

플루오레신나트륨의 농도 범위 분석

이다애^{1,3,5} · 김용재^{2,3,5} · 윤기철^{3,5} · 김광기^{3,4,5,6*}

¹가천대학교 바이오나노대학 나노물리학과, ²가천대학교 바이오나노대학 바이오나노학과,
³가천대학교 의과대학 의예과 의공학교실, ⁴가천대학교 보건과학대학 의용생체공학과,
⁵가천대길병원 의료기기 R&D센터, ⁶가천대학교 융합의과학과

Analysis for Concentration Range of Fluorescein Sodium

Da-Ae Lee^{1,3,5}, Yong-Jae Kim^{2,3,5}, Ki-Cheol Yoon^{3,5} and Kwang-Gi Kim^{3,4,5,6*}

¹Department Nano-physics, College of Bionano Technology, Gachon University

²Department Bio-nano Science, College of Bionano Technology, Gachon University

³Department of Biomedical Engineering, College of Medicine, Gachon University

⁴Bio-medical Engineering, College of Health Science, Gachon University

⁵Medical Device R&D Center, Gachon University Gil Hospital

⁶Department of Health Sciences and Technology, Gachon Advanced Institute for Health Sciences
and Technology (GAIHST), Gachon University

(Manuscript received 25 September 2019 ; revised 20 December 2019 ; accepted 27 February 2020)

Abstract: Brain tumors or gliomas are fatal cancer species with high recurrence rates due to their strong invasiveness. Therefore, the goal of surgery is complete tumor resection. However, the surgery is difficult to distinguish the border because tumors and blood vessels have the same color tone and shape. The fluorescein sodium is used as a fluorescence contrast agent for boundary separation. When the external light source is irradiated, yellow fluorescence is expressed in the tumor, which helps distinguish between blood vessels and tumor boundaries. But, the fluorescence expression of fluorescein sodium depends on the concentration of fluorescein sodium and such analytical data is insufficient. The unclear fluorescence can obscure the boundaries between blood vessels and tumors. In addition, reduce the efficiency of fluorescein sodium use. This paper proposes a protocol of concentration range for fluorescence expression conditions. Fluorescent expression was observed using a near-infrared (NIR) color camera with corresponding dilution using normal saline in 1 ml microtube. The fluorescence emission density range is 1.00 mM to 0.15 mM. The fluorescence emission begins to 1.00 mM and the 0.15 mM discolor. The discolor is difficult to fluorescence emission condition observation. Thus, the maximum density range of the bright fluorescein is 0.15 mM to 0.30 mM. When the concentration range of fluorescein sodium is analyzed based on the gradient of fluorescence expression and the power measurement, the brightest fluorescence is expected to facilitate the complete resection of the tumor. For the concentration range protocol, setting concentration ranges and analyzing fluorescence expression image according to saturation and brightness to find optimal fluorescence concentration are important. Concentration range protocols for fluorescence expression conditions can be used to find optimal concentrations of substances whose expression pattern varies with concentration ranges. This study is expected to be helpful in the boundary classification and resection of brain tumors and glioma.

Key words: Fluorescein sodium, NIR camera, Dilution, Half-life-time, Normal saline

Corresponding Author : Kwang-Gi Kim
38-13, Dokjeom-ro 3beon-gil, Namdong-gu, Incheon, Republic of Korea
Tel: +82-32-460-2177
E-mail: kimkg@gachon.ac.kr

본 연구는 “2017-0-01630-003 (Information Technology Research Center, ITRC)”, “2019-0303 (Future Innovation & Challenge, Gachon University)”, “GRRC Gachon 2017-B01 (Gyeonggi do Regional Research Enter)”, “IITP-2019-0-01750-001 (Institute of Information & Communications Technology Planning & Evaluation)”의 연구 결과로 수행되었음.

I. 서 론

플루오레신 나트륨(fluorescein sodium)은 종양에 염색되어 진단과정에서 노란색 계열의 형광이 발현되는 특징을 가지고 있고 이로인하여 참고문헌 인용과 같이 노란색 형광 염색(Yellow-dye)의 명칭을 사용하기도 한다[1,2].

플루오레신 나트륨은 뇌 신경외과와 안과에서 사용되는 것으로 분석되었고 뇌신경외과는 뇌종양 혹은 뇌신경교종 수술과정에서 종양과 혈관의 경계 구분과 종양 절제 상태 등을 관찰을 하기 위해 종양에 형광을 염색하여 종양 상태를 진단하는데 사용되기도 한다[3,4].

종양에 형광 염색을 위해 사용되는 플루오레신 나트륨은 체내 주입을 하게 되며 이때, 신체의 신장과 연령 그리고 체중 등을 고려하여 주입량을 결정하게 된다. 플루오레신 나트륨을 주입하기 위해 생리식염수(nomal saline)를 희석하는 과정은 필수적이다[5].

[5]에 보고되는 생리식염수량은 기준 값이며 실제 주입할 때의 양은 신체 조건에 맞게 결정된다. 그러므로 신체 조건에 맞추어 주입할 때, 형광염료의 농도가 결정되며 농도에 따라 형광 밝기가 뚜렷해진다[6]. 형광 밝기 차이는 밝기 시작되는 시점과 가장 밝을 때 그리고 시간이 흘러 반감기에 의해 퇴색되는 시점의 밝기 등으로 구분되며 마지막으로 형광퇴색으로 밝기가 사라지는 현상이 발생된다. 참고문헌[5]를 참고하여 종양에 형광염색을 하였을 때, 밝기 차이로 형광조영진단 상태가 달라지거나 형광 밝기가 저하되어 진단하는데 어려움이 발생하는 현상이 발생되기도 한다[7]. 그러므로 종양을 적출하는데 어려움을 겪기도 하며 이를 해결하기 위해 많은 자료를 참고하여 분석을 해야 하겠지만 분석을 위한 자료들이 부족한 실정이다[4,5,8].

종양에 플루오레신 나트륨을 주입하여 형광 염색을 한 후, 종양 절제 및 절제 상태를 정확하게 진단하기 위해 플루오레신 나트륨과 생리식염수를 희석 그리고 희석량에 따라 형광발현 밝기 관찰의 필요성이 대두되며 또한 형광 밝기 시작 및 밝기 종료 등에 대한 특성을 분석하기 위한 실험이 필요할 것으로 사료된다.

본 논문은 플루오레신 나트륨의 형광 발현에 대해 실험을 하여 생리식염수 희석량과 형광 발현 밝기 시작점 그리고 종료 등에 대한 특성 등 결과를 얻는데 기여하며 형광발현 밝기 차이에 따른 색상표현을 표현하여 생리식염수 희석량에 따라 형광 밝기 차이에 대해 명확히 표현 및 제시하고자 한다.

본 실험과정부터 얻기 위한 결과는 플루오레신 나트륨 농도에 따라 형광 발현 및 종양 절제술의 목표에 적용될 만큼 수술 성적에 크게 좌우될 것으로 판단되며 형광 발현을 위해 사용되는 외부 광원 파라미터(parameter)는 405 nm LED(light emitting diode) 그리고 형광발현 감지 및 영상판독

에 대한 관찰 장비는 근적외선(NIR, near infrared) 칼라 카메라(color camera)를 이용하여 플루오레신 나트륨의 최적 형광 발현 농도 범위를 분석 및 결정을 한다.

II. 형광 발현 특성 분석

그림 1은 형광조영을 통해 종양상태를 관찰하는 형태로써 플루오레신 나트륨을 체내 주입 후, 체외에서 광원을 조사하게 되면 종양에서 노란색 형광을 발현하게 된다. 그러므로 종양에서 형광이 발현됨으로써 종양과 혈관의 경계구분이 명료해지며 종양 절제 상태 진단이 가능해 진다[9-13]. 형광 발현 조건에 맞는 외부 특정 광원을 조직에 조사(여기 파장 및 전력)를 하게 되면 형광 물질은 분광현상을 통해 형광이 발현되며 이때 그림 2를 참고했을 때, 형광 발현 과정에서 발현파장(emission wavelength) 및 전력이 발생된다. 형광 파장은 스펙트럼(spectrum)의 고유 색상을 가지게 되며

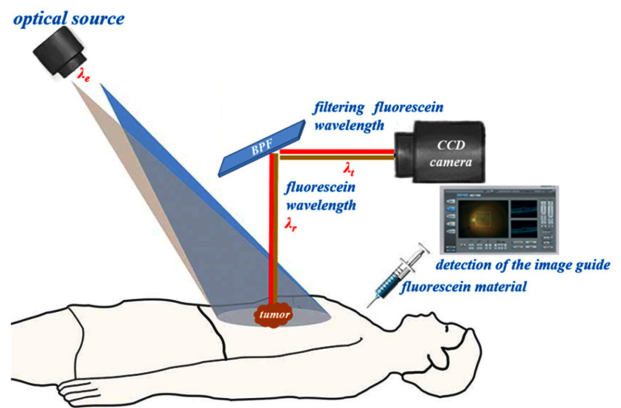


그림 1. 수술용 형광 현미경 진단

Fig. 1. Diagnosis of the surgical fluorescence microscopy

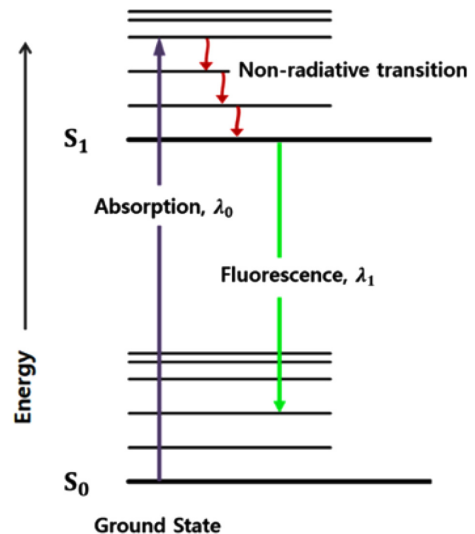


그림 2. 형광 발현 현상

Fig. 2. Phenomenon of the fluorescein emission

표 1. 형광 발현 조건

Table 1. Condition of the fluorescence emission

Condition	Wavelength [nm]	Power [mW]
Optical source (excitation)	405	11.0
Fluorescence (emission)	505-530	2.00

영상수집장치(이하, 카메라)에서 형광 발현 색상 영상을 촬영 및 관찰 할 수 있게 된다(그림 1 참고). 이때, 플루오레신 나트륨을 종양에 주입 한 후, 체외에서 여기파장과 전력을 가진 광원을 조사한다고 가정하면 형광 발현의 파장 및 전력은 표 1과 같이 조건이 성립된다[10-13]. 이러한 조건을 만족시키기 위해 플루오레신 나트륨은 화학적 변화가 발생되며 이는 플루오레신 나트륨이 형광발현 조건 최적의 화학식 구조를 가지고 있기 때문이다. 그러므로 플루오레신 나트륨은 그림 3과 같이 크산텐(xanthene) 염료(dye)에 종속되는 2-benzofurans 화합물을 가지게 되고 그림 4를 고려했을 때

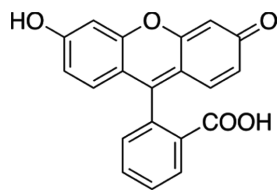


그림 3. 플루오레신 나트륨 화학식 구조

Fig. 3. Chemical structure of fluorescein sodium

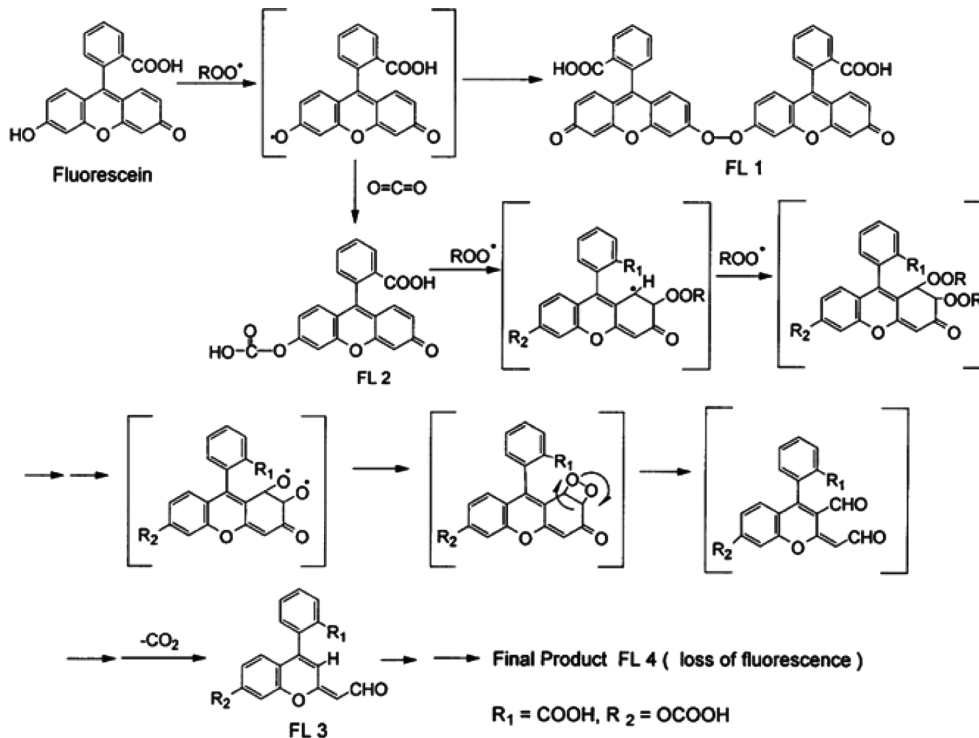


그림 4. 플루오레신 나트륨 화학식 세부구조

Fig. 4. Chemical detail structure of fluorescein sodium

다양한 유도체로 변환 및 순환 되며 만일 405 nm의 광원 여기 파장을 종양에 조사하게 되면 종양은 플루오레신 나트륨에 대한 유도체 발생 현상에 의해 505-530 nm의 형광 파장 및 형광발현 등의 현상이 발생하게 된다(그림 2 참고)[14].

유기 화학 구조를 갖는 플루오레신 나트륨은 생리식염수와 혼합했을 때 수용액 상태에서 희석(dilution) 정도에 따라 형광 발현 양상이 민감하게 변화되며[15] 플루오레신 나트륨이 2% 농도 범위로 희석되었을 때 형광은 발현되지만 농도 범위를 초과하게 되면 형광은 퇴색하게 된다는 것이 그림 3

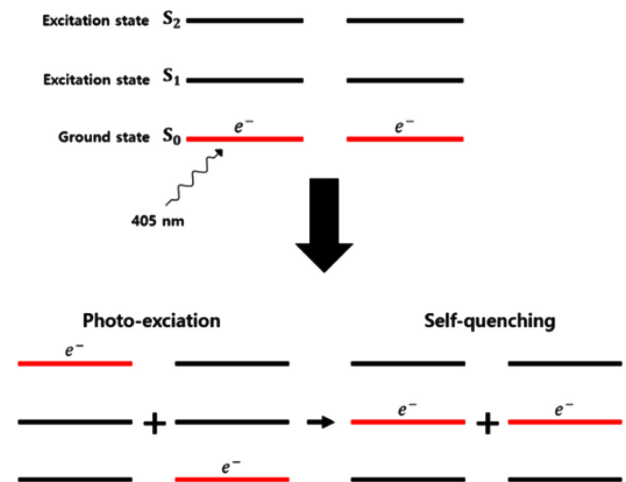


그림 5. 형광 발현의 자기 소멸

Fig. 5. Self-quenching of the fluorescein emission

에서 이해를 도울 수 있다[15,16].

원인 분석에 의거, 그림 5와 같이 플루오레신 나트륨은 농도에 따라 자기 소멸(self-quenching)이 가능하기 때문이며 [17] 따라서 플루오레신 나트륨을 희석하여 최적의 범위 내에 농도를 제조하면 종양은 형광 발현 조건이 성립되어 종양과 혈관이 명료한 경계구분을 제공하게 된다[13].

III. 형광 발현을 위한 농도 프로토콜 분석

플루오레신 나트륨과 생리식염수 희석 및 농도 변화에 따

른 형광발현 특성을 분석하기 위해 그림 6은 실험환경 구성하고 있다. 그림토대로 실험을 위한 계획 프로토콜(protocol)은 표 2에 제시되었으며 표에서 광원 조사는 LED 사용을 원칙으로 하고 있고 LED의 빔 폭(beam angle)은 2.86° 이며 조영제 샘플(sample)과 광원 사이의 사거리는 0.7 mm로 고정시켰다. 또한 조사 강도는 440 mW로 구성되며 광원 조사와 플루오레신 나트륨을 관찰하기 위해 NIR 카메라를 사용하여 표 3과 같이 사양을 제공한다. 형광 조영제는 그림 7과 같이 플루오레신 나트륨(113.2 mg)에 생리식염수(100 ml)를 혼합하여 10%의 초기 농도로 희석 시켜 제조한다고 가정을 한

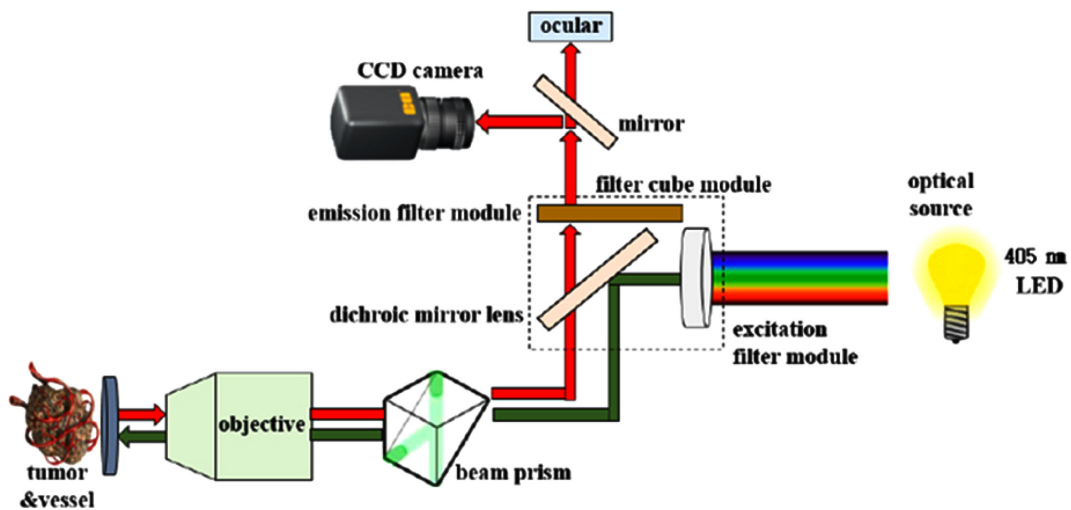


그림 6. 형광 발현 실험을 위한 환경 구성

Fig. 6. Experimental environment for fluorescence emission

표 2. 형광 발현 조건을 위한 실험 방법 구성

Table 2. Experimental method for fluorescence expression

Light source type	Irradiation wavelength [nm]	Fluorescence contrast medium	Contrast agent mass [mg]
LED (M405L2-C1/Thorlabs)	405 nm	Fluorescein sodium	113.2 mg

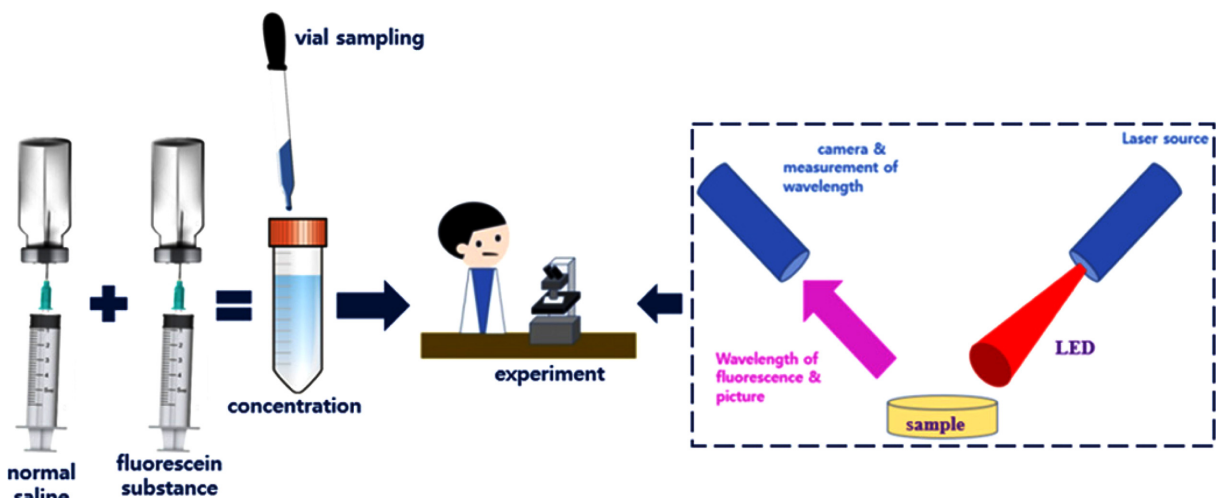


그림 7. 형광 발현 농도 분석을 위한 실험과정

Fig. 7. Experimental procedure for analysis of fluorescence expression concentration

표 3. 근적외선 카메라의 사양

Table 3. Specifications of near infrared camera

Case	Model name	Specification	
NIR	Lt-225c (color camera)	Image sensor	CMOS
		Pixel size[μm]	5.5 μm
		Resolution[pixels]	2048 $\times$ 1088 pixels
		Frame Rate[fps]	170 fps

다. 이때, 초기 농도에 대한 형광발현 가능성 실험을 수행해 본 결과 형광 발현이 안되는 것으로 결과를 얻었다. 이는 형광염료의 밀도가 높아서 형광발현 농도에 대한 조건이 불만족스러운 것으로 분석된다. 그러므로 형광 발현이 가능한 조건으로 만들기 위해 플루오레신 나트륨 113.2 mg에 생리식염수 100 ml를 혼합하여 10%의 초기 농도로 제조한다고 가정한다. 그리고 혼합된 염료(농도 10%)를 마이크로튜브(microtube)에 1 ml씩 주입을 한다. 그러므로 생리식염수를 1% 추가 주입하여 밀도를 최적화시킨다. 즉, 형광염료 농도를 얻게 하여 형광이 발현될 수 있도록 조건을 만족시켜준다. 이러한 방법 토대로 실험 프로토콜을 계획하게 되며 마이크로튜브(microtube)에 405 nm LED 광원을 조사한 후 NIR 칼라 카메라(color camera)를 통해 yellow-dye 형광발현 영상을 관찰 및 촬영할 수 할 수 있도록 LED 광원과 NIR 칼라 카메라를 설치한다. 이때, 영상 촬영에 대한 관찰이 용이하도록 외부 모니터링(monitoring) 시스템을 구축하며 이는 그림 8과 같이 보여주고 있다. 모니터링 시스템은 조사 광원 빔(beam)과 형광발현의 위치 및 조사 각도를 고려하여 LED 광원을 설치하고 형광 발현 관찰에 적합한 촬영 각도 및 사거리(working distance)로 NIR 카메라를 설치하는 것이 중요하다. 그 이유는 각도와 사거리에 따른 영상 포착 범위 및 영상 화질 등이 좌우되기 때문이며 그림 9는 구성을 위한 광학 영상 촬영 환경을 사진을 통해 보여주고 있다.

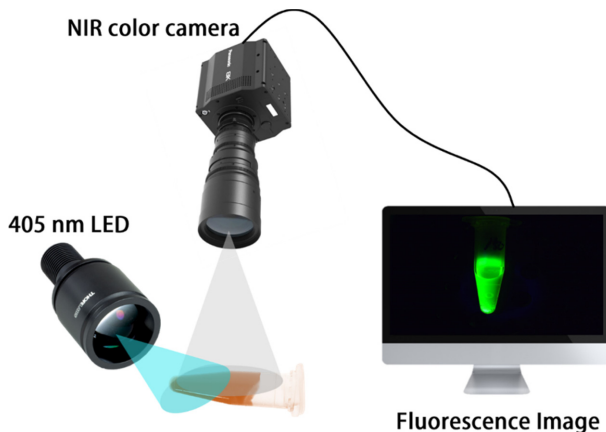


그림 8. 형광발현 관찰 시스템

Fig. 8. Observation system of the flunorescein emission

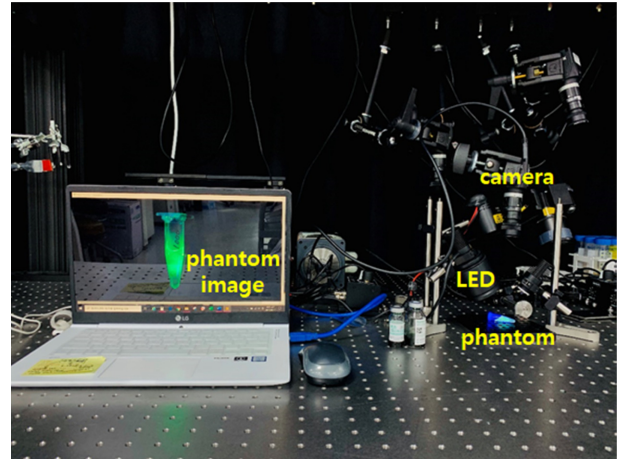


그림 9. 실험 환경 구성 사진

Fig. 9. Experiment environment photo

IV. 결과 및 고찰

1. 실험결과

본 연구는 플루오레신 나트륨 농도에 따른 형광 발현 상태를 분석하였고 그림 10에서 제시되고 있다. 형광 발현 농도 대역은 1.00 mM부터 0.15 mM 이며 0.15 mM 이후 형광퇴색이 시작된다. 그러므로 1.00 mM은 형광 발현 시작점 이며 0.15 mM은 형광발현 마치는 범위에 속한다. 퇴색

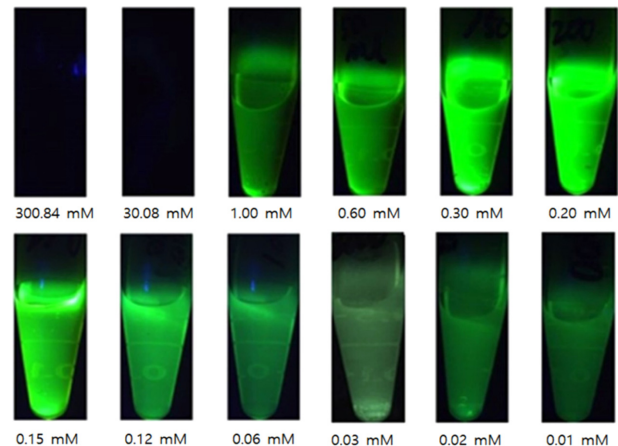


그림 10. 형광 발현 촬영 이미지

Fig. 10. Image of fluorescence emission

표 4. 형광 발현 특성 분석

Table 4. Fluorescence characteristics by concentration range

Concentration	Saturation	Brightness	Color code
mM	%	%	#
301	65	3	#05030E
30.1	63.0	3.0	#05030D
1.00	98.00	50.00	#04FB02
0.60	100.00	50.00	#01FF01
0.30	98.00	45.00	#02E502
0.20	98.00	51.00	#07FD05
0.15	80.00	46.00	#18D318
0.12	80.00	34.00	#119A2F
0.06	78.00	25.00	#0E722E
0.03	78.00	23.00	#0d682a
0.02	79.00	20.00	#0B5D1B
0.01	81.00	18.00	#09541B

범위의 0.01 mM 이하부터 형광 발현이 어려우며 관찰 또한 어렵다.

강한 형광 발현은 높은 채도(saturation)와 명도(brightness)를 가지게 되고 채도는 색(color)의 짙은 정도를 의미하고 있으며 명도는 색의 밝은 정도를 나타내고 있다.

플루오레신 나트륨은 녹색을 띄고 있으며 육안으로 판단했을 때 최대 형광 발현 농도 범위는 0.15 mM 부터 0.30 mM 에 내포된다.

최적 형광 농도 범위 결정을 위해 형광 발현 이미지에서 명도와 채도 등을 추출하여 농도(concentration) 기반으로 분석을 하였고 분석 결과를 표 4에 제시를 하였다. 표 4에 대한 결과는 그림 11에서 그래프 수치 형태로 제시를 하였고 분석에 의거, 높은 채도를 갖는 최적 농도 구간은 0.20 mM 부터 1.00 mM, 최대 채도는 0.60 mM을 얻었다. 명도 최적 농도 구간은 0.15 mM에서 1.00 mM, 최대 명도를 갖는 농도는 0.20 mM이다.

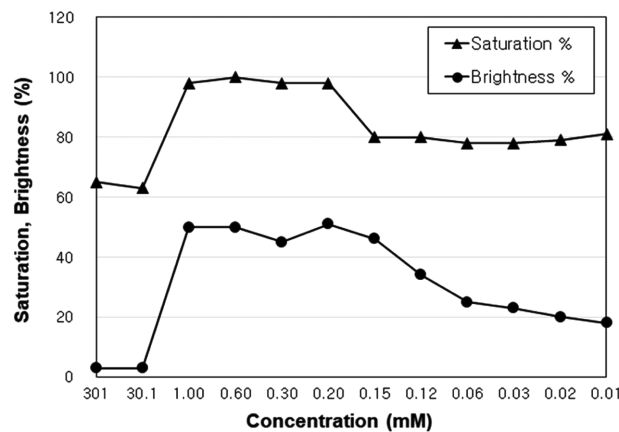


그림 11. 농도 범위 따른 형광 특성

Fig. 11. Fluorescence characteristics by concentration range

플루오레신 나트륨은 표와 그림에 대한 결과를 종합 분석했을 때, 1.00 mM 이하부터 형광 발현이 뚜렷하게 관찰되었고 0.20 mM 기점으로 농도가 낮아지며 퇴색된다. 육안 관찰, 명도 분석 그리고 채도 분석의 최적 형광발현 농도 빈도수를 바탕으로 가장 뚜렷한 형광 발현 농도는 0.20 mM 결과를 나타내었다.

2. 고찰

뇌종양 혹은 뇌신경교종의 국내 발생 건은 2016년 기준에 의거, 약 2천 건으로 연간 인구 10만명 당 4명 정도의 환자들이 발생하는 것으로 조사된다. 뇌종양과 뇌신경교종은 5년 생존률 기준으로 했을 때, 완치율이 각각 65% 및 38%의 수준에 머물러 있다[18]. 그 이유는 높은 침윤성으로 인해 종양 절제가 미비하게 되면 재발률이 높기 때문이다[18]. 그러므로 종양 완전 절제가 수술의 목표라고 표현을 해도 과언이 아니다. 그러나 종양과 혈관이 같은 형태와 생조를 가지고 있기 때문에 육안 관찰이 어렵고 종양과 혈관 사이의 경계구분 또한 어렵다[19]. 그러므로 종양 절제 과정에서 절제 상태가 미비하거나 완벽한 절제를 위해 혈관이 손상되어 혈류 장애가 발생할 수 있는 우려가 대두되기 때문에 그나마만큼 수순의 난이도가 높고 위험성이 따르게 된다[19-21]. 광역학 진단 기반의 형광 조영 진단은 혈관과 종양의 경계를 구분할 수 있기 때문에 다양한 형광 조영제를 사용되고 있지만 그 중에서 플루오레신 나트륨은 다형성아교모세포종을 노란색으로 염색(yellow-dye)을 하기 때문에 특정 조직에서 노란색 형광을 발현시키는 특징을 가지고 있고 이를 위해 정맥주사요법을 통해 체내 약물을 주입시킨다[21,22]. 이때, 체외에서 특정 파장을 가진 광원을 조사했을 때 플루오레신 나트륨은 특정 조직에서 형광 염색이 되어 노란색 형광을 발현하게 된다[9-11,13,23-25]. 그러므로 안저 혈관 및 뇌 종양 혹은 뇌혈관 조영 그리고 뇌척수액류 판별 등 다양한 진단요법에 사용되어 의료분야에서도 수술 진단에 성공한 사례들이 보고되고 있다[3,4,9-11,13,22-26]. 특히, 뇌종양 및 악성 뇌신경교종 수술 시 플루오레신 나트륨 형광조영제 적용은 다형성아교모세포종에 선명한 형광 색상을 제공하므로 육안을 통해 종양과 혈관 경계를 구분 및 절제를 할 수 있는 수술진단 연구 사례가 보고되고 있다[11,13,22,26]. 그러므로 형광 조영제는 다형성아교모세포종 특징적인 화학작용 변화 때문에 형광발현을 통해 절제 수술의 경계 구분을 좌우할만큼 종양 절제 상태 진단하는데 매우 중요하다고 볼 수 있다. 플루오레신 나트륨 농도는 형광 발현을 조절하여 종양의 형광 염색 정도와 종양 및 혈관 형태 표현 정도 그리고 종양과 혈관의 경계 구분 관찰 가능 여부를 좌우하는 특정 농도 범위를 갖는다. 그러나, 전임상 실험 혹은 임상실험 및 실제 환자에 적용한다고 가정할 때, 플루오레신 나트륨을 생리식염수와 희

석하게 된다면 초기 농도는 사용설명서[5,6]의 기준 값을 따르게 된다. 그러므로 형광발현이 불가능하게 될 수 있다. 실제에 적용하기 위해 신체 조건을 고려하여 생리식염수량을 조절하여 희석할 필요성이 있으며 희석에 대한 조절량에 대해 분석을 하여 기준을 세우게 되면 분석을 위한 참고자료가 부족한 실정이다. 그러므로 인도시아닌그린(indocyanine green)의 생리식염수 희석할 때 형광발현 상태에 대해서만 보고되고 있으므로 플루오레신 나트륨의 생리식염수 희석량 조절에 대한 실험과 실험 방법 및 결과에 대해 제시할 필요성이 있다[5,8].

일반적으로 의료기관에서 형광물질을 이용하여 특정조직을 관찰할 때, 대부분 사용설명서를 숙지하고 생리식염수를 익숙한 방법으로 희석을 해왔을 것으로 여겨진다[27]. 그러므로 전임상시험 혹은 임상시험을 할 때, 처음 접해보는 실험자의 입장에서 희석 문제 때문에 많은 사용하는데 많은 곤란함을 느꼈을 것으로 예측된다. 이러한 상황을 고려했을 때, 희석시킬 수 있는 문헌이 필요할 것으로 사료되며 본 논문에서 제시되고 있는 실험 값은 형광발현되기 위한 생리식염수 희석 범위에 대해 정확한 프로토콜을 제시하고자 하는 의미가 내포되어 있다.

V. 결 론

본 논문은 플루오레신 나트륨(fluorescein sodium)의 형광 발현 조건을 위한 최적 농도 범위 프로토콜(protocol)을 제안한다. 종양과 혈관의 경계를 구분하여 절제하기 위해 형광 조영 진단이 중요하며 플루오레신 나트륨은 외부 광원 조사 시 종양에 노란색 형광이 발현되어 경계 구분을 명료하게 한다[3,4]. 플루오레신 나트륨은 농도에 따라 형광 발현 양상이 변화하므로 형광 발현을 위한 농도 범위 분석을 위해 본 실험을 진행하였다.

농도 범위 프로토콜(protocol)에 따라 근적외선 (NIR:near infrared) 칼라(color) 카메라(camera)로 관찰했을 때, 생리식염수(nommar saline) 희석 부피(dilution volume) 증가에 따라 플루오레신 나트륨을 적용한 형광 발현은 1.00 mM에서 관찰되어 0.20 mM에 이르기 전까지 지속적으로 증가, 이후 점진적으로 퇴색되는 양상을 보였다.

형광 발현을 위한 0.20 mM-1.00 mM의 플루오레신 나트륨 최적 농도 범위는 NIR 칼라 카메라를 이용하여 촬영한 이미지를 바탕으로 했을 때 육안 관찰과 명도 그리고 채도 정도로 결정하였다. 분석 결과, 0.20 mM은 특히 최대 형광 발현을 나타내므로 다형성아교모세포종 수술 적용 시 확실한 경계 구분을 제공할 것으로 판단된다.

본 연구에서 제안하는 플루오레신 나트륨 최적 형광발현 농도범위 분석은 뇌종양 및 뇌신경교종 절제 수술에서 뚜렷

한 형광 발현으로 종양 경계 구분을 명확하게 하여 정상 조직 손상을 최소화 하며 종양 완전 절제가 가능할 것으로 기대된다.

References

- [1] Schebesch KM, Brawanski A and Hohne J. Fluorescein sodium-guided surgery of malignant brain tumors:history, current concepts, and future project. *Turkish Neurosurgery*. 2016;26(2):185-94.
- [2] Schebesch KM, Proescholdt M, HÖhne J, Hohenberger C, Hansen E, Riemenschneider MJ, Ullrich W, Doenitz C, Schlaier J, Lange M and Brawanski A. Sodium fluorescein-guided resection under the YELLOW 560 nm surgical microscope filter in malignant brain tumor surgery—a feasibility study. *Acta Neurochir*. 2013;155:693-9.
- [3] Belykh EG, Zhao X, Cavallo C, Bohl MA, Yamurlu K, Aklinski JL, Byvaltsev VA, Sanai N, Spetzler RF, Lawton MT, Nakaji P and Preul MC. Laboratory evaluation of a robotic operative microscope—visualization platform for neurosurgery. *Cureus*. 2018;10(7):2-22.
- [4] Setten GV. Sandbank Epitheliopathy of the conjunctiva (SEC) a new indicator in dry eye. *J. Eye & Cataract Surgery*. 2017;3(2):1-4.
- [5] Fluorescein Ophthalmic Disclosing Agent Fluorescein Sodium (<https://allmedtech.com/flbopdiagfls.html>).
- [6] Shingnapurkar SH, Mitra DK, Kadav MS, Shah RA, Rodrigues SV and Prithyani SS. The effect of indocyanine green-mediated photodynamic therapy as an adjunct to scaling and root planing in the treatment of chronic periodontitis: A comparative split-mouth randomized clinical trial. *Indian J. Dental Research*. 2016;27(6):609-17.
- [7] Lee HM, Kim HR, Yoon WB, Kim YJ, Kim KG, Kim SK, Yoo H, Lee SH, Shin M S and Kwon KC. Study of a brain tumor and blood vessel detection system using multiple fluorescence imaging by a surgical microscope. *Korean J. Opt. Photon*. 2015;26(1):23-9.
- [8] Cherrick, G. R, Stein, S. W, Leevy, C. M, & Davidson, C. S. Indocyanine green: observations on its physical properties, plasma decay, and hepatic extraction. *J Clin Invest*. 1960; 39(4):592-600.
- [9] DR W. Fluorescein angiography basic science and engineering. *Ophthalmology*. 1986;93(2):1617-20.
- [10] Bennett TJ, Quillen DN and Coronica R. Fundamentals of fluorescein angiography. *American Soc. Ophthalmic Registered Nurses Insight*. 2016;41(1):5-11.
- [11] Schebesch KM, Proescholdt M, Hohne J, Hohenberger C, Hansen E, Riemenschneider MJ, Ullrich W, Doenitz C, Schlaier J, Lange M and Brawanski A. Sodium fluorescein-guided resection under the yellow 560 nm surgical microscope filter in malignant brain tumor surgery-a feasibility study. *Acta Neurochirurgica*. 2013;155(4):693-9.
- [12] Suzuki K, Kodama N, Sasaki T, Matsumoto M, Ichikawa T, Munakata R, Muramatsu H and Kasuya H. Confirmation of blood flow in perforating arteries using fluorescein cerebral angiography during aneurysm surgery. *J. Neurosurgery*. 2007;107:68-73.
- [13] Chen B, Wang H, Ge P, Zhao J, Li W, Gu H, Wang G, Luo Y and Chen D. Gross total resection of glioma with the intraoperative fluorescence-guidance of fluorescein sodium. *Int. J. Medical*

- Sciences. 2012;9(8):708-14.
- [14] Christopoulos TK and Diamandis EP. Fluorescence immunoassays. *Hum Pathol.* 1984;15(2):112-6.
- [15] Efor, N. Contact lens complications 3rd. Elsevier Expert Consult, USA:Saunders;2004.
- [16] Polomska AK, Lerous JC and Detmar M. Minimally invasive method for the point-of-care quantification of lymphatic vessel function. *JCI Insight.* 2019;4(4):e126515.
- [17] Kim TW, Park JH and Hong JI. Self-quenching mechanism: the influence of quencher and spacer on quencher-fluorescein probes. *Bull. Korean Chem. Soc.* 2007;28(7):1221-3.
- [18] web site on www.cancer.go.kr (definition of brain gliomas)
- [19] Lefranc F, Sadeghi N, Camby I, Metens T, Dewitte O and Kiss R. Present and potential future issues in glioblastoma treatment. *J. Expert Review of Anticancer Therapy.* 2006; 6(5):719-32.
- [20] Larcroix M, Abi-Said D, Fournay DR, Gokaslan ZL, Shi W, DeMonte F, Lang FF, McCutcheon IE, Hassenbusch SJ, Holland E, Hess K, Michael C, Miller D and Sawaya R. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *J. Neurosurgery.* 2001;95(2):190-8.
- [21] Stummer W, Novotny A, Stepp H, Goetz C, Bise K and Reulen HJ. Fluorescence-guided resection of glioblastoma multiforme utilizing 5-ALA-induced porphyrins: a prospective study in 52 consecutive patients. *J. Neurosurgery.* 2000; 93(6): 1003-13.
- [22] Shinoda J, Yano H, Yoshimura SI, Okumura A, Kaku Y, Iwama T and Sakai N. Fluorescence-guided resection of glioblastoma multiforme by using high-dose fluorescein sodium. *J. Neurosurgery.* 2003;99:597-603.
- [23] Flower RW. Injection technique for indocyanine green and sodium fluorescein dye angiography of the eye. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 1973;12(12):881-95.
- [24] Spaide RF, Klancnik JM and Cooney J. Retinal vascular layers Imaged by fluorescein angiography and optical coherence tomography angiography. *JAMA Ophthalmology.* 2015;133(21): 45-50.
- [25] Keerl R, Weber RK, Draf W, Wienke A, and Schaefer SD. Use of sodium fluorescein solution for detection of cerebrospinal fluid fistulas: An analysis of 420 administrations and reported complications in Europe and the United states. *Laryngoscope.* 2004;114(2):266-72.
- [26] Koc K, Anik I, Cabuk B And Ceylan S. Fluorescein sodium-guided surgery in glioblastoma multiforme: a prospective evaluation. *British J. Neurosurgery.* 2008;22(1):99-103.
- [27] Mondal SB, Gao S, Zhu N, Liang R, Grucev V and Achilefu S. Real-time fluorescence image-guided oncologic surgery. *Adv. Cancer Research.* 2014;124:171-211.