

10. *Störmann I., Ehmer U.* A prospective randomized study of different retainer types // *Journal of Orofacial Orthopedics / Fortschritte der Kieferorthopädie.* 2002. Vol. 63. № 1. PP. 42-50.
11. *Renkema A.M., Renkema A., Bronkhorst E., Katsaros H.* Long-term effectiveness of canine-to-canine bonded flexible spiral wire lingual retainers // *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics.* 2011. Vol. 139. № 5. PP. 614-621.
12. *Steinnes J., Gunn J., Heidi K.* Stability of orthodontic treatment outcome in relation to retention status: An 8-year follow-up // *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics.* 2017. Vol. 151. № 6. PP. 1027-1033.
13. *Bjering R., Vandevska-Radunovic V.* Occlusal changes during a 10-year posttreatment period and the effect of fixed retention on anterior tooth alignment // *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics.* 2018. Vol. 154. № 4. PP. 487-494.
14. *Al-Moghrabi, Dalya, Ama Johal, Niamh O'Rourke, Nikolaos Donos, Nikolaos Pandis, Cecilia Gonzales-Marin, Padhraig S. Fleming* Effects of fixed vs removable orthodontic retainers on stability and periodontal health: 4-year follow-up of a randomized controlled trial // *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics.* 2018. Vol. 154. № 2. PP. 167-174.
15. *Pizarro K., Jones M.L.* Crown inclination relapse with multiflex retainers // *Journal of Clinical Orthodontics: JCO* 26. 1992. № 12. PP. 780-782.
16. *Katsaros C., Livas C., Renkema A.M.* Unexpected complications of bonded mandibular lingual retainers // *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics.* 2007. Vol. 132. № 6. PP. 838-841.
17. *Abudiak H., Shelton A., Spencer R.J., Burns L., Littlewood S.J.* A complication with orthodontic fixed retainers: A case report // *Orthodontic Update.* 2011. Vol. 4. № 4. PP. 112-117.
18. *Pazera P., Fudalej P., Katsaros C.* Severe complication of a bonded mandibular lingual retainer // *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics.* 2012. Vol. 142. № 3. PP. 406-409.
19. *Kucera J., Streblov J., Marek I., Hanzelka T.* Treatment of complications associated with lower fixed retainers // *J. Clin. Orthod.* 2016. Vol. 50. № 1. PP. 54-59.
20. *Godtfredsen M.L., Rylev M., Melsen B.* Treatment of complications after unintentional tooth displacement by active bonded retainers // *Journal of Clinical Orthodontics: JCO.* 2016. Vol. 50. № 5. PP 290-297.
21. *Kučera J., Marek I.* Unexpected complications associated with mandibular fixed retainers: A retrospective study // *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics.* 2016. Vol. 149. № 2. PP 202-211.

*Андрей Владимирович Синегуб,  
инженер,  
компания «СМЛ АТ Medical»,  
аспирант,*

*Высшая школа автоматизации и робототехники,  
ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический  
университет Петра Великого»,  
г. С.-Петербург,*

*Яков Николаевич Карасенков,  
канд. мед. наук, главный врач,  
стоматологическая клиника «РОСДЕНТ»,  
г. Москва,*

*Евгений Александрович Егоров,  
врач,  
Екатерина Константиновна Тарасова,  
врач,*

*стоматологическая клиника «Эстетика»,  
г. Фрязино, Московская обл.,*

*Надежда Валерьевна Латута,  
канд. мед. наук, доцент,  
кафедра детской, профилактической  
стоматологии и ортодонтии,*

*Институт стоматологии им. Е.В. Боровского,  
ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова  
Минздрава России (Сеченовский университет),*

*Всеволод Валерьевич Джатдаев,  
врач-стоматолог, хирург,  
стоматологическая клиника «Президент»,  
г. Москва,*

*e-mail: a.sinegub@yandex.ru*

*Д.Д. Ставцев, Т.В. Дубинина, Е.А. Горбунова, А.Ю. Герасименко*

## **Метод флуоресцентной диагностики злокачественных новообразований кожи при помощи фталоцианинов иттербия**

### **Аннотация**

Злокачественные новообразования кожи являются наиболее распространенной разновидностью рака, на которые, по данным ВОЗ, приходится до трети всех случаев. Несмотря на успешное лечение данного типа патологий, рост заболеваемости раком кожи, непрерывно регистрируемый на протяжении последних десятилетий, делает актуальной разработку новых методов диагностики. Потенциальным решением данной проблемы может быть использование флуоресцентной диагностики в сочетании с препаратами на основе иттербиевых комплексов фталоцианинов. Получены новые хлорзамещенные фталоцианины иттербия: гексадекахлорфталоцианинат иттербия (III) и окта(пара-хлорфенокси)замещенный фталоцианин иттербия (III), а также изучены их спектральные свойства в видимой и ближней ИК-области спектра. Показано, что окта(пара-хлорфенокси)замещенный фталоцианин иттербия (III) дает больший выход флуоресценции в ИК-области, что делает его использование предпочтительным в качестве фотосенсибилизатора при диагностике злокачественных новообразований кожи.

### **Введение**

Рак кожи является одним из наиболее распространенных видов злокачественных новообразований. По данным Всемирной организации здравоохранения, на его долю приходится каждый третий диагностируемый тип рака [1]. К основным разновидностям рака кожи относятся: базальноклеточная карцинома, плоскоклеточный рак кожи и меланома. Первые два

вида являются наиболее распространенными и относятся к немеланомному типу, ежегодно в мире они диагностируются по меньшей мере у 2...3 млн. человек [1]. Общие стандартизированные по возрасту показатели заболеваемости и смертности для данного типа злокачественных новообразований в России составляют 29,64 и 0,70 на 100 тыс. человек соответственно [2]. Немеланомный рак кожи редко приводит к летальному исходу, что связано с его четкой локализацией и низким

ростом метастазирования [2], однако его хирургическое лечение болезненно и часто вызывает серьезные косметические дефекты. Меланома встречается значительно реже: в среднем, по данным ВОЗ, ежегодно диагностируется около 130 тыс. случаев. В России ежегодно регистрируется около 8 500 случаев меланомы, что соответствует заболеваемости на уровне 3,97 новых случая на 100 тыс. человек с ежегодным приростом в 4,55...6,1 % [3]. 10-летняя выживаемость при меланоме колеблется от 82 до 98 % [4]. Ожидается, что в ближайшее десятилетие показатели заболеваемости меланомой и соответствующей смертности будут только расти [5]. Постоянно растущие темпы распространения рака кожи в последние 20...40 лет [6] делают актуальным вопрос разработки новых неинвазивных методов его диагностики. Данная задача может быть решена с использованием методов лазерной спектродиффузиометрии и металлокомплексов на основе тяжелых металлов, таких как фталоцианины иттербия, флуоресцирующих в ближней ИК-области спектра (900...1050 нм).

Методы диагностики, основанные на изучении флуоресценции биологических тканей, приобретают все большую популярность среди практикующих врачей и ученых. Исследование собственной флуоресценции биологических тканей (аутофлуоресценции) уже давно используется для выявления злокачественных новообразований [7]. Однако широкому распространению данного подхода мешает его низкая специфичность. Решить эту проблему позволяет использование экзогенных флуорофоров. Отдельным направлением исследований является разработка фотосенсибилизирующих агентов, которые одновременно могут быть использованы для флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии. Использование ближнего ИК-диапазона на данный момент считается одним из наиболее перспективных направлений в биомедицинской диагностике. Это связано с большой глубиной проникновения, слабой зависимостью от окружающего света и минимальным влиянием аутофлуоресценции биологических тканей в данной области спектра.

Ранее было предложено использовать для диагностики злокачественных новообразований порфирины лантанидов [8]. Группой авторов [9] на основе комплекса иттербия 2,4 – диметоксигематопорфирина IX – был разработан препарат Флюроскан. Было продемонстрировано действие данного препарата на воспаленные и здоровые участки кожи: сигнал люминесценции, регистрируемый в патологических тканях, был в три раза больше. Флюроскан может использоваться не только для фотодинамической терапии онкологических заболеваний, но и в других областях медицины, например в стоматологии или дерматологии (при исследовании воспалительных поражений слизистых оболочек и кожи). Продемонстрирован эффект разных механизмов накопления иттербиевого комплекса протопорфина в злокачественных и различных доброкачественных кожных новообразованиях [10]. Таким образом, калибровка интенсивности сигнала флуоресценции дает возможность определить вид диагностируемого новообразования.

Важным недостатком Флюроскана является его длительное накопление (45...48 ч после введения препарата) в клетках новообразования. Поэтому перспективной является модификация препарата путем введения различных лигандов.

В связи с этим целью рассматриваемой работы является синтез и спектральные исследования веществ для разработки метода лазерной флуоресцентной диагностики в ближней ИК-области спектра при помощи новых хлорзамещенных фталоцианиновых комплексов иттербия, которые выбраны в качестве объекта исследования благодаря своей высокой термо- и фотохимической стабильности за счет фталоцианинового макрокольца и наличия атомов хлора в качестве функциональных групп.

## Материалы и методы

Для реализации метода лазерной флуоресцентной диагностики был разработан стенд (рис. 1), позволяющий зарегистрировать спектры флуоресценции при помощи спектрометра «FLAME-T-VIS-NIR-ES» («Ocean Optics Inc.», США) с оптоволоконным выходом, а также интегральную интенсивность ИК-флуоресценции полученных фталоцианиновых комплексов. Для возбуждения флуоресценции использовался полупроводниковый лазерный источник с центральной длиной волны 405 нм, излучение от которого подводилось к держателю с кварцевой кюветой. Для регистрации ИК-флуоресценции излучение от образца через многожильный оптоволоконный зонд передавалось на блок интерференционных отражательных фильтров, где полезный сигнал отделялся от фоновой флуоресценции в видимой области спектра. Отфильтрованное излучение в ближней ИК-области спектра регистрировалось фотодиодом, сигнал с которого оцифровывался при помощи АЦП и поступал на компьютер.

Для исследований использовались образцы, представляющие собой синтезированные фталоцианины иттербия, растворенные в диметилсульфоксиде (ДМСО).

Для синтеза 1,2,3,4,8,9,10,11,15,16,17,18,22,23,24,25-гексадекахлорфталоцианината иттербия (III) ацетата 1 смесь 3,4,5,6-тетрахлорфталононтрила (132,00 мг, 0,56 ммоль),  $Yb(OAc)_3 \cdot 4H_2O$  (40,00 мг, 0,125 ммоль) и 1,8-диазабицикло[5.4.0]ундец-7-ен (ДБУ) (19 мкл, 0,125 ммоль) кипятится в изоамиловом спирте (3 мл) при перемешивании в течение 4 ч. Реакционная масса охлаждалась до комнатной температуры и высаживалась  $MeOH:H_2O$  (4:1, V:V). Осадок отфильтровывался и промывался  $MeOH:H_2O$  (4:1, V:V) для получения 150,00 мг (93 %) комплекса 1.

Для синтеза 2,3,9,10,16,17,23,24-окта(пара-хлорфенокси)-замещенного фталоцианина иттербия (III) ацетата 2 смесь 4,5-(пара-хлорфенокси)фталононтрила (100,00 мг, 0,26 ммоль),  $Yb(OAc)_3 \cdot 4H_2O$  (28,00 мг, 0,065 ммоль) и ДБУ (39 мкл, 0,26 ммоль) кипятится в изоамиловом спирте (1,5 мл) при перемешивании в течение 4 ч. Реакционная масса охлаждалась до комнатной температуры и высаживалась  $MeOH:H_2O$  (4:1, V:V). Осадок отфильтровывался и промывался

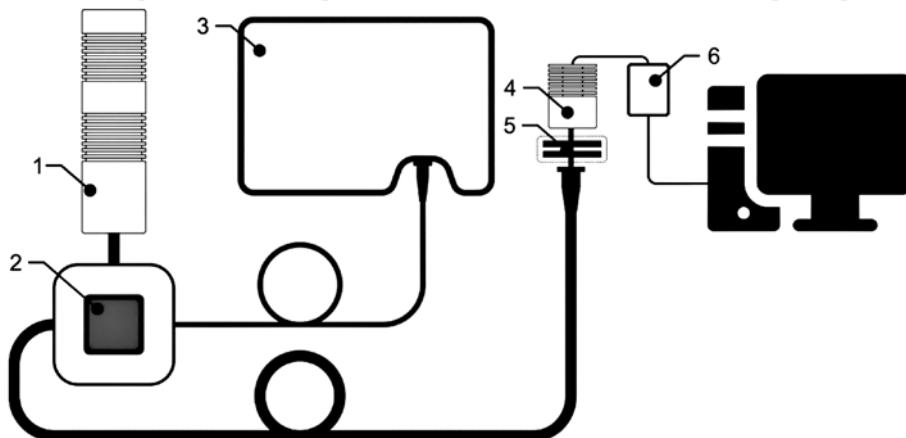


Рис. 1. Схема стенда для реализации метода лазерной флуоресцентной диагностики: 1 – полупроводниковый лазер с длиной волны 405 нм; 2 – кварцевая кювета; 3 – спектрометр; 4 – фотодиод; 5 – блок интерференционных фильтров; 6 – АЦП

MeOH:H<sub>2</sub>O (4:1, V:V) для получения 81,00 мг (70 %) соединения 2.

Контроль за ходом реакции осуществлялся методом электронной спектроскопии поглощения (ЭСП) при помощи спектрофотометра «Genesys 10S UV-vis» («Thermo Scientific», США) с использованием двулучевой схемы относительно воздуха в диапазоне длин волн  $\lambda = 300 \dots 900$  нм с разрешением 0,2 нм. ИК-Фурье спектры регистрировались при помощи прибора «Nicolet IR200» («Thermo Scientific», США) с разрешением 4 см<sup>-1</sup>.

## Результаты

Синтез фталоцианиновых комплексов иттербия (рис. 2) осуществлялся темплатным методом, исходя из коммерчески доступных фторированных фталонитрилов. В качестве растворителя для проведения реакции использовался изоамиловый спирт, а в качестве основания, инициирующего сборку фталоцианина, – 1,8-диазабидцикло[5.4.0]ундец-7-ен (ДБУ). Более сильные основания – алкоголяты щелочных металлов – в данном случае не могут быть введены в реакцию, так как они вступают в конкурирующий процесс ароматического нуклеофильного замещения хлоров. Еще одним преимуществом исполь-

зования ДБУ является то, что он способен координироваться по центральному иону металла. Это препятствует сборке таких побочных продуктов, как комплексы сэндвичевого строения состава лантанид:фталоцианиновый лиганд 1:2 или 2:3.

Максимумы пиков поглощения на спектрах ЭСП, необходимые для возбуждения флуоресценции для двух синтезированных комплексов, приведены в табл. 1. Также в табл. 1 приведены основные частоты колебаний связей, образовавшихся между редкоземельным элементом и его окружением.

Полученные соединения характеризуются наличием интенсивного максимума поглощения на границе видимого и ближнего ИК-диапазонов, соответствующего переходу с высшей занятой молекулярной орбитали (ВЗМО) на низшую свободную молекулярную орбиталь (НСМО) фталоцианинового лиганда (Q-полоса). Кроме того, в УФ-области наблюдается полоса поглощения, отвечающая переходу электрона с ВЗМО-1 на НСМО (B-полоса).

При помощи разработанного стенда для флуоресцентной диагностики были получены спектры флуоресценции в видимой области спектра и интегральная интенсивность ИК-флуоресценции растворов синтезированных фталоцианиновых комплексов в ДМСО с концентрацией 10<sup>-5</sup> М, представленные на

Таблица 1

Основные полосы поглощения в спектрах ЭСП и ИК

Вид спектроскопии	ЭСП			ИК			
	Длина волны, нм ( $I / I_{max}$ )			Частота, см <sup>-1</sup>			
Комплекс 1	360 (0,65)	640 (0,34)	702 (1,00)	1091 (st C–Cl)	1554 ( $\gamma$ -пиррол)	1377 (st COO-sym)	1554 (COO-as)
Комплекс 2	356 (0,67)	609 (0,28)	675 (1,00)	1010...1089 (st C–Cl)	1373...1398 ( $\gamma$ -пиррол)	1373...1484 (st COO-sym)	1531...1583 (st COO-as)

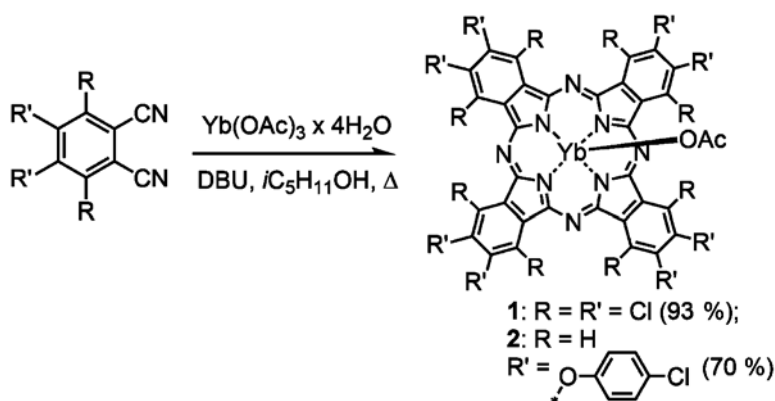


Рис. 2. Схема получения фталоцианинов иттербия

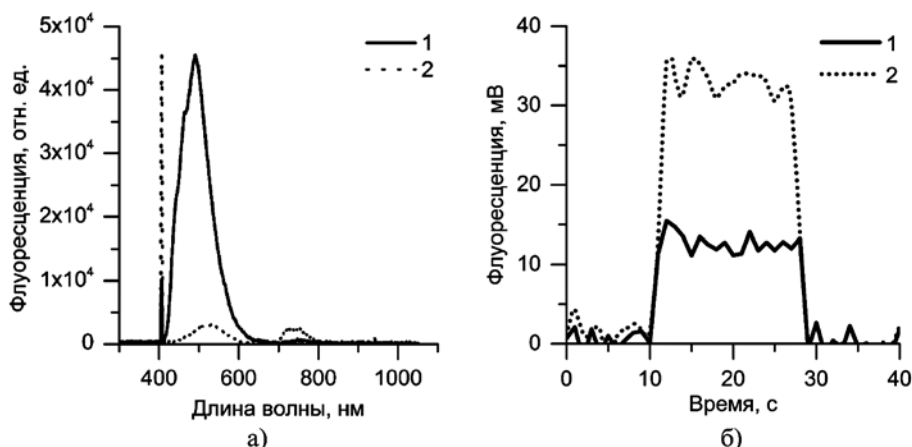


Рис. 3. Спектры флуоресценции (а) и графики интегральной интенсивности ИК-флуоресценции (б) при возбуждении на длине волны 405 нм гексадекахлорфталоцианината иттербия (III) – 1 и окта(пара-хлорфенокси)замещенного фталоцианина иттербия (III) – 2

рис. 3. При измерении флуоресценции в ближней ИК-области спектра оптоволоконный зонд используемого лабораторного стенда подводился к пробирке с растворами, имитируя диагностику кожи с нанесенным препаратом (рис. 3б).

Раствор гексадекалорфталоцианината иттербия имеет ярко выраженную флуоресценцию в видимой области спектра с пиком на длине волны 490 нм. Интенсивность флуоресценции раствора на основе окта(пара-хлорфенокси)замещенного фталоцианина иттербия в видимой области спектра значительно ниже, с наличием двух пиков на длинах волн 520 и 730 нм. Низкая интенсивность флуоресценции в области Q-полосы объясняется наличием в молекуле парамагнитного центрального иона иттербия. При этом интенсивность ИК-флуоресценции обоих фталоцианиновых комплексов значительно уступает флуоресценции в видимой области спектра, что не позволяет зарегистрировать их при помощи спектрометра. Интенсивность флуоресценции в ИК-области спектра, полученная при помощи разработанного лабораторного стенда (рис. 3б), была выше у окта(пара-хлорфенокси)замещенного фталоцианина иттербия, что в сочетании с более низкой флуоресценцией в видимой области спектра может свидетельствовать о более эффективной передаче энергии накачки от фталоцианина к иттербию.

### Заключение

Предложен метод флуоресцентной диагностики с использованием стенда, позволяющего одновременно регистрировать спектры флуоресценции и интегральную интенсивность ИК-флуоресценции. Получены новые хлорзамещенные фталоцианины иттербия с высокими выходами (70...93 %), а также определены их оптические поглощательные и флуоресцентные свойства. Обнаружена флуоресценция фталоцианиновых комплексов иттербия в видимой и ближней ИК-области спектра, при этом более высокий выход флуоресценции характерен для раствора окта(пара-хлорфенокси)замещенного фталоцианина иттербия в диметилсульфоксиде по сравнению с гексадекалорфталоцианинатом иттербия, что предположительно связано с более эффективной передачей энергии накачки внутри фталоцианинового комплекса. Это делает его более предпочтительным в качестве фотосенсибилизатора при флуоресцентной диагностике злокачественных новообразований кожи.

*Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (№ 075-03-2020-216 от 27.12.2019 г.) и гранта РФФИ (проект № 20-33-90157 «Аспиранты»).*

### Список литературы:

1. Radiation: Ultraviolet (UV) radiation and skin cancer / [https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/radiation-ultraviolet-\(uv\)-radiation-and-skin-cancer](https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/radiation-ultraviolet-(uv)-radiation-and-skin-cancer). (дата обращения: 25.06.2022).
2. *Muntyanu A., Savin E., Ghazawi F.M., Alakel A., Zubarev A., Litvinov I.V.* Geographic variations in cutaneous melanoma distribution in the Russian federation // *Dermatology*. 2020. Vol. 236. № 6236 (6). PP. 500-507.
3. *Bratchenko I.A., Artemyev D.N., Khristoforova Y.A., Bratchenko L.A., Myakinin O.O., Moryatov A.A., Orlov A.E., Kozlov S.V., Zakharov V.P.* Raman Spectroscopy Techniques for Skin Cancer Detection and Diagnosis / In: *Multimodal Optical Diagnostics of Cancer*. – Cham: Springer, 2020. PP. 359-393.
4. *Webb A., Ma J., Lô S.N.* Penalized likelihood estimation of a mixture cure Cox model with partly interval censoring – An application to thin melanoma // *Statistics in Medicine*. 2022. Vol. 21. № 1.
5. *Saginala K., Barsouk A., Aluru J.S., Rawla P., Barsouk A.* Epidemiology of melanoma // *Medical Sciences*. 2021. Vol. 9. № 4. P. 63.

6. *Schadendorf D., van Akkooi A.C., Berking C., Griewank K.G., Gutzmer R., Hauschild A., Stang A., Roesch A., Ugurel S.* Melanoma // *The Lancet*. 2018. Vol. 392. № 10151. PP. 971-984.
7. *Moghissi K., Stringer M.R., Dixon K.* Fluorescence photodiagnosis in clinical practice // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2008. Vol. 5. № 4. PP. 235-237.
8. *Alekseev Y.V., Ivanov A.V., Romyantseva V.D., Gorshkova A.S., Shchelkunova A.E., Shilov I.P.* Luminescent diagnostics of skin defects in the near-infrared range // *Journal of Biomedical Optics*. 2017. Vol. 22. № 9. P. 098001.
9. *Щелкунова А.Е., Румянцева В.Д., Алексеев Ю.В., Шиллов И.П., Иванов А.В., Ковалева А.М., Ковалев М.И.* Препарат Флюроскан для люминесцентной диагностики в ближней ИК-области спектра // *Biomed. Photonics*. 2018. Vol. 7. № 5. PP. 16-17.
10. *Щелкунова А.Е.* Иттербиевый комплекс порфирина для диагностики новообразований различной локализации / Дис. канд. хим. наук. – МИРЭА – Российский технологический университет, 2020. С. 123.

*Дмитрий Дмитриевич Ставцев,  
аспирант, мл. научный сотрудник,  
Институт БМС,  
ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский  
университет «МИЭТ»,  
г. Москва, г. Зеленоград,  
Институт бионических технологий  
и инжиниринга,  
Первый Московский государственный  
медицинский университет им. И.М. Сеченова  
Министерства здравоохранения  
Российской Федерации,  
г. Москва,  
Татьяна Валентиновна Дубинина,  
канд. хим. наук, ведущий научный сотрудник,  
Елена Александровна Горбунова,  
канд. хим. наук, мл. научный сотрудник,  
химический факультет,  
ФГБОУ ВО «Московский государственный  
университет им. М.В. Ломоносова»,  
Александр Юрьевич Герасименко,  
канд. физ.-мат. наук, доцент,  
Институт БМС,  
ФГБОУ ВПО «Национальный  
исследовательский университет «МИЭТ»,  
г. Москва, г. Зеленоград,  
Институт бионических технологий  
и инжиниринга,  
Первый Московский государственный  
медицинский университет им. И.М. Сеченова  
Министерства здравоохранения  
Российской Федерации,  
г. Москва,  
e-mail: stavtsev.dmitry@gmail.com*