85526-31-X.

*Kontakt na hlavního autora:  
MUDr. Jaroslava Kyplová, Ph.D.  
Ústav biofyziky a informatiky 1. LF UK Praha  
Salmovská 1  
120 00 Praha 2  
Tel.: 603 150 292  
jkyplova@volny.cz*