

# Indocyaninová zeleň – vlastnosti, současné možnosti a trendy využití v klinických aplikacích

Roman Kufa

Chirurgická klinika 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Motol, Praha

Indocyaninová zeleň patří mezi fluorescenční barviva (fluorofory, fluorochromy). Jedná se o chemické sloučeniny obsahující ve své molekule reaktivní skupinu, která je schopna reagovat s nukleofilními skupinami. Podstatou fluorescence je vyzáření energie ve velmi krátkém čase, nejčastěji vyvolané účinkem jiného dopadajícího záření. Každá látka je charakterizována dvěma typy spekter – excitačním a emisním spektrem. ICG má excitační i emisní spektrum v tzv. blízké infračervené oblasti, hovoříme o NIR (near infrared) fluoroforu. ICG je dosud jediným NIR barvivem, které má FDA (US Food and Drug Administration) atest pro použití v biomedicině od roku 1959 (1). Zejména v posledních letech jí je věnována velká pozornost pro stále se rozšiřující indikace použití v klinické medicíně. Již tradičně je využívána v očním lékařství k diagnostice chorob oční sítnice, dále ke stanovení srdečního výdeje a měření jaterních funkcí. Uplatnění však nachází i při detekci sentinelových uzlin v onkochirurgii a s úspěchem je využívána například v neurochirurgii, v cévní chirurgii či rekonstrukční chirurgii k hodnocení mikrocirkulace volně přenesených tkáňových celků.

Předkládané review přináší přehled informací o základních chemických a fyzikálních vlastnostech látky a o možnostech jejího využití v klinických aplikacích.

**Klíčová slova:** indocyaninová zeleň, ICG, fluorescence, infračervená oblast, vizualizace, angiografie.

## Indocyanine green: properties, current use and trends in clinical practice

Indocyanine green (ICG) is one of the types of fluorescent dyes (fluorophores, fluorochromes). It is a chemical compound containing a reactive group capable of reacting with nucleophilic groups. The principle of fluorescence is the emission of energy in a very short time, caused by the effect of radiation. Each fluorescent substance is characterized by two types of spectra – an excitation and an emission spectrum. ICG has an excitation and emission spectrum in the near infrared region, hence the so-called NIR (near infrared) fluorophores. ICG is the only NIR dye that has been certified by the FDA (U.S. Food and Drug Administration) for use in biomedicine since 1959 (1). Especially in recent years, indocyanine green has received a lot of attention due to its ever-expanding indications for use in clinical medicine. It has been traditionally used in ophthalmology to diagnose diseases of the retina as well as to determine cardiac output and to measure liver function. However, it is also used in surgical oncology to detect sentinel nodes and in neurosurgery, vascular surgery or reconstructive surgery to evaluate microcirculation following free tissue transfer.

The article presents an overview of the basic chemical and physical properties of the substance and the possibilities for its use in clinical applications.

**Key words:** indocyanine green, ICG; fluorescence, infrared region, visualization, angiography.

Klin Farmakol Farm 2013; 27(2): 89–91

## ICG – základní charakteristiky

Molekula indocyaninové zeleně je složena ze dvou polycyklických komponent, benzoin-dotricarbocyaninu, které jsou spojeny karbo-novým řetězcem. Benzoindotricarbocyaniny jsou lipofilní, na nich vázaná sulfátová skupina způsobuje rozpustnost ve vodě. Tato komplexní molekula tak vykazuje amfifilní vlastnosti. Její molekulová hmotnost je vysoká, 775 daltonů (2).

ICG je krystalická látka stabilní při pokojové teplotě. Je rozpustná ve vodě (1 mg/ml). Ve vodních roztocích tvoří v závislosti na koncentraci mono- i oligomery, agreguje v solných roztocích. Z toho důvodu má být k ředění roztoku pro intravenózní podání užívána aqua pro injectione. Stabilita ICG v roztoku se zvyšuje např. přidáním polyaspartátu sodného (PASP). Použití PASP bylo referováno in vivo na kryším modelu (3).

Také absorpční spektrum závisí na druhu rozpouštědla a na koncentraci barviva. Maximální absorpční spektrum monomeru je 785 nm, zatímco maximální absorpční spektrum pro agregáty je 690 nm. Přidáním albuminu dochází k posunu maximálního absorpčního spektra k hodnotám 805 či 810 nm. Emisní spektrum ve vodných roztocích dosahuje vrcholu při 820 nm či 810 nm (4, 5).

Po intravenózní aplikaci ICG vstupuje do vazby s lidským sérovým albuminem (HSA – Human Serum Albumin), což vede k chemické stabilizaci ICG. Vazba s HSA je však poměrně slabá v porovnání s vazbou na lipoproteiny a plazmatické proteiny, s nimiž ICG vzhledem ke svým amfifilním vlastnostem také reaguje. Po intravenózní injekci dochází ke kompetici mezi tvorbou ICG agregátů a vazbou na lipoproteiny a plazmatické proteiny, což následně ovlivňuje spektrální

charakteristiky (6). ICG může vstupovat do interakcí také s micelárními systémy či lipozomy. Vzhledem k 3-dimenzionální struktuře ICG molekuly může dojít k současnému navázání lipofilní i hydrofilní části molekuly, např. k fosfolipidům. Jedná se o specifickou interakci, která ovlivňuje emisní spektrum ICG a intenzitu fluorescence (5).

Z oběhu je ICG vychytáváno výlučně jaterními buňkami a kompletně sekretováno do žluče, čímž je zajištěna rychlá eliminace. Reakce jsou katalyzovány Glutathion-S-transferázou (7). Plazmatická clearance ICG je bifázická, vykazuje rychlou iniciální fázi s poločasem rozpadu 3–4 minuty a následnou sekundární fázi s přetrváváním nízkých koncentrací více než 60 minut (8). Pro studium úvodních fází degradace je proto vhodnější monoexponenciální model, zatímco pro časy v rozmezí 30. a 50. minuty se lépe uplatní biexponenciální rovnice.

Indocyaninová zeleň je dostupná ve čtyřech variantách komerčně vyráběných preparátů – Diagnogreen, ICGreen, Pulsion jsou přípravky pro ředění ve vodě pro injekci, obsahují maximálně v 5 % jodid sodný pro zajištění lepší rozpustnosti, dále je k dispozici Infracyanin určený k ředění v glukóze, bez obsahu jódu. Nežádoucí účinky se po podání přípravků vyskytují jen zřídka, může jít o návaly či flush. Závažné nežádoucí účinky, jako anafylaktický šok, hypotenze či tachykardie, byly popsány ojediněle, a to pouze u pacientů s chronickým ledvinovým selháním. Toxicita ICG je klasifikována jako nízká. Hodnota LD50 intravenózně je pro myš 60 mg/kg, pro potkana 87 mg/kg (9). Paumgartner udává, že v humánní medicíně nebyl toxický efekt pozorován ani při relativně vysoké dávce 5 mg/kg tělesné hmotnosti (10).

Ačkoli samotná ICG představuje prozatím jedinou NIR sondu s atestem pro klinické využití, byly již zaznamenány tendence o vývoj jejich derivátů. Zkoumány byly konjugace ICG s protilátkami (11), připravena byla nanopartikule s obsahem fosfosilikátu vápníku (12) či laktózou s ICG (13), které by mohly přinést rozšíření indikací využití látky v oblasti ultrastrukturální diagnostiky, respektive k zobrazení nádorových ložisek.

## Klinické aplikace

ICG byla vyvinuta v Kodak Research Laboratories v roce 1955 a o rok později byla schválena pro klinické využití (1). Podstatou klinických aplikací je využití principu fluorescence, kdy se v látce schopné fluorescence netermálním světelným zářením vyvolá excitace molekul. V průběhu vlastní excitace se aktivují volné elektromony, které přecházejí do excitované pozice. Tento stav je ovšem nestabilní a během krátké doby dochází k návratu excitovaných elektronů do výchozí pozice. Návrat je doprovázen emisí světelné energie o vyšší vlnové délce, než je vlnová délka světla, která fluorescenci vyvolala (14). Vyzářená světelná energie byla zachycována nejprve pomocí fotografického záznamu, který však neposkytoval dostatečnou citlivost. Zlepšení přineslo zavedení videoangiografie s použitím senzitivní infračervené kamery a záznamem na videokazetu (15). Dalším zdokonalením bylo zavedení digitálních zobrazovacích systémů, které již umožnily zobrazení s vysokým rozlišením.

Poprvé byla ICG v humánní medicíně použita k zobrazení cévního systému srdce (16). Jako rutinní zobrazovací metoda však našla uplatnění nejprve v očních lékařství. V roce 1973 Flower a Hochheimer představili techniku fluorescenční angiografie v diagnostice chorob oční sítnice (17). Vzhledem k amfifilním vlastnostem ICG je

po její intravenózní aplikaci 98 % molekul navázáno na proteiny plazmy a jen velmi malá část barviva pronikne fenestracemi v chorioideálních kapilárách, což umožňuje průběh cévního systému velmi dobře zobrazit (18). Obvykle se podává intravenózně bolus 25 mg ICG v 5 ml rozpouštědla a pomocí snímacího zařízení (nejčastěji funduskamera s CCD kamerou) je pořízen digitální záznam okamžitě po aplikaci – časná fáze angiogramu, následně v 5.–10. minutě a 20.–40. minutě – střední a pozdní fáze (19). Vedle ICG je k diagnostice vaskulopatií oční sítnice využíván fluorescein. Jeho emisní spektrum leží v oblasti viditelného zeleného světla a je z valné části absorbováno očními pigmenty. Infračervené světlo však pigmenty jako melaninem či xantofyly proniká a při fluorescenční angiografii s použitím ICG je tak možno zobrazit chorioideální cirkulaci i přes hemoragie, depozita melaninu či lipidů (20). Obě metody se tak vhodně doplňují, přínosné jsou zejména ve sporných případech. Oproti ICG bylo u použití fluoresceinu popsáno větší množství nežádoucích a alergických reakcí (21).

Vzrůst zájmu o ICG je v posledních letech spojen s uplatněním metody v chirurgických oborech. Pozornost vyvolala především možnost peroperační monitorace krevní cirkulace a její aplikace. ICG angiografie (ICGA) narozdíl od běžně užívaných metod, jako je CT či MR angiografie, umožňuje přímou peroperační vizualizaci krevních cév, která následuje v průběhu několika málo minut po intravenózní aplikaci roztoku. Metoda je nenáročná, ve srovnání s alternativami ekonomicky výhodná a vizualizace může být opakována v cca 15minutových intervalech.

První klinické užití ICGA bylo zaznamenáno v roce 2003 v neurochirurgii, kde se následně stala rutinní metodou (22). Většina neurochirurgických operací je prováděna pod zvětšením chirurgickým mikroskopem, což představovalo dobrou platformu pro implementaci nových optických systémů. ICGA nachází uplatnění při řešení arteriovenózních malformací mozku a míchy, je využívána k ověření průchodnosti intra- i extrakraniálních cévních anastomóz při bypasových operacích (23). Umožňuje také například přesnou lokalizaci příjmové cévy u extra-intrakraniálních bypassů, a tím provedení výkonu z velmi malého přístupu (kraniotomie cca 3 cm) (24). V roce 2011 Haga popsal využití ICGA při karotické endarterektomii (25). Recentní studie referuje o možnosti semikvantitativní vizualizace ischemicky poškozených oblastí mozku (26).

Zlatým standardem posouzení průchodnosti kardiochirurgických bypassů zůstává klasická angiografie. Metoda ICGA umožňuje peroperační

ověření průchodnosti cévních anastomóz s možností okamžité revize v případě zjištění okluze. Úspěšnost metody je dokumentována řadou studií. Největší soubor pacientů prezentoval Desai et al., kteří peroperačně vyšetřili 348 koronárních bypassů. U 4,2 % pacientů byla na základě ICGA indikována revize pro uzávěr, který by jinak zůstal neidentifikován (27). Podobně Reuthebuch et al. referovali revizní operaci u 4 ze 107 pacientů (3,7 %) (28). Alternativou umožňující odhad průtoku bypassem peroperačně je ultrazvuková metoda transit time flowmetrie (TTFM), avšak bylo popsáno, že v některých případech vedla k nadbytečným revizním operacím (29).

Podobně je možné využití ICGA k peroperačnímu ověření průtoku bypassem v cévní chirurgii (30). Metoda se ukázala jako efektivní i v diagnostice periferní okluzivní arteriosklerózy, kde výsledky byly srovnatelné s užitím zlatého standardu stanovení kotníkových tlaků (ankle-brachial index) (31). Kikuchi popsal využití vizualizace žilek pomocí ICGA při provádění sklerotizace žil dolních končetin (32).

Velmi zajímavé jsou možnosti uplatnění v oblasti mikrochirurgie a rekonstrukční chirurgie. Popsáno bylo využití ICGA jak při vyhledání vhodných perforátorů v rámci předoperačního plánování volných laloků, tak při peroperačním hodnocení průchodnosti mikroanastomóz a viability přenášených tkáňových celků či monitoraci prokrvení laloků v pooperačním období (33). Tyto principy byly využity například v oblasti rekonstrukce prsu pomocí přenosu tkáně z oblasti břicha. Specifická je studie publikovaná v roce 2010, kdy autoři využili peroperační monitorace prokrvení tkání a nedostatečně prokrvenou kůži z oblasti hrudníku po iradiaci odstranili, což mohlo vést k dosažení lepších výsledků (34).

V oblasti onkochirurgie je diskutováno využití ICG při detekci sentinelové uzliny (SNL). SLN je „splavná“ regionální uzlina, která je teoreticky jako první metastaticky postižena v případě lymfogenní propagace solidního nádoru a její histologické vyšetření je důležité pro staging a terapeutický postup. Vedle tradičně užívaných metod detekce (značení radionuklidem či lymfotropním barvivem) je v praxi již ověřenou alternativou vizualizace lymfatických cév a uzlin pomocí ICG. Metoda byla poprvé popsána autory Lim a Soter v roce 1993 (35). Po aplikaci roztoku barviva do okolí tumoru dochází k jeho šíření lymfaticky a kumulaci v uzlinách, přičemž může být vizualizováno speciálním snímacím zařízením. Z hlediska použití v této indikaci je vedle povrchového náboje důležitou vlastností molekuly barviva také hydrodynamický průměr

molekuly. Ukázalo se, že při hodnotách do 1 nm nejsou molekuly lymfatickou uzlinou zadrženy. Z toho důvodu je vhodná konjugace molekuly ICG (hydrodynamický průměr 1,2 nm) s HSA, čímž je dosaženo hodnoty 7,3 nm (36).

Studována byla také možnost využití ICG jako fotosenzibilizátoru pro fotodynamickou terapii (photodynamic therapy, PTD). Za přítomnosti kyslíku dochází po ozaření fotosenzibilizátoru k uvolnění energie a vzniku reaktivních forem kyslíku, které mohou reagovat s buněčnými membránami a mechanismem lipoperoxidace dochází k následné apoptóze či nekróze buněk. PTD je v současnosti užíváno jako alternativa léčby některých typů nádorů a v kožním lékařství. ICG představuje perspektivu v uvedených oblastech, také se osvědčilo využití jako baktericidního agens při léčbě akné nebo infikovaných ran (37). Zajímavý je také zatím v experimentu studovaný destruktivní efekt na tukové buňky, který by v budoucnu mohl být využit v kosmetické medicíně (38).

## Závěr

Již z uvedeného výčtu možných indikací, který nelze považovat za zcela vyčerpávající, lze soudit, že indocyaninová zeleň je látkou s velkou perspektivou uplatnění v mnoha oborech klinické medicíny a v budoucnu lze očekávat implementaci dalších teoretických možností využití a rozšíření aplikace ICG v biomedicíně.

## Literatura

1. Indocyanine\_green [online], poslední aktualizace 1. 12. 2012; 3: 46 [cit. 1.1.2013], Wikipedie. Dostupné na: <[http://en.wikipedia.org/wiki/Indocyanine\\_green](http://en.wikipedia.org/wiki/Indocyanine_green)>.
2. Landsman ML, Kwant G, et al. Light-absorbing properties, stability, and spectral stabilization of indocyanine green. *J Appl Physiol* 1976; 40: 575–583.
3. Maarek JMI, Holschneider DP, et al. Fluorescence of indocyanine green in blood: intensity dependence on concentration and stabilization with sodium polyaspartate. *J Photochem Photobiology* 2001; 65: 157–164.
4. Benson RC, Kues HA. Fluorescence properties of indocyanine green as related to angiography. *Phys Med Biol* 1978; 23: 159–163.
5. Mordon S, Devoisselle JM, et al. Indocyanine green: physicochemical factors affecting its fluorescence in vivo. *Microvasc Res* 1998; 55: 146–152.
6. Yoneya S, Saito T, et al. Binding properties of indocyanine green in human blood. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39: 1286–1290.
7. Engel E, Schraml R, et al. Light-induced decomposition of indocyanine green. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 2008; 49: 1777–1783.
8. Hollins B, Noe B, et al. Fluorometric determination of indocyanine green in plasma. *Clin Chem* 1987; 33: 765–768.
9. Laperche Y, Oudea MC, et al. Toxic effects of indocyanine green on rat liver mitochondria. *Toxicology and applied pharmacology* 1978; 41: 377–387.
10. Paumgartner G. The handling of indocyanine green by the liver. *Schweizerische Medizinische Wochenschrift* 1975; 105: 30.
11. Ogawa M, Kosaka N, et al. In vivo molecular imaging of cancer with a quenching nearinfrared fluorescent probe using conjugates of monoclonal antibodies and indocyanine green. *Cancer Research* 2009; 69: 1268–1272.
12. Barth BM, Sharma R, et al. Bioconjugation of calcium phosphosilicate composite nanoparticles for selective targeting of human breast and pancreatic cancers *In vivo*. *ACS Nano* 2010; 4: 1279–1287.
13. Makino A, Kizaka-Kondoh S, et al. Nearinfrared fluorescence tumor imaging using nanocarrier composed of poly (L-lactic acid)-block-poly (sarcosine) amphiphilic polydepsipeptide. *Biomaterials* 2009; 30: 5156–5160.
14. Wolfe DR. Fluorescein angiography basic science and engineering. *Ophthalmology* 1986; 93: 1617–1620.
15. Hayashi K, de Laey JJ. Indocyanine green angiography of submacular choroidal vessels in the human eye. *Ophthalmologica* 1985; 190: 20–29.
16. Fox IJ, Brooker LG, et al. A tricarboyanine dye for continuous recording of dilution curves in whole blood independent of variations in blood oxygen saturation. *Proc Staff Meet Mayo Clin* 1957; 32: 478–484.
17. Flower RW, Hochheimer BF. Quantification of indicator dye concentration in ocular blood vessels. *Exp Eye Res* 1977; 25: 103–111.
18. Baker KJ. Binding of sulfobromophthalein (BSP) sodium and indocyanine green (ICG) by plasma alpha-1 lipoproteins. *Proc Soc Exp Biol Med* 1966; 122: 957–963.
19. Stanga PE, Lim JJ, et al. Indocyanine green angiography in chorioretinal diseases: Indications and interpretation: An evidence-based update. *Ophthalmology* 2003; 110: 15–21.
20. Yannuzzi LA, Slakter JS, et al. Digital indocyanine green videoangiography and choroidal neovascularization. *Retina* 1992; 12 (3): 191–223.
21. Fox IJ, Wood EH. Indocyanine green: physical and physiologic properties. *Proc Mayo Clin* 1960; 35: 732–744.
22. Hajnal JV, Hill DLG, et al. Medical Image Registration, CRC Press, Boca Raton, Fla, USA, 2001.
23. Woitzik J, Horn P, et al. Intraoperative control of extracranial-intracranial bypass patency by near-infrared indocyanine green videoangiography. *J Neurosurg* 2005; 102: 692–698.
24. Peña-Tapia PG, Kemmling A, et al. Identification of the optimal cortical target point for extracranial-intracranial bypass surgery in patients with hemodynamic cerebrovascular insufficiency. *J Neurosurg* 2008; 108: 655–661.
25. Haga S, Nagata S, et al. Near-infrared indocyanine green videoangiography for assessment of carotid endarterectomy. *Acta Neurochir* 2011; 153: 1641–1644.
26. Kamp MA, Slotty P, et al. Microscope integrated quantitative analysis of intra-operative indocyanine green fluorescence angiography for blood flow assessment: first experience in 30 patients. *Neurosurgery* 2012; 70: 65–73.
27. Desai ND, Miwa S, et al. Improving the quality of coronary bypass surgery with intra-operative angiography: validation of a new technique. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46: 1521–1525.
28. Reuthebuch O, Häussler A, et al. Novadaq SPY: intraoperative quality assessment in off-pump coronary artery bypass grafting. *Chest* 2004; 125: 418–424.
29. Balacumaraswami L, Taggart DP. Intraoperative imaging techniques to assess coronary artery bypass graft patency. *Ann Thor Surg* 2007; 83: 2251–2255.
30. Unno N, Inuzuka K, et al. Preliminary experience with a novel fluorescence lymphography using indocyanine green in patients with secondary lymphedema. *J Vasc Surg* 2007; 45: 1016–1021.
31. Kang Y, Lee J, et al. Application of novel dynamic optical imaging for evaluation of peripheral tissue perfusion. *Inter J Cardiol* 2010; 145: 99–101.
32. Kikuchi M, Hosokawa K. Visualized sclerotherapy of varicose veins. *Derm Surg* 2010; 36: 1050–1055.
33. Mothes H, Döncke T, et al. Indocyanine-green fluorescence video angiography used clinically to evaluate tissue perfusion in microsurgery. *J Trauma* 2004; 57(5): 1018–1024.
34. Komorowska-Timek E, Gurtner GC. Intraoperative perfusion mapping with laser-assisted indocyanine green imaging can predict and prevent complications in immediate breast reconstruction. *Plast Reconstr Surg* 2010; 125: 1065–1073.
35. Lim H, Soter N. Clinical Photomedicine. Marcel Dekker Inc., New York, NY USA 1993.
36. Ohnishi S, Lomnes SJ, et al. Organic alternatives to quantum dots for intraoperative near-infrared fluorescent sentinel lymph node mapping. *Mol Imaging* 2005; 4: 172–181.
37. Omar GS, Wilson M, et al. Lethal photosensitization of wound-associated microbes using indocyanine green and near-infrared light. *BMC Microbiology* 2008; 8: 111.
38. Yanina IY, Bochkov VA, et al. Optical image analysis of fat cells for indocyanine green mediated near-infrared laser treatment. *Laser Physics Letters* 2011; 8(9): 684–690.

Článek přijat redakcí: 15. 1. 2013

Článek přijat k publikaci: 3. 6. 2013

---

### MUDr. Roman Kufa

Chirurgická klinika 2. LF UK a FN Motol, Praha  
V Úvalu 84, 150 06 Praha 5  
[roman@kufa.cz](mailto:roman@kufa.cz)

---