



<https://doi.org/10.24060/2076-3093-2018-8-3-176-184>

## Комплекс индоцианина зеленого с аргинин-глицин-аспарагиновой кислотой как новый метод интраоперационной визуализации при резекции рака мочевого пузыря

Ли Пэнг — аспирант урологического отделения больницы № 4, e-mail: 15636152446@163.com

Кабилов Ильдар Раифович — аспирант урологического отделения больницы № 4, ассистент кафедры урологии, тел.: +7 (917) 422-58-81, e-mail: ildarkabirov@gmail.com

Касинская Аделина Рустамовна — аспирант кафедры урологии, тел.: +7 (905) 353-49-50, e-mail: adelina-fly@rambler.ru

Джичи Ван — врач урологического отделения больницы № 4, e-mail: 346290658@qq.com

Ванхай Сю — профессор, зав. кафедры урологии, вице-президент больницы № 4, e-mail: xuwanhai@163.com

Жук Екатерина Игоревна — студент 4 курса лечебного факультета, тел.: +7 (917) 359-48-30, e-mail: Zhukketrin@yandex.ru

Нуралиева Радмила Авазовна — студент 4 курса лечебного факультета, e-mail: Nayka606@mail.ru

Ли Пэнг<sup>1</sup>, И.Р. Кабилов<sup>2</sup>, А.Р. Касинская<sup>2</sup>, Джичи Ван<sup>1</sup>, Ванхай Сю<sup>1</sup>, Е.И. Жук<sup>2</sup>, Р.А. Нуралиева<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Харбинский медицинский университет, Китай, 150081, Хэйлунцзян, Харбин, Наньган, Баоцзянь-роуд, 157

<sup>2</sup> Башкирский государственный медицинский университет, Россия, 450008, Уфа, ул. Ленина, 3

**Контакты:** Кабилов Ильдар Раифович, тел.: +7 (917) 422-58-81, e-mail: ildarkabirov@gmail.com

### Резюме

**Введение.** Рак мочевого пузыря является одним из наиболее распространенных злокачественных новообразований, приносящих значительный экономический и социальный ущерб человеку. Для решения данной проблемы предложено использование высокочувствительного метода обнаружения рака мочевого пузыря, выявления остаточной опухоли и определения границ опухоли мочевого пузыря — интраоперационной флуоресцентной молекулярной визуализации. Ранее нами синтезирован таргетный агент — индоцианина зеленого-аргинин-глицин-аспарагиновая кислота, которая является интегрин  $\alpha\text{V}\beta 3$ -целенаправленной в *in vitro* и *in vivo* моделях рака мочевого пузыря.

**Материалы и методы.** Токсичность индоцианина зеленого-аргинина-глицин-аспарагиновой кислоты (АГАк-ИЦЗ) была измерена с помощью МТТ-теста. Самки BALB/nu и клеточные линии MB49 уротелиальной карциномы мыши использовали для установки опухолевых ксенотрансплантатов, инъекцией в заднюю локтевую область. Рост опухоли наблюдался ежедневно и проверялся магнитно-резонансной томографией, пока он не становился подходящим для экспериментов *in vivo*. Далее лабораторные животные были разделены на 2 группы: ИЦЗ и АГАк-ИЦЗ (150 мкл, 0,2 мг/мл для всех мышей). Затем проводилось хирургическое удаление опухоли. Удаленную ткань подвергали флуоресцентной микроскопии на основе ближневолнового инфракрасного спектра и гистологическому исследованию.

**Результаты.** Операции, проведенные на подкожной и ортотопической мышинных моделях под контролем флуоресцентной визуализации с использованием АГАк-ИЦЗ, демонстрируют эффективность использования прицельной опухолевой пробы для достижения аккуратной и точной РМП резекции. Операции под контролем БИК-спектрометрии продемонстрировали, что предлагаемое вещество может эффективно помочь хирургам найти опухоль, определить край опухоли и постоянно проверять наличие остатков опухоли во время операции.

**Заключение.** Таким образом, по результатам исследования продемонстрирована высокая эффективность АГАк-ИЦЗ как потенциального молекулярного флуоресцентного агента для опухолеспецифичной интраоперационной визуализации при резекции рака мочевого пузыря и большой потенциал для проведения дальнейших клинических исследований.

**Ключевые слова:** новообразования мочевого пузыря, визуализация с использованием потенциал-чувствительных красителей, интраоперационный мониторинг, аспарагиновая кислота, аргинин, глицин, индоцианин зеленый

**Для цитирования:** Ли Пэнг, Кабилов И.Р., Касинская А.Р., Джичи Ван, Ванхай Сю, Жук Е.И., Нуралиева Р.А. Комплекс индоцианина зеленого с аргинин-глицин-аспарагиновой кислотой как новый метод интраоперационной визуализации при резекции рака мочевого пузыря. Креативная хирургия и онкология. 2018;8(3):176-184. <https://doi.org/10.24060/2076-3093-2018-8-3-176-184>

# Indocyanine Green and Arginine-Glycine-Aspartic Acid Complex Used in Intraoperative Visualization during Resection of Bladder Tumour

Li Peng<sup>1</sup>, Ildar R. Kabirov<sup>2</sup>, Adelina R. Kasinskaya<sup>2</sup>, Jiaqi Wang<sup>1</sup>, Wanhai Xu<sup>1</sup>, Ekaterina I. Zhuk<sup>2</sup>, Radmila A. Nuralieva<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Harbin Medical University, 157 Baojian Rd, Nangang Qu, Haerbin Shi, Heilongjiang Sheng, 150081, China

<sup>2</sup> Bashkir State Medical University, 3 Lenin str., Ufa, 450008, Russian Federation

**Contacts:** Kabirov Ildar Raifovich, tel.: +7 (917) 422-58-81, e-mail: ildarkabirov@gmail.com

## Summary

**Introduction.** Bladder cancer is one of the most common malignancies in humans, causing significant economic and social damage. In the connection, it is proposed to use a highly sensitive bladder cancer detection method, which also detects residual tumours. Additionally, the method can be used to determine the boundaries of the bladder tumour, namely through intraoperative fluorescence molecular imaging. The target agent was synthesised earlier with indocyanine green-arginine-glycine-aspartic acid, which is an integrin  $\alpha v\beta 3$ -targeted in *in vitro* and *in vivo* bladder cancer models.

**Materials and methods.** The toxicity of indocyanine green-arginine-glycine-aspartic acid (Agac-IG) was measured using the MTT-test. Urothelial carcinoma cell lines were introduced in Female BALB/nu and MB49 mice by means of tumour xenografts via injection in the back of the elbow area. Tumour growth was observed on a daily basis and tested by magnetic resonance imaging until it became suitable for *in vivo* experiments. Then, all the laboratory animals were divided into 2 groups: ig and AGAk-ig (150  $\mu$ l, 0.2 mg/ml for all mice). Following this, the tumour was surgically removed. The removed tissue was subjected to a fluorescent microscopy on the basis of infrared-spectrum and histologic studies.

**Results.** Operations carried out on subcutaneous and orthotopic mouse models under the control of fluorescent imaging using AGAk-IG demonstrate the effectiveness of using a targeted tumour sample to achieve consistent and accurate RMP-resection. Operations under the control of BIC-spectrometry have demonstrated that the proposed substance can effectively help surgeons to locate tumours, determine their edges and constantly check the presence of tumour residues during surgery.

**Conclusion.** The findings demonstrated the high efficiency of AGAk-IG as a potential molecular fluorescent agent for tumour-specific intraoperative imaging in bladder cancer resection, as well as offering great potential for further clinical studies.

**Keywords:** urinary bladder neoplasms, voltage-sensitive dye imaging, aspartic acid, arginine, glycine, intraoperative monitoring, indocyanine green

**For citation:** Li Peng, Kabirov I.R., Kasinskaya A.R., Jiaqi Wang, Wanhai Xu, Zhuk E.I., Nuralieva R.A. Indocyanine Green and Arginine-Glycine-Aspartic Acid Complex Used in Intraoperative Visualization during Resection of Bladder Tumour. *Creative Surgery and Oncology*. 2018;8(3):176–184. <https://doi.org/10.24060/2076-3093-2018-8-3-176-184>

Li Peng —  
Post-graduate student of the  
Department of Urology of the  
Fourth Affiliated Hospital,  
e-mail: 15636152446@163.com

Kabirov Ildar Raifovich —  
Post-graduate student of the  
Department of Urology of the  
Fourth Affiliated Hospital; Assistant  
lecturer of the Department  
of Urology,  
tel.: +7 (917) 422-58-81,  
e-mail: ildarkabirov@gmail.com

Kasinskaya Adelina  
Rustamovna —  
Post-graduate student of the  
Department of Urology,  
tel.: +7 (905) 353-49-50,  
e-mail: adelina-fly@rambler.ru

Jiaqi Wang —  
Physician of the Department of  
Urology of the Fourth Affiliated  
Hospital,  
e-mail: 346290658@qq.com

Wanhai Xu —  
Professor, Head of the Department  
of Urology, Vice-president  
of the Fourth Affiliated Hospital,  
e-mail: xuwanhai@163.com

Zhuk Ekaterina Igorevna —  
Fourth-year student of the  
Faculty of General Medicine,  
tel.: +7 (917) 359-48-30,  
e-mail: Zhukketrin@yandex.ru

Nuralieva Radmila  
Avazovna —  
Fourth-year student of the  
Faculty of General Medicine,  
e-mail: Nayka606@mail.ru

## Введение

Рак мочевого пузыря (РМП) — одно из наиболее распространенных злокачественных опухолевых заболеваний во всем мире [1, 2]. В Китае уровень заболеваемости РМП достиг 80 случаев на 100 000 населения и продолжает расти [1]. Для немышечного инвазивного рака мочевого пузыря трансуретральная резекция (ТУР) является золотым стандартом [3, 4]. Однако белая световая цистоскопия с трудом может визуализировать плоские новообразования и с точностью определять очаги РМП [5, 6], что приводит к риску остаточной опухоли и, как следствие, рецидиву. Применение  $\delta$ -Аминолевулиновой кислоты с флуоресцентной цистоскопией в синем спектре является утвержденным методом усиления визуализации опухоли и снижения рецидивов, но чувствительность метода составляет 30 % из-за низкой специфичности визуализационного агента [7]. В этой связи создание нового флуоресцентного агента с более высокой опухолевой специфичностью для применения в клинической практике при резекции РМП является приоритетной задачей.

Ранее проведен синтез индоцианина зеленого-аргинин-глицин-аспарагиновой кислоты (АГАк), конъюгированного с высокоинтенсифицированным индоцианином зеленого (ИЦЗ), как потенциального молекулярного флуоресцентного агента для опухолеспецифичной интраоперационной визуализации при резекции РМП. Химическая структура и стереохимическое описание индоцианина зеленого-аргинин-глицин-аспарагиновой кислоты представлены на рисунке 1.

Основной целью данной работы является доклиническая оценка безопасности и эффективности АГАк-ИЦЗ как потенциального инструмента интраоперационной индикации рецептора  $\alpha\text{v}\beta 3$  опухоли.

## Материалы и методы

Для определения биосовместимости АГАк-ИЦЗ и установки безопасной дозы, которую можно применять *in vivo*, использовали МТТ. Клеточную линию MB49

(уротелиальная карцинома) высевали в 96-луночные планшеты 10 000 клеток/лунку в 200 мкл клеточной культуральной среды. Через 24 часа после фиксации клетки промывали PBS и среду заменяли свежей с различной концентрацией АГАк-ИЦЗ. Через 24 часа после инкубации клетки промывали PBS, до инкубации-с МТТ 0,5 мг/л в среде с 100 мкл в течение 4 часов. Затем супернатант удаляли, нерастворимые кристаллы формазана растворяли в 200 мкл диметилсульфоксида, измеряли оптическую плотность с использованием считывателя микропланшетов с длиной волны 490 нм. Экспериментальные исследования в условиях *in vivo* выполнены на лабораторных мышах с соблюдением Международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных для экспериментальных животных, правил лабораторной практики при проведении доклинических исследований. На проведение исследования получено одобрение Комитета по институциональному уходу за животными и этикой Четвертой больницы Харбинского медицинского университета, вся работа проведена в соответствии с утвержденными методическими рекомендациями. Животные приобретались в лаборатории Vital River Laboratory Animal Technology Co. Ltd (Китай) и прошли карантинизацию в течение 2 недель.

Самки BALB/nu (возрастом 5 недель) и клеточные линии MB49 уротелиальной карциномы мыши использовали для установки опухолевых ксенотрансплантатов. Около  $2 \times 10^6$  MB49 клеток в 75 мкл среды для культивирования клеток DMED инъецировали в заднюю локтевую область каждой мыши. Рост опухоли наблюдался ежедневно и проверялся магнитно-резонансной томографией (МРТ), пока он не становился подходящим для экспериментов *in vivo*. Шесть мышей с размером опухоли 5 мм в диаметре были выбраны и разделены на 2 группы. ИЦЗ и АГАк-ИЦЗ (150 мкл, 0,2 мг/мл для всех мышей) вводили внутривенно (IV) в обеих группах соответственно. Затем флуоресцентные изображения *in vivo* были получены в нескольких точках времени (0 ч, 0,5 ч, 1 ч, 2 ч, 3 ч, 6 ч, 8 ч, 12 ч, 24 ч, 36 ч, 48 ч)

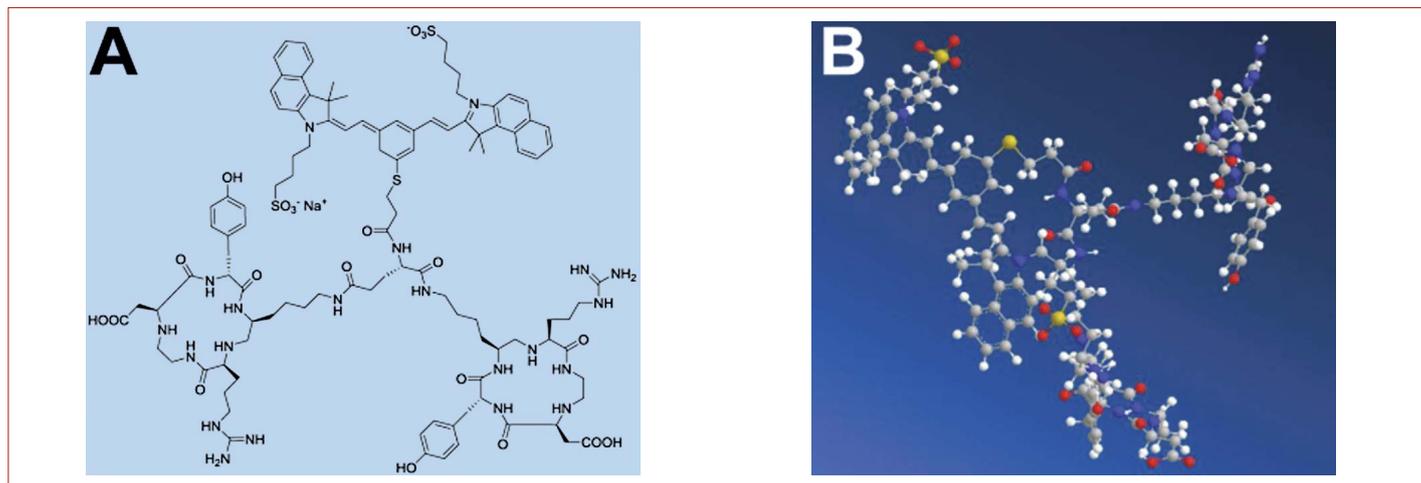


Рисунок 1. Структура (А) и стереохимическое (В) описание индоцианина зеленого-аргинин-глицин-аспарагиновой кислоты  
Figure 1. Structure (A) and stereochemical (B) description of indocyanine green-arginine-glycine-aspartic acid

в течение следующих 48 ч с использованием системы визуализации спектра IVIS (PerkinElmer, USA) для доступа ИЦЗ и АГАк-ИЦЗ к накоплению в опухоли. Для получения всех изображений мышам была проведена анестезия с 3 % изофураном/воздушной смесью.

Для анестезии использовали пентобарбитал натрия, мыши катетеризованы модифицированным IV катетером (размер 24G). Затем последовательно промывали HCl и NaOH внутреннюю поверхность мочевого пузыря, чтобы вызвать повреждение эпителиальных клеток. После этого его промывали буферным раствором для выведения остаточного NaOH. Наконец мы вводили 100 мкл ( $1 \times 10^7$ ) клеток MB49 и инкубировали их в мочевом пузыре в течение 2 часов.

Диагностические исследования МРТ (Aspect M3, Aspect Imaging, Israel) были выполнены для подтверждения опухолевой прогрессии в моделях РМП мыши. Входными параметрами были взвешенные спиновые эхо-последовательности T1/T2, толщина среза: 0,8–1,0 мм, матрица 256 × 256, ширина окна 19 119 и уровень окна 9733. T1 и T2 МРТ-исследование проводилось как диагностическая процедура для опухолевых мышей и интерпретировалась опытными радиологом и урологом для обеспечения успешного создания модели (рис. 2).

Мышам с подкожной опухолевой имплантацией была проведена инъекция АГАк-ИЦЗ кислоты в шейную вену за 8 ч до операции. Затем они были подвергнуты эктаназии, и опухоли были удалены хирургом под руководством сделанной нами интраоперационной системы визуализации на основе ближневолнового инфракрасного спектра (NIR). В течение операции остаточная опухоль была удалена и визуализирована в реальном времени, и далее постепенно проводили резекцию до того времени, пока хирург не решил, что резекция R0 была достигнута. Удаленную ткань подвергали флуоресцентной микроскопии на основе ближневолнового инфракрасного спектра и гистологическому исследованию.

Все животные были приобретены в лаборатории Vital River Laboratory Animal Technology Co. Ltd (Китай). Все

экспериментальные протоколы мелких животных были одобрены Комитетом по институциональному уходу за животными и этикой Четвертой больницы Харбинского медицинского университета, все методы были выполнены в соответствии с утвержденными методическими рекомендациями.

Статистические данные анализировались с использованием SPSS v.20 (IBM Software, США). Данные приведены в качестве средних чисел ± стандартные отклонения, характерные для экспериментов, выполненных в трех повторениях. Для оценки различий в интенсивности флуоресценции и соотношения опухоль-фон между группами использовали двухсторонние независимые двухкамерные t-тесты. Критический уровень значимости  $p$  для статистических критериев принимали равным 0,05.

## Результаты и обсуждение

### Цитотоксичность и поглощение АГАк-ИЦЗ *in vitro*

По результатам МТТ анализа установлено, что АГАк-ИЦЗ проявляла сопоставимую с ИЦЗ цитотоксичность при всех исследованных концентрациях ( $p > 0,05$ ), а жизнеспособность клеток превышала 80 %, даже когда концентрация достигала 400 мкг/мл (рис. 3).

Таким образом, АГАк-ИЦЗ имеет токсичность, аналогичную утвержденному FDA ИЦЗ, а значит, может безопасно использоваться для визуализации с помощью ближневолнового инфракрасного спектра *in vivo*.

### Флуоресцентная визуализация *in vivo* и биораспределение АГАк-ИЦЗ

Результаты оценки специфичности опухоли к АГАк-ИЦЗ (рис. 4) демонстрируют, что АГАк-ИЦЗ имеет лучший оптический контраст в опухолевом участке, чем ИЦЗ спустя 8 ч наблюдения. После начального периода распределения (<3 ч) в опухолевых и абдоминальных областях наблюдалось относительно более высокое накопление, чем в остальных частях тела, как для АГАк, так и для АГАк-ИЦЗ, но спустя 8 ч АГАк постепенно



**Рисунок 2.** Пример результатов МРТ-диагностики подкожной опухоли (А, В) или ортотопической опухоли мочевого пузыря (С, D)  
**Figure 2.** An example of the results of MRI diagnosis for subcutaneous tumour (A, B) or orthotopic bladder tumour (C, D)

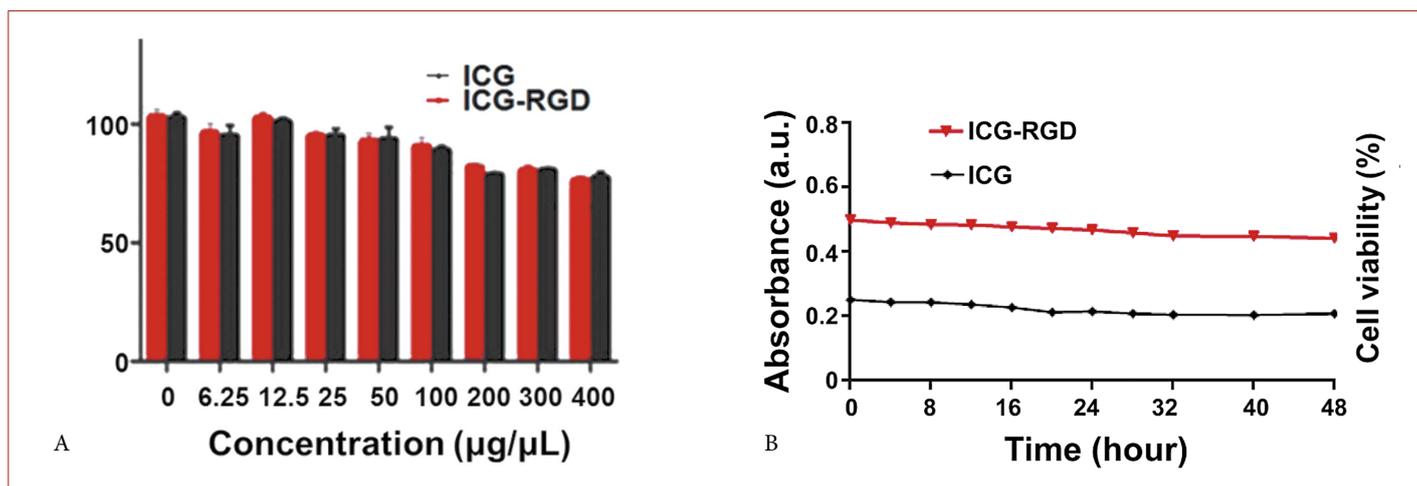


Рисунок 3. MTT-анализ АГАк-ИЦЗ и ИЦЗ на клетках MB49 в разных концентрациях (А) и различные моменты времени (В)  
 Figure 3. MTT analysis of AGAk-IG and IG on MB49 cells at different concentrations (A) and different time points (B)

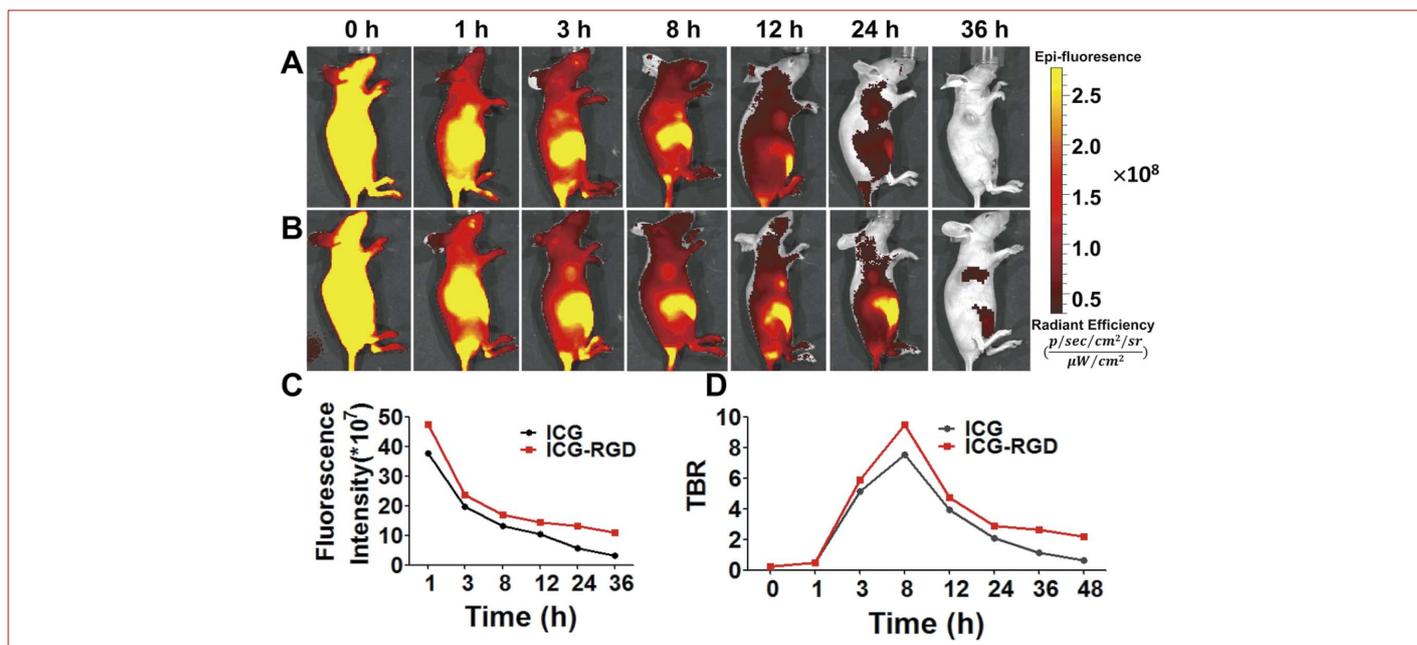


Рисунок 4. Флюоресцентная визуализация *in vivo* и биораспределение АГАк-ИЦЗ. А, В — продолжительное (48 ч) наблюдение *in vivo* ксенотрансплантата рака мочевого пузыря после назначения АГАк-ИЦЗ и АГАк, используя IVIS (*in vitro* irritancy score — оценка раздражительности *in vitro*); С — количественная оценка интенсивности флюоресцентного излучения на участке с опухолью показывает накопление АГАк-ИЦЗ; D — сравнение отношения опухоли к фону в двух пробах  
 Figure 4. Fluorescence imaging *in vivo* and biodistribution AGAk-IG. A, B — prolonged (48 h) observation *in vivo* of xenotransplants of bladder cancer after prescription of AGAk-IG and AGAk using IVIS (*in vitro* irritancy score — assessment of irritability *in vitro*); C — quantitative assessment of the intensity of the fluorescent radiation at the site the tumour shows accumulation of AGAk-IG; D — comparison of the relationship of the tumour to the background in the two samples

выводилась из печени, как и ожидалось, тогда как время нахождения АГАк-ИЦЗ внутри опухоли было по меньшей мере на 12 ч дольше. Количественное сравнение также подтвердило, что АГАк-ИЦЗ обеспечивала лучшую интенсивность сигнала и большее отношение опухоли к фону по сравнению с ИЦЗ в каждый момент времени, что подразумевает его превосходное прицельное действие *in vivo*. Данные непрерывные наблюдения *in vivo* также предполагали, что лучшим временем для исследования будет через 8 ч после инъекции, потому

что профиль отношения опухоли к фону к этому времени достигает своего пика (максимальное отношение опухоли к фону, АГАк-ИЦЗ против ИЦЗ:  $9,9 \pm 0,8$  против  $7,5 \pm 0,7$ ,  $P < 0,05$ ).

**Интраоперативная резекция опухоли мочевого пузыря в мышинных моделях с подкожным типом опухоли**  
 Через 8 часов после инъекции АГАк-ИЦЗ (0,2 мг/мл, 150 µL) опухоль была подсвечена с помощью высокооптического контрастного вещества (рис. 5A1–A3).

Затем опухолевая ткань была поэтапно удалена хирургом, а остаточную опухолевую ткань поместили справа от мыши (рис. 5B1–B3). Ожидаемые остатки были эффективно найдены во время операции, и эти с размером 1–2 мм могут быть точно определены и удалены (рисунки 5B2, красные стрелки). Для того чтобы доказать точность определения края опухоли, используя АГАк-ИЦЗ, хирург удаляет кусочки опухоли, содержащие и не содержащие флуоресцентный агент (рис. 5C1–C3, белые стрелки). Из изъятых тканей были отобраны образцы и исследованы с помощью флуоресцентной БИК-микроскопии для определения области с высоким содержанием АГАк-ИЦЗ (рис. 5D1–D3). После этого выбранная область была окрашена гематоксилин-эозином для дальнейшего гистологического исследования. Заметно, что там было также излучение, исходящее из абдоминальной области мыши после удаления кожи (рис. 5B3 и C3), но, скорее всего, АГАк-ИЦЗ выделилось в полость кишечника.

#### Интраоперационная резекция РМП на ортотопических мышечных моделях с РМП

В отличие от модели подкожной опухоли ортотопическая опухоль мочевого пузыря расположена далеко от печени и кишечника, поэтому нет помех от флуоресцентного сигнала АГАк-ИЦЗ, выделившегося в пищеварительную систему. БИК-спектроскопия показывала отличные изображения контраста в опухоли в режиме реального времени (рис. 6A1–A3), что позволяло хирургу удалить опухолевую ткань под контролем спектроскопии (рис. 6B1–B3). Образец выделенной ткани был подтвержден с помощью флуоресцентной БИК-микроскопии (рис. 6C1–C2), которая показала распространение АГАк-ИЦЗ в ткани.

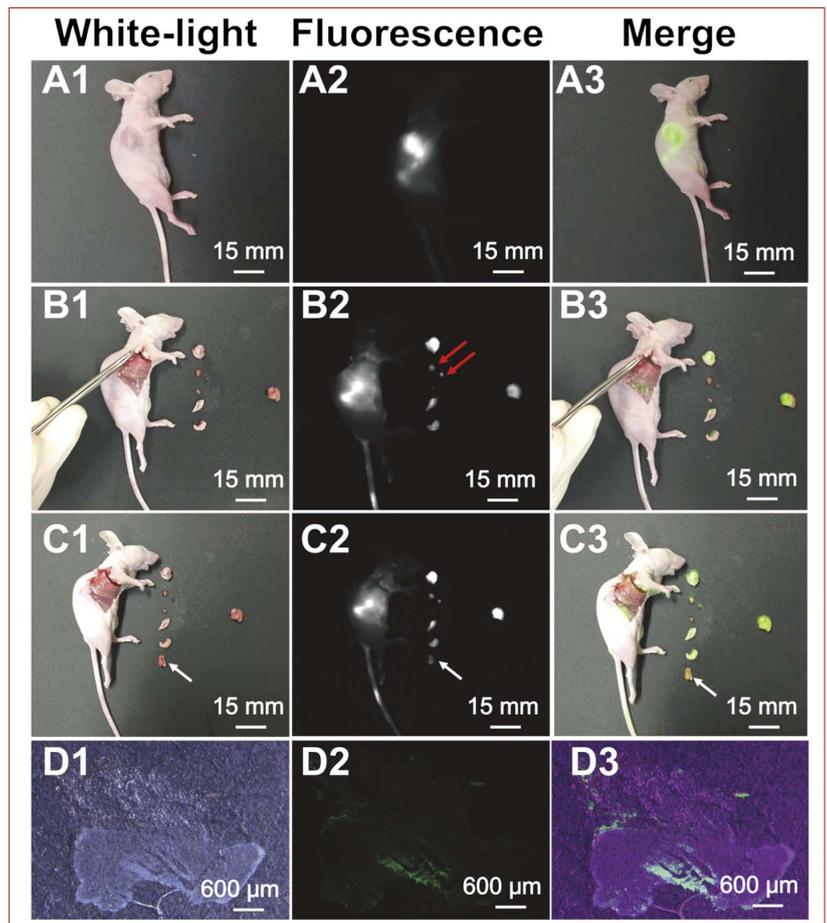
#### Гистологический анализ

Замороженные срезы были получены из пограничных областей между опухолью и соседней нормальной тканью, обнаруженной с помощью флуоресцентной БИК-спектроскопии, а затем окрашены гематоксилин-эозином. Результаты подтвердили, что хирург действительно нашел границу опухоли в обоих случаях — подкожной (рис. 7A–B) и ортотопической мышечных моделях (рис. 7C–D) под контролем флуоресцентной БИК-спектроскопии.

#### Обсуждение

Хирургическое лечение, трансуретральная резекция и радикальная цистэктомия, являются золотым стандартом лечения локализованного РМП [8]. Однако, несмотря на предпринятые большие усилия по оптимизации стратегии хирургического лечения для улучшения долгосрочных результатов, частота рецидива РМП остается высокой и составляет 15–61 % в первый год, а в течение 5 лет возрастает до 78 % [4, 5].

Технологии оптической визуализации уже широко применяются в хирургии при РМП. Обычные цистоскопии под белым и синим светом с использованием гексаминолевулина являются ценными клиническими

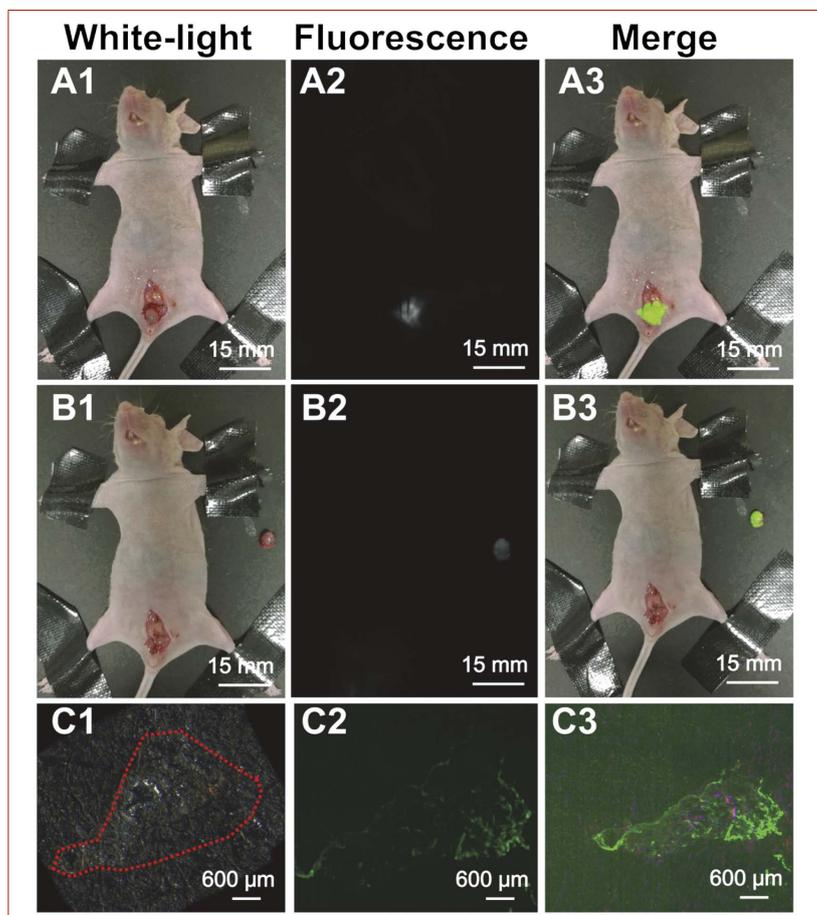


**Рисунок 5.** Основные этапы резекции опухоли мочевого пузыря в мышечных моделях с подкожным типом опухоли. A1–A3 — опухоль была подсвечена с помощью высокооптического контрастного вещества; B1–B3 — опухолевая ткань поэтапно удалена хирургом. Красная стрелка указывает на остаточную опухолевую ткань 1–2 мм; C1–C3 — остаток опухоли удален хирургом. Белая стрелка показывает остаточную опухолевую ткань, точно определенную пинцетом под контролем БИК-спектроскопии; D1–D3 — образец удаленной ткани был подтвержден с помощью флуоресцентной БИК-микроскопии

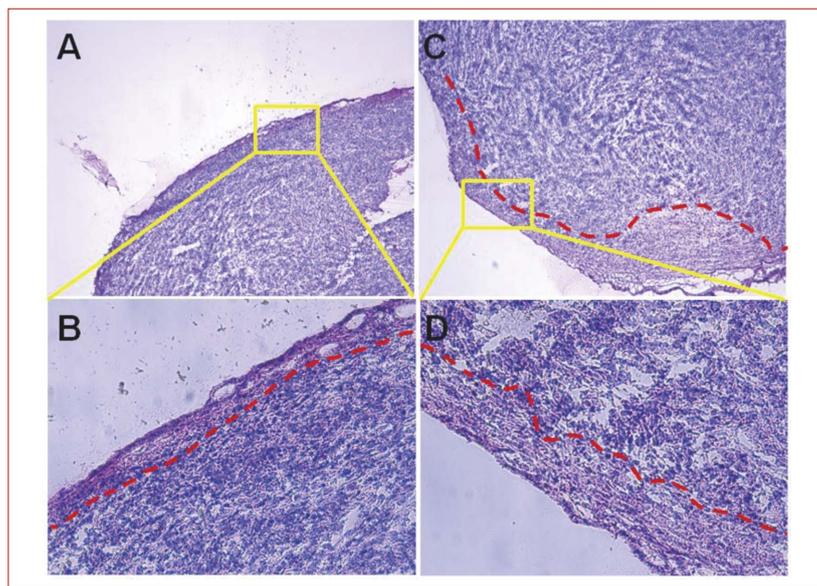
**Figure 5.** The main stages of bladder tumour resection in mouse models with subcutaneous tumour type. A1–A3 — the tumour was illuminated by a highly optical contrast agent. B1–B3 — the tumour tissue was removed by the surgeon in stages. The red arrow indicates the residual tumour tissue 1–2 mm. C1–C3 — the tumour residue was removed by the surgeon. The white arrow shows the residual tumour tissue precisely defined by the tweezers under the control of BIC-spectroscopy. D1–D3 — the sample of the removed tissue was confirmed by fluorescence BIC-microscopy

инструментами в минимально инвазивной трансуретральной резекции при мышечно-неинвазивном РМП. Однако рандомизированные клинические испытания и метаанализ предполагали, что они по-прежнему страдают от ограниченной чувствительности и специфичности, что обычно считается причиной высокой частоты послеоперационных рецидивов.

В последнее время представлены различные флуоресцентные агенты ближнего инфракрасного спектра для применения в интраоперационной визуализации при резекции опухолей как на доклинических, так и клинических этапах исследования. [9, 10]. Применение ближневолнового инфракрасного спектра (650–900 нм) имеет несколько очевидных преимуществ: высокая



**Рисунок 6.** Интраоперативное определение ортотопического РМП MV49 под контролем БИК-спектроскопии. А1–А3 — изображения БИК-спектроскопии отлично показывают контрастное вещество в опухоли; В1–В3 — опухолевая ткань удалена под контролем спектроскопии; С1–С3 — выделенный образец опухолевой ткани подтвержден с помощью флуоресцентной БИК-микроскопии  
**Figure 6.** Intraoperative determination of orthotopic RMP MV49 under the control of BIC spectroscopy. A1–A3 — BIC spectroscopy images show excellent contrast agent in the tumour; B1–B3 — the tumour tissue was removed under spectroscopy control; C1–C3 — the isolated tumour tissue sample was confirmed by fluorescence BIC-microscopy



**Рисунок 7.** Гистологический анализ выделенной опухолевой ткани. А и В — ткань подкожной опухоли, окр. гематоксилин-эозин; С и D — ткань ортотопической опухолевой ткани, окр. гематоксилин-эозин. Линия красным пунктиром обозначает край опухоли  
**Figure 7.** Histological analysis of the selected tumour tissue. A and B — Tissue of the subcutaneous tumour, hematoxylin-eosin staining; C and D — tissue of orthotopic tumour tissue, hematoxylin-eosin. The red dotted line indicates the edge of the tumour

способность проникновения в ткани, отсутствие флюоресценции с нормальных тканей, высокое отношение сигнал-фон и отсутствие помех от света в операционной [11–13]. В нескольких исследованиях было доказано, что интраоперационная визуализация на основе ближневолнового инфракрасного спектра может эффективно обнаруживать микроопухолевые очаги диаметром менее 2 мм при раке печени [14], раке молочной железы [15], раке яичников [16] и т. д. Однако флюоресцентная визуализация с помощью ближневолнового инфракрасного спектра при хирургическом вмешательстве (резекции РМП) пока полностью не изучена.

Ранее проведен синтез индоцианина зеленого-аргининглицин-аспарагиновой кислоты (АГАк), конъюгированной с высокоинтенсифицированным индоцианина зеленого (ИЦЗ), как потенциального молекулярного флюоресцентного агента для опухолеспецифичной интраоперационной визуализации при резекции РМП. АГАк является пептидом, лиганды которого специфично связываются с интегрином  $\alpha\beta 3$  [17, 18]. Экспрессия интегрин происходит в различных типах опухоли [19–22] и играет критическую роль в регуляции опухолевого роста, метастазировании и ангиогенезе [23, 24]. Именно поэтому он использовался в качестве молекулярной мишени для разработки новых методов визуализации опухоли в клинических испытаниях [25–27]. ИЦЗ в настоящее время является единственным флюоресцентным красителем ближневолнового инфракрасного спектра, разрешенным управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов в Соединенных Штатах и Китае.

В данном исследовании с помощью клеточных исследований *in vitro* и в ксенотрансплантате *in vivo* мы оценили возможности АГАк-ИЦЗ как потенциального молекулярного флюоресцентного агента для опухолеспецифичной интраоперационной визуализации при резекции РМП. Операции, проведенные на подкожной и ортотопической мышечных моделях под контролем флюоресцентной визуализации с использованием АГАк-ИЦЗ, демонстрируют эффективность использования прицельной опухолевой пробы для достижения аккуратной и точной РМП резекции. Операции под контролем БИК-спектрометрии продемонстрировали, что предлагаемое вещество может эффективно помочь хирургам найти опухоль, определить край опухоли и постоянно проверять наличие остатков опухоли во время операции. Из-за высокой чувствительности БИК-спектрометрии микроостатки опухоли размером от 1 до 2 мм были успешно визуализированы и удалены, и это было достигнуто с аналогичного поля зрения клинической операции. Следует отметить, что вырезанные ткани по-прежнему обладали большой контрастностью флюоресценции БИК между предполагаемой областью с опухолью и соседней нормальной тканью. Это может также помочь хирургам или патологоанатомам с забором криоматериала из правильного места, а не резать образцы для гистологического анализа произвольно. Это может дополнительно сократить время работы в реальных клинических применениях.

## Заклучение

Таким образом, по результатам исследования продемонстрирована высокая эффективность АГАК-ИЦЗ как потенциального молекулярного флюоресцентного агента для опухолеспецифичной интраоперационной визуализации при резекции рака мочевого пузыря. Считаем, что данный метод является многообещающим и имеет большой потенциал для проведения дальнейших клинических исследований.

### Информация о конфликте интересов.

Конфликт интересов отсутствует.

### Информация о спонсорстве.

Данная работа не финансировалась.

## Список литературы

- Chen W, Zheng R., Baade P.D., Zhang S., Zeng H., Bray F. et al. Cancer statistics in China, 2015. *Ca-cancer J Clin.* 2016;66(2):115–32. DOI: 10.3322/caac.21338
- Voltaggio L., Cimino-Mathews A., Bishop J.A., Argani P., Cuda J.D., Epstein J.I. et al. Current concepts in the diagnosis and pathobiology of intraepithelial neoplasia: a review by organ system. *Ca-cancer J Clin.* 2016;66(5):408–36. DOI: 10.3322/caac.21350
- Babjuk M., Burger M., Zigeuner R., Shariat S.F., van Rhijn B.W., Compérat E. et al. EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: update 2013. *Eur Urol.* 2008;54(2):303–14. DOI: 10.1016/j.eururo.2013.06.003
- Pan Y., Volkmer J.P., Mach K.E., Rouse R.V., Liu J.J., Sahoo D. et al. Endoscopic molecular imaging of human bladder cancer using a CD47 antibody. *SCI Transl Med.* 2014;6(260):e524. DOI: 10.1126/scitranslmed.3009457
- Witjes J.A., Gomella L.G., Stenzl A., Chang S.S., Zaak D., Grossman H.B. Safety of hexaminolevulinate for blue light cystoscopy in bladder cancer. A combined analysis of the trials used for registration and postmarketing data. *Urology.* 2014;84(1):122–6. DOI: 10.1016/j.urolgy.2014.03.006
- Павлов В.Н., Абдрахимов Р.В., Измайлов А.А., Урманцев М.Ф., Кутляров Л.М., Насибуллин И.М. Интраоперационная флюоресцентная экспресс-диагностика для выбора объема лимфаденэктомии при радикальном хирургическом лечении мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря. *Медицинский вестник Башкортостана.* 2016;11(3):31–4.
- Inoue K., Anai S., Fujimoto K., Hirao Y., Furuse H., Kai F. et al. Oral 5-aminolevulinic acid mediated photodynamic diagnosis using fluorescence cystoscopy for non-muscle-invasive bladder cancer: a randomized, double-blind, multicentre phase II/III study. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2015;12(2):193–200. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2015.03.008
- Baltacı S., Bozlu M., Yıldırım A., Gökçe M.I., Tinay I., Aslan G. et al. Significance of the interval between first and second transurethral resection on recurrence and progression rates in patients with high-risk non-muscle-invasive bladder cancer treated with maintenance intravesical Bacillus Calmette-Guérin. *BJU Int.* 2015;116(5):721–6. DOI: 10.1111/bju.13102
- Saccomano M., Dullin C., Alves F., Napp J. Preclinical evaluation of near-infrared (NIR) fluorescently labeled Cetuximab as a potential tool for fluorescence-guided surgery. *Int J Cancer.* 2016;139(10):2277–89. DOI: 10.1002/ijc.30277
- Vahrmeijer A.L., Hutteman M., Van Der Vorst J.R., Van De Velde C., Frangioni J.V. Image-guided cancer surgery using near-infrared fluorescence. *Nat Rev Clin Oncol.* 2013;10(9):507–18. DOI: 10.1038/nrclinonc.2013.123
- Garciaallende P.B., Glatz J., Koch M., Tjalma J.J., Hartmans E., Symvoulidis P. et al. Towards clinically translatable NIR fluorescence molecular imaging for colonoscopy. *Biomed Opt Express.* 2014;5(5):78–92. DOI: 10.1364/BOE.5.000078
- Wada H., Hyun H., Vargas C., Gravier J., Park G., Gioux S. et al. Pancreas-targeted NIR fluorophores for dual-channel image-guided abdominal surgery. *Theranostics.* 2015;5(1):1–11. DOI: 10.7150/thno.10259
- Liang X., Shang W., Chi C., Zeng C., Wang K., Fang C. et al. Dye-conjugated single-walled carbon nanotubes induce photothermal therapy under the guidance of near-infrared imaging. *Cancer Lett.* 2016;383(2):243–9. DOI: 10.1016/j.canlet.2016.09.006
- Zeng C., Shang W., Wang K., Chi C., Jia X., Fang C. et al. Intraoperative identification of liver cancer microfoci using a targeted near-infrared fluorescent probe for imaging-guided surgery. *Sci Rep.* 2016;6:21959. DOI: 10.1038/srep21959
- Hill T.K., Kelkar S.S., Wojtynek N.E., Souček J.J., Payne W.M., Stumpf K. et al. Near infrared fluorescent nanoparticles derived from hyaluronic acid improve tumor contrast for image-guided surgery. *Theranostics.* 2016;6(13):2314–28. DOI: 10.7150/thno.16514
- Lee J.Y., Thawani J.P., Pierce J., Zeh R., Martinez-Lage M., Chanin M. et al. Intraoperative near-infrared optical imaging can localize gadolinium-enhancing gliomas during surgery. *Neurosurgery.* 2016;79(6):1. DOI: 10.1227/NEU.0000000000001450
- Chen H., Niu G., Wu H., Chen X. Clinical application of radiolabeled RGD peptides for PET imaging of integrin  $\alpha v \beta 3$ . *Theranostics.* 2016;6(1):78–92. DOI: 10.7150/thno.13242
- Wang Y., Xiao W., Zhang Y., Meza L., Tseng H., Takada Y. et al. Optimization of RGD containing cyclic peptides against  $\alpha v \beta 3$  integrin. *Mol Cancer Ther.* 2016;15(2):232–40. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-15-0544
- Leblanc R., Lee S.C., David M., Bordet J.C., Norman D.D., Patil R. et al. Interaction of platelet-derived autotaxin with tumor integrin  $\alpha V \beta 3$  controls metastasis of breast cancer cells to bone. *Blood.* 2014;124(20):3141–50. DOI: 10.1182/blood-2014-04-568683
- López-Rodríguez V., Galindo-Sarco C., García-Pérez F.O., Ferro-Flores G., Arrieta O., Ávila-Rodríguez M.A. PET-based human dosimetry of the dimeric  $\alpha v \beta 3$  integrin ligand 68Ga-DOTA-E-[c(RGDfK)]<sub>2</sub>, a potential tracer for imaging tumor angiogenesis. *J Nucl Med.* 2015;57(3):404–9. DOI: 10.2967/jnumed.115.161653
- Oudart J.B., Doué M., Vautrin A., Brassart B., Sellier C., Dupontde-shorgue A. et al. The anti-tumor NCI domain of collagen XIX inhibits the FAK/PI3K/Akt/mTOR signaling pathway through  $\alpha v \beta 3$  integrin interaction. *Oncotarget.* 2015;7(2):1516–28. DOI: 10.18632/oncotarget.6399
- Ma P., Yu H., Zhang X., Mu H., Chu Y., Ling N. et al. Increased active tumor targeting by an  $\alpha v \beta 3$ -targeting and cell-penetrating bifunctional peptide-mediated dendrimer-based conjugate. *Pharm Res.* 2016;34(1):1–15. DOI: 10.1007/s11095-016-2045-7
- Schittenhelm J., Schwab E.I., Spervelage J., Tatagiba M., Meyer-mann R., Fend F. et al. Longitudinal expression analysis of  $\alpha v \beta 3$  integrin in human gliomas reveals upregulation of integrin  $\alpha v \beta 3$  as a negative prognostic factor. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2013;72(3):194–210. DOI: 10.1097/NEN.0b013e3182851019
- Tucci S., Tucci M., Passarelli A., Silvestris F.  $\alpha v \beta 3$  integrin: pathogenetic role in osteotropic tumors. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2015;96(1):183–93. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2015.05.018
- Schmieder A.H., Winter P.M., Williams T.A., Allen J.S., Hu G., Zhang H. et al. Molecular MR imaging of neovascular progression in the Vx2 tumor with  $\alpha v \beta 3$ -targeted paramagnetic nanoparticles. *Radiology.* 2013;268(2):470–80. DOI: 10.1148/radiol.13120789
- Terry S.Y., Abiraj K., Frielink C., van Dijk L.K., Bussink J., Oyen W.J. et al. Imaging integrin  $\alpha v \beta 3$  on blood vessels with <sup>111</sup>In-RGD2 in head and neck tumor xenografts. *J Nucl Med.* 2014;55(2):281. DOI: 10.2967/jnumed.113.129668
- Wenk C.H., Ponce F., Guillermet S., Tenaud C., Boturyn D., Dumy P. et al. Near-infrared optical guided surgery of highly infiltrative fibrosarcomas in cats using an anti- $\alpha v \beta 3$  integrin molecular probe. *Cancer Lett.* 2013;334(2):188. DOI: 10.1016/j.canlet.2012.10.041

## References

- Chen W, Zheng R., Baade P.D., Zhang S., Zeng H., Bray F. et al. Cancer statistics in China, 2015. *Ca-cancer J Clin.* 2016;66(2):115–32. DOI: 10.3322/caac.21338
- Voltaggio L., Cimino-Mathews A., Bishop J.A., Argani P., Cuda J.D., Epstein J.I. et al. Current concepts in the diagnosis and pathobiology of intraepithelial neoplasia: a review by organ system. *Ca-cancer J Clin.* 2016;66(5):408–36. DOI: 10.3322/caac.21350
- Babjuk M., Burger M., Zigeuner R., Shariat S.F., van Rhijn B.W., Compérat E. et al. EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: update 2013. *Eur Urol.* 2008;54(2):303–14. DOI: 10.1016/j.eururo.2013.06.003
- Pan Y., Volkmer J.P., Mach K.E., Rouse R.V., Liu J.J., Sahoo D. et al. Endoscopic molecular imaging of human bladder cancer using a CD47 antibody. *SCI Transl Med.* 2014;6(260):e524. DOI: 10.1126/scitranslmed.3009457
- Witjes J.A., Gomella L.G., Stenzl A., Chang S.S., Zaak D., Grossman H.B. Safety of hexaminolevulinate for blue light cystoscopy in bladder

- cancer. A combined analysis of the trials used for registration and postmarketing data. *Urology*. 2014;84(1):122–6. DOI: 10.1016/j.urolgy.2014.03.006
- 6 Pavlov V.N., Abdrakhimov R.V., Izmailov A.A., Urmantsev M.F., Kutliyarov L.M., Nasibullin I.M. Fluorescent intraoperative express diagnostics for the choice of lymphadenectomy in radical surgical treatment of muscle-invasive bladder cancer. *Bashkortostan Medical Journal*. 2016;11(3):31–4. (in Russ.)
  - 7 Inoue K., Anai S., Fujimoto K., Hirao Y., Furuse H., Kai F. et al. Oral 5-aminolevulinic acid mediated photodynamic diagnosis using fluorescence cystoscopy for non-muscle-invasive bladder cancer: a randomized, double-blind, multicentre phase II/III study. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2015;12(2):193–200. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2015.03.008
  - 8 Baltacı S., Bozlu M., Yıldırım A., Gökçe M.I., Tinay I., Aslan G. et al. Significance of the interval between first and second transurethral resection on recurrence and progression rates in patients with high-risk non-muscle-invasive bladder cancer treated with maintenance intravesical Bacillus Calmette-Guérin. *BJU Int*. 2015;116(5):721–6. DOI: 10.1111/bju.13102
  - 9 Saccomano M., Dullin C., Alves F., Napp J. Preclinical evaluation of near-infrared (NIR) fluorescently labeled Cetuximab as a potential tool for fluorescence-guided surgery. *Int J Cancer*. 2016;139(10):2277–89. DOI: 10.1002/ijc.30277
  - 10 Vahrmeijer A.L., Hutteman M., Van Der Vorst J.R., Van De Velde C., Frangioni J.V. Image-guided cancer surgery using near-infrared fluorescence. *Nat Rev Clin Oncol*. 2013;10(9):507–18. DOI: 10.1038/nrclinonc.2013.123
  - 11 Garciaallende P.B., Glatz J., Koch M., Tjalma J.J., Hartmans E., Symvoulidis P. et al. Towards clinically translatable NIR fluorescence molecular guidance for colonoscopy. *Biomed Opt Express*. 2014;5(5):78–92. DOI: 10.1364/BOE.5.000078
  - 12 Wada H., Hyun H., Vargas C., Gravier J., Park G., Gioux S. et al. Pancreas-targeted NIR fluorophores for dual-channel image-guided abdominal surgery. *Theranostics*. 2015;5(1):1–11. DOI: 10.7150/thno.10259
  - 13 Liang X., Shang W., Chi C., Zeng C., Wang K., Fang C. et al. Dye-conjugated single-walled carbon nanotubes induce photothermal therapy under the guidance of near-infrared imaging. *Cancer Lett*. 2016;383(2):243–9. DOI: 10.1016/j.canlet.2016.09.006
  - 14 Zeng C., Shang W., Wang K., Chi C., Jia X., Fang C. et al. Intraoperative identification of liver cancer microfoci using a targeted near-infrared fluorescent probe for imaging-guided surgery. *Sci Rep*. 2016;6:21959. DOI: 10.1038/srep21959
  - 15 Hill T.K., Kelkar S.S., Wojtynek N.E., Soucek J.J., Payne W.M., Stumpf K. et al. Near infrared fluorescent nanoparticles derived from hyaluronic acid improve tumor contrast for image-guided surgery. *Theranostics*. 2016;6(13):2314–28. DOI: 10.7150/thno.16514
  - 16 Lee J.Y., Thawani J.P., Pierce J., Zeh R., Martinez-Lage M., Chanin M. et al. Intraoperative near-infrared optical imaging can localize gadolinium-enhancing gliomas during surgery. *Neurosurgery*. 2016;79(6):1. DOI: 10.1227/NEU.0000000000001450
  - 17 Chen H., Niu G., Wu H., Chen X. Clinical application of radiolabeled RGD peptides for PET imaging of integrin  $\alpha v \beta 3$ . *Theranostics*. 2016;6(1):78–92. DOI: 10.7150/thno.13242
  - 18 Wang Y., Xiao W., Zhang Y., Meza L., Tseng H., Takada Y. et al. Optimization of RGD containing cyclic peptides against  $\alpha v \beta 3$  integrin. *Mol Cancer Ther*. 2016;15(2):232–40. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-15-0544
  - 19 Leblanc R., Lee S.C., David M., Bordet J.C., Norman D.D., Patil R. et al. Interaction of platelet-derived autotaxin with tumor integrin  $\alpha v \beta 3$  controls metastasis of breast cancer cells to bone. *Blood*. 2014;124(20):3141–50. DOI: 10.1182/blood-2014-04-568683
  - 20 López-Rodríguez V., Galindo-Sarco C., García-Pérez F.O., Ferro-Flores G., Arrieta O., Ávila-Rodríguez M.A. PET-based human dosimetry of the dimeric  $\alpha v \beta 3$  integrin ligand 68Ga-DOTA-E-[c(RGDfK)]<sub>2</sub>, a potential tracer for imaging tumor angiogenesis. *J Nucl Med*. 2015;57(3):404–9. DOI: 10.2967/jnumed.115.161653
  - 21 Oudart J.B., Doué M., Vautrin A., Brassart B., Sellier C., Dupontdeshorgue A. et al. The anti-tumor NC1 domain of collagen XIX inhibits the FAK/PI3K/Akt/mTOR signaling pathway through  $\alpha v \beta 3$  integrin interaction. *Oncotarget*. 2015;7(2):1516–28. DOI: 10.18632/oncotarget.6399
  - 22 Ma P., Yu H., Zhang X., Mu H., Chu Y., Ling N. et al. Increased active tumor targeting by an  $\alpha v \beta 3$ -targeting and cell-penetrating bifunctional peptide-mediated dendrimer-based conjugate. *Pharm Res*. 2016;34(1):1–15. DOI: 10.1007/s11095-016-2045-7
  - 23 Schittenhelm J., Schwab E.L., Sperveslage J., Tatagiba M., Meyer-mann R., Fend F. et al. Longitudinal expression analysis of  $\alpha v$  integrins in human gliomas reveals upregulation of integrin  $\alpha v \beta 3$  as a negative prognostic factor. *J Neuroopathol Exp Neurol*. 2013;72(3):194–210. DOI: 10.1097/NEN.0b013e3182851019
  - 24 Tucci S., Tucci M., Passarelli A., Silvestris F.  $\alpha v \beta 3$  integrin: pathogenetic role in osteotropic tumors. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2015;96(1):183–93. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2015.05.018
  - 25 Schmieder A.H., Winter P.M., Williams T.A., Allen J.S., Hu G., Zhang H. et al. Molecular MR imaging of neovascular progression in the Vx2 tumor with  $\alpha v \beta 3$ -targeted paramagnetic nanoparticles. *Radiology*. 2013;268(2):470–80. DOI: 10.1148/radiol.13120789
  - 26 Terry S.Y., Abiraj K., Frielink C., van Dijk L.K., Bussink J., Oyen W.J. et al. Imaging integrin  $\alpha v \beta 3$  on blood vessels with 111In-RGD2 in head and neck tumor xenografts. *J Nucl Med*. 2014;55(2):281. DOI: 10.2967/jnumed.113.129668
  - 27 Wenk C.H., Ponce F., Guillermet S., Tenaud C., Boturyn D., Dumy P. et al. Near-infrared optical guided surgery of highly infiltrative fibrosarcomas in cats using an anti- $\alpha v \beta 3$  integrin molecular probe. *Cancer Lett*. 2013;334(2):188. DOI: 10.1016/j.canlet.2012.10.041