

ИЛЬИН
АНДРЕЙ АНДРЕЕВИЧ

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ РЕГИОНАРНОГО ЛИМФАТИЧЕСКОГО АППАРАТА И
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПУТЕЙ ЛИМФООТТОКА ОТ ЛЕГКОГО МЕТОДОМ
ИНФРАКРАСНОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ И
КЛИНИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

14.01.17 – Хирургия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург – 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Андрей Леонидович Акопов

Официальные оппоненты:

Пикин Олег Валентинович, доктор медицинских наук, Московский научный исследовательский онкологический институт имени П.А. Герцена – филиал федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, торакальное хирургическое отделение, заведующий

Кузнецов Игорь Михайлович, доктор медицинских наук, федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации, кафедра госпитальной хирургии, доцент

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

Защита диссертации состоится «29» июня 2021 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д208.092.01 при федеральном государственном бюджетном учреждении «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (191036, Санкт-Петербург, Лиговский пр., 2-4, тел. (812) 775-75-55). С диссертацией можно ознакомиться на официальном сайте www.srbniif.ru федерального государственного бюджетного учреждения «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации и в научной библиотеке (191036, г. Санкт-Петербург, Лиговский пр., д. 2-4, тел. (812) 775-75-55).

Автореферат разослан «_____» _____ 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор

Виноградова Татьяна Ивановна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы исследования

Лимфатическая система (ЛС) представляет собой сложную сеть из лимфатических сосудов, протоков, стволов и лимфатических узлов (ЛУ). Визуализация особенностей ее строения и функционирования представляет значительный интерес как при проведении научных исследований, так и в клинической практике [Кузнецов И. М., 2005, Яблонский П. К. и др., 2010, Акопов А. Л. и др., 2015, Папаян Г.В. и др., 2017]. Для этих целей применяют различные методы, отличающиеся физическими принципами, используемой аппаратурой и контрастирующими агентами: лимфосцинтиграфия, магнитно-резонансная лимфография, ультразвуковое исследование с контрастным усилением, 18-фтордезоксиглюкоза-позитронно эмиссионная томография в сочетании с компьютерной томографией и др. [Sevick-Muraca E. et al., 2014, Bollinger A. et al., 2007]. В последние годы все большее внимание привлекают оптические методы, основанные на флуоресценции в ближнем инфракрасном (БИК) свете [Пищик В. Г. и др., 2017, Kessous R. et al., 2019]. Преимущества такого подхода - отсутствие необходимости дорогостоящего и громоздкого оборудования, высокое пространственное и временное разрешение изображения, позволяющее проводить исследование *in vivo* в режиме реального времени, абсолютная безвредность для пациента и персонала [Папаян Г.В. и др., 2016, Goyal A., 2018]. В качестве флуоресцирующего красителя используется разрешенный для клинического использования препарат – индоцианин зелёный (ИЦЗ). Флуоресценция ИЦЗ возбуждается при длине волны 750 - 800 нм, а эмиссия регистрируется на длинах волн выше 800 нм [Troyan S.L. et al., 2009; Alander J. et al., 2012]. Глубина визуализации при этом может достигать 3-4 см [<http://www.perkinelmer.com/product/ivis-lumina-lt-inst-series-iii-120v-cls136331>].

Клиническое значение изучения ЛС в хирургическом лечении рака легкого связано попытками обнаружения «сигнальных» лимфатических узлов (СЛУ) [Little A.G., 2002, Shersher D. D. et al., 2015, Matsuura Y. et al., 2019]. Теория СЛУ подразумевает наличие регионарных лимфатических коллекторов, которые первыми поражаются метастазами первичной опухоли [Седов В. М. и др., 2009, Акопов А. Л. и др., 2015]. Выявление и последующее патоморфологическое исследование СЛУ является сегодня стандартом в хирургическом лечении рака молочной железы и меланомы кожи, однако практически не применяется при раке легкого [Garbe C. et al. 2019, Dixon J.M. et al., 2019]. Причинами этого являются технические сложности выявления узлов, редкие антракозные, поствоспалительные изменения в узлах, не всегда

удовлетворительная интраоперационная визуализация зон лимфогенного метастазирования. Определенное значение имеют и особенности анатомии легкого, органов грудной клетки. Возможность интраоперационной визуализации СЛУ может помочь в более точном определении степени вовлечения в опухолевый процесс тех или иных зон регионарного лимфатического аппарата и, соответственно уточнить необходимость регионарной лимфодиссекции и ее объем [Miyoshi S., 2013, Matsuura Y. et al., 2019].

Все это подтверждает актуальность выявления и оценки СЛУ, а также определения путей регионарного лимфооттока от определенной доли легкого при ее поражении раком. Знание о «сигнальном» характере узла может быть особенно полезным, так как позволит на одном ЛУ сконцентрировать временные и материальные ресурсы иммуногистохимического и молекулярно-биологического исследования [Акопов А. Л. и др., 2015]. Главная же причина, из-за которой концепция СЛУ не реализуется при раке легкого, – отсутствие высокоинформативных методов визуализации.

Степень разработанности темы исследования

При детальном изучении проблемы визуализации лимфатических сосудов и ЛУ по данным современной отечественной и зарубежной литературы очевидно, что прижизненно решить эту задачу крайне сложно. Предложенные методы, включающие радиоизотопные, рентгенологические и другие лучевые исследования, в большинстве наблюдений недостаточно эффективны. Для реализации флуоресцентной визуализации лимфатической системы необходимо разработать соответствующую аппаратуру и методики исследований, что и выполнено в настоящей работы. Проведенные экспериментальные исследования и полученные результаты позволяют считать их достаточными для клинического внедрения метода.

Цель исследования

Разработка методики прижизненной визуализации лимфатических сосудов и лимфатических узлов с помощью флуоресценции в ближнем инфракрасном диапазоне и изучение путей оттока лимфы от легкого.

Задачи исследования

1. Разработать аппаратный комплекс для визуализации флуоресценции в ближнем инфракрасном свете.
2. Оптимизировать концентрацию и состав раствора индоцианина зеленого для лимфографии в ближнем инфракрасном диапазоне.

3. Определить особенности накопления индоцианина зеленого в патологической ткани.
4. Разработать методику флуоресцентной лимфографии в экспериментальных условиях.
5. Изучить направление тока лимфы у оперированных больных немелкоклеточным раком легкого в зависимости от локализации первичной опухоли в той или иной доле легкого.

Научная новизна исследования

Разработана методика инфракрасной флуоресцентной визуализации лимфатических сосудов и СЛУ в эксперименте и у больных немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) с использованием первой отечественной экспериментальной системы «FLUM–808». Впервые оценено влияние 20% раствора альбумина человеческого (АЧ) на флуоресцирующие свойства водного раствора ИЦЗ. Оценена возможность накопления и задержки конъюгата ИЦЗ и АЧ в опухолевой ткани в сравнении с нормальной тканью. Впервые проведен анализ особенностей лимфогенного распространения НМРЛ на основании флуоресцентной картины.

Теоретическая и практическая значимость

Разработана первая отечественная инструментальная система «FLUM–808» для прижизненной инфракрасной флуоресцентной визуализации, применимая как в экспериментальной работе, так и в клинических исследованиях. Продемонстрированы флуоресцентные свойства конъюгата раствора АЧ с ИЦЗ, характеризующиеся существенно большей флуоресценцией по сравнению с чистым раствором ИЦЗ, а также обеспечивающие большую стабильность раствора. В эксперименте доказано существенно большее и стабильное накопление конъюгата ИЦЗ и АЧ в опухолевой ткани по сравнению со здоровой тканью. Клинически изучена возможность выявления СЛУ у больных раком легкого, оценено их возможное количество и локализация в зависимости от опухолевого поражения той или иной доли легкого.

Методология и методы исследования

Методологическая база данного диссертационного исследования основывается на принципах надлежащей экспериментальной и клинической практики применительно к торакальной хирургии. Для получения необходимой научной информации применяли основные клинические, лабораторные, инструментальные, а также общенаучные методы, выполняли анализ и

сопоставление полученных результатов. Объектом исследования явились экспериментальные животные (крысы, кролики), а также больные НМРЛ разного пола и возраста, которым проводили хирургическое лечение. Предметом исследования были структуры ЛС, лимфатические сосуды и ЛУ, как в экспериментальных, так и в клиническом исследовании. При проведении данного исследования соблюдались требования Национального стандарта Российской Федерации «Надлежащая клиническая практика» ГОСТ Р 52379-2005, использовались современные методы обработки информации и статистического анализа, в том числе параметрические и непараметрические критерии. Вычисления выполняли с использованием персональной электронно-вычислительной машины и стандартных пакетов прикладного статистического анализа (Statistica for windows v 9. 0).

Положения, выносимые на защиту

1. Разработана первая отечественная инструментальная система для инфракрасной флуоресцентной визуализации, позволяющая проводить прижизненные исследования ЛС как в экспериментальной работе, так и в клинической практике.

2. Для визуализации регионарных лимфатических сосудов и ЛУ оптимальным является внутритканевое введение ИЦЗ, растворенного в 20% АЧ в концентрации 0,1 мг/мл.

3. Разработанная методика инфракрасной флуоресцентной визуализации лимфатической системы позволяет визуализировать СЛУ у большинства больных раком легкого, а также изучать особенности регионарного лимфогенного метастазирования, характеризующегося существенной вариабельностью.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов диссертационного исследования подтверждается достаточным количеством наблюдений, а также использованием современных методов обработки информации и статистического анализа.

Результаты работы внедрены в лечебную работу кафедры хирургии госпитальной с клиникой и клиники НИИ хирургии и неотложной медицины ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова Минздрава России; в учебную и научно-исследовательскую работу кафедры клинической анатомии и оперативной хирургии им. М. Г. Привеса ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова Минздрава России.

Основные положения диссертационной работы изложены на всероссийской научно-практической конференции «Актуальные вопросы фотодинамической терапии и фотодиагностики» (Санкт-Петербург, 2015; Москва, 2018); XII-XIV Научно-практических конференциях с международным участием Северо-Западного федерального округа РФ «Актуальные вопросы торакальной хирургии, онкологии и бронхологии» (Санкт-Петербург, 2016, 2017, 2018, 2019); VI International Symposium “Topical problems of biophotonics” (St.-Petersburg – Nizhny Novgorod, Russia, 2017); VII Всероссийский конгресс «Фотодинамическая терапия и фотодиагностика» (Москва, 2018); 18 Международная конференции «Оптика лазеров» (Санкт-Петербург, 2018); “Photodynamic therapy and Photodiagnosis Update 2018” (Munich, 2018); VIII Съезд Научного медицинского общества анатомов, гистологов и эмбриологов России, Воронеж, 2019; Всероссийская научная конференция с международным участием «Клиническая анатомия и оперативная хирургия: итоги и перспективы» (Оренбург, 2019); Российская научная конференция «Анатомия и хирургия: общий путь развития – достояние отечественной медицины» (Санкт-Петербург, 2019); II международный форум онкологии и радиологии (Москва, 2019); First European society of thoracic surgery virtual congress (2020)

Публикации

По теме диссертации опубликовано 10 научных работ, в том числе 5 статей в рецензируемых журналах, входящих в перечень рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Минобрнауки России для публикации основных научных результатов диссертаций.

Личный вклад автора

Автором самостоятельно осуществлено планирование клинической и экспериментальной части исследования, выполнение экспериментальной части работы, набор клинического материала, статистическая обработка и анализ полученных результатов. Автор принимал непосредственное участие в обследовании и лечении пациентов, включенных в исследование. Автором подготовлены публикации по результатам проведенного исследования.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 93 страницах печатного текста, состоит из введения, 5 глав, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Работа содержит 5 таблиц, 29 рисунков. Список литературы включает 105 источников, в том числе 87 зарубежных авторов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Исследования компонентов ЛС проводили с помощью системы «FLUM-808», разработанной в ПСПБГМУ им. акад. И.П. Павлова, которая предназначена для решения широкого круга биомедицинских задач, в том числе методами флуоресцентной диагностики в БИКобласти как в эксперименте, так и в клинических условиях. В качестве источника возбуждения БИК флуоресценции использовался медицинский диодный лазер «ЛАХТА-МИЛОН»; длина волны – 808 нм, максимальная выходная мощность 9 Вт. Доставка излучения производилась через кварцевое моноволокно. К преимуществам «FLUM-808», среди прочих, относится возможность количественной оценки яркости флуоресценции объекта. Задача регистрации решалась с помощью телевизионно-компьютерной системы, включающей мультиспектральную телевизионную (ТВ) камеру «ICG-Skope» (960x960 пикселей) и ноутбук «ACER V3-772G». Камера оснащена объективом ($f=24$ мм), обеспечивающим поле зрения размером от 28x28 мм до 46x46 мм, при вариации дистанции до объекта от 225 мм до 350 мм. В зависимости от особенности исследования камерная головка либо устанавливалась на штативе, как показано на рисунке 1, либо находилась в руках оператора. В клиническом исследовании удаленные ЛУ исследовались на предмет наличия флуоресценции на специально оборудованном столике (back-table) интегрированном в стойку «FLUM-808». Картины в «белом» и БИК спектре наблюдали в реальном масштабе времени. Параллельно производилась видео- и фотосъемка.



Рисунок 1 – Система FLUM-808 при проведении лимфографических исследований в эксперименте на кролике: 1 – лазерный аппарат «Лакхта-Милон 808/9»; 2 – ноутбук; 3 – световод; 4 – ТВ-камера «ICG-Skope»; 5 – штатив; 6 – аппарат искусственной вентиляции легких; 7 – испаритель «МИНИВАП 20/1»

В работе использовали лиофилизат ИЦЗ (Pulsion medical systems, AG, Германия).

Работа с животными одобрена этическим комитетом ПСПБГМУ и проводилась в соответствии с принципами «Правил этического обращения с лабораторными животными при проведении экспериментальных работ».

В экспериментальной работе на крысах была поставлена задача определения особенностей накопления ИЦЗ в опухолевой ткани. Опыты выполнялись на 18 крысах-самцах линии Вистар, массой 200-250 г, ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово» НИЦ «Курчатовский институт». Крыс наркотизировали (хлоралгидрат 350 мг/кг внутривенно в 0,9 % стерильном растворе хлорида натрия, объём введения 10 мл/кг). Крысам, после депиляции правого и левого бедра, под кожу правого бедра, инъецировали гомогенат ткани лимфосаркомы Плисса (ЛП) в дозе 0,2 мл с целью индукции роста опухоли. Рост опухоли в зоне инъекции имел место у 100% включенных в эксперимент животных. Левое бедро оставалось интактным и в дальнейшем служило зоной контроля.

Через 24 часа после индукции роста ЛП внутривенно (в хвостовую вену) каждой крысе вводился раствор ИЦЗ в дозе около 1 мг/кг массы. Все крысы разделены на 3 группы по 6 в каждой в зависимости от состава введенного раствора:

Группа 1 - раствор ИЦЗ в дистиллированной воде;

Группа 2 - конъюгат ИЦЗ в бычьем сывороточном альбумине в весовом отношении ИЦЗ/ БСА = 1:40;

Группа 3 - конъюгат ИЦЗ в 20% растворе АЧ.

Концентрация вводимого ИЦЗ во всех группах составила 0,33 мг/мл.

Через 1 час после введения раствора ИЦЗ, а затем через каждые 24 часа в течение 6 суток проводилось измерение интенсивности инфракрасной флуоресценции в области правого бедра (зона поражения) и левого бедра (контроль). Следует отметить, что в эти сроки не удавалось оценить макроскопически и пальпаторно индукцию роста опухоли в правом бедре, то есть, появление яркой флуоресценции существенно опережало развитие макроскопических изменений.

Соответственно задаче разработки методики БИК лимфографии экспериментальная работа проводилась на 7 кроликах-самцах породы Шиншилла (ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово» НИЦ «Курчатовский институт») массой $3 \pm 0,1$ кг. У 5 кроликов при внутридермальной лимфографии проводилась общая анестезия с использованием тиопентала натрия, 40 мг/кг внутривенно. Для визуализации поверхностных лимфатических сосудов пошагово, с временным интервалом

0,5-23 мин вводился альбуминовый раствор ИЦЗ (0,02 мл, 0,1 мг/мл) в эпидермальный слой кожи в различных анатомических зонах. Во время инъекции препарата с помощью системы «FLUM-808» регистрировался его ток по лимфатическим сосудам, проводилась фото- и видеосъемка.

Двум кроликам с целью изучения лимфоттока от места введения конъюгата ИЦЗ и АЧ в стенку желудка и легочную паренхиму в качестве премедикации внутримышечно вводился 0,1% раствор атропина из расчета 0,025 мл/кг и внутривенно 1% раствор пропофола в дозировке 2 мг/кг, после чего выполнялась интубация трахеи и проводился основной наркоз изофлураном в концентрации 1,5 – 2% объема вдыхаемой смеси и 1 - 1,5 л/мин газового потока, дозирование которого осуществлялось испарителем «МИНИВАП 20/1». Выполняли депиляцию передней поверхности грудной и брюшной стенки. Перед разрезом в кожу брюшной и грудной стенок в области предполагаемого разреза вводили новокаин (10 мл 1% раствора). Первым этапом выполняли срединную лапаротомию. В стенку желудка вводили 1 мл конъюгата ИЦЗ + АЧ в концентрации 0,1 мг/мл. От места введения при помощи системы «FLUM-808» визуализировался ток введенного флуоресцирующего контраста по лимфатическим путям в направлении малого сальника. Лапаротомную рану послойно ушивали. Вторым этапом выполняли двустороннюю переднебоковую торакотомию с поперечным пересечением грудины (по типу «clamshell») и вскрывали обе плевральные полости. В паренхиму легкого в трех точках вводили конъюгат ИЦЗ и АЧ в количестве 3 мл и концентрации 0,1 мг/мл. От места введения с помощью системы «FLUM-808» регистрировали ток лимфы вместе с раствором ИЦЗ + АЧ по лимфатическим путям в направлении корня легкого.

Клинические исследования проводились в отделе торакальной хирургии НИИ хирургии и неотложной медицины ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова с одобрения этического комитета. Принципы Хельсинкской декларации (2013) были соблюдены в полном объеме. Перед включением в исследование у пациентов получено письменное информированное согласие.

С сентября 2015 г. по январь 2019 г. методика инфракрасной флуоресцентной лимфографии реализована в процессе 92 анатомических резекций легких у больных НМРЛ. Средний возраст включенных в исследование больных составил $63,2 \pm 6,3$ лет.

В ходе обследования перед операцией согласно рекомендациям по обследованию и лечению пациентов с НМРЛ оценивали распространение заболевания при помощи МСКТ органов грудной клетки с внутривенным контрастированием, фибротрехеобронхоскопии, УЗИ шеи, УЗИ брюшной полости и забрюшинного пространства. При выявлении изменений по данным

УЗИ брюшной полости и почек пациенту выполнялось МСКТ органов брюшной полости в ангиорежиме.

В работе использовали лиофилизат ИЦЗ, растворенный в дистиллированной воде и смешанный с 20% АЧ в пропорции, обеспечивавшей соотношение масс АЧ/ИЦЗ не менее 90, что по соотношению числа молекул соответствует 1:1 [Папаян Г. В. и др., 2016]. Исследования лимфатической системы проводили с помощью экспериментально/инструментальной системы «FLUM-808», ее варианта для исследования материала на «backtable» (рисунок 2).



Рисунок 2 – Экспериментально/инструментальная система «FLUM-808» при проведении лимфографических исследований на «backtable»: 1 – лазерный аппарат «Лахта-Милон 808/9»; 2 – световод; 3 – ТВ-камера; 4 – ноутбук

Сразу после торакотомии или введения в плевральную полость троакаров при торакоскопии раствор ИЦЗ с 20% АЧ в количестве 3 мл и концентрации 0,1 мг/мл вводился перитуморально в 3 точки. Выделение элементов корня легкого, тем самым пересечение путей лимфооттока, начиналось через 5 минут после инъекции ИЦЗ, затем проводилась стандартная резекция легкого в необходимом объеме и полная прикорневая и медиастинальная ипсилатеральная лимфодиссекция. Удаленные ЛУ маркировались и подвергались плановому патоморфологическому исследованию. В операционной, сразу же после удаления препарата, проводилась тщательная оценка флуоресценции зоны первичной опухоли, легочной паренхимы, всех удаленных ЛУ и жировой клетчатки (рисунок 3).

Все флуоресцирующие ЛУ расценивались как СЛУ. Производилось сопоставление локализации первичной опухоли доли легкого и локализации СЛУ, оценка наличия метастазов в регионарных ЛУ, в том числе и в СЛУ.

Изучение групп ЛУ проводилось согласно классификации Т. Naruke et al. [1978] в модификации С. Mountain and С. Dresler [1997].



Рисунок 3 – Регистрация флуоресценции ИЦЗ в ЛУ бифуркационной группы (7 группа), стрелкой отмечено место накопления ИЦЗ и его флуоресценция в БИК свете

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оптимизация концентрации растворов ИЦЗ для лимфографии в БИК спектре

В процессе подготовки к экспериментальной работе оценивалось влияние альбумина на флуоресценцию ИЦЗ в водном растворе по изменению яркости флуоресценции раствора в пробирке эппендорф. График титрования, полученный при добавлении к исходному раствору ИЦЗ (0,33 мг/мл) 20% АЧ, представлен на рисунке 4.

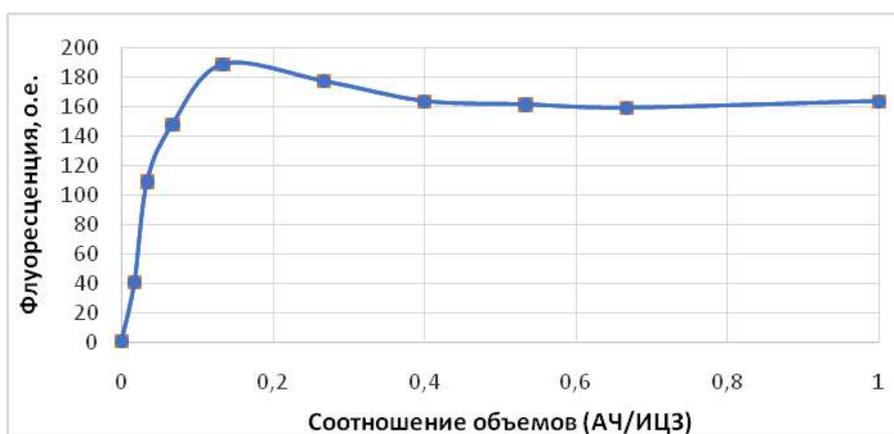


Рисунок 4 – Кривая титрования раствора ИЦЗ в присутствии 20% АЧ. По оси ординат – нормированная относительно исходного свежего водного раствора (0,33 мг/мл) интенсивность флуоресценции. По оси абсцисс – соотношение объема АЧ (20%) к массе ИЦЗ в растворе. Максимум флуоресценции зафиксирован при АЧ (20%) / ИЦЗ = 0,13 мг/мл

Из графика видно, что благодаря связыванию с АЧ интенсивность флуоресценции ИЦЗ возрастала в 180 раз относительно водного раствора ИЦЗ. При проведении исследований отметили и другую полезную особенность конъюгата – его высокую стабильность. В отличие от водного раствора ИЦЗ, который быстро теряет флуоресцирующие свойства и требует приготовления непосредственно перед применением, конъюгат с альбумином не терял флуоресцентных свойств в течение, по крайней мере, месяца при условии его хранения при - 4°С.

Определение особенностей накопления ИЦЗ в патологической ткани (эксперимент на крысах)

Через 1 час после введения раствора ИЦЗ в хвостовую вену, в центре перевивки опухоли наблюдалось яркое свечение. При этом на контрольном участке степень флуоресценции была минимальной (рисунок 5). Следует отметить, что в эти сроки не удавалось оценить макроскопически и пальпаторно индукцию роста опухоли в правом бедре, то есть, появление яркой флуоресценции существенно опережало развитие макроскопических изменений.

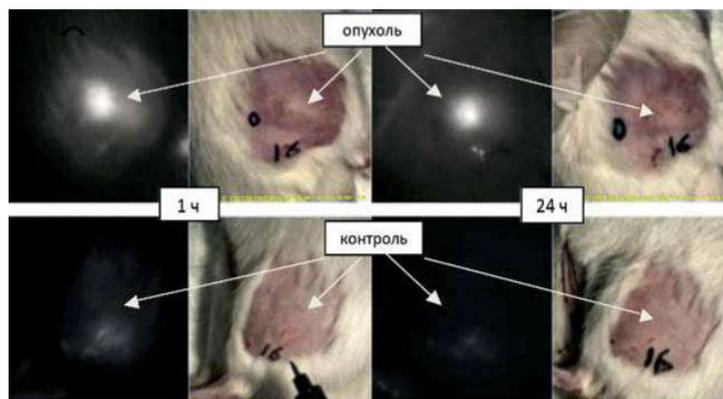


Рисунок 5 – Парные фотографии результатов визуализации опухолевого участка лимфосаркомы Плисса и симметричного здорового участка в свете индоцианиновой флуоресценции и обычном свете. Вверху опухолевый участок, внизу контрольный участок. Слева картина через 1 час после введения препарата ИЦЗ+АЧ, справа – через 24 часа

В первый час после введения раствора ИЦЗ + АЧ у крыс каждой группы наблюдали наибольшую по сравнению с последующими днями яркость свечения в области пораженного бедра.

Через 24 часа интенсивность инфракрасной флуоресценции уменьшилась во всех группах (в 6-8 раз). В последующие сутки интенсивность инфракрасной флуоресценции продолжала снижаться, но зона развития патологического

процесса визуализировалась в БИК свете у крыс, где использовался конъюгат ИЦЦ и альбумин, вплоть до 6-х суток.

Представленные данные показывают, что с помощью ИК флуоресценции можно выявлять пораженные участки ткани с высокой яркостью и контрастом, причем контраст при использовании конъюгатов ИЦЗ с АЧ выше, чем при использовании только ИЦЗ.

Разработка методики флуоресцентной лимфографии в экспериментальных условиях (эксперимент на кроликах)

Визуализацию лимфатических сосудов уха кролика при помощи флуоресценции осуществляли после введения препарата (ИЦЦ + АЧ) в точку № 1 (рисунок 6). За счет абсорбции ИЦЗ в течение нескольких секунд визуализировались лимфатические сосуды диаметром 0,3–1,0 мм (преколлекторы и коллектор) в виде четко оконтуренных светящихся дорожек и выявлялось направление тока лимфы (стрелка). После следующих инъекций стала доступной для наблюдения сеть преколлекторов.

Одна из фотографий, полученная через 55 мин после начала серии микроуколов, показана на рисунке 6.

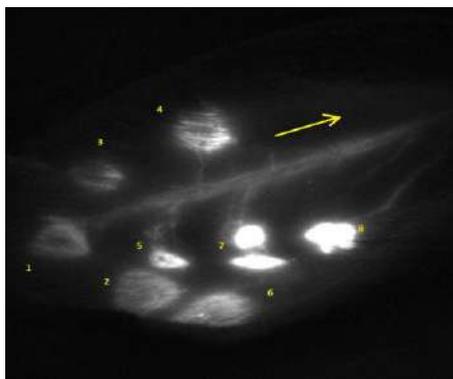


Рисунок 6 – Картина в свете ИЦЗ флуоресценции, полученная на ухе кролика в результате ввода микродоз препарата. Цифрами обозначены место и последовательность вколов, стрелкой показано направление тока лимфы

После введения конъюгата ИЦЦ и АЧ в эпидермальный слой кожи межфалангового пространства правой нижней конечности кролика удалось зафиксировать ток лимфы по правой нижней конечности в проксимальном направлении и последующее накопление контрастного вещества в ЛУ, собирающем лимфу от правой нижней конечности (рисунок 7).

Двум кроликам после срединной лапаротомии в стенку желудка вводился конъюгат ИЦЗ + АЧ в объеме 1 мл. Через 1 минуту от места введения флуоресцирующего контраста зарегистрирован его ток по лимфатическим путям желудка и последующее накопление в ЛУ, что показано на рисунке 8.

Следует отметить возможность аппарата «FLUM – 808» совмещать изображение в «белом» свете и БИК флуоресценции.

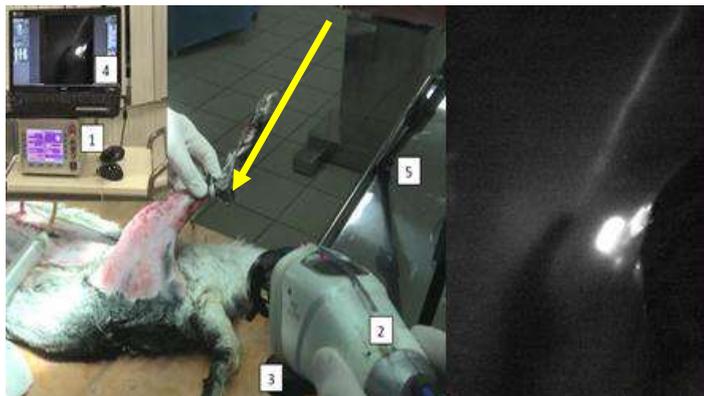


Рисунок 7 – Лимфография нижней конечности кролика при помощи системы «FLUM-808». Слева изображение в белом свете 1 – лазерный аппарат «Лахта-Милон 808/9»; 2 – световод; 3 – ТВ-камера «ICG-Skоре»; 4 – ноутбук; 5 – штатив. Справа получаемое изображение в БИК свете. Стрелкой указано направление тока лимфы и его накопление в лимфатическом коллекторе

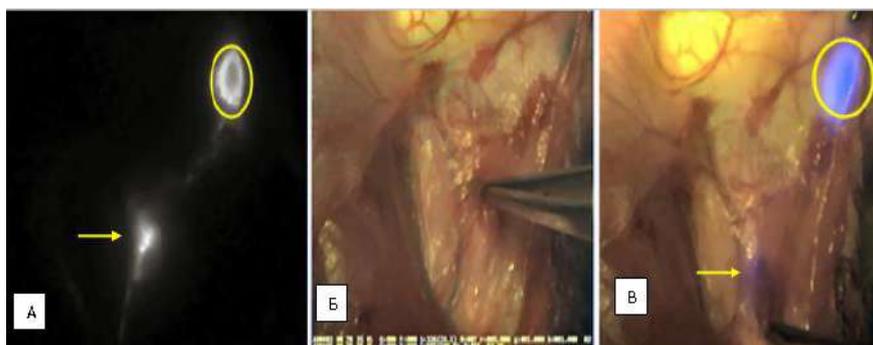


Рисунок 8 – Изображение одного и того же участка с ЛУ, сформированное системой FLUM-808: А) БИК флуоресценция, Б) белый свет, В) совмещенное (комбинированное) изображение. Стрелкой показано место введения препарата ИЦЗ, кружком – место расположение лимфатического узла

После выполнения доступа к легким и средостению в паренхиме легкого вводился раствор ИЦЗ с АЧ. Через 5 минут отмечался ток лимфы с флуоресцирующим раствором в направлении корня легкого.

В последующем, при помощи системы «FLUM-808», выявлены округлые участки задержки флуоресцирующего вещества в области легочной связки и парааортальной клетчатки (рисунок 9). При гистологическом исследовании вышеописанных участков доказано наличие в них ЛУ.



Рисунок 9 – Изображение одного и того же участка в белом свете (слева) и БИК флуоресценции (справа). Стрелкой обозначено место накопления ИЦЗ и его флуоресценция

Исследование ЛС легкого человека

Достоверно визуализировать флуоресценцию ИЦЗ как минимум в 1 регионарном ЛУ корня легкого или средостения удалось у 70 пациентов (76%). У 22 пациентов (24%) флуоресценция ЛУ не зафиксирована, проводили анализ возможных причин непопадания контрастного вещества в ЛУ.

Среди 70 пациентов, у которых выявлена флуоресценция СЛУ, при патоморфологическом исследовании, Ia стадия НМРЛ диагностирована у 23 больных (33%), Ib стадия – у 9 больных (13%), IIa стадия – у 12 больных (17%), IIb стадия – у 5 больных (7%), IIIa стадия – у 17 больных (26%), IIIb стадия – у 4 больных (6%). Плоскоклеточный рак легкого диагностирован у 25 пациентов (36%), аденокарцинома – у 36 больных (52%), другие виды НМРЛ – у 9 пациентов (12%).

При обследовании перед операцией, основываясь на данных МСКТ органов грудной клетки, в случае распространения опухоли на ЛУ средостения (критерий N2) или инвазии первичного очага в рядом расположенные органы (трахея, грудная стенка, крупные сосуды) пациентам проводили полихимиотерапию в неоадьювантном режиме.

Среди всех 92 пациентов, включенных в исследование, неоадьювантную полихимиотерапию (НПХТ) получили 12 (13%) больных. Применяли платиносодержащие схемы НПХТ. После НПХТ проводили контрольное обследование для оценки динамики. У 9 пациентов (75%) отмечен частичный регресс опухоли (уменьшение размеров ЛУ средостения, уменьшение первичного очага в размере). У 3 пациентов (25%) выявлена стабилизация заболевания. На основании вышеизложенного выставлялись показания к оперативному лечению.

Лобэктомия выполнена 64 пациентам (71%), билобэктомия - 6 пациентам (7%), пневмонэктомия - 20 пациентам (22%).

После операции, в которую входила стандартная анатомическая резекция легкого, а также прикорневая, ипсилатеральная медиастинальная

лимфаденэктомия, материал направляли на гистологическое исследование. Общее число патоморфологически исследованных групп ЛУ составило 312, в каждой группе содержалось от 1 до 7 ЛУ. Сигнальными (флуоресцирующими) являлись 171 ЛУ (55%), в среднем 2,7 у одного больного. Если флуоресценцию фиксировали в нескольких ЛУ одной группы, то это расценивали как один ЛУ, так как в большинстве наблюдений удалялись не ЛУ изолированно, а жировая клетчатка той или иной группы с содержащимися в ней ЛУ. У 14 больных (20%) флуоресценция зарегистрирована в одном ЛУ, у 18 больных (26%) – в 2 ЛУ, у 20 больных (28%) – в 3 ЛУ, у 12 больных (18%) – в 4 ЛУ, у 5 пациентов (7%) – в 5 ЛУ, и у 1 больного (1%) – в 7 регионарных ЛУ.

Среди флуоресцирующих 171 ЛУ прикорневыми являлись у 10%, медиастинальными – у 27 %, и в корне, и в средостении - у 63% пациентов (рисунок10).



Рисунок 10 – Распределение флуоресцирующих лимфоузлов по местоположению

При плановом патоморфологическом исследовании метастазы в ЛУ (при исследовании всех групп регионарных ЛУ диагностированы у 32 из 70 (46%) больных, степень регионарного лимфогенного метастазирования N1 имела место в 15 наблюдениях (47%), N2 – в 17 наблюдениях (53%). Причем группа N1 была поражена метастазами у 10 пациентов (31%), N2 - у 14 пациентов (44%), метастазы в прикорневых и медиастинальных ЛУ обнаружены у 8 пациентов (25%).

У всех больных с лимфогенным метастазированием имело место наличие метастазов в СЛУ. У 1 пациента (3%) все обнаруженные методом флуоресценции СЛУ были поражены метастазами (4 группы ЛУ). У 9 пациентов (28%) выявлено 2-3 группы пораженных метастатическим процессом

СЛУ. В остальных 22 наблюдениях (69%) метастазы выявлены лишь в одной группе СЛУ.

Ни в одном клиническом наблюдении метастазы в регионарных ЛУ не выявлялись в случае, если СЛУ были интактными. То есть, ток лимфы, содержащей метастазы, всегда проходил через СЛУ, и лишь затем опухолевые клетки попадали в другие регионарные ЛУ. Более того, если методом флуоресценции определялся хоть один СЛУ, при наличии метастазов в регионарных ЛУ во всех пораженных узлах имела место флуоресценция.

Наличие флуоресценции в ЛУ свидетельствовало о попадании в него введенного перитуморально ИЦЗ. Соответственно, устанавливая локализацию флуоресцирующих ЛУ, независимо от наличия или отсутствия в них метастазов, можно определить путь оттока лимфы, содержащей ИЦЗ, от опухоли, а точнее от мест введения ИЦЗ вокруг опухоли. Так как перитуморальная инъекция раствора ИЦЗ во всех наблюдениях проводили в доли легкого, в которых локализовалась первичная опухоль, сопоставление путей лимфооттока с локализацией первичной опухоли позволяло исследовать путь тока лимфы у каждого больного. Местоположение первичного очага и пути распространения и накопления в группы ЛУ показаны в таблице 1.

Таблица 1 – Частота накопления ИЦЗ в регионарных ЛУ в зависимости от локализации зон инъекции препарата в легкое (указаны значения более 30%)

№ группы лимфоузлов	Верхняя доля правого легкого n = 24 (34%)	Средняя и нижняя доли правого легкого n = 16 (23%)	Верхняя доля левого легкого n = 18 (26%)	Нижняя доля левого легкого n = 12 (17%)
10/11 группа	14 (58%)	10 (63%)	12 (67%)	7 (58%)
9 группа				5 (42%)
7 группа	12 (50%)	7 (44%)	8 (44%)	7 (58%)
6 группа			6 (33%)	6 (50%)
5 группа			5 (28%)	
4 группа	17 (71%)	6 (38%)		
3 группа	7 (30%)	4 (25%)		

При локализации опухоли в верхней доле правого легкого (24 больных) наиболее часто, в 71% наблюдений, флуоресцирующие ЛУ локализовались в 4 группе ЛУ, в 58% наблюдений – в 10 и 11 группах ЛУ, в 50% случаев зафиксирована флуоресценция в 7 группе, в 30% – в 3 группе (таблица 1). У 9 из 24 пациентов (38%) ИЦЗ не попал в прикорневые группы лимфоузлов, а его

накопление зарегистрировано в 4 группе, а у 4 из этих 9 (45 %) – и в 7 группе ЛУ.

Учитывая небольшое количество пациентов с опухолевым поражением средней и нижней доли правого легкого, полученные данные регистрации попадания флуоресцирующего вещества в ЛУ от этих долей суммированы, общее число больных - 16 (23%). Наиболее часто, в 63% наблюдений, флуоресценция зарегистрирована в ЛУ 10 и 11 групп, в 44% наблюдений – в 7 группе, у 38% больных – в 4 группе и у 25% больных – в 3 группе ЛУ (таблица 1). Флуоресценция в 3 и 7 группах у 3 из 4 пациентов (75 %) выявлена при отсутствии флуоресценции в 10 группе ЛУ.

У 22 пациентов (24%) из 92 включенных в исследование отсутствовала флуоресценция в ЛУ. При анализе возможных причин выявлено, что у 12 из 22 пациентов (55%) была проведена НПХТ (таблица 2), у всех этих пациентов имел место плоскоклеточный рак. Отмечен эффект предоперационного лечения, выразившийся в стабилизации заболевания у 3 больных (25%), частичной регресс опухоли – у 9 пациентов (75%), полный регресс опухоли у пациентов не отмечался. Среди 70 больных, у которых флуоресценция в лимфоузлах отчетливо выявлялась, предоперационная химиотерапия не проводилась ни в одном наблюдении ($p=0,000$). Учитывая данный факт, можно предположить, что эффективная предоперационная химиотерапия существенно редуцирует отток лимфы от пораженного первичной опухолью доли легкого.

Таблица 2 – Пациенты, которым проведена предоперационная химиотерапия

Наличие выявленных СЛУ	Предоперационная ХТ (+)	Предоперационная ХТ (-)	Уровень р
СЛУ выявлены (70 больных)	0	70 (100%)	0,000
СЛУ не выявлены (22 больных)	12 (55%)	10 (45%)	

Таким образом, ток лимфы от легкого характеризуется вариабельностью. Говорить об одном сигнальном лимфатическом узле, изучая ток лимфы от той или иной доли, не приходится. Напротив, исходя из полученных данных, наиболее часто лимфоотток направлен в несколько групп лимфатических узлов, как прикорневых, так и медиастинальных групп.

ВЫВОДЫ

1. Разработана инструментальная система для визуализации флуоресценции в ближнем инфракрасном спектре, позволяющая выполнять как экспериментальные, так и клинические исследования в реальном времени с высоким качеством визуализации.

2. Применение конъюгата ИЦЗ с АЧ позволяет повысить интенсивность флуоресценции до 180 раз по сравнению с раствором ИЦЗ в дистиллированной воде, что существенно улучшает визуализацию лимфатических сосудов и лимфатических узлов.

3. Водный раствор ИЦЗ в смеси с АЧ накапливается в опухолевой ткани интенсивнее, чем чистый раствор ИЦЗ, и задерживается в них в течение 72 часов.

4. Разработанная методика инфракрасной флуоресцентной визуализации в реальном времени позволяет исследовать лимфатическую систему и выявлять лимфатические узлы, расположенные на удалении от места внутритканевой инъекции флуоресцирующего агента.

5. Применение инфракрасной флуоресцентной диагностики позволило определить наличие сторожевых лимфатических узлов у 76 % оперированных больных раком легкого, как в корне легкого (47%), так и в средостении (53%), а также изучить особенности регионарного лимфогенного метастазирования.

6. Основным фактором, определяющим неэффективность интраоперационной флуоресцентной визуализации СЛУ у больных раком легкого, является проведение противоопухолевого лекарственного лечения в неоадьювантном режиме.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для флуоресцентной визуализации лимфатических сосудов, а также опухолевых очагов, оптимальным является использование в качестве флуоресцирующего агента лиофилизата ИЦЗ, растворенного в дистиллированной воде и смешанного с 20% АЧ в пропорции, обеспечивавшей соотношению числа молекул 1:1.

2. Интерстициальное введение конъюгата ИЦЗ и АЧ позволяет визуализировать лимфатических сосуды и регионарные ЛУ путем инфракрасной флуоресцентной диагностики

3. Отечественная инструментальная система для инфракрасной флуоресцентной визуализации может быть рекомендована для проведения

широкого круга экспериментальных и клинических интраоперационных исследований ЛС, в том числе в открытой и эндоскопической хирургии.

4. Лимфоотток из пораженных НМРЛ долей легкого характеризуется существенной вариабельностью, что подтверждает необходимость выполнения систематической лимфодиссекции с целью адекватного стадирования.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Данная диссертационная работа является исследованием, в котором разносторонне и широко рассмотрены вопросы, касающиеся изучения ЛС животных и человека, разработанного метода лимфографии. Рост числа публикаций, анализирующих опыт подобных операций в России и за рубежом, свидетельствует о повышенном интересе врачей различных специальностей и актуальности данной темы. Результаты проведенного диссертационного исследования открывают перспективы для дальнейшего, более углубленного изучения функционирования ЛС, оттока лимфы от органов, определения СЛУ и тех или иных факторов, оказывающие влияние на лимфоотток.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работы, опубликованные в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации:

1. Возможность использования конъюгата индоцианина зеленого с альбумином для инфракрасной флуоресцентной диагностики патологических процессов в эксперименте / Г.В. Папаян, С.Г. Чефу, Н.Н. Петрищев, **А.А. Ильин**, А.Л. Акопов // Вопросы онкологии. – 2016. – Т. 62, №6. – С. 839 – 844.

2. Прицельная биопсия плевры при торакоскопии под инфракрасным флюоресцентным контролем / А.Л. Акопов, Г.В. Папаян, А. Карлсон, И.В. Чистяков, С.Ю. Дворецкий, А.С. Агишев, С.Д. Горбунков, **А.А. Ильин** // Вестник хирургии им. И.И. Грекова. – 2017. – Т. 176, № 6. – С. 18-21.

3. Инфракрасная флуоресцентная лимфография в экспериментальных и клинических условиях / Г.В. Папаян, А.Л. Акопов, П.А. Антонян, **А.А. Ильин**, Н.Н. Петрищев // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2018. – Т. 17, №2. – С. 84-91.

4. Изучение путей регионарного лимфооттока при раке легкого с помощью инфракрасной флуоресценции / А.Л. Акопов, Г.В. Папаян, **А.А. Ильин**, С.Ю. Дворецкий, А.С. Агишев, И.В. Чистяков // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. – 2020. – №1. – С. 61-66.

5. Акопов, А.Л. Прижизненное изучение направления оттока лимфы при раке легкого с помощью индоцианина зеленого / А.Л. Акопов, Г.В. Папаян, **А.А. Ильин** // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2020. – Т. 19, №3. – С. 19-24.

Работы, опубликованные в других изданиях:

6. Интраоперационная флуоресцентная визуализация путей лимфооттока у больных раком легкого / А.Л. Акопов, Г.В. Папаян, И.В. Чистяков, **А.А. Ильин**, Карсон Арулдас // Biomedical Photonics. – 2015. – № S1. – С.44.

7. Возможность использования конъюгата индоцианина зеленого с белками для инфракрасной флуоресцентной диагностики патологических процессов в эксперименте / Г.В. Папаян, С.Г. Чефу, Н.Н. Петрищев, И.В. Чистяков, А.Н. Ефимов, **А.А. Ильин**, А.Л. Акопов // Biomedical Photonics. – 2015. – Т. 4, № S1. – С. 11-12.

8. Инфракрасная флуоресцентная лимфоциркуляция в экспериментальных и клинических условиях / Г.В. Папаян, А.Л. Акопов, **А.А. Ильин**, Н.Н. Петрищев // Biomedical Photonics. – 2018. – Т.7, № S: материалы VII Всероссийского конгресса «Фотодинамическая терапия и фотодиагностика», Москва, 27-28 сентября 2018 года. – С.15-16.

9. Акопов, А.Л. Инфракрасная флуоресцентная визуализация лимфатической системы в анатомических и клинических исследованиях / А.Л. Акопов, Г.В. Папаян, **А.А. Ильин** // Forcipe. – 2019. – Т.2, № S2. – С. 6.

10. Инфракрасная флуоресцентная лимфография в экспериментальных и клинических условиях // Г.В. Папаян, А.Л. Акопов, **А.А. Ильин**, Н.Н. Петрищев // Морфология. – 2019. – Т. 155, № 2. – С. 226.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ЛС – лимфатическая система

ЛУ – лимфатический узел

БИК – ближний инфракрасный

ИЦЗ – индоцианин зеленый

СЛУ – сторожевые лимфатические узлы

НМРЛ – немелкоклеточный рак легкого

АЧ – альбумин человеческий

ТВ – телевизионная

ЛП – лимфосаркома Плисса

НПХТ – неoadьювантная полихимиотерапия

МСКТ – мультиспиральная компьютерная томография