

OZNAČEVANJE TUMORJEV S FLUORESCENČNIMI BARVILI S KSANTENSKIM TRICIKLIČNIM STRUKTURNIM MOTIVOM IN CIANINSKIM FRAGMENTOM ZA RAKA TREBUŠNE SLINAVKE

Luka Irenej Pečan ^{1,2}, Tine Tesovnik ^{3,4}, Julija Vodenik ², Gašper Tavčar ⁵, Julian R Silverman ⁶, Miroslav Petrovec ⁷, Marko Jeran ⁵

¹ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko, Katedra za agrarno ekonomiko, politiko in pravo, Domžale, Slovenija

² University of Trieste, Department of Life Sciences, Trieste, Italy

³ Univerzitetni klinični Center Ljubljana, Pediatrična klinika, Klinični inštitut za specialno medicinsko diagnostiko, Ljubljana, Slovenija

⁴ Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Katedra za pediatrijo, Ljubljana, Slovenija

⁵ Institut "Jožef Stefan", Odsek za anorgansko kemijo in tehnologijo, Ljubljana, Slovenija

⁶ Fashion Institute of Technology, Department of Science and Math, New York, USA

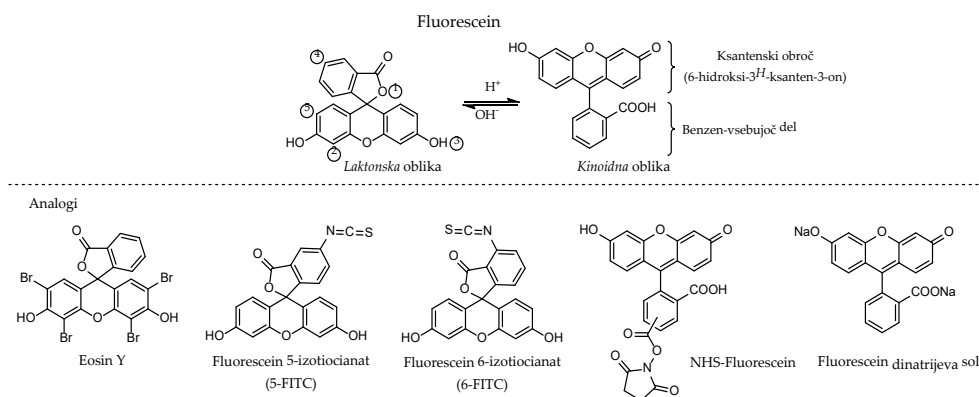
⁷ Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Ljubljana, Slovenija

Izvleček

Zaradi edinstvenih zmožnosti vizualizacije, analiz kompleksnih bioloških sistemov in vsestranskosti, so fluorescenčna barvila postala pomembna orodja na različnih znanstvenih in medicinskih področjih. V prispevku osvetljujemo njihovo vsestranskost in aplikativnost, posebno na področju raziskav različnih rakavih obolenj. V zadnjem delu se posvečamo tudi uporabi fluorescenčnih označevalcev pri raku trebušne slinavke.

Uvod

Fluorescenčna barvila, so zaradi zagotavljanja edinstvenih zmožnosti za vizualizacijo in analizo kompleksnih bioloških sistemov, postala nepogrešljivo orodje različnih znanstvenih in medicinskih področij. Fluorescenčne molekule, vključno s fluoresceinom, absorbirajo svetlobo pri krajši valovni dolžini in oddajajo svetlobo pri višji valovni dolžini. Med takšna barvila, ki jih odražajo visoka intenziteta emisije fluorescenčne svetlobe in visoka aplikativnost, uvrščamo fluorescein in njegove derivate (Slika 1) (1).



Slika 1: Fluorescein in njegovi analogi.

Fluorescein je trden organski fluorofor, rumeno-oranžne barve, ki izpostavljen svetlobi absorbira svetlobo pri 460 nm ter oddaja zeleno-modro emisijo fluorescence pri 515 nm (2). Zaradi njegove izjemne intenzivnosti fluorescence, ga lahko zaznamo celo pri razredčitvi 1:50.000.000 (3). V primerjavi z natrijevo soljo, je sam fluorescein tako v vodi kot v organskih topilih slabo topna učinkovina. Vodne raztopine fluoresceina so zaradi procesa razgradnje občutljive na dolgotrajno izpostavljenost svetlobi (4). Uporablja se kot označevalec v medicinskih in bioloških aplikacijah, zlasti kot sonda za lokalizacijo

tumorskih tkiv (5). V nadaljevanju opisujemo nekaj primerov le-teh.

Možganski tumorji

Natrijeva sol fluoresceina se že dolgo uporablja pri diagnosticiranju tumorjev v možganih (6). Tumorji v možganih izvirajo iz nenormalne rasti celic v možganih ali bližnjih strukturah, kot so živci, hipofiza, epifiza in možganske membrane. Primarni tumorji izvirajo iz možganov, sekundarni tumorji pa so metastaze iz drugih delov telesa (7). Pred kraniotomijo, kjer se del kosti odstrani za dostop do možganov, bolniki prejmejo injekcijo natrijeve soli fluoresceina (6). Med posegom se možganska skorja pregleda pod UV svetlobo; površinski tumorji se obarvajo rumeno-zeleno, kar olajša njihovo prepoznavanje in določanje meje (6). Za globlje tumorje se uporabljajo biopsijski materiali, ki jih testirajo na pojav fluorescence, ki prikaže prisotnost ali odsotnost bolezensko spremenjenega tkiva (6). Benigni in počasi rastoči tumorji morda ne fluorescirajo, zaznamo pa lahko tudi bolezenske spremembe, ki motijo krvno-možgansko pregrado, kot so edem, kapsule abscesov in poškodovana tkiva (6,8). Metastatski tumorji običajno kažejo svetlo fluorescenco, tudi v primeru nekroze (6).

Rak želodca

Rak želodca izhaja iz celic notranje plasti želodca, pri čemer je najpogostejši tip adenokarcinom, ki se razvije v celicah, ki proizvajajo sluz (9). Bhunchet je s sodelavci (10) preučil novo metodo za odkrivanje raka želodca z uporabo fluoresceinske elektronske endoskopije, namenjene odkrivanju raka v zgodnji fazi. Študija je zajemala 16 bolnikov z zgodnjim rakom želodca (diagnosticiranim z belo svetlobo endoskopije in kromoskopijo), ki so pred operacijo prejeli intravensko injekcijo natrijeve soli fluoresceina in nato opravili fluoresceinsko elektronsko endoskopijo. Opravljena je bila tudi temeljita histopatološka analiza odstranjenih vzorcev. Približno 10 sekund po injiciranju fluorescenčnega označevalca so opazili fluorescenco, ki se je hitro širila po notranji površini želodca. Rak želodca v zgodnji fazi, z večjim številom stromalnih celic, je pokazal izrazitejšo fluorescenco v primerjavi z rakom z manj stromalnimi celicami, ki je odražal šibkejšo fluorescenco. Močnejša fluorescenca je bila prisotna tudi pri nediferenciranih rakih z razširjeno stromo zaradi malignih invazij. Meje rakov v zgodnji fazi so bile jasno opazne, nekatere spremljajoče bolezenske spremembe, ki so bile pri rutinski endoskopiji spregledane, so bile zaznane med operacijo (10).

Rak ustne votline

Rak ustne votline zajema rake, ki nastajajo v različnih delih ust, in se uvrščajo med rake glave in vratu. Zdravljenje raka ustne votline je pogosto podobno kot pri drugih rakih te skupine. Rak ustne votline se običajno začne v ploščatih celicah, imenovanih skvamozne celice, ki oblagajo notranjost ust in ustnic (11). V študiji Qaiserja s sodelavci (12) je sodelovalo 100 oseb, vključno z 42 z oralnimi potencialno malignimi spremembami (OPMD), 40 z oralnim skvamoznim celičnim karcinomom (OSCC) in 18 kontrolnih posameznikov z vnetnimi stanji, kot sta perikoronitis in benigni fibrozni polipi. Študija je prva dokumentirala vlogo fluoresceina pri odkrivanju raka ustne votline in OPMD. Bolniki so najprej opravili vizualni pregled ust z belo in nato še pregled z modro svetlobo v temni sobi za avtofluorescenco. Lezije, ki so kazale avtofluorescenco, so bile izključene. Nato je bil na bolezensko spremembo in okolico topikalno nanesena natrijeva sol fluoresceina, usta so bila sprana, sprememba pa pregledana glede fluorescenco. Raziskovalci so ugotovili, da fluorescein omogoča hitro in občutljivo prepoznavanje potencialno malignih motenj (OPMD) in oralnega skvamoznega celičnega karcinoma (OSCC), saj lahko razlikuje med zdravo ustno sluznico in displazijo/malignimi spremembami ustne votline (12).

Rak sečnega mehurja

Rak sečnega mehurja je deseti najpogostejši rak na svetu, pogostejši pri moških kot ženskah (13). Pravilno presejanje in zgodnje zdravljenje lahko upočasni napredovanje bolezni ter izboljšata terapevtski izid (13). Zgodnje odkrivanje raka mehurja je ključno, kar je mogoče doseči s fluorescenčnimi metodami, ki vključujejo endogeno in eksogeno fluorescenco. Endogena fluorescenca ali avtofluorescenca temelji na svetlobi, ki jo oddajajo tkivni fluorofori, kot sta NADH in kolagen. Pri raku sečnega mehurja

pride do sprememb v avtofluorescenci zaradi večje absorpcije krvi, povečane debeline epitelijskih celic in zmanjšane vzbujenosti kolagena in NADH. Natančnejša diagnoza nadalje zajema obravnavo dveh ključnih valovnih dolžin (14). Vplivi debeline epitela in absorpcije krvi, lahko tako privedejo do nezanesljivosti pri avtofluorescenci (14). Eksogena fluorescenca vključuje vnos fluoroforjev v mehur in njihovo vzbujanje z vidno svetlobo (14). Fotodinamična terapija (PDT) temelji na uporabi fotosenzibilizatorjev, ki se kopičijo v tumorju in ob aktivaciji s svetlobo povzročijo njegovo nekrozo, pri čemer je deformacija zdravega tkiva minimalna. Uporaba hematoporfirinov za fluorescenčno vodenje diagnostike raka mehurja sega v leto 1976 (15). Koncept fotodinamične diagnostike (PDD) izkorišča fluorokrome, ki ob absorpciji svetlobe oddajajo fluorescenço, kar omogoča natančno lokacijo tumorskega tkiva. V rakavih celicah, 5-aminolevulinska kislina (ALA) sproži kopičenje fluorescenčnega protoporfirina IX (PPIX), kar ustvari kontrast med rdeče fluorescenčnimi malignimi lezijami in nefluorescenčno normalno sluznico (16).

3

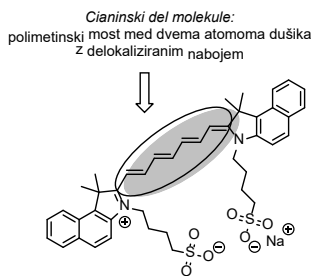
Metastaze raka dojke v možgane

Natrijeva sol fluoresceina je bila uporabljena tudi pri operacijah metastaz raka dojke v možganih (17). Rak dojke je najpogostejša vrsta raka in glavni vzrok smrti zaradi raka pri ženskah (18). Prekomerna izpostavljenost estrogenom lahko prispeva k poškodbam DNA in genetskim spremembam, kar spodbuja napredovanje raka dojke (18). Mutacije v genih *BRCA1* in *BRCA2*, ki naj bi delovali kot genski supresorji, lahko povzročijo razvoj raka dojk in jajčnikov (19). Razsoj tumorja je odgovoren za 90 % smrti in je glavni vzrok smrti pri raku dojke (18). Rak dojke se najpogosteje širi v možgane, aksilarne bezgavke, kosti, pljuča in jetra. Rakave celice dojke lahko prodrejo v možgane preko krvožilnega sistema, kjer se razmnožijo, kar vodi do metastaz v možganih (18). Študija Xiao s sodelavci (17), izvedena med majem 2012 in junijem 2016, je zajela 38 bolnic z razsojem raka dojke v možgane. Cilj študije je zajemal primerajvo kirurškega posega ob uporabi fluoresceina, glede na standardno nevrokirurško metodo. Izsledki so pokazali, da je z natrijevo soljo fluoresceina (5 mg/kg, intravensko: po alergijskem testu in splošno anestezijo) voden poseg izboljšal vidnost tumorja in imel boljši vpliv na stanje bolnic v primerjavi s standardno mikrooperacijo. Poleg omenjenega je bilo skupno preživetje po zdravljenju metastaz v možganih nekoliko višje pri bolnikih, ki so prejeli fluorescenčni marker, kar kaže na varnost in izvedljivost postopka za odstranjevanje metastaz raka dojke v možganih (17).

Rak trebušne slinavke

Fluorescenčna barvila so postala ključno orodje pri odkrivanju, slikovni diagnostiki in zdravljenju raka trebušne slinavke, saj pomenijo pomemben napredek tako v predkliničnih kot kliničnih okoljih. Rak trebušne slinavke ostaja ena najbolj smrtonosnih oblik raka zaradi pozne diagnoze in zapletenosti, povezanih s kirurškim zdravljenjem. V zadnjih letih se je uporaba fluorescenčnih barvil v bližnjem infrardečem spektru (NIRF) izkazala za obetavno pri izboljšanju natančnosti kirurškega odstranjevanja tumorjev in izboljšanju izidov za bolnike (20). Pomemben napredek zajema razvoj konjugatov hialuronske kisline, ki so natančno prirejeni za ciljno dostavo v celice raka trebušne slinavke. Kot so pokazali Qi in sodelavci (20), so ti konjugati zasnovani za izboljšanje intraoperativnega slikanja z zagotavljanjem izboljšanega kontrasta, kar omogoča kirurgom natančnejšo vizualizacijo mej tumorja med odstranitvijo. Ta natančna slikovna zmogljivost je ključna, kjer so čiste kirurške meje bistvenega pomena za zmanjšanje stopnje ponovitve bolezni in izboljšanje dolgoročnega preživetja.

Fluorescenčno barvilo indocianin zeleno (ICG) (Slika 2), ki ga je odobrila Ameriška uprava za hrano in zdravila (FDA), je bilo med drugim uporabljeno za izboljšanje kontrasta pri odkrivanju raka trebušne slinavke. Li in sodelavci (21) so raziskali uporabo slikovne diagnostike s fluorescenço z ICG v prvem in drugem bližnjem infrardečem oknu, kar znatno izboljša prikaz tumorjev v tkivu trebušne slinavke. Natančna sposobnost razlikovanja med malignimi in zdravimi celicami tako pripomore pri zgodnjem odkrivanju raka trebušne slinavke, povečuje tudi natančnost odstranjevanja tumorja, kar lahko vodi do boljših kirurških izidov.



Slika 2: Indocianin zeleno (ICG) je heptametin cianinska spojina z več dolgimi konjugiranimi metinskimi verigami. V središču obeh dušikovih heterocikličnih motivov, ki ima lipofilne lastnosti, velik molarni absorpcijski koeficient, visok kvantni izkoristek fluorescence, hiter metabolizem v telesu in redke stranske učinke (22).

Na področju zgodnjega odkrivanja so Kalubowilage in sodelavci (23) razvili ultraobčutljive fluorescenčne nanobiosenzorje, ki lahko preko tekočinskih biopsij prepoznajo raka trebušne slinavke v najzgodnejših fazah. Ti nanobiosenzorji izkoriščajo občutljivost fluorescenčnega odkrivanja za zajem in analizo biomarkerjev, povezanih z rakom trebušne slinavke, kar omogoča neinvazivno in zelo natančno diagnostično orodje. Zgodnje odkrivanje je še posebej pomembno pri raku trebušne slinavke, kjer se simptomi pogosto pojavijo šele, ko je bolezen že napredovala, in so učinkovite možnosti zdravljenja omejene. Velik napredek je bil dosežen pri razvoju konjugatov fluorescenčnih protiteles, ki ciljajo na specifične biomarkerje celic raka trebušne slinavke. Olson in sodelavci (24) so se osredotočili na preučevanje konjugata z bližnjo infrardečo fluorescenco, ki cilja na MUC16. Slednji je pokazal močno ojačanje fluorescence v rakavih celicah. Konjugat med operacijo omogoča boljšo vizualizacijo tumorjev, kar olajša njihovo popolnejšo odstranitev in zmanjšuje verjetnost preostalih rakavih celic, ki bi lahko povzročile ponovitev bolezni.

Prehod od predkliničnih raziskav h klinični uporabi je prikazan v študiji, ki so jo izvedli Lu in sodelavci (25), kjer so v kliničnem preizkušanju (faza 1) testirali konjugat panitumumab-IRDye800CW. Slednje je zaznamovalo pomemben korak k tumorsko specifičnemu kirurškemu vodenju s fluorescenco pri obravnavi raka trebušne slinavke. Konjugat cilja na receptor za epidermalni rastni faktor (EGFR), ki je prekomerno izražen v mnogih primerih raka trebušne slinavke. Nadaljnje bližnje infrardeče barvilo pa zagotavlja visoko kontrastno slikanje med operacijo. Študija je pokazala izvedljivost in varnost uporabe omenjenega konjugata za intraoperativno slikanje med kirurškim posegom, kar lahko izboljša natančnost odstranjevanja tumorjev in izide za bolnike. Drugi inovativen pristop vključuje razvoj konjugatov fluorescenčnih protiteles z zdravili (ADC) za molekularno slikanje in ciljno zdravljenje. Knutson in sodelavci (26) so razvili fluorescentni ADC, ki se specifično veže na celice raka trebušne slinavke, ki izražajo karcinoembrionski antigen (CEA). Dvojno funkcionalno sredstvo omogoča tako vizualizacijo tumorjev kot tudi dostavo citotoksičnih zdravil neposredno v rakave celice, s čimer se poveča terapevtska učinkovitost in zmanjša poškodba zdravih tkiv. Hoogstins in sodelavci (27) so pri fluorescenčno vodenem kirurškem posegu raziskovali uporabo novega karcinoembrionskega antigena SGM-101, ki cilja na fluorescenčno barvilo v bližnjem infrardečem spektru. Izsledki so pokazali potencial uporabljenega barvila za izboljšanje intraoperativnega prepoznavanja tumorjev trebušne slinavke, s čimer omogoča natančnejšo odstranitev tumorjev in izboljšanje stopnje preživetja bolnikov. Za utišanje genov pri raku trebušne slinavke je bila raziskana tudi uporaba polimernih nanodelcev z vezanim barvilom za emisijo, povzročeno z agregacijo (AIE). Hu in sodelavci (28) so razvili nanovektorje, ki so uspešno transfecirali siRNA v celice raka trebušne slinavke, kar je bilo potrjeno tudi s fluorescenčnim slikanjem. Pristop poudarja potencial kombiniranja fluorescenčnih barvil z gensko terapijo za ciljno zdravljenje raka trebušne slinavke na molekularni ravni.

Zaključek

Vključitev fluorescenčnih barvil v diagnostiko in zdravljenje rakavih obolenj predstavlja pomemben

napredek vse od znanstvenih do kliničnih poti. Tovrstna barvila izboljšajo vizualizacijo tumorjev, omogočajo zgodnje odkrivanje z neinvazivnimi metodami in izboljšujejo natančnost kirurških posegov.

Zahvala

Prispevek je nastal v okviru raziskav programa (P1-0045) Javne agencije za znanstvenoraziskovalno in inovacijsko dejavnost Republike Slovenije (ARIS).

Literatura

1. Jun JV, Chenoweth DM, Petersson EJ. Rational design of small molecule fluorescent probes for biological applications. *Org Biomol Chem*. 2020;18(30):5747–5763.
2. Marinko K, Pečan LI, Vodenik J, et al. Fluorescence and fluorescein as pivotal tools in cancer diagnosis and therapy. *Proc Socrat Lect*. 2024;11:7–19.
3. Britannica TE of E. Fluorescein. 2018. <https://www.britannica.com/technology/fluorescein>.
4. Martínek M, Ludvíková L, Šranková M, et al. Common xanthene fluorescent dyes are visible-light activatable CO-releasing molecules. *Org Biomol Chem*. 2023;21(1):93–97.
5. Pothén A-G, Parmar M. Fluorescein. *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555957/>.
6. Moore GE, Kohl DA, Marvin JF, Wang JC, Caudill CM. Biophysical Studies of methods utilizing fluorescein and its derivatives to diagnose brain tumors. *Radiology*. 1950;55(3):344–362.
7. Mayo Clinic. Brain tumor – Symptoms and causes. 2023. <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/brain-tumor/symptoms-causes/syc-20350084>.
8. Schebesch K, Brawanski A, Hohenberger C, Hohne J. Fluorescein sodium-guided surgery of malignant brain tumors: History, current concepts, and future projects. *Turk Neurosurg*. 2016.
9. National Cancer Institute. What is stomach cancer? n. d. <https://www.cancer.gov/types/stomach>.
10. Bhunchet E, Hatakawa H, Sakai Y, Shibata T. Fluorescein electronic endoscopy: A novel method for detection of early stage gastric cancer not evident to routine endoscopy. *Gastrointest Endosc*. 2002;55(4):562–571.
11. Mayo Clinic. Mouth cancer – Symptoms and causes. 2024. <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/mouth-cancer/symptoms-causes/syc-20350997>.
12. Qaiser D, Sood A, Mishra D, et al. Novel use of fluorescein dye in detection of oral dysplasia and oral cancer. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2020;31:101824.
13. World Cancer Research Fund International. Bladder cancer statistics. <https://www.wcrf.org/cancer-trends/bladder-cancer-statistics/>.
14. D'Hallewin M-A, Bezdetnaya L, Guillemin F. Fluorescence detection of bladder cancer: A review. *Eur Urol*. 2002;42(5):417–425.
15. Kelly JF, Snell ME. Hematoporphyrin derivative: A possible aid in the diagnosis and therapy of carcinoma of the bladder. *J Urol*. 1976;115(2):150–151.
16. Zaak D, Karl A, Knüchel R, et al. Diagnosis of urothelial carcinoma of the bladder using fluorescence endoscopy. *BJU Int*. 2005;96(2):217–222.
17. Xiao S, Zhang J, Zhu Z, et al. Application of fluorescein sodium in breast cancer brain-metastasis surgery. *Cancer Manag Res*. 2018;Volume 10:4325–4331.
18. Farahani MK, Gharibshahian M, Rezvani A, Vaez A. Breast cancer brain metastasis: from etiology to state-of-the-art modeling. *J Biol Eng*. 2023;17(1):41.
19. Casaubon JT, Kashyap S, Regan J-P. BRCA1 and BRCA2 mutations. *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470239/>.
20. Qi B, Crawford AJ, Wojtynek NE, et al. Tuned near infrared fluorescent hyaluronic acid conjugates for delivery to pancreatic cancer for intraoperative imaging. *Theranostics*. 2020;10(8):3413–3429.
21. Li Z, Li Z, Ramos A, et al. Detection of pancreatic cancer by indocyanine green-assisted fluorescence imaging in the first and second near-infrared windows. *Cancer Commun*. 2021;41(12):1431–1434.
22. Zhai J, Yang H, Wang Z, Li Y, Ning C. Multifunctional nanomaterials-enhanced synergistic sono-phototherapy: Breaking the limitation of monotherapy. *Smart Mater Med*. 2022;3:315–328.
23. Kalubowilage M, Covarrubias-Zambrano O, Malalasekera AP, et al. Early detection of pancreatic cancers in liquid biopsies by ultrasensitive fluorescence nanobiosensors. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med*. 2018;14(6):1823–1832.
24. Olson MT, Wojtynek NE, Talmon GA, et al. Development of a MUC16-Targeted Near-Infrared Fluorescent Antibody Conjugate for Intraoperative Imaging of Pancreatic Cancer. *Mol Cancer Ther*. 2020;19(8):1670–1681.
25. Lu G, Van Den Berg NS, Martin BA, et al. Tumour-specific fluorescence-guided surgery for pancreatic cancer using panitumumab-IRDye800CW: A phase 1 single-centre, open-label, single-arm, dose-escalation study. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2020;5(8):753–764.
26. Knutson S, Raja E, Bomgarden R, et al. Development and evaluation of a fluorescent antibody-drug conjugate for molecular imaging and targeted therapy of pancreatic cancer. Hagemeyer CE, editor. *PLOS ONE*. 2016;11(6):e0157762..
27. Hoogstins CES, Boogerd LSF, Sibinga Mulder BG, et al. Image-guided surgery in patients with pancreatic cancer: First results of a clinical trial using SGM-101, a novel carcinoembryonic antigen-targeting, near-infrared fluorescent agent. *Ann Surg Oncol*. 2018;25(11):3350–3357.
28. Hu R, Yang C, Wang Y, et al. Aggregation-induced emission (AIE) dye loaded polymer nanoparticles for gene silencing in pancreatic cancer and their *in vitro* and *in vivo* biocompatibility evaluation. *Nano Res*. 2015;8(5):1563–1576.