



DOI 10.56618/2071-2693_2023_15_1_68

ВОЗМОЖНОСТИ ИНТРАОПЕРАЦИОННОЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ БИОВИЗУАЛИЗАЦИИ НЕРВОВ В НЕЙРОХИРУРГИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

А. Ю. Рында, В. Е. Олюшин, Д. М. Ростовцев, К. К. Куканов,
С. В. Пустовой, Ю. М. Забродская

«Российский научно-исследовательский нейрохирургический институт
имени проф. А. Л. Поленова» — филиал ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» МЗ РФ,
Маяковского ул., 12, Санкт-Петербург, 191014

РЕЗЮМЕ. Одной из главных целей различных хирургических операций является сохранение нервов, поскольку непреднамеренное повреждение может привести к появлению неврологического дефицита у пациента, включая онемение, боль, локальный паралич и другие. Идентификация нерва во время операции зависит от множества параметров, включая анатомию, текстуру, цвет и взаимосвязь с окружающими структурами с использованием освещения белым светом. Использование флуоресцентной маркировки нервов может усилить контраст между нервами и прилегающими тканями во время операции, что может привести к улучшению результатов.

ЦЕЛЬ. Анализ результатов пилотных исследований в области флуоресцентной биовизуализации нервов применительно к нейрохирургической практике.

МАТЕРИАЛЫ. В анализ включены публикации сообщающие о результатах применения методик флуоресцентной биовизуализации нервов с разными индукторами флуоресценции.

РЕЗУЛЬТАТЫ. На данный момент перспективными фотосенсибилизаторами, обладающими большинством желаемых характеристик для флуоресцентной хирургии нервов под визуальным контролем *in vivo* являются флуоресцентные GE3126, оксазин 4, Cy5-NP41.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. В идеальных условиях флуоресцентная визуализация нервных волокон *in vivo* превосходит другие методы из-за возможности получения сигнала в реальном времени, высокого пространственного разрешения, высокой чувствительности, простоты в эксплуатации и низкой стоимости. Хотя методы флуоресцентной визуализации не используются широко в клинической идентификации нервов, они демонстрируют исключительные перспективы, позволяющие существенно снизить риск неврологического дефицита.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: флуоресценция нервов, хирургия, результаты, биовизуализация.

Для цитирования: Рында А. Ю., Олюшин В. Е., Ростовцев Д. М., Куканов К. К., Пустовой С. В., Забродская Ю. М. Возможности интраоперационной флуоресцентной биовизуализации нервов в нейрохирургической практике. Российский нейрохирургический журнал им. проф. А. Л. Поленова. 2023;15(1):68–83. DOI 10.56618/2071-2693_2023_15_1_68

A POSSIBILITIES OF INTRAOPERATIVE NERVE FLUORESCENT BIOVISUALIZATION IN NEUROSURGICAL PRACTICE

A. Yu. Rynda, V. E. Olyushin, D. M. Rostovtsev, K. K. Kukanov, S. V. Pustovoi, Yu. M. Zabrodskaya

“Russian Neurosurgical Institute named after prof. A. L. Polenov” —
a branch of “the National Medical Research Center named after V. A. Almazov” Ministry of Health of Russia,
St. Petersburg, Russia, 191014, st. Mayakovskaya, 12. E-mail: fmrc@almazovcentre.ru

ABSTRACT. One of the main purpose of various surgical operations is to preserve the nerves, since unintentional damage can lead to neurological deficits in the patient, including numbness, pain, local paralysis, and others. Nerve identification during surgery depends on a variety of parameters, including anatomy, texture, color, and relationship to surrounding structures using white light illumination. The use of fluorescent labeling of nerves may enhance the contrast between nerves and adjacent tissues during surgery, which may lead to improved outcomes.

PURPOSE OF THE STUDY. Analysis of the results of pilot studies in the field of fluorescent biovisualization of nerves in relation to neurosurgical practice.

MATERIALS. The analysis includes publications reporting on the results of the application of methods of fluorescent biovisualization of nerves with different fluorescence inducers.

RESULTS. Currently, promising photosensitizers that have most of the desired characteristics for *in vivo* image-guided fluorescent nerve surgery are fluorescent GE 3126, oxazine 4, Cy5-NP41.

CONCLUSION. Under ideal conditions, *in vivo* fluorescence imaging of nerve fibers is superior to other methods due to its real-time signal acquisition, high spatial resolution, high sensitivity, ease of operation, and low cost. Although fluorescence imaging techniques are not widely used in the clinical identification of nerves, they show exceptional promise for significantly reducing the risk of neurological deficits.

KEY WORDS: nerve fluorescence, nerve surgery, results, surgery, bioimaging.

For citation: Rynda A. Yu., Olyushin V. E., Rostovtsev D. M., Kukanov K. K., Pustovoi S. V., Zabrodskaya Yu. M. Possibilities of intraoperative fluorescent bioimaging of nerves in neurosurgical practice. *The Russian Neurosurgical Journal named after prof. A. L. Polenov*. 2023;15(1):68–83. DOI 10.56618/2071–2693_2023_15_1_68

Введение.

Одной из фундаментальных целей множества хирургических операций является сохранение функции нерва для сведения к минимуму неврологического дефицита у пациента. Текущая идентификация нерва во время операции использует не поддающиеся количественной оценке критерии, такие как анатомия, текстура, цвет и связь с окружающими структурами. В случаях травмы, опухолевой инвазии или инфекции идентификация нерва с использованием вышеуказанных критериев может быть еще более сложной задачей. Используя коэффициент отражения белого света, визуальная разница между нервами, особенно небольшими нервами, такими как вегетативные нервы, и соседними тканями может быть незаметной. Непреднамеренное повреждение этих тонких или скрытых ветвей нервов является одним из наиболее болезненных, но непреднамеренных последствий хирургического вмешательства, которое может привести к потере функции, онемению и вызванной хирургическим вмешательством нейропатической боли [1–5].

Нынешние методы визуализации нервов, такие как магнитно-резонансная томография (МРТ), компьютерная томография (КТ) и ультразвук высокого разрешения, не могут предоставить хирургам рекомендации в реальном времени во время хирургических операций. Таким образом, даже если местонахождение нерва подтверждено, у хирурга нет прямого визуального контроля, чтобы определить длину или ориентацию нервных волокон. Раньше, интраоперационное распознавание нервов в основном зависело от опыта хирурга. Но теперь методы оптической визуализации, в которых используется флуоресцентный режим, позволяют напрямую интраоперационно визуализировать интересующие области на операционном поле, что может улучшить идентификацию нервов в реальном времени во время операций [1, 3, 6–9].

За последние несколько лет произошел взрыв клинических испытаний в области флуоресцентной визуализации опухолей (злокачественных и доброкачественных), сосудов и нервов для улучшения диагностики и точных операций [2, 4, 10–14]. Хирургия под флуоресцентным контролем быстро набирает обороты благодаря возможности оценки нормальных и пораженных тканей в режиме реального времени. Экспоненциальный рост интереса к этой области был продемонстрирован увеличением количества опубликованных статей за последние десятилетия [1, 7, 11, 14, 15]. По сравнению с другими методами, упомянутыми ранее, флуоресцентная визуализация обладает преимуществами охвата широкого поля, высокого пространственного разрешения и скорости оптиче-

ской визуализации без ионизирующего излучения, а также меньшей потенциальной неопределенности во время работы [1, 3, 4, 6, 8].

Использование флуоресцентных с целью маркировки нервных волокон, участков их поражения или важных хирургических структур позволяет хирургу визуализировать сигналы, которые скрыты под мышцами и жиром, в режиме реального времени во время диссекции [1, 4, 8]. В этом обзоре мы обобщили разработанные в настоящее время методики флуоресценции для нацеливания на нервы и сосредоточились на методах оптической визуализации нервов *in vivo* с применением прямого интраоперационного контроля.

Материалы.

Первой попыткой окрашивания нервов путем ретроградной маркировки с помощью флуоресцентного метода было использование красителя Evans Blue, что вызвало значительный сдвиг в области флуоресцентных красителей для окрашивания нервов и применения в других областях [15]. Эти флуоресцентные в настоящее время в значительной степени вытеснены более современными флуорофорами такие как: FG (Fluoro-Gold), FB (Fast Blue), вирусами, токсинами, белками/пептидами и синтезированными органическими молекулами [15–18].

Современные методы окрашивания нервов определяют две стратегии:

1) ретроградное или антероградное отслеживание отдельных аксональных трактов с использованием нейротропных вирусных индикаторов или невирусных индикаторов [3,17].

Так одним из методов данной технологии является введение флуоресцентных веществ непосредственно в нерв рассеченного периферического нерва (ПН) или нанесение индикаторов на край рассечения рассеченного нерва [1–3, 19–21].

2) отображение всех нервов с использованием флуоресцентных или целевых комплексов флуоресцент/нерв для проникновения через гемато-нейрональный барьер (ГНБ) (т.е. доставка флуоресцентных веществ через сосуды и отображении всех нервов/ПН после системного введения).

Есть два пути доставки флуоресцентных этим методом; во-первых, конъюгировать флуоресцент со специфичной для нерва молекулой-мишенью, чтобы они могли избирательно накапливаться в нервных волокнах; второй использует небольшие органические флуоресцентные молекулы для просачивания в нервные ткани из микрососудов внутри нервных волокон [1, 2, 22].

Преимущество метода заключается в том, что ГНБ предотвращает утечку всех биомолекул во внутриневральную ткань, кроме самых маленьких

и обычных флуоресцентных агентов визуализации, тем самым обычно предотвращая любое неспецифическое накопление [1–3].

В настоящий момент существуют в основном три пути доставки флуоресцентных веществ, нацеленных на нерв.

1. Вещества, нацеленные на аксоны

Как правило, это нейротропные вирусы, которые представляют собой набор вирусных векторов, которые заражают нейроны и распространяются по нейронным связям, такие как вирус псевдобешенства, вирус бешенства, вирус леса Семлики и аденоассоциированные вирусы [17]. Использование сконструированного вируса, несущего определенные репортерные гены, например, люциферазу, пероксидазу и зеленый флуоресцентный белок (GFP), позволяет отслеживать пространственное и временное развитие инфекции *in vivo* в режиме реального времени. Однако данная методика флуоресцентной биовизуализации не может работать последовательно для разных моделей, особенно из-за отсутствия эффективных инструментов отслеживания вирусов для млекопитающих. Кроме того, используемые в настоящее время инструменты отслеживания вирусов ограничены для клинических исследований из-за их патогенности и вирулентности [1–3].

Многие невирусные индикаторы, в том числе биотин декстранамин (BDA), FG, FB, Dio, и бактериальные токсины, теперь доступны в доклинических моделях [15, 16, 19]. Эти флуоресцентные обладают преимуществами безопасности и простоты использования по сравнению с вирусными трассерами. Однако они по-прежнему страдают другими недостатками, среди которых ключевой проблемой является сильное затухание сигнала с каждым синаптическим шагом. Кроме того, ретроградная или антероградная доставка требует локальной инъекции флуоресцента в нейрональный тракт или терминальное поле иннервации [4, 5, 23–28]. Недостатком этого метода является то, что каждый раз маркируется только одно нервное волокно, а маркировка аксонов может занять несколько дней из-за медленного аксонального транспорта [4, 6].

Существуют исключения для агентов, нацеленных на аксоны, которые не ограничиваются только местной инъекцией, например, нейронные антитела и пептиды. Так например, антитело к тубулину β -III (TUJ-1) представляет собой нейрональный маркер, который связывается с микротрубочками нейрона и может использоваться для мечения как в ЦНС, так и ПН; антитело к агриновому белку связывается с аксонами моторных нейронов и может быть использовано для специфического мечения ПН; антитело к тирозингидроксилазе связывается с адренергическими нервами и может использоваться для мечения симпатических волокон; и везикулярный транспортер ацетилхолина, специфически связывающийся с холинергическими нервами, может быть использован для мечения парасимпатических волокон. Антитела

имеют преимущества, в том числе высокое сродство и селективность по отношению к нейронам, но также сообщается, что им требуется длительное время циркуляции для накопления в нужных местах и выведения для оптимального контраста нерв/мышца. Так для быстрого мечения нервов были отобраны и применены некоторые нервные пептиды. Пептид Hsp1a, полученный из яда перуанского птицеда, является сильнодействующим и селективным по подтипу ингибитором потенциал зависимых натриевых каналов подтипа 1.7, который можно использовать в качестве мишени для ПН, в естественных условиях [4, 16, 28].

2. Флуоресцентные, нацеленные на миелин

Гемато-нейрональный барьер избирательно ограничивает обмен веществ между кровью и ПНС, подобно ГЭБ. Для отображения флуоресцентами всех нервов необходимо, чтобы флуоресцентные пересекали ГНБ после внутривенной инъекции. Так была разработана серия небольших флуоресцентных органических молекул, нацеленных на миелиновую оболочку, и они использовались для выделения нервов *in vivo*. Например, было показано, что флуоресцентные *styryl pyridinium* (FM) метят органы мышечного веретена, вкусовые рецепторы и ноцицепторы, такие как ганглии задних корешков и ганглии тройничного нерва [16, 23–25]. Производные стильбена 4,4'-диамино-транс-стильбен (DAS) и производное кумарина, производное кумарина 3-(4-аминофенил)-2Н-хромен-2-он (СМС), обладают специфичностью к миелину и проявляют сигнал флуоресценции в ткани головного мозга [23]. Дистирилбензолные флуорофоры (DSB), такие как, 1,4-бис(п-аминостирил)-2-метоксibenзол (BMB), 1,4-бис(4-аминостирил)-2-диметоксibenзол (BDB) и GE выделяют все нервные ткани после системного введения [25]. Gibbs S.L. с соавторами предположили, что общая конфигурация трехкольцевой системы является доминирующей чертой, влияющей на специфичность флуоресцентной визуализации нерва. Однако ни одна из вышеупомянутых молекул не является оптимальным выбором для идентификации нервов с помощью флуоресцентной визуализации из-за коротких длин волн этих соединений, на которые легко влияет аутофлуоресценция других тканей, не относящихся к нервам. Кроме того, эти молекулы обладают высокой липофильностью и зарядом, а также высоким сродством к жировым тканям, что приводит к низкому SNR (отношение сигнал-шум) [5, 14].

3. Флуоресцентные, нацеленные на эндоневрий

В имеющихся исследованиях сообщается, что различные небольшие молекулы и олигопептиды могут связываться с эндоневрием волокон ПН и могут быть использованы для мечения нервов *in vivo* [12, 19, 20–23, 26–39]. Например, недавно было продемонстрировано, что оксазиновый флуорофор демонстрирует как флуоресценцию в ближней инфракрасной области, так и сильную нервную специфичность, которая может окрашивать все нервы *in vivo* после

системного введения [12]. Группа Gibbs S.L. с соавторами создала обширную библиотеку флуорофоров оксазина на основе структуры оксазина 1 и оксазина 4 и провела скрининг четырех производных оксазина (LGW01–08, LGW05–75, LGW04–31 и LGW03–76) с помощью тестирования флуоресценции нервов *in vivo* [14, 33].

Так же другой группой исследователей изучающих флуоресцентные нацеленные на эндоневрий было доказано, что нервный пептид 41 (NP41) и нервный пептид 401 (NP401), предпочтительно связываются с ПН, а не с не нервными тканями, среди которых NP401 проявляет более высокое сродство к нервам человека [20–22]. Лектины, такие как агглютинин зародышей пшеницы (WGA), лектин арахиса (PNA), лектин томата (LEL) и лектин красной фасоли (PHA-L), представляют собой белки, способные прочно связываться с углеводами, и также имеют специфическое сродство связи с периферическими нервами [4, 26].

Другие флуоресцентные вещества для маркировки нервов

Существуют и другие флуоресцентные вещества, которые использовались для выделения ПН. Например, было доказано, что 4-(4-диэтиламиноэтил)-N-метил-

пиридиний йодид полезен при местном применении для окрашивания нервных окончаний, но также сообщалось, что он токсичен для нервов из-за его связывания с митохондриями в нервных окончаниях. Индоцианиновый зеленый (ICG), излучающий в ближней ИК-области, и который был одобрен Американским управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA), также использовался для не прямой визуализации нервов при хирургических операциях. ICG не проявляет специфического нацеливания на нервы, но может оставаться ограничено в сосудистом русле, тем самым усиливая *vaso nervorum* внутри нервов. Но визуализация нервов с помощью ICG была неадекватной, когда нервы были скрыты другими окружающими тканями, особенно в анатомических областях с большим количеством сосудов. Поэтому были разработаны и применены для визуализации ПН несколько аналогов ICG с излучением NIR (ближняя инфракрасная зона), таких как LS601 и 3,3'-диэтилтиатрикарбоцианин йодид (DBT) [28, 31].

В таблице ниже представлены основные флуоресцентные вещества, которые использовались для флуоресцентной идентификации нервов *in vivo* (таблица 1).

Таблица 1. Флуоресцентные вещества, использованные для визуализации нервов *in vivo*.

Table 1. Fluorescent substances used for nerve imaging *in vivo*

Вещество	Класс	Антиген цель	Путь распространения	Возбуждение, длина волны, нм	Эмиссия, длина волны, нм	Визуализация нерва
Fluorogold [15]	карбоцианиновый краситель	аксон	интракохлеарное	361	536	VIII ч.м.н.
Fast blue [15]	карбоцианиновый краситель	аксон	интракохлеарное	365	420	VIII ч.м.н.
BMB-PM [9, 16]	малые молекулы	миелин	внутрисосудистое	393	503	плечевое сплетение, II, V ч.м.н., седалищный нерв
GE 3126 [5, 25]	малые молекулы	миелин	внутрисосудистое	395	583	плечевое сплетение, II, V ч.м.н., седалищный нерв
GE 3111 [5, 25]	малые молекулы	миелин	внутрисосудистое	396	594	плечевое сплетение, II, V ч.м.н., седалищный нерв
GE 3082 [5, 25]	малые молекулы	миелин	внутрисосудистое	414	584	плечевое сплетение, II, V ч.м.н.
Dio [27]	карбоцианиновый краситель	аксон	интракорпоральное	484	501	кавернозные нервы
FastDio [18]	карбоцианиновый краситель	аксон	внутримышечное	484	501	VII ч.м.н.
NeuroTrace [19]	малые молекулы	эндоневрий	внутримышечное	500	525	гастро-энтеральные сплетения
Dylight550-GT1b 2b-550 [24]	моноклональные антитела	миелин	внутрисосудистое	563	576	ЦНС, сплетения ЖКТ, предстательной железы, седалищный нерв, спинной мозг, шейные ганглии, сплетения мочеполовой системы
оксазин 4 [12]	малые молекулы	эндоневрий	внутрисосудистое	616	635	плечевое сплетение, II, V, VII, VIII ч.м.н., возвратный гортанный нерв, седалищный нерв
Лектин арахиса (PNA) [26]	олигосахарид	эндоневрий	внутримышечное	640	680	седалищный нерв
Лектин красной фасоли (PHA-L) [26]	олигосахарид	эндоневрий	внутримышечное	640	680	седалищный нерв
Лектин томата (LEL) [26]	олигосахарид	эндоневрий	внутримышечное	640	680	седалищный нерв
Лектин зародыша пшеницы (WGA) [26]	олигосахарид	эндоневрий	внутримышечное	640	680	седалищный нерв
CMC [23]	малые молекулы	миелин	внутрисосудистое	345, 407, 655	479, 551, 674	ЦНС, седалищный нерв
FAM-NP41 [20, 21, 22]	олигопептиды	эндоневрий	внутрисосудистое	450-490	500-550	плечевое сплетение, седалищный нерв, VII ч.м.н.
ICG (индоцианиновый зеленый) [28]	цианиновый краситель	Vaso nervorum	внутрисосудистое	780-805	820-835	VII ч.м.н., периферические нервы
Холерный токсин В (CTb-488) [27, 35]	конъюгат бактериального токсина	ретроградный аксональный транспорт	внутримышечное, интракорпоральное	495	519	VII ч.м.н., периферические нервы

Результаты.**Оптическая визуализация нервов с использованием флуоресцентных методов.**

Отображение всех волокон ПН *in vivo* с помощью конъюгатов флуоресцента и пептида.

Специфичные для нервов белки/пептиды являются мощными инструментами для выполнения мечения нервов. Так в репрезентативной работе Nguyen L. и его коллеги разработали серию пептидов с помощью фаговой визуализационной методики и выделили нервный пептид (NP41), который предпочтительно связывается с нервной тканью ПН по сравнению с соседними не нервными тканями. Олигопептид NP41 был получен путем селекции

in vitro с использованием вырезанных у мышей ПН или очищенного миелинового белка и селекции *in vivo* после инъекции фага живым мышам и дальнейшим изъятием нервов для выделения фага. NP41 специфически связывается с ламинином вдоль эпинеурия, обеспечивая возможность усиленного интраоперационного мечения нервов. Путем конъюгации флуоресцеин-5(6)-карбонильной группы (FAM) или флуорофора Cy5 с пептидом и системного введения конъюгатов удалось выделить все ПН, и даже были ярко помечены ветви нервов диаметром до 50 мкм. При этом в ЦНС не наблюдалось никакой флуоресценции, поскольку NP41 не проникал через ГЭБ (рис. 1) [4].

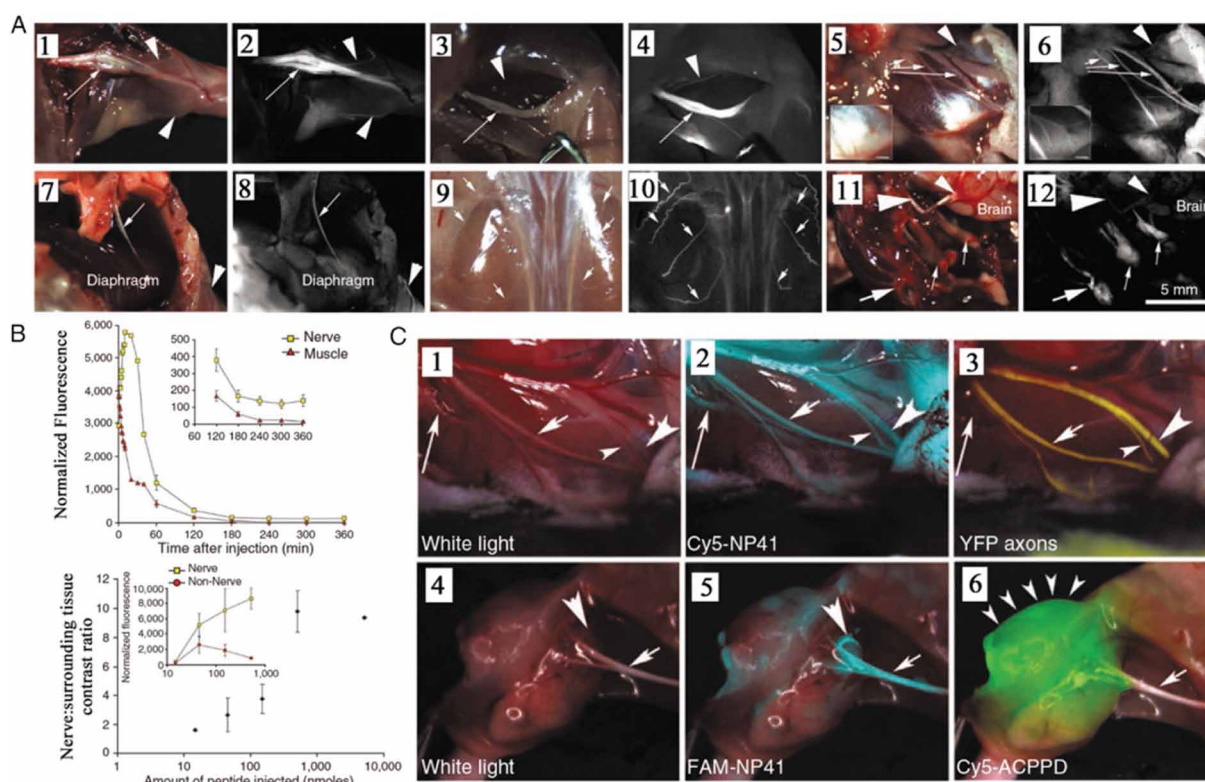


Рисунок 1.

А) Исследование нервов у мышей после системного введения флуоресцентного пептида FAM-NP41. 1,2 — нативное изображение и изображение флуоресценции плечевого сплетения; 3,4 — нативное изображение и изображение флуоресценции седалищного нерва; 5,6 — нативное изображение и изображение флуоресценции лицевого нерва; 7,8 — нативное изображение и изображение флуоресценции диафрагмального нерва; 9,10 — нативное изображение и изображение флуоресценции дорсальных кожных нервов; 11,12 — нативное изображение и флуоресцентное изображение нервов основания черепа в дорсальной проекции.

В) Время флуоресценции (верхний график) и зависимость флуоресценции от дозы (нижний график) связывания FAM-NP41 с нервной и не нервной тканью.

С) Выявление скрытых ветвей нерва при введении флуоресцента NP41, невидимые при стандартном освещении и в сравнении с желтым флуоресцентным белком (YFP). 1–3 Правый лицевой нерв и его разветвления у трансгенной мыши, меченной желтым флуоресцентным белком, которой вводили Cy5-NP4 (4–6). (L. Nguyen et al.)[4].

Figure 1.

A) Examination of nerves in mice after systemic administration of the fluorescent peptide FAM-NP41. 1,2 — native image and fluorescence image of the brachial plexus; 3,4 — native image and fluorescence image of the sciatic nerve; 5,6 — native image and fluorescence image of the facial nerve; 7,8 — native image and phrenic nerve fluorescence image; 9,10 — native image and fluorescence image of the dorsal cutaneous nerves; 11,12 — native image and fluorescent image of the nerves of the base of the skull in the dorsal projection.

B) Fluorescence time (upper graph) and fluorescence versus dose (lower graph) of FAM-NP41 binding to neural and non-nervous tissue.

C) Identification of hidden nerve branches with NP41 fluorescent, invisible under standard illumination and compared to yellow fluorescent protein (YFP). 1–3 Right facial nerve and its ramifications in a yellow fluorescent protein labeled transgenic mouse injected with Cy5-NP4 (4–6). (L. Nguyen et al.) [4].

В других работах группа Nguyen L. также обнаружили, что поглощение флуоресцентного NP41 наблюдалось в эпинерии лицевых нервов мышей. А дегенерирующие ветви лицевого нерва можно было пометить флуоресцентным NP41 в течение 9 месяцев после пересечения основной ветви нерва. После этого та же группа объявила о разработке другого пептида NP401 с более высоким сродством к ПН. Кроме того, пептид NP401 показал высокую контрастность нерва и мышцы на местных срезах ткани человека *ex vivo*. Также сообщалось, что антитела к нервным волокнам, меченным флуорофорами, могут избирательно накапливаться в ПН *in vivo* [36].

Например, группа Sheikh K.A. разработала методику позволяющую отображать ПН с помощью антиганглиозидного антитела, меченного Dylight550, и идентифицировать сегменты нервов с дегенерацией и регенерацией аксонов с помощью макроскопии *in vivo* у живых животных [28].

В некоторых случаях специфическая для нерва мишень неизвестна. При использовании обычных стратегий молекулярной визуализации, нацеленных на рецепторы, обычно ищут внеклеточно экспрессируемые мишени. В этом смысле нулевой миелиновый

белок (MPZ или P0), большой гомотипический белок, состоящий из 124 аминокислотных остатков, который составляет 80 % содержания белка в периферическом миелине, и который расположен на внешней мембране шванновских клеток, образующих миелиновую оболочку, наверняка будет мишенью, которую стоит изучать. Уникально то, что P0 специфичен для ПНС и не экспрессируется в ЦНС. В ЦНС формированию миелиновой оболочки способствуют адгезивные свойства протеолипидного белка миелина (PLP) [1, 20, 22].

Так Buckle T. с соавторами использовали укороченные гомотипические пептидные последовательности на основе белка P0 с цианиновым красителем Cy5 (соединение Cy5-P0₁₀₁₋₁₂₅) для флуоресценции тканей *in vitro* и *ex vivo*. Cy5-P0₁₀₁₋₁₂₅ позволил провести *in vivo* флуоресцентную визуализацию седалищного нерва после местного внутривенного введения и продемонстрировал совместимость с клиническим флуоресцентным лапароскопом во время оценки на модели животного, подвергающейся роботизированной хирургии. Данные биораспределения показали, что при внутривенном введении Cy5-P0₁₀₁₋₁₂₅ не проникает в центральную нервную систему (рис. 2) [1].

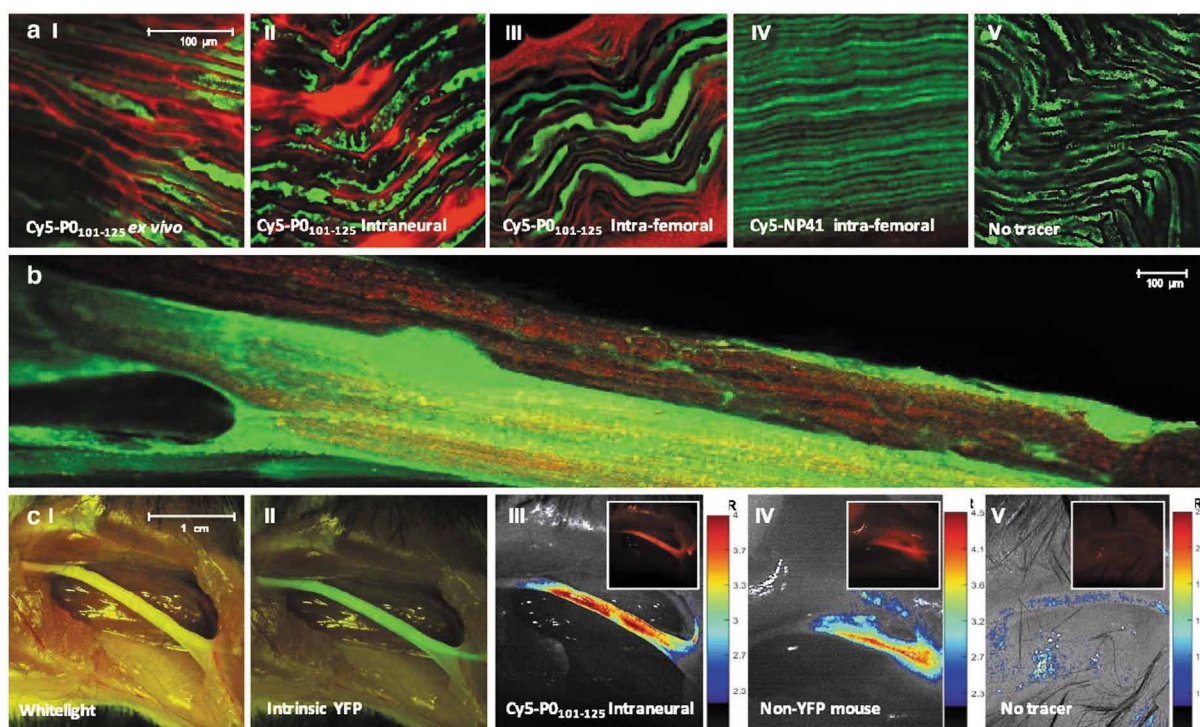


Рисунок 2. *Ex vivo* и *in vivo* визуализация седалищного нерва мышей.

А. 63-кратное увеличение седалищного нерва после (I) инкубации *ex vivo*, (II) внутринеурального введения или (III) внутривенного введения (v. femoralis) Cy5-P0₁₀₁₋₁₂₅, (IV) Флуоресцентное конфокальное изображение седалищного нерва F после внутривенного введения (v. femoralis) Cy5-NP41 или (V), когда индикатор не применялся.

В. *In vivo* флуоресцентное конфокальное изображение седалищного нерва в большом поле зрения у трансгенной мыши, меченной желтым флуоресцентным белком Thy-1 YFP (YFP — желтый флуоресцентный белок) через 1 ч после внутривенного введения (v. femoralis) Cy5-P0₁₀₁₋₁₂₅. Cy5 выделен красным, а YFP, расположенный в аксонах мышей Thy-1 YFP, выделен зеленым.

С. Изображения микроскопии *in vivo*, показывающие (I) изображение седалищного нерва в белом свете и (II) собственный сигнал YFP у мыши Thy-1 YFP. Обработка изображения после освещения седалищного нерва после внутринеурального введения Cy5-P0₁₀₁₋₁₂₅ у (III) мыши Thy-1 YFP, (IV) у мыши без YFP и (V) без применения индикатора. На вставках показано необработанное флуоресцентное изображение. Масштабная линейка представляет собой отношение нерва к фону. (T. Buckle et al.) [1].

Figure 2. *Ex vivo* and *in vivo* visualization of the sciatic nerve of mice.

A. 63-fold enlargement of the sciatic nerve after (I) *ex vivo* incubation, (II) intraneural injection, or (III) intravenous injection (v. femoralis) of Cy5-P0_{101–125}. (IV) Fluorescent confocal image of the sciatic nerve F after intravenous (v. femoralis) Cy5-NP41 or (V) when the indicator was not applied.

B. *In vivo* large field of view fluorescent confocal image of the sciatic nerve in a transgenic mouse labeled with the yellow fluorescent protein Thy-1 YFP (YFP is a yellow fluorescent protein) 1 h after intravenous (v. femoralis) Cy5-P0_{101–125}. Cy5 is highlighted in red and YFP located in the axons of Thy-1 YFP mice is highlighted in green.

C. *In vivo* microscopy images showing (I) white light image of the sciatic nerve and (II) native YFP signal in a Thy-1 YFP mouse. Image processing after illumination of the sciatic nerve after intraneural administration of Cy5-P0_{101–125} in (III) a Thy-1 YFP mouse, (IV) in a mouse without YFP, and (V) without the use of an indicator. The insets show the raw fluorescent image.

The scale bar represents the ratio of nerve to background. (T. Buckle et al.) [1].

Как указывают авторы P0_{101–125} оказался мощным нервно-специфическим агентом, способным нацеливаться на P0/миелин в условиях *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo*, не создавая угрозы токсичности, связанной с ЦНС [1].

В дополнение к красителям для выделения нервов при хирургии под флуоресцентным визуальным контролем предполагается использование коротких пептидов, связывающихся с нервами, в качестве носителей терапевтических агентов. Такие сопряженные системы могут способствовать восстановлению/регенерации поврежденных нервов как в периферической нервной системе, так и в спинном мозге. Небольшой размер нервных пептидов, таких как NP401, также делает их идеальными для покрытия наночастиц или дендримеров для доставки большого количества лекарств или агентов визуализации в нервную систему. NP41 служит полезным агентом для отслеживания нервов у живых животных, требующих быстрого связывания и клиренса флуоресцентного агента. Поэтому следует ожидать, что NP401 или его оптимизированный вариант могут оказать огромное влияние на результаты лечения пациентов, помогая хирургам идентифицировать нервы до их обнажения во время операции [20–22].

Наночастицы (НЧ) в качестве флуоресцентных меток для отображения волокон ПН *in vivo*.

Благодаря быстрому развитию нанотехнологий в последние десятилетия люминесцентные наноматериалы стали привлекать внимание, благодаря их превосходным оптическим свойствам, стабильности и биосовместимости. В последнее время эта концепция применялась при визуализации ПН после комбинации флуоресцентных нейропептидов со специфическими для нерва мишенями. Например, группа Lin Q. разработала метод маркировки седалищного нерва путем конъюгации флуоресцентных наноточек Au (AuND) с холерным токсином В (СТВ). При анализе эндоцитоза AuNDs-СТВ с помощью просвечивающей электронной микроскопии они обнаружили, что наночастицы флуоресцента в основном располагались в лизосомах в цитоплазме. После локального введения флуорофора AuND-СТВ крысам вещество ретроградно транспортировалось в спинной мозг на расстояние более 5 см. Благодаря длительному удерживанию наноча-

стиц внутри клеток этот флуорофор может удерживаться в нерве до 2-х суток [35].

В других работах сообщалось, что в дополнение к длительному удержанию в месте нацеливания наноматериалы могут излучать флуоресценцию в спектре NIR-II, что может обеспечить визуализацию глубоких анатомических структур с беспрецедентной степенью четкости [29, 37].

Так группа Zhang X. с соавт. синтезировала флуоресцент QD PbS (квантовые точки на основе сульфида свинца), испускающие в спектре NIR-II, и конъюгировала QD с пептидом NP41 через сшивающий линкер, содержащий несколько N – гидроксисукцинимидных сложно эфирных малеимидных групп. Они показали, что после внутривенного введения флуоресцента мышам плечевое сплетение и седалищный нерв неинвазивно подсвечивались в спектре NIR-II. Визуализирующие агенты NP41-QD позволяли отображать пересеченные и повторно сшитые нервы, предполагая, что эта методика потенциально может применяться в качестве руководства при лечении ятрогенных повреждений нервов во время первоначального повреждения (рис. 3) [29].

В последнее время с целью визуализации нервов также сообщалось о совмещении NP41 с другими оптическими метками, такими как магнитные нанопептиды. Учитывая это, группа Tian J. пометила суперпарамагнитные наночастицы (НЧ) оксида железа (SPIO НЧ) с помощью NP41 и визуализировала плотность нервов в опухолевой ткани (рис. 4) [32].

Отображение всех нервных волокон *in vivo* с помощью малых органических молекул.

Флуоресцентная визуализация нервов *in vivo* с помощью низкомолекулярных флуоресцентов также проводилась в последние несколько лет. В отличие от активных целевых биомолекул, синтетические органические молекулы связываются с нервами посредством пассивной утечки из кровеносных сосудов внутри нервных волокон. Для достижения такого пассивного нацеливания молекулы должны быть достаточно маленькими и иметь достаточную липофильность для пересечения ГНБ. Теоретически органические молекулы должны быть менее 500 Да, и иметь коэффициент распределения от 0,5 до 3,0 (логарифм D при pH 7,4) [9, 12, 15, 16, 19, 23].

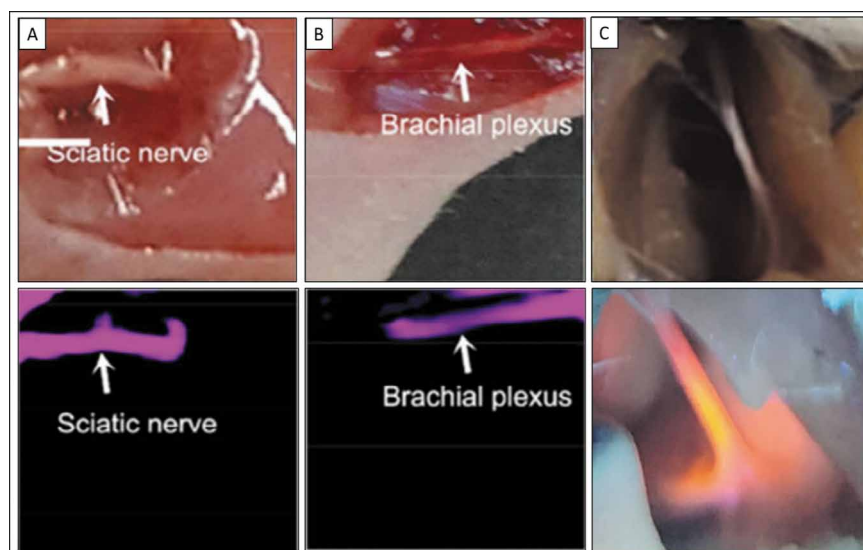


Рисунок 3. Сравнение светловых и флуоресцентных изображений седалищного нерва А. и плечевого сплетения В. после введения QD Pb S. C. Флуоресцентное изображение седалищного нерва после инъекции AuNDs-CTB. (X. Zhang et al.) [29, 35].
Figure 3. Comparison of bright-field and fluorescent images of the sciatic nerve A. and the brachial plexus B. after QD PbS injection.
C. Fluorescent image of the sciatic nerve after AuNDs-CTB injection. (X Zhang et al.) [29, 35].

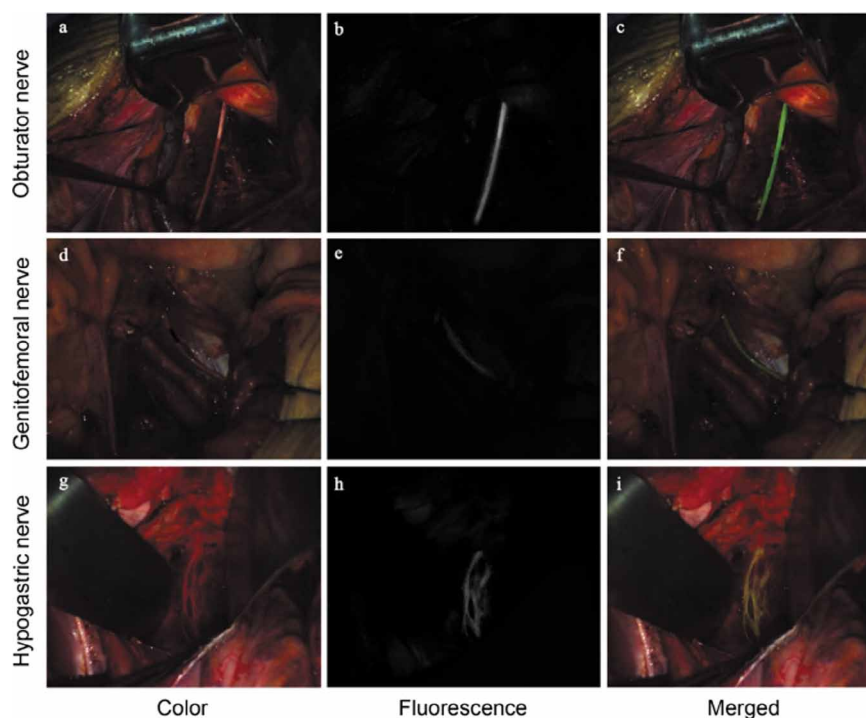


Рисунок 4. Репрезентативные изображения флуоресценции с помощью SPIO НЧ-NP41: а–с запирательного, d–f генитофеморального и e–h подчревного нервов. (J. Tian et al.) [32].
Figure 4. Representative SPIO NP-NP41 fluorescence images of a–c obturator, d–f genitofemoral, and e–h hypogastric nerves. (J. Tian et al.) [32].

В 2006 г. было обнаружено, что BDB проникает через ГЭБ и избирательно связывается с миелиновой оболочкой, что позволяет выявить индуцированную купризом демиелинизацию [16]. Позже группой Stankoff В. была синтезирована молекула BMB (4,4'-[(2-метокси-1,4-фенилен) ди-(1E)-2,1-этидил] бис-бензенамин), производная BDB и представляла собой флуоресцентную молекулу, которая применялась для флуоресцентной визуализации [9]. Группа Frangioni J. V. сообщила о эффективности флуорес-

цента BMB и его производной GE 3082 (4-[(1E)-2-[4-[(1E)-2-[4-аминофенил]этинил]-3-метоксифенил]этинил]бензонитрил) для операций с флуоресцентным контролем ПН [5]. И BMB, и GE 3082 выделяют центральные и периферические нервные ткани на срок до 8 часов после системного введения, и демонстрируют большие перспективы в качестве специфичных для нервов контрастных агентов для хирургии под визуальным контролем [5, 25]. Затем Frangioni J. V. и Hehir C. A. T. разработали другие аналоги DSB, на-

зываемые GE с сопряженными жесткими плоскими структурами. GE 3111 и GE 3126 представляют собой небольшие молекулы, что позволяет им эффективно проникать через ГНБ. После внутривенной инъекции ПН четко окрашивались *in vivo* (рис. 5, 6, 7) [39].

Визуализация нерва наблюдалась быстро в модели свиньи, в течение 5–10 минут после инъекции, а сигнал флуоресценции нерва сохранялся до 80 минут. Сигнал флуоресценции в жировой ткани был ослаблен, а мышца оставалась темной на протяжении всей процедуры, демонстрируя, что контраст между нервом и окружающей его мышцей и жировой тканью был значительно улучшен [5, 39].

Поскольку длинноволновое излучение имеет уникальные преимущества при флуоресцентной визуализации *in vivo*, недавно были разработаны несколько молекул, излучающих в ближней инфракрасной области. Например, группа Choi H. S. исследовала химические вещества на основе оксазина и подтвердила, что оксазин 4 показал самый высокий сигнал флуоресценции нерва и самый низкий фон после системного введения. Они связали это превосходство оксазина 4 над другими оксазинами с малой молекулярной массой, из-за которых оксазин 4 имел максимальное проникновение ГНБ [33]. Прямое введение оксазина 4 в нервную ткань также позволило избирательно выделять нервную ткань и улучшить радикальность операции с сохранением нерва. Следует отметить, что излучение оксазина 4 находится не в истинном окне NIR; следовательно, при применении *in vivo* он по-прежнему имеет относительно низкий SNR (рис. 8) [33].

Группа Gibbs S. L., Choi H. S. и другие исследователи смогли визуализировать излучение флуорофоров оксазина на более длинных волнах (606–708 нм). Они отобрали 4 соединения из 64 производных оксазина, которые проявляли как флуоресценцию в ближней ИК-области, так и специфичность для нервов. Из-за улучшенной глубины проникновения флуорофоров, они обнаружили, что глубокозалегающие нервные ткани, невидимые в обычном белом свете, могут быть однозначно визуализированы после системного введения этих флуорофоров при хирургии с эндоскопической флуоресцентной навигацией (рис. 9) [22, 31, 33].

Другим типом молекулы, излучающей NIR, разработанной в качестве мишени, специфичной для нерва, являются производные ICG. Группа Johnson P. J. заявила, что в то время как, ICG задерживается в ткани нейронов в месте инъекции, более гидрофильное производное ICG LS601 обладает улучшенной тропностью и распределением в нервной ткани после локальной инъекции и, таким образом, может достигать определенной цели путем как ретроградной, так и антероградной миграции. Небольшие органические молекулы перспективны из-за их способности проникать через ГНБ и прикрепляться к нервной ткани; однако они не идеальны, поскольку обладают высокой гидрофобностью и имеют тенденцию накапливаться в жировой ткани, что приводит к относительно низкому SNR (рис. 9 (E, F)) [31].

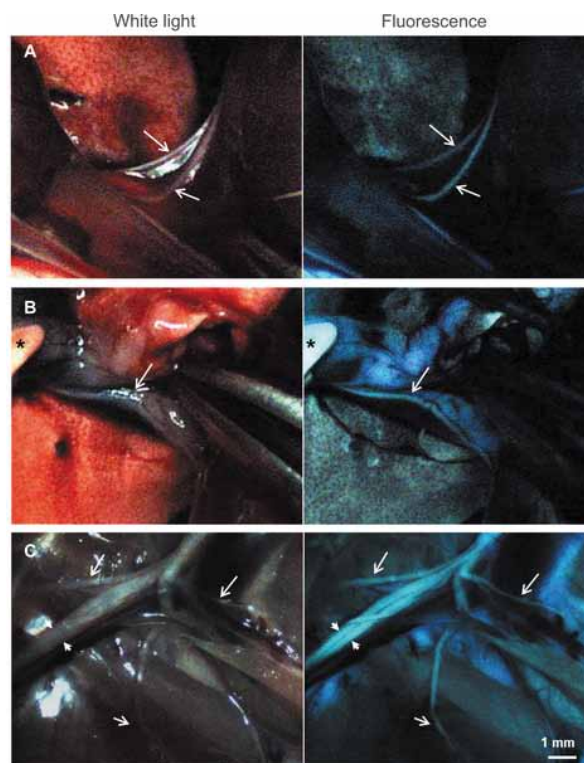


Рисунок 5. Отдельные кадры, извлеченные из видео в реальном времени, записанного во время операции с минимальным эндоскопическим доступом (А, В) и открытым доступе (С) у крысы, которой вводили 12,2 мг/кг GE 3126 с использованием специального двухрежимного лапароскопического инструмента для визуализации. Стрелки указывают на нервы. В диафрагме был сделан небольшой разрез, обеспечивающий доступ эндоскопа в грудную полость, выделяя области вокруг диафрагмального нерва (А) и блуждающего нерва (В). Изображения в белом свете (левый столбец) идентифицируют анатомические маркеры (такие как легкие и кровеносные сосуды), а флуоресцентные изображения (правый столбец) показывают нервы небольшого диаметра, которые легко скрыты окружающей фасцией. (С) Открытый разрез в плечевом сплетении. Медиальные и латеральные тяжи (стрелки) легче различить в режиме флуоресценции. Нервы меньшего размера, которые лучше видны при флуоресценции, такие как надлопаточный, переднегрудной и торакодорзальный нервы, показаны белыми стрелками. Звездочка в (В) — это палец оператора в перчатке. Масштабная линейка около 1 мм. (C.A.T. Hehir et al. 2015) [39].

Figure 5. Individual frames extracted from live video recorded during minimal endoscopic access (A, B) and open access (C) surgery in a rat injected with 12.2 mg/kg GE 3126 using a dedicated dual-mode laparoscopic instrument for visualization. Arrows point to nerves. A small incision was made in the diaphragm, allowing the endoscope to enter the chest cavity, highlighting the areas around the phrenic nerve (A) and the vagus nerve (B). White light images (left column) identify anatomical markers (such as lungs and blood vessels), while fluorescent images (right column) show small diameter nerves that are easily obscured by the surrounding fascia. (C) Open incision in the brachial plexus. Medial and lateral cords (arrows) are easier to distinguish in fluorescence mode. Smaller nerves that are better seen under fluorescence, such as the suprascapular, prothoracic, and thoracodorsal nerves, are indicated by white arrows. The asterisk in (B) is the operator's gloved finger. Scale bar about 1 mm. (C.A.T. Hehir et al. 2015) [39].

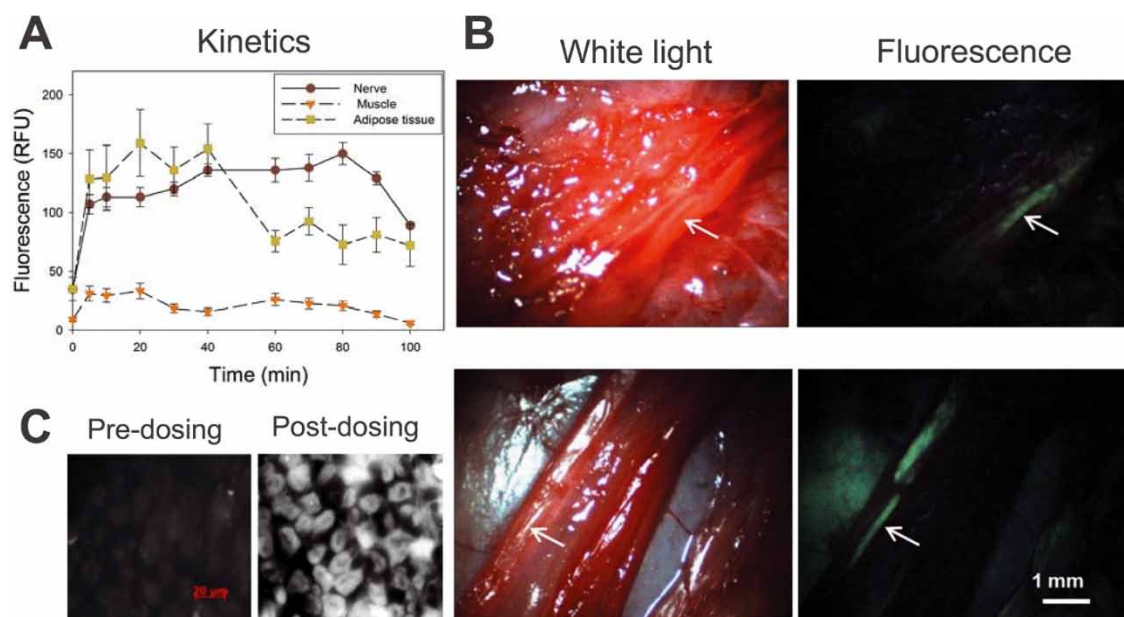


Рисунок 6. Двухрежимная эндоскопическая визуализация нервов на модели свиньи.

Свинье вводили дозу 0,74 мг/кг GE3126. Был сделан разрез в левом плечевом сплетении, и видео было записано непосредственно перед инъекцией GE3126 и в определенные моменты времени до 100 минут после инъекции.

(А) Были извлечены отдельные кадры и нанесены графики интенсивности флуоресценции нерва, прилегающих мышц и жировой ткани в зависимости от течения времени.

(В) Репрезентативные изображения белого света и флуоресценции, извлеченные из видео, показывают плечевое сплетение (вверху) и забрюшинную область (внизу) через 80 минут после инъекции. Нервы показаны белыми стрелками.

(С) Изображения флуоресцентной микроскопии среза нервной ткани свиньи, полученные до инъекции GE 3126 и через 90 минут после инъекции. Масштабная линейка в 1 мм; масштабная линейка в С = 20 мкм. (C.A.T. Hehir et al. 2015) [39].

Figure 6. Dual mode endoscopic nerve imaging in a porcine model.

The pig was dosed with 0.74 mg/kg GE3126. An incision was made in the left brachial plexus and video was recorded just before the GE3126 injection and at certain times up to 100 minutes after the injection.

(A) Individual frames were extracted and fluorescence intensity plotted for nerve, adjacent muscle, and adipose tissue over time.

(B) Representative images of white light and fluorescence extracted from the video show the brachial plexus (top) and retroperitoneum (bottom) 80 minutes after injection. Nerves are shown as white arrows.

(C) Fluorescence microscopy images of a section of porcine neural tissue taken before GE3126 injection and 90 minutes after injection. Scale bar in 1 mm; scale bar in C = 20 μ m. (C.A.T. Hehir et al. 2015) [39].

Обсуждение.

Применение минимально инвазивных процедур подкрепляется возможностью картирования областей заболевания в контексте здоровой анатомии (так называемые хирургические дорожные карты) с использованием неинвазивных предоперационных методов визуализации, таких как МРТ или ПЭТ/КТ [6, 9, 40, 41]. К сожалению, интраоперационное обнаружение предоперационно выявленных поражений/структур может быть затруднено. Например, увеличенное расстояние между хирургом и пациентом ограничивает сенсорный опыт хирурга в форме пальпации (например, при использовании хирургического робота) [18, 19, 24]. Этот недостаток можно хотя бы частично компенсировать за счет использования интервенционной молекулярной визуализации [10, 39]. На сегодняшний день эта субдисциплина визуализации в основном сосредоточена на интраоперационном обнаружении опухолевых поражений с использованием либо радио-, либо флуоресцентного контроля. Флуоресценция в хирургии онкологических заболеваний на таких сложных анатомических структурах, таких как область головы и шеи или позвоночника, где визуальный контроль используется как для об-

наружения узловых метастазов, так и для выявления краев первичной опухоли [18, 22, 40, 42]. Однако в этих же анатомических структурах случайное хирургическое повреждение нервов может привести к значительным побочным эффектам, таким как потеря сенсорной чувствительности или речи, недержание мочи и другие дисфункции [18, 24, 26, 27]. Оптическая визуализация нервов имеет большое значение для сохранения нервов во время операций, выявления неврологических заболеваний и оценки прогрессирования рака [19, 22, 24]. Ятрогенное повреждение нерва является одной из причин ухудшения качества жизни больных после оперативного вмешательства. Такое хирургически индуцированное повреждение нерва не редкость: несмотря на то, что более 70 % пациентов с опухолями получают нервосберегающие операции, считается, что 30 % пациентов страдают от потери неврологических функций в течение 1 года после операции. Здесь следует отметить, что степень неврологического ущерба трудно предсказать. У пациентов с опухолями головы и шеи анатомия нервов является сложной, а рецидивирующее повреждение гортанного нерва и повреждение нижнечелюстного нерва наблюдается у 14 % пациентов, перенесших

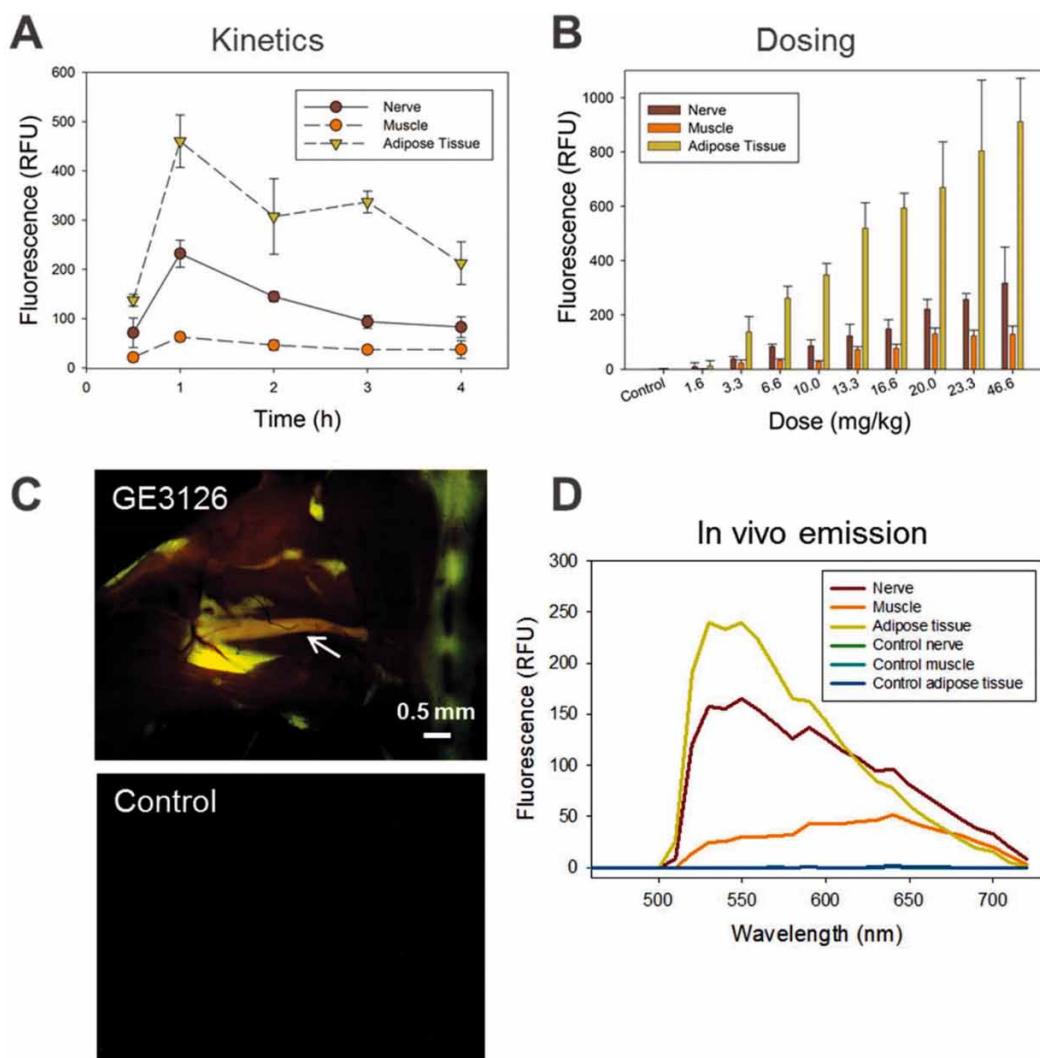


Рисунок 7. Кинетика и дозировка флуоресцента GE3126 у мышей после его внутривенного введения, приготовленного из 80 % дистиллированной/деионизированной воды, 10 % 2-HPβCD и 10 % пропиленгликоля.

Визуализация выполнялась с использованием коммерческого флуоресцентного стереомикроскопа с мультиспектральным детектированием. Возбуждение достигалось с помощью фильтра с центром на 406 нм и шириной полосы 15 нм. Численные данные представляли собой площадь под кривой для длины волны излучения в диапазоне от 550 нм до 720 нм, полученных в седалищных нервах, прилегающих мышцах и жировой ткани, с $n = 3$ мышами в группе.

(A) Для кинетики флуоресцента каждой мыши давали 16 мг/кг GE3126, а визуализацию выполняли через 0,5, 1, 2, 3 или 4 ч после инъекции.

(B) В исследовании дозировано мышам давали 1,6; 3,3; 6,6; 10,0; 13,3; 16,6; 20,0; 23,3 или 46,6 мг/кг GE3126, а визуализацию выполняли через 1 час после инъекции. Контрольным мышам была сделана однократная инъекция состава для внутривенного введения (только носитель) и проведена визуализация для определения фоновой флуоресценции.

(C) Репрезентативное флуоресцентное мультиспектральное изображение мыши, которой вводили 16,6 мг/кг GE3126.

Седалищный нерв (красновато-оранжевый) указан стрелкой. Обратите внимание на флуоресцентную маркировку прилегающей жировой ткани зеленым цветом. Ткань контрольного животного выглядела темной. Масштабная линейка около 0,5 мм.

(D) Спектры излучения нервной, мышечной и жировой ткани иллюстрируют спектральные разделения между типами тканей как у мыши, получавшей GE3126, так и у контрольной мыши. (C.A.T. Hehir et al. 2015) [39].

Figure 7. Kinetics and dosage of fluorescent GE3126 in mice following intravenous administration prepared from 80 % distilled/deionized water, 10 % 2-HPβCD, and 10 % propylene glycol.

Visualization was performed using a commercial fluorescent stereomicroscope with multispectral detection. Excitation was achieved with a filter centered at 406 nm with a bandwidth of 15 nm. Numerical data were area under the curve for radiation wavelengths ranging from 550 nm to 720 nm obtained in sciatic nerves, adjacent muscles and adipose tissue, with $n = 3$ mice per group.

(A) For fluorescent kinetics, each mouse was given 16 mg/kg GE3126 and imaging was performed 0.5, 1, 2, 3, or 4 h after injection.

(B) In the study, mice were dosed at 1.6; 3.3; 6.6; 10.0; 13.3; 16.6; 20.0; 23.3 or 46.6 mg/kg GE3126 and imaging was performed 1 hour after injection. Control mice were given a single injection of the intravenous formulation (vehicle only) and imaged for background fluorescence.

(C) Representative fluorescence multispectral image of a mouse treated with 16.6 mg/kg GE3126. The sciatic nerve (reddish-orange) is indicated by an arrow. Note the fluorescent labeling of adjacent adipose tissue in green. The tissue of the control animal looked dark. Scale bar approx. 0.5 mm.

(D) Nervous, muscle, and adipose tissue emission spectra illustrate spectral separations between tissue types in both GE3126-treated and control mice. (C.A.T. Hehir et al. 2015) [39].

операцию на щитовидной железе или при диссекции шеи. Постоянный паралич наблюдается у 4–7 % пациентов. Так данные показали, что до одной трети пациентов, перенесших паротидэктомию, имели преходящий паралич лицевого нерва, в то время как более 2 % имели постоянную недостаточность функции лицевого нерва [16, 26, 27]. В урологической хирургии частота недержания мочи через 1 год после простатэктомии составила 20,6 %. И последнее, но не менее важное: визуализация плотности нервов в опухолях поможет в оценке агрессивности рака и прогноза из-за перекрестного взаимодействия нерва и раковых клеток во время прогрессирования рака [19, 22, 24, 32].

Флуоресцентная визуализация нервов была разработана как средство, позволяющее идентифицировать нервы с высоким разрешением в режиме реального времени. Для этого применения был оценен ряд различных стратегий нацеливания, начиная от отслеживания нейронов и заканчивая нацеливанием на внутриклеточные экспрессированные белки в листках миелина, такие как основной белок миелина.

Идеальное нацеливающее соединение должно обладать высокой специфичностью к ПН, не проникать через ГЭБ и мало накапливаться в других тканях. Флуоресцентное вещество должно удерживаться в ПН в течение нескольких часов, чтобы обеспечить

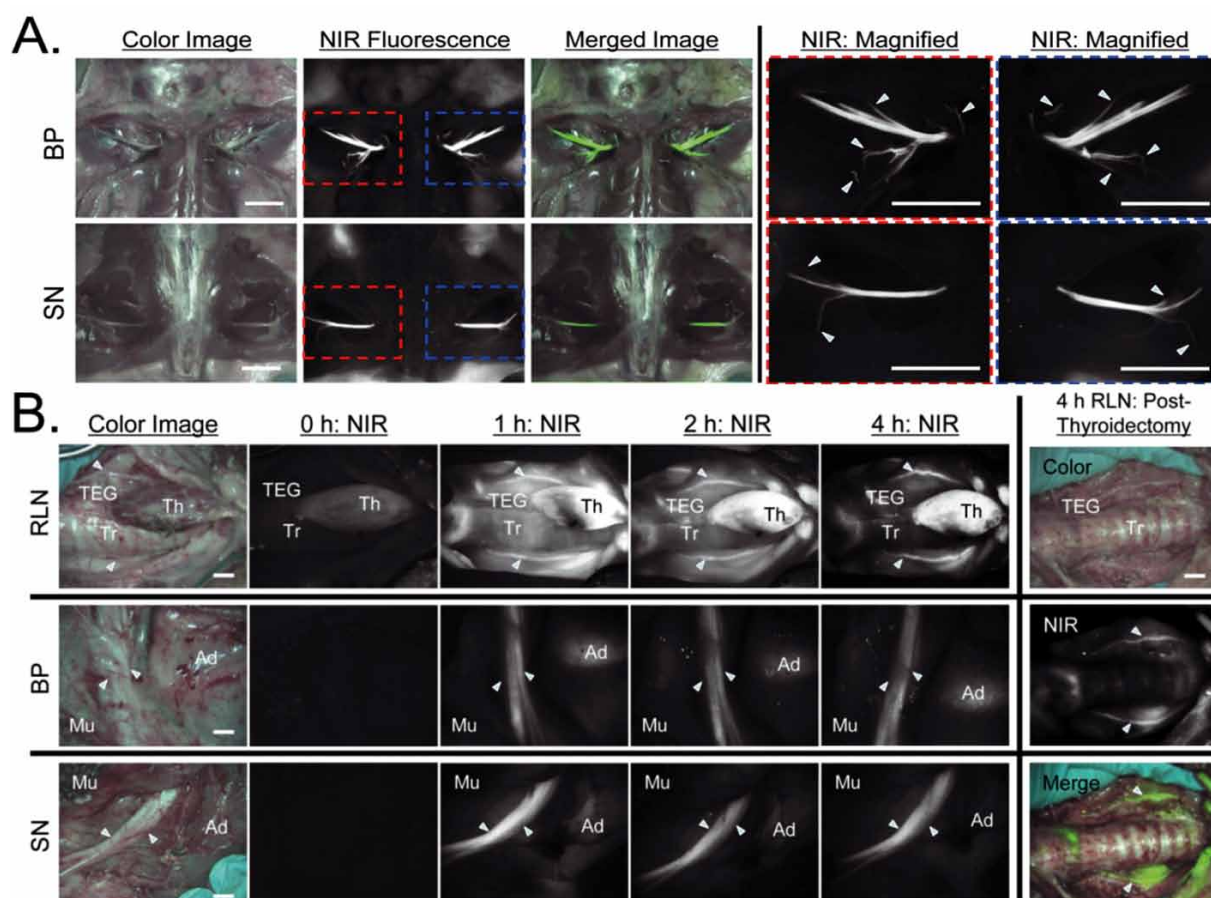


Рисунок 8. In vivo специфическое нацеливание на нерв с использованием оксазина 4.

А) 1 мкмоль оксазина 4 вводили внутривенно крысам за 4 часа до визуализации. Показаны цветное изображение, флуоресценция в ближнем ИК-диапазоне, объединенное изображение двух изображений (псевдоцветное, светло-зеленого цвета) и увеличенные изображения флуоресценции в ближнем ИК-диапазоне, полученные с помощью системы визуализации FLARE. Стрелки указывают на мелкие ветви главных нервов, которые не видны на цветном изображении. Шкала линейки = 1 см.

В) Кинетика захвата оксазина 4 в нервах свиньи. Полученные интраоперационные флуоресцентные изображения в режиме реального времени RLN (вверху), BP (в центре) и SN (внизу), в разные моменты времени (T = 0, 1, 2 и 4 ч). Щитовидная железа была резецирована (тиреоидэктомия) через 4 часа, и RLN был выделен без прерывания сигнала. Ad = жировая ткань; Mu = мышца; TEG = трахеопищеводная борозда; Th = щитовидная железа; Tr = трахея. Шкала линейки = 1 см. (H.S. Choi et al. 2014) [33].

Figure 8. In vivo specific nerve targeting using oxazine 4.

A) 1 μ mol oxazine 4 was administered intravenously to rats 4 hours prior to imaging. Shown are a color image, near-IR fluorescence, a merged image of two images (pseudo-color, light green), and enlarged near-IR fluorescence images obtained with the FLARE imaging system. The arrows point to small branches of the main nerves that are not visible in the color image. Ruler scale = 1 cm.

B) Kinetics of oxazine 4 uptake in porcine nerves. Acquired real-time intraoperative fluorescent images of RLN (top), BP (middle), and SN (bottom), at different time points (T = 0, 1, 2, and 4 h). The thyroid gland was resected (thyroidectomy) 4 hours later and RLN was isolated without signal interruption. Ad = adipose tissue; Mu = muscle; TEG = tracheoesophageal sulcus; Th = thyroid gland; Tr = trachea. Ruler scale = 1 cm. (H.S. Choi et al. 2014) [33].

непрерывное управление визуализацией в реальном времени, и его должно полностью вывестись из организма через несколько дней без какого-либо вреда для нервной системы и других органов. Кроме того, нацеливающие агенты должны производиться в больших количествах с минимальными затратами и в кратчайшие сроки. Предпочтительно, чтобы идеальные нацеливающие агенты обладали собственной флуоресценцией, но до сих пор это казалось невозможным для клинического применения из-за исключительного доступа к ГНБ малых молекул, которые обычно не обладают желаемой яркостью или длиной волны излучения и достаточной специфичностью к нервам [6, 7, 10].

Хотя предварительные результаты исследования флуоресцентных, подсвечивающих нервы, являются многообещающими, данная методика все еще сталкивается со многими проблемами, связанными с отношением сигнал-шум (SNR), временем предварительной инъекции флуоресцента, метаболическим периодом полураспада и, что наиболее важно, цитотоксичностью [2, 6].

Оценка периферических нервов происходит во многих жизненно важных хирургических вмешательствах, и в настоящее время в клинике нет системы для идентификации нервов в режиме реального времени как при открытой, так и при эндоскопической хирургии. Разработка флуоресцентных агентов

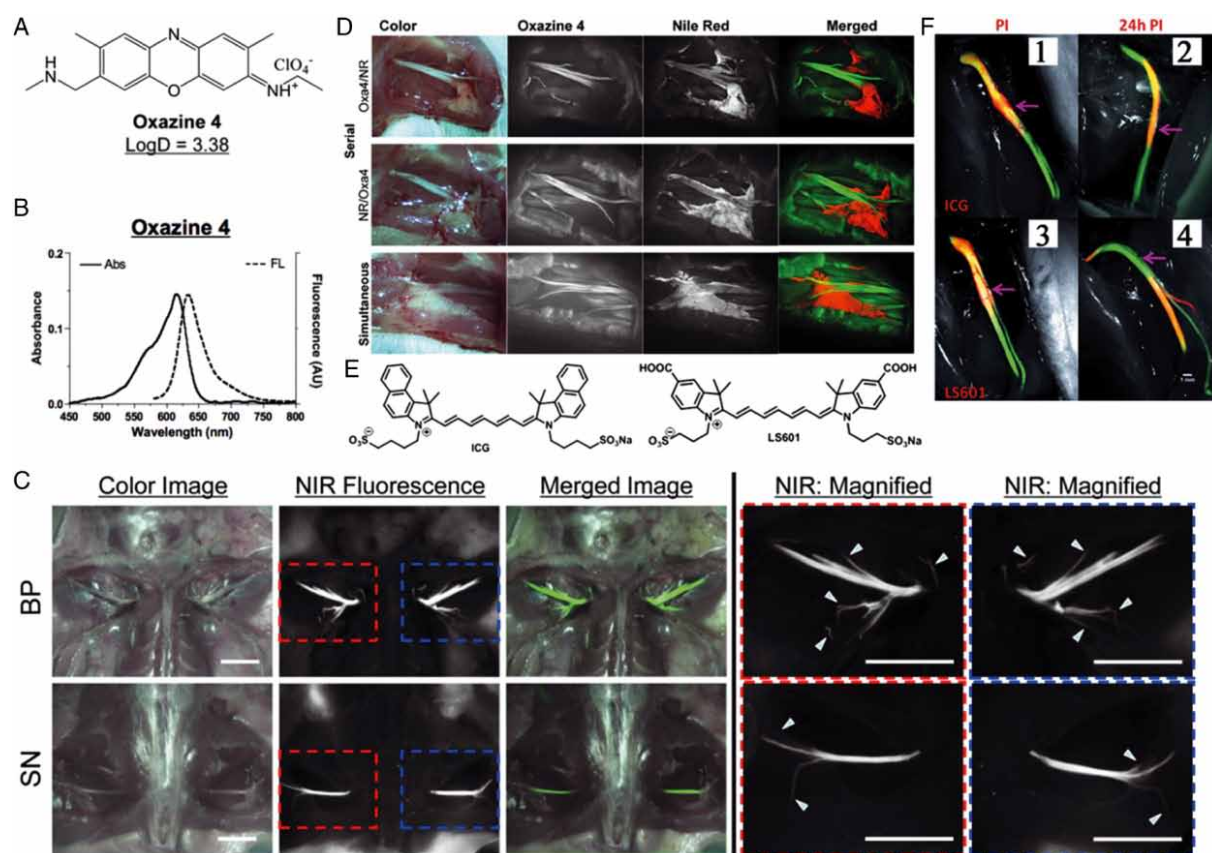


Рисунок 9. Исследование флуоресценции нервов на основе оксазина 4.

A) Химическая структура оксазина 4.

B) Спектры флуоресценции оксазина 4. (H. S. Choi et al. 2014) [33].

D) Техника двойного флуорофорного окрашивания нервов и жировой ткани путем местного введения оксазина 4 и нильского красного соответственно. (S. L. Gibbs et al. 2017) [22].

E) Химическая структура красителя NIR ICG и его аналога LS601.

F) движение флуоресцента в NIR зоне вдоль седалищного нерва крыс Thy1-GFP. Зеленый цвет указывает на излучение GFP, красный цвет соответствует излучению NIR от ICG или LS601. (MY Berezin et al. 2012) [31].

Figure 9. Nerve fluorescence study based on oxazine 4.

A) Chemical structure of oxazine 4.

B) Fluorescence spectra of oxazine 4. (H. S. Choi et al. 2014) [33].

D) Technique of double fluorophore staining of nerves and adipose tissue by topical administration of oxazine 4 and Nile red, respectively. (S. L. Gibbs et al. 2017) [22].

E) Chemical structure of the NIR ICG dye and its analogue LS601.

F) Fluorescent movement in the NIR zone along the sciatic nerve of Thy1-GFP rats. Green indicates GFP emission, red indicates NIR emission from ICG or LS601. (MY Berezin et al. 2012) [31].

биовизуализации нервов осложняется особой физиологией ГНБ, который может блокировать доставку молекул в нервную систему [8, 39].

Разработка новых флуоресцентных агентов является движущей силой передовых методов визуализации. Хирургическая техника под флуоресцентным контролем состоит из специальных контрастных веществ, которые сочетаются с оборудованием для оптической визуализации, чтобы обеспечить визуализацию и повышенный контраст неразличимых анатомических структур. Кроме того, для того чтобы систему визуализации можно было легко преобразовать в клиническое применение, желательно, чтобы микроскоп мог работать при комнатном освещении с целью возможности в реальном времени накладывать отражательную способность белого света на флуоресцентные изображения. Минимально инвазивная хирургия получает все большее распространение из-за небольших разрезов, меньшей раневой поверхности и более быстрого восстановления; таким образом, предполагается, что системы флуоресцентной биовизуализации также подходят для хирургических систем, таких как роботизированный микроскоп и эндоскоп [8, 10, 19, 24].

Заключение.

Флуоресцентная визуализация имеет огромный клинический потенциал для хирургии под визуальным контролем, потому что обычно ее гораздо легче интерпретировать визуально, чем МРТ или УЗИ. Путем введения определенного нервного контраста анатомии нерва можно визуализировать непосредственно в режиме реального времени во время операции. Сохранение жизненно важных нервов во время операции в основном зависит от опыта хирурга. Мы надеемся, что развитие прямой визуализации нервов с помощью флуоресценции улучшит эту ситуацию.

В идеальных условиях флуоресцентная визуализация нервных волокон *in vivo* превосходит другие методы из-за возможности получения сигнала в реальном времени, высокого пространственного разрешения, высокой чувствительности, простоты в эксплуатации и низкой стоимости. Хотя методы флуоресцентной визуализации не используются широко в клинической идентификации нервов, они демонстрируют исключительные перспективы благодаря их универсальному применению и доклиническому использованию.

В будущем прямое внедрение таких инструментов и платформы обработки изображений в микроскоп может дополнительно повысить ценность этого метода. Таким образом, хирурги сразу же получают средние значения соответствующих областей интереса в режиме реального времени. Тем самым будет еще больше упрощено и улучшено дифференцированное принятие интраоперационных решений.

Список сокращений:

ГНБ — гемато-нейрональный барьер
ПНС — периферическая нервная система
ЦНС — центральная нервная система
МРТ — магнитно-резонансная томография
ПЭТ — позитронно-эмиссионная томография
КТ — компьютерная томография
ПН — периферические нервы
MPZ — нулевой миелиновый белок
PLP — протеолипидный белок миелина
YFP — желтый флуоресцентный белок
DSB — дистиллированный бензол-1-ил
ICG — индоцианиновый зеленый
CTB — флуоресцентного холерного токсина В
SNR — отношение сигнал-шум
GE 3126 — (2-(4-(4-(4-аминофенил)-3-метоксифенил)сульфонил) пиперазин-1-ил) этанола гидрохлорид)
Cy5 — цианиновый краситель
QD PbS — квантовые точки на основе сульфида свинца
FG — флуоресцент Fluoro-Gold,
FB — флуоресцент Fast Blue
GFP — зеленый флуоресцентный белок
FAM-NP41 — конъюгат флуоресцеин-5(6)-карбонильной группы (FAM) с нейрональным пептидом
NP — нейрональный пептид
Да — дальтон
NIR — ближняя инфракрасная зона
НЧ — наночастицы

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. **Conflict of interest.** The author declares no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки. **Financing.** The study was performed without external funding.

Работа выполнена в рамках государственного задания № 123021000128-4 «Разработка новой технологии лечения больных вторичными новообразованиями головного мозга и рецидивирующими менигиомами». The work was carried out within the framework of the state assignment № 123021000128-4. «Development of a new technology for the treatment of patients with secondary brain tumors and recurrent meningiomas».

ORCID авторов / ORCID of authors:

Рында Артемий Юрьевич/Rynda Artemii Yurievich — <https://orcid.org/0000-0002-3331-4175>.

Олюшин Виктор Емельянович/Olyushin Victor Emelyanovich, — <https://orcid.org/0000-0002-9960-081X>.

Ростовцев Дмитрий Михайлович/Rostovtsev Dmitry Mikhailovich — <https://orcid.org/0000-0002-8956-7921>.

Куканов Константин Константинович/Kukanov Konstantin Konstantinovich — <https://orcid.org/0000-0002-1123-8271>.

Пустовой Сергей Владимирович/Pustovoi Sergey Vladimirovich — <https://orcid.org/0000-0001-5506-4990>.

Забродская Юлия Михайловна/Zabrodskaya Yulia Mikhailovna — <https://orcid.org/0000-0001-6206-2133>.

Литература/ References.

1. Buckle T, Hensbergen AW, van Willigen DM. et al. Intraoperative visualization of nerves using a myelin protein-zero specific fluorescent tracer. *EJNMMI Res.* 2021; 11: 50. <https://doi.org/10.1186/s13550-021-00792-9>
2. Walsh EM, Cole D, Tipirneni KE, Bland KI, Udayakumar N, Kasten BB, Bevans SL, McGrew BM, Kain JJ, Nguyen QT, Rosenthal EL, Warram JM. Fluorescence Imaging of Nerves During Surgery. *Ann Surg.* 2019; 270(1): 69–76. <https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000003130>
3. Xu H, Chen J, Feng ZJ, Fu K, Qiao YS, Zhang Z, Wang WJ, Wang YM, Zhang J., Perdanasari AT, Hanasono MM, Levin LS, Yang X, Hao YF, Li YX, Wo Y, Zhang YX. Shortwave infrared fluorescence in vivo imaging of nerves for minimizing the risk of intraoperative nerve injury. *Nanoscale.* 2019; (11): 19736–19741. <https://doi.org/10.1039/C9NR06066A>
4. Whitney M, Crisp J, Nguyen L et al. Fluorescent peptides highlight peripheral nerves during surgery in mice. *Nat Biotechnol.* 2011; 29: 352–356. <https://doi.org/10.1038/nbt.1764>
5. Gibbs-Strauss SL, Nasr KA, Fish KM, Khullar O, Ashitate Y, Siclovan TM, Johnson BF, Barnhardt NE, Hehir CAT, Frangioni JV. Nerve-highlighting fluorescent contrast agents for image-guided surgery. *Mol Imaging.* 2011; 10(2): 91–101.
6. Chen Y, Zhang H, Lei Z, Zhang F. Recent Advances in Intraoperative Nerve Bioimaging: Fluorescence-Guided Surgery for Nerve Preservation. *Small structures. Small Structures.* 2020; 1 (1): 2000036. <https://doi.org/10.1002/ssr.202000036>
7. Hingorani DV, Whitney MA, Friedman B, Kwon JK, Crisp JL, Xiong Q, Gross L, Kane CJ, Tsien RY, Nguyen QT. Nerve-targeted probes for fluorescence-guided intraoperative imaging. *Theranostics.* 2018; 8(15): 4226–4237. <https://doi.org/10.7150/thno.23084>
8. Pedro MT, Gröbel N, Durner G, Pala A, Wirtz CR, Koenig RW. Intraoperative Sodium-Fluorescence Imaging in Peripheral Nerve Sheath Tumors (PNST) — A New Additional Promising Diagnostic Tool. *Front Oncol.* 2021; 11: 655392. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.655392>
9. Stankoff B, Wang YM, Bottlaender M, Aigrot MS, Dolle F, Wu CY, Feinstein D, Huang GF, Semah F, Mathis CA, Klunk W, Gould RM, Lubetzki C, Zalc B. Imaging of CNS myelin by positron-emission tomography. *Proc Natl Acad Sci. USA* 2006; 103(24): 9304–9309. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600769103>
10. Hernández IC, Mohan S, Minderler S et al. Super-resolved fluorescence imaging of peripheral nerve. *Sci Rep.* 2022; 12: 12450. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-16769-0>
11. Рында А.Ю., Ростовцев Д.М., Олюшин В.Е. Флуоресцентно-контролируемая резекция астроцитарных опухолей головного мозга — обзор литературы // Российский нейрохирургический журнал имени профессора А.Л. Поленова. — 2018. — Том X, No.1. — С. 97–110. [Rynda A. Yu., Rostovtsev D. M., Olyushin V. E. Fluorescence-Guided Resection of Glioma — literature review. *Russian Neurosurgical Journal named after professor A. L. Polenov*, 2018, vol. X, no.1, pp.97–110. (In Russ.)].
12. Heckel A, Weiler M, Xia A, et al. Peripheral nerve diffusion tensor imaging: assessment of axon and myelin sheath integrity. *PLoS One.* 2015; 10: e0130833. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130833>
13. Рында А.Ю., Олюшин В.Е., Ростовцев Д.М., Забродская Ю.М., Папаян Г.В. Флуоресцентная диагностика с хлорином е6 в хирургии глиом низкой степени злокачественности. *Biomedical Photonics.* 2021;10(4):35–43. [Rynda A. Yu., Olyushin V. E., Rostovtsev D. M., Zabrodskaya Y. M., Papayan G. V. Fluorescent diagnostics with chlorin e6 in surgery of low-grade glioma. *Biomedical Photonics.* 2021;10(4):35–43. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.24931/2413-9432-2021-10-4-35-43>
14. Wang LG, Barth CW, Kitts CH, Mebrat MD, Montano AR, House BJ, McCoy ME, Antaris AL, Galvis SN, McDowall I, Sorger JM, Gibbs SL. Near-infrared nerve-binding fluorophores for buried nerve tissue imaging. *Sci Transl Med.* 2020; 12(542): eaay0712. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aay0712>
15. Nguyen JT, Ashitate Y, Buchanan IA, et al. Face transplant perfusion assessment using near-infrared fluorescence imaging. *J Surg Res.* 2012; 177: e83–e88. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2012.04.015>
16. Hussain T, Nguyen LT, Whitney M, et al. Improved facial nerve identification during parotidectomy with fluorescently labeled peptide. *Laryngoscope.* 2016; 126: 2711–2717. <https://doi.org/10.1002/lary.26057>
17. Enquist LW, Card JP. Recent advances in the use of neurotropic viruses for circuit analysis. *Curr Opin Neurobiol.* 2003; 13(5): 603–606. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2003.08.001>
18. Wagner OJ, Louie BE, Vallie's E, et al. Near-infrared fluorescence imaging can help identify the contralateral phrenic nerve during robotic thymectomy. *Ann Thorac Surg.* 2012; 94: 622–625. <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2012.04.119>
19. Mangano MS, De Gobbi A, Beniamin F, et al. Robot-assisted nerve-sparing radical prostatectomy using near-infrared fluorescence technology and indocyanine green: initial experience. *Urologia.* 2017; 85: 29–31. <https://doi.org/10.5301/uj.5000244>
20. Cage TA, Yuh EL, Hou SW, et al. Visualization of nerve fibers and their relationship to peripheral nerve tumors by diffusion tensor imaging. *Neurosurg Focus.* 2015; 39: E16. <https://doi.org/10.3171/2015.6.FOCUS.15235>
21. Stone JJ, Graffeo CS, de Ruiter GCW, et al. Intraoperative intravenous fluorescein as an adjunct during surgery for peroneal intraneural ganglion cysts. *Acta Neurochir (Wien).* 2018; 160: 651–654. <https://doi.org/10.1007/s00701-018-3477-0>
22. Barth CW, Gibbs SL. Direct Administration of Nerve-Specific Contrast to Improve Nerve Sparing Radical Prostatectomy. *Theranostics.* 2017; 7(3): 573–593. <https://doi.org/10.7150/thno.17433>
23. Marangos NR, Illing B, Kruger J, Laszig R. In vivo visualization of the cochlear nerve and nuclei with fluorescent axonal tracers. *Hearing Res.* 2001; 162(1–2): 48–52. [https://doi.org/10.1016/S0378-5955\(01\)00368-9](https://doi.org/10.1016/S0378-5955(01)00368-9)
24. Barnoiu OS, Garcia Galisteo E, Baron Lopez F, et al. Prospective urodynamic model for prediction of urinary incontinence after robot-assisted radical prostatectomy. *Urol Int.* 2014; 92: 306–309. <https://doi.org/10.1159/000354352>
25. KleinJan GH, Buckle T, van Willigen DM, et al. Fluorescent lectins for local in vivo visualization of peripheral nerves. *Molecules.* 2014; 19: 9876–9892. <https://doi.org/10.3390/molecules19079876>
26. Koch M, Zenk J, Iro H. Long-term results of morbidity after parotid gland surgery in benign disease. *Laryngoscope.* 2010; 120: 724–730. <https://doi.org/10.1002/lary.20822>
27. Chen SC, Wang MC, Wang WH, et al. Fluorescence-assisted visualization of facial nerve during mastoidectomy: a novel technique

- for preventing iatrogenic facial paralysis. *Auris Nasus Larynx*. 2015; 42: 113–118. <https://doi.org/10.1016/j.anl.2014.08.008>
28. Massaad CA, Zhang G, Pillai L, Azhdarinia A, Liu WQ, Sheikh KA. Fluorescently-tagged anti-ganglioside antibody selectively identifies peripheral nerve in living animals. *Sci Rep*. 2015; 5: 15766. <https://doi.org/10.1038/srep15766>
29. Zhang X, Chen Y, Lian L et al. Stability enhancement of PbS quantum dots by site-selective surface passivation for near-infrared LED application. *Nano Res*. 2021; (14): 628–634. <https://doi.org/10.1007/s12274-020-3081-5>
30. Kobbert C, Apps R, Bechmann I, Lanciego JL, Mey J, Thanos S. Current concepts in neuroanatomical tracing. *Prog Neurobiol*. 2000; 62(4): 327–351. [https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(00\)00019-8](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(00)00019-8)
31. Gustafson TP, Yan Y, Newton P, Hunter DA, Achilefu S, Akers WJ, Mackinnon SE, Johnson PJ, Berezin MY. A NIR Dye for Development of Peripheral Nerve Targeted Probes. *Med Chem Comm*. 2012; 3: 685–690. <https://doi.org/10.1039/C2MD00297C>
32. He K, Li P, Zhang Z, Liu J, Liu P, Gong S, Chi C, Liu P, Chen C, Tian J. Intraoperative near-infrared fluorescence imaging can identify pelvic nerves in patients with cervical cancer in real time during radical hysterectomy. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2022; 49(8): 2929–2937. <https://doi.org/10.1007/s00259-022-05686-z>
33. Park MH, Hyun H, Ashitate Y, Wada H, Park G, Lee JH, Njiojob C, Henary M, Frangioni JV, Choi HS. Prototype Nerve-Specific Near-Infrared Fluorophores. *Theranostics*. 2014; 4(8): 823–833. <https://doi.org/10.7150/thno.8696>
34. Hackman KM, Doddapaneni BS, Barth CW, et al. Polymeric micelles as carriers for nerve-highlighting fluorescent probe delivery. *Mol Pharm*. 2015; 12: 4386–4394. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.5b00582>
35. Zhao YQ, Maharjan S, Sun YQ, Yang Z, Yang EF, Zhou N, Lu LJ, Whittaker AK, Yang B, Lin Q. Red fluorescent AuNDs with conjugation of cholera toxin subunit B (CTB) for extended-distance retro-nerve transporting and long-time neural tracing. *Acta Biomater*. 2020; 102: 394–402. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.11.045>
36. Hussain T, Mastrodimos MB, Raju SC, Glasgow HL, Whitney M, Friedman B, Moore JD, Kleinfeld D, Steinbach P, Messer K, Pu MY, Tsien RY, Nguyen QT. Fluorescently Labeled Peptide Increases Identification of Degenerated Facial Nerve Branches during Surgery and Improves Functional Outcome. *PLoS ONE*. 2015; 10(3): e0119600. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119600>
37. Schubert R, Trenholm S, Balint K, Kosche G, Cowan CS, Mohr MA, Munz M, Martinez-Martin D, Flaschner G, Newton R, Krol J, Scherf BG, Yonehara K, Wertz A, Ponti A, Ghanem A, Hillier D, Conzelmann KK, Muller DJ, Roska B. Virus stamping for targeted single-cell infection in vitro and in vivo. *Nat Biotechnol*. 2018; 36(1): 81–88. <https://doi.org/10.1038/nbt.4034>
38. Wu CY, Tian DH, Feng Y, Polak P, Wei JJ, Sharp A, Stankoff B, Lubetzki C, Zalc B, Mufson EJ, Gould RM, Feinstein DL, Wang YM. A Novel Fluorescent Probe That Is Brain Permeable and Selectively Binds to Myelin. *J Histochem Cytochem*. 2006; 54(9): 997–1004. <https://doi.org/10.1369/jhc.5A6901.2006>
39. Cotero VE, Kimm SY, Siclovan TM, Zhang R, Kim EM, Matsumoto K, Gondo T, Scardino PT, Yazdanfar S, Laudone VP, Hehir CAT. Improved Intraoperative Visualization of Nerves through a Myelin-Binding Fluorophore and Dual-Mode Laparoscopic Imaging. *Plos One* 2015; 10(6): e0130276. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130276>
40. Рында А.Ю., Олюшин В.Е., Ростовцев Д.М., Забродская Ю.М., Тастанбеков М.М., Папаян Г.В. Результаты использования интраоперационного флюоресцентного контроля с хлорином Е6 при резекции глиальных опухолей головного мозга // Журнал «Вопросы нейрохирургии» имени Н.Н. Бурденко.— 2021. — Том 85, No.4. — С. 20–28. [Rynda A. Yu., Olyushin V. E., Rostovtsev D. M., Zabrodskaia Yu. M., Tastanbekov M. M., Papayan G. V. Intraoperative fluorescence control with chlorin E6 in resection of glial brain tumors. *Zhurnal Voprosy Neurokhirurgii Imeni N. N. Burdenko*, 2021, vol.85, no.4, pp.20–28. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.17116/neiro20218504120>
41. Gonzales J, Hernández-Gil J, Wilson TC, Adilbay D, Cornejo M, de Souza Franca PD, Guru N, Schroeder CI, King GF, Lewis JS, Reiner T. Bimodal Imaging of Mouse Peripheral Nerves with Chlorin Tracers. *Molecular Pharmaceutics*. 2021; 18(3): 940–951. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.0c00946>
42. Рында А.Ю., Олюшин В.Е., Ростовцев Д.М., Забродская Ю.М., Папаян Г.В. Сравнительный анализ флуоресцентной навигации в хирургии злокачественных глиом с использованием 5-АЛА и хлорина Е6. *Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова*. 2022;(1):5–14. [Rynda AY, Olyushin VE, Rostovtsev DM, Zabrodskaia YuM, Papayan GV. Comparative analysis of 5-ALA and chlorin E6 fluorescence-guided navigation in malignant glioma surgery. *Pirogov Russian Journal of Surgery = Khirurgiya. Zurnal im. N. I. Pirogova*. 2022;(1):5–14. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.17116/hirurgia20220115>