

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «ПЕРВЫЙ
САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ АКАДЕМИКА И. П. ПАВЛОВА» МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

ИЛЬИН Андрей Андреевич

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

14.01.17 – хирургия

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор
Акопов Андрей Леонидович

Санкт-Петербург – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ		Стр.
Введение		4
Глава 1. Обзор литературы		11
1.1	Лимфатическая система – анатомические и физиологические аспекты	11
1.2	Методы изучения лимфатической системы	13
1.3	Инфракрасная флуоресцентная визуализация лимфатической системы	14
1.4	Концепция сторожевых лимфатических узлов при онкологических заболеваниях	19
1.5	Сторожевой лимфатический узел: историческая справка	20
1.6	Определение сторожевых лимфатических узлов при немелкоклеточном раке легкого	22
1.6.1	Применение красителей	23
1.6.2	Применение радиоактивных веществ	23
1.6.3	Применение флуоресцентной диагностики	26
Глава 2. Материалы и методы исследования		27
2.1	Изучение особенностей накопления индоцианина зеленого в опухолевой ткани в эксперименте	27
2.2	Разработка методики ближней инфракрасной лимфографии в эксперименте	28
2.3	Клиническое исследование. Характеристика пациентов с немелкоклеточным раком легкого	29
2.4	Методы обследования больных	32
2.5	Методика исследования лимфатических узлов	33

2.6	Методы статистического анализа результатов исследования	34
Глава 3. Техническое обеспечение инфракрасной флуоресцентной визуализации лимфатической системы		35
3.1	Аппаратное обеспечение	35
3.2	Методологические особенности использования индоцианина зеленого с целью лимфографии	44
Глава 4. Прижизненная лимфография в экспериментальных условиях		48
4.1	Разработка методики флуоресцентной лимфографии в экспериментальных условиях	48
4.2	Визуализация лимфатических сосудов и лимфатических узлов внутренних органов в эксперименте	50
4.3	Определение особенностей накопления индоцианина зеленого в патологической и нормальной ткани в эксперименте на крысах	53
ГЛАВА 5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТОРОЖЕВЫХ ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЛЕГКОГО		59
5.1	Результаты исследования сторожевых лимфатических узлов	59
5.2	Пути лимфогенного метастазирования при различных локализациях первичных опухолей	65
5.3	Возможные причины отсутствия флуоресценции в регионарных лимфатических узлах	68
Заключение		71
Выводы		77
Практические рекомендации		78
Перспективы дальнейшей разработки темы исследования		79
Список сокращений		80
Список литературы		81

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы исследования

Изучение направления тока лимфы от разных органов имеет большое научное и практическое значение. Лимфатическая система (ЛС) представляет собой сложную сеть из лимфатических сосудов, протоков и лимфатических узлов (ЛУ). Визуализация особенностей ее строения и функционирования представляет значительный интерес как при проведении научных исследований, так и в клинической практике [18, 100, 113]. Для этих целей применяются различные методы, отличающиеся физическим принципом, используемой аппаратурой и контрастирующими агентами: лимфосцинтиграфия, магнитно-резонансная лимфография, ультразвуковое исследование (УЗИ) с контрастным усилением, 18-фтордезоксиглюкоза-позитронно эмиссионная томография в сочетании с компьютерной томографией (КТ) и др. [104, 105]. В последние годы все большее внимание привлекают оптические методы, основанные на флуоресценции в ближнем инфракрасном (БИК) свете [111, 114]. Преимущества такого подхода - отсутствие необходимости дорогостоящего и громоздкого оборудования, высокое пространственное и временное разрешение, позволяющее проводить исследование *in vivo* в режиме реального времени, отсутствие пагубного воздействия, как например гамма-излучение, на пациента и персонал [13, 43]. 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 [20, 98]. Глубина визуализации при этом может достигать 3-4 см [49].

Клиническое значение изучения ЛС в хирургическом лечении рака легкого связано с попытками обнаружения «сигнальных» («сторожевых») ЛУ [69, 85, 91]. Теория сигнальных лимфатических узлов (СЛУ) подразумевает наличие регионарных лимфатических коллекторов, которые первыми поражаются

метастазами первичной опухоли [1, 16]. 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 [35, 36]. Причинами этого являются технические сложности выявления узлов, нередкие антракозные, поствоспалительные изменения в узлах, не всегда удовлетворительная интраоперационная визуализация зон лимфогенного метастазирования. Определенное значение имеют и особенности анатомии легкого, грудной полости. 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, ее объем [69, 71]. Все это подтверждает актуальность выявления и оценки СЛУ, а также определения путей регионарного лимфоотока от доли легкого при раке легкого. Знание о «сторожевом» характере узла может быть особенно полезным, так как позволит на одном лимфатическом узле сконцентрировать временные и материальные ресурсы иммуногистохимического и молекулярно-биологического исследования [2].

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 неэффективны. Для реализации флуоресцентной визуализации лимфатической системы необходимо разработать соответствующую аппаратуру и методики исследований, что и выполнено в рамках 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 БИК диапазоне и изучение путей оттока лимфы от легкого.

Задачи исследования

1. Разработать аппаратный комплекс для визуализации флуоресценции в БИК свете.
2. Оптимизировать концентрацию и состав раствора ИЦЗ для лимфографии в БИК диапазоне.
3. Определить особенности накопления ИЦЗ в патологической ткани
4. Разработать методику флуоресцентной лимфографии в экспериментальных условиях.
5. Изучить направление тока лимфы у оперированных больных немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) в зависимости от локализации первичной опухоли в той или иной доле легкого.

Научная новизна исследования

Разработана методика инфракрасной (ИК) флуоресцентной визуализации лимфатических сосудов и СЛУ в эксперименте и у пациентов НМРЛ с использованием первой отечественной экспериментальной системы «FLUM-808». Впервые оценено влияние раствора 20% 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 обеспечивающим 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, использовали современные методы обработки информации и статистического анализа с применением параметрических и непараметрических критериев. 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 проведённого 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.

Глава 1

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Лимфатическая система – анатомические и физиологические аспекты

ЛС - входит в состав сосудистой системы и развивается в тесной связи с венозной системой, что проявляется в сходных чертах строения (наличие клапанов, направление тока переносимой жидкости от тканей к сердцу). ЛС состоит из прелимфатического звена, лимфатических капилляров, посткапилляров, ЛУ, лимфатических сосудов и протоков. В ЛУ, расположенных по ходу лимфатических сосудов и являющихся биологическими и механическими фильтрами для протекающей сквозь них лимфы, она подвергается очищению [8].

ЛС в целом участвует в жидкостно-макромолекулярном равновесии интерстициального пространства. Основная функция – дренажная, которая определяется не только сбросом конкретного количества жидкости, но и «очищением» жидких сред от естественных и патологических макромолекул [7]. Лимфа (от лат. *lympha* — чистая вода) — жидкость, состоящая из лимфоплазмы, близкой по составу к плазме крови, но с меньшим содержанием белков, также она содержит форменные элементы — в основном лимфоциты. Возврат в кровеносное русло осуществляется благодаря лимфовенозным сообщениям на разных уровнях. Основное лимфовенозное сообщение располагается между грудным протоком и левым венозным углом, образованный левой подключичной и левой внутренней яремной венами. Совместно с интерстициальной жидкостью в кровеносное русло возвращаются белки, электролиты, витамины, продукты метаболизма. Тем самым лимфатическая система участвует в энергетическом и пластическом обмене веществ и метаболизме жирорастворимых витаминов (А, Е, К), которые сначала

всасываются в лимфу, а затем поступают в кровь. Барьерная функция осуществляется за счет лимфоузлов, задерживающих инородные частицы, микроорганизмы и опухолевые клетки (метастазирование в лимфоузлы). Иммунная функция осуществляется за счет образующихся в лимфоузлах плазматических клеток, вырабатывающих антитела. Кроме того, в них находятся Т- и В-лимфоциты, отвечающие за иммунитет. ЛС принимает участие в жировом обмене. Эмульгированные жиры из кишечника после всасывания поступают в лимфатические сосуды, затем в кровеносную систему и в жировые депо в виде хиломикронов.

Необходимость оценки состояния компонентов ЛС существует у врачей различных специальностей. Для визуализации любой сосудистой системы зачастую необходимо использование контрастного вещества, которое вводится обычно внутривенно. В настоящий момент отсутствует методика контрастирования и визуализации ЛС. Дерма кожи пронизана слепо заканчивающимися лимфатическими прекапиллярами, которые служат входным порталом для микроэлементов, клеток, межтканевой жидкости [32]. Лимфодренаж из прекапилляров осуществляется посредством более глубоких собирающих сосудов, которые содержат клапаны для однонаправленного тока лимфы. Сосуды окружены гладкомышечными клетками, которые ритмично сокращаются, чтобы продвигать лимфу в направлении ЛУ.

Существует четыре различных пути введения контрастных агентов в лимфатическое пространство:

1. Внутрикжно для доставки в лимфатические сосуды через лимфатическое сплетение в дерме;
2. В подкожную жировую клетчатку для проникновения в лимфатические капилляры и сосуды;
3. Непосредственное введение агентов в лимфатическое пространство через катетеризацию лимфатических сосудов;

4. Внутривенно для транзита из сосудистого пространства в интерстициальное пространство с последующим проникновением в ЛС[88].

Пути введения контрастного вещества в лимфатическую систему показаны на рисунке 1.

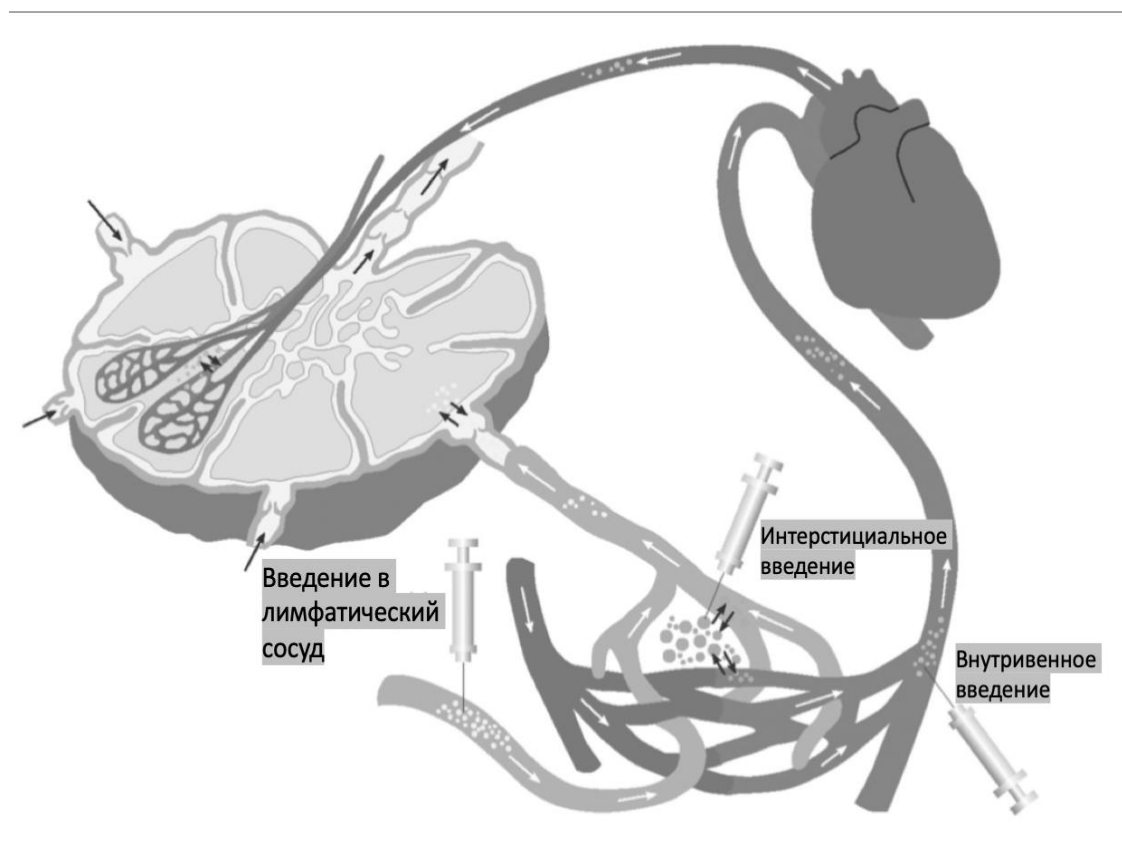


Рисунок 1 – Пути введения контрастных веществ в лимфатическую систему: внутрикожное (внутрикожное или подкожное); в канюлированный лимфатический сосуд; внутривенное введение[23]

1.2 Методы изучения лимфатической системы

Введение специальных лимфотропных красителей, способных проникать из ткани в просвет лимфатических капилляров, таких как изосульфат синий, проявило себя, как возможный метод исследования ЛС и позволило определить путь оттока лимфы от различных мест введения в эксперименте. Однако в ходе клинических исследований стало ясно, что происходит диффузное окрашивание опухоли, соединительной и жировой ткани, что затрудняет работу,

исследователя. Недостатком является и низкая избирательность накопления контраста, что снижает точность диагностики [17].

Методы, основанные на рентгеновском излучении, ультразвуке, магнитном резонансе позволяют визуализировать ЛУ и лимфатические сосуды только крупного диаметра, и требуют введения контрастных веществ. Отрицательными сторонами является: высокая стоимость исследований и комплектующих, нежелательные побочные реакции в месте введения контраста и частые системные реакции на него. Низкая информативность исследований существенно ограничивает их использование в клинических и экспериментальных исследованиях.

Наиболее распространенным методом визуализации ЛС является радиоизотопная лимфосцинтиграфия. В 1993 году с целью определения путей оттока лимфы при раке молочной железы и меланомы J.C. Alex, D.N. Krag предложили использовать радиоактивный лимфотропный коллоид, способный проникать сквозь стенку лимфатических капилляров. Этот коллоид накапливается в лимфатических узлах и при помощи стационарного гамма-томографа или портативного гамма-сканера проводится диагностика [21, 54]. К недостаткам можно отнести отсутствие четкой визуализации структур ЛС, не все клиники обладают подобным техническим оснащением и ресурсами для проведения сцинтиграфических исследований. Кроме того, применение радиоизотопа сопровождается определенным риском для больного и медицинского персонала, контактирующего с материалом.

Таким образом, в настоящий момент не существует оптимального метода позволяющего прижизненно в норме и при патологии изучать ЛС, что заставляет разрабатывать другие методы исследования.

1.3 Инфракрасная флуоресцентная визуализация лимфатической системы

В последнее время все большее внимание исследователей привлекают оптические методы, основанные на флуоресценции, основным принципом

которого является поглощение света одной длины волны и ответное излучение света другой длины волны. Процесс флуоресцентного излучения происходит, когда падающий фотон резонансной энергии поглощается молекулой, находящейся в равновесном состоянии. Флуоресценция обусловлена высвобождением энергии, необходимой для обратного возвращения в основное состояние молекулы. Высвобождается энергия в виде фотонов, которые имеют длину волны в видимом диапазоне (400–700 нм) или в области БИК спектра (700–900 нм) [88].

В методе флуоресцентной микролимфангиографии, которая проводится в видимой области спектра, в качестве флуоресцентного красителя используется флуоресцеинизотиоцианат-декстран. Результаты флуоресцентной лимфангиографии после интрадермального введения 10 мкл 25% изотиоцианата флуоресцеина передней брюшной стенки (А) и предплечья (В) у больной раком молочной железы после мастэктомии и подмышечной лимфодиссекции продемонстрированы на рисунке 2.

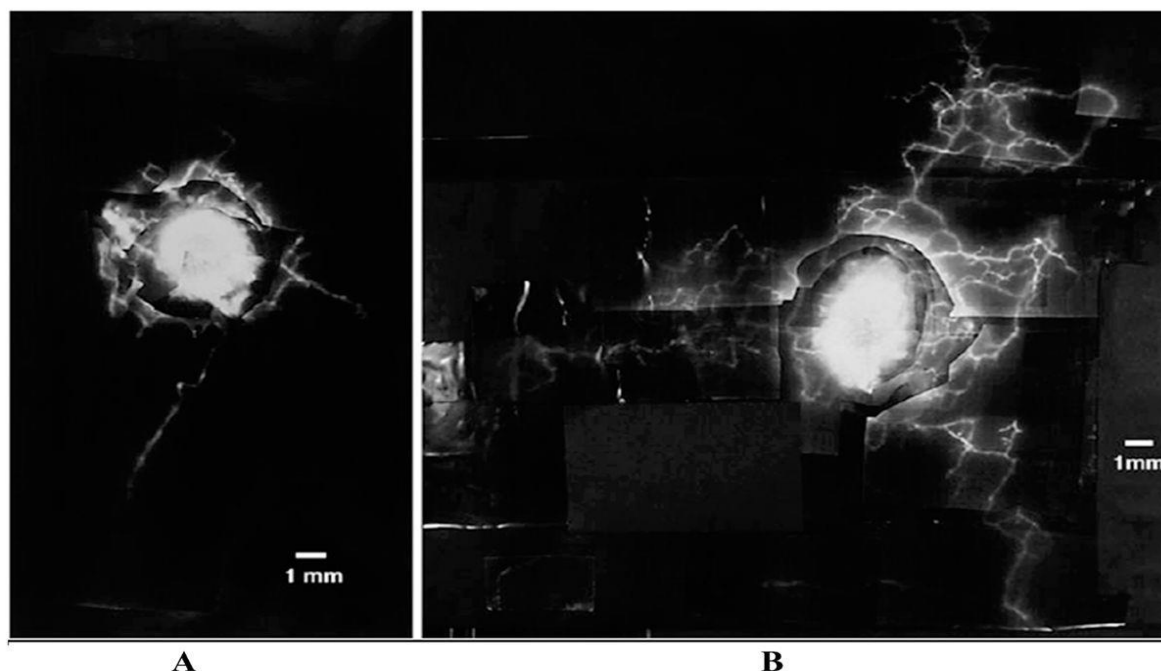


Рисунок 2 – Результаты флуоресцентной лимфангиографии после интрадермального введения 10 мкл 25% изотиоцианата флуоресцеина передней брюшной стенки (А) и предплечья (В) пациентки после подмышечной лимфодиссекции по поводу рака молочной железы[88]

При наиболее высоком пространственном разрешении (около 50мкм), метод позволяет визуализировать лимфатические капилляры на глубине не более 100 -150 мкм. Этот недостаток можно преодолеть переходом к визуализации в БИК-область спектра (700–900нм), где глубина проникновения в биологическую ткань существенно увеличивается благодаря меньшему поглощению гемоглобином и меланином и ослаблению потерь, обусловленных рассеянием света внутри ткани. [63, 88]. При этом в качестве флуоресцирующего красителя используется разрешённый для клинического использования препарат – ИЦЗ. Коммерчески доступный в виде лиофилизата, он с недавних пор применяется в разных областях хирургии благодаря сильному поглощению в БИК области спектра, низкой токсичности и быстрому выведению его из организма [20,39]. С его помощью осуществляют визуализацию желчных протоков, определяют качество кровоснабжения тканевых и органных трансплантатов, состоятельность сосудистых анастомозов. Преимущество метода заключается также в высокой контрастности получаемых изображений, высокой чувствительности, возможности работы в помещениях без затенения, его безопасности для больного и персонала, простоте применения [19, 22]. Важной особенностью методики является то, что в организм вводится гораздо меньшее количество ИЦЗ, чем при использовании его в качестве красителя. ИЦЗ быстро мигрирует по лимфатическим сосудам, накапливаясь в ЛУ.

Уникальные возможности визуализации движения флуоресцирующего агента по лимфатическим сосудам описаны в экспериментальном исследовании R. Sharma et al. на свиньях после внутрикожных инъекций 200 мкл ИЦЗ[87].

В клиническом исследовании визуализации ЛС в БИК-спектре T. Kitai et al. [58] описали методику лимфографии после подкожного введения 25 мг ИЦЗ у больных раком молочной железы и при помощи данной методики получили информацию о путях распространения лимфы, что показано на рисунке 3.

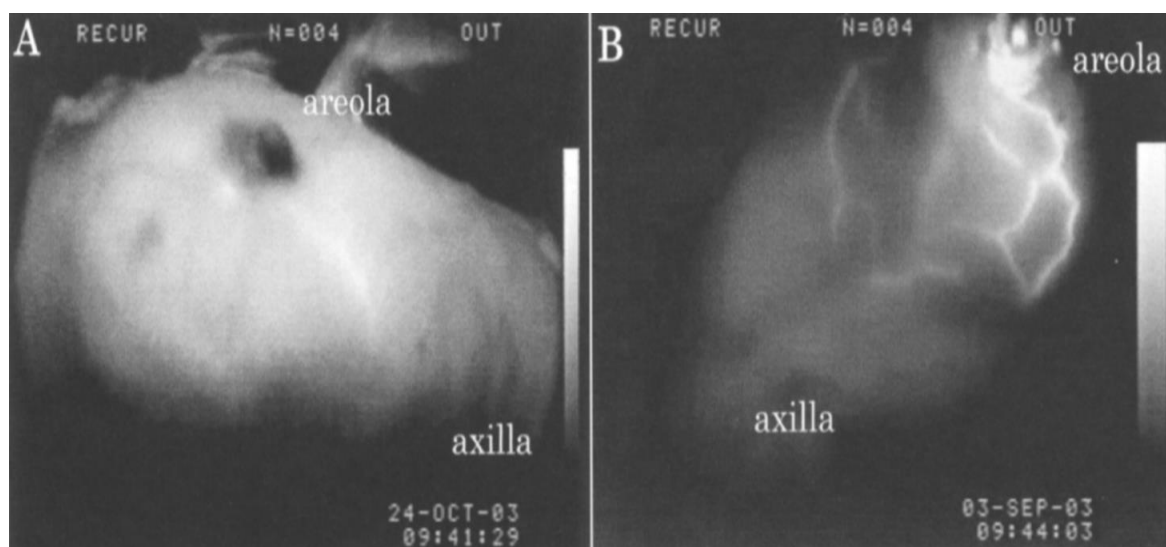


Рисунок 3 –Результаты лимфографии у больных раком молочной железы. Пути распространения флуоресцирующего ИЦЗ по подкожным лимфатическим сосудам от ареолы в направлении подмышечных ЛУ[58]

При использовании данной методики авторы установили пути лимфооттока и локализацию СЛУ, что определило место для доступа с целью последующей биопсии.

N. Unno et al. [99] использовали флуоресценцию ИЦЗ для определения состояния ЛС у пациентов с лимфедемой. В исследовании выполняли подкожные инъекции 1 мг ИЦЗ в тыльной части стопы и регистрировали расширенные лимфатические сосуды, реверсивный ток лимфы и накопление красителя в тыльной и подошвенной частях стопы, что не наблюдалось на здоровой конечности (рисунок 4).

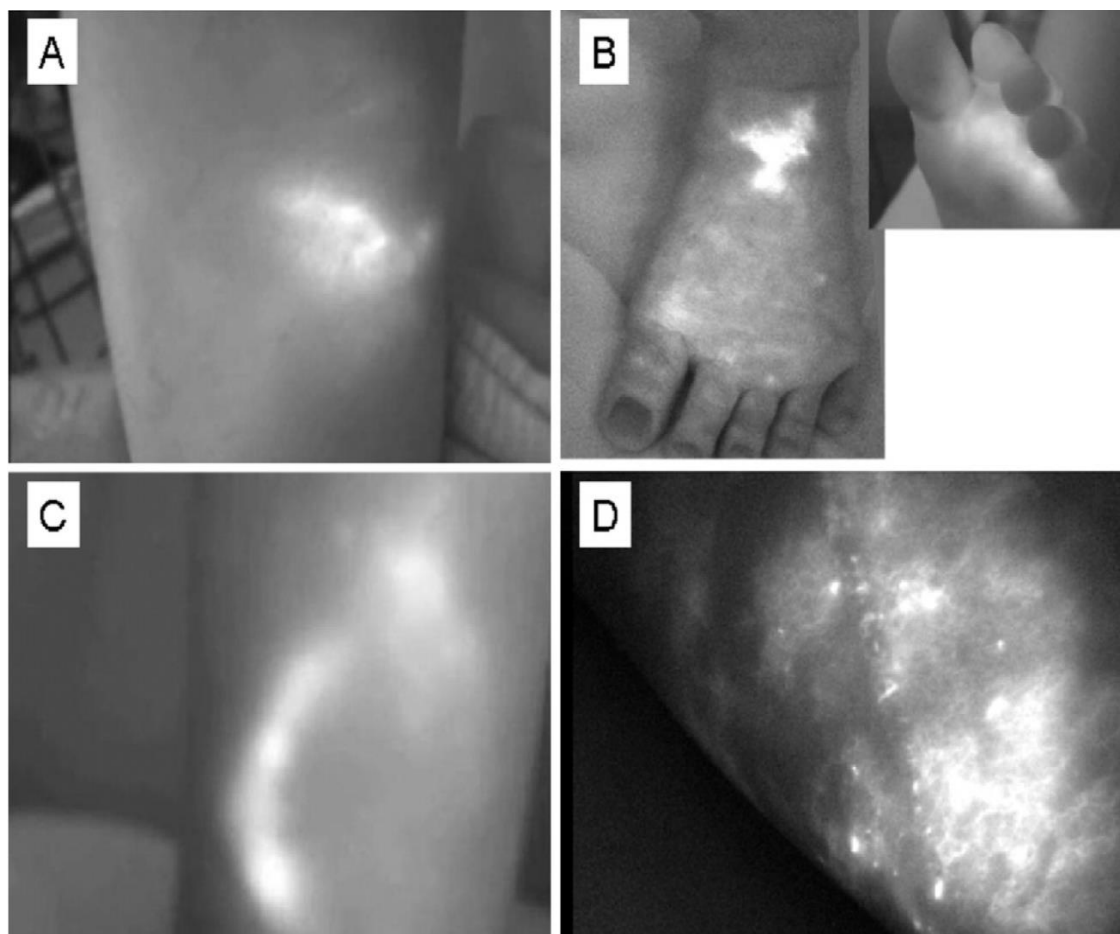


Рисунок 4 –Результаты флуоресцентной лимфографии у пациентов с вторичной лимфэдемой А - обратный кожный ток. В - Расширенные флуоресцентные изображения на тыльной и подошвенной области стопы. С - расширенные лимфатические каналы с проксимальной облитерацией. D – диффузная флуоресценция [37]

К настоящему времени разработаны и внедрены ряд технических средств для улавливания и визуализации флуоресценции. Часть из них предназначена для проведения открытых полостных операций [37]. В этом случае устройства оснащаются специализированными штативами, позволяющими располагать детекторную часть аппаратуры над операционным полем и ею манипулировать. Возможность проникновения инфракрасного излучения в глубину ткани способствует применению этих приборов также для визуализации СЛУ через кожу [72]. Для решения микрохирургических задач в состав прибора включают операционные микроскопы [30, 39], а при проведении минимально инвазивных операций – эндоскопы [44, 100]. Кроме того, для визуализации ИК

флуоресцентного изображения, невидимого невооруженным глазом, требуются специальные телевизионные камеры, а для отображения - мониторы. Поскольку исходная картина распределения ИЦЗ в ткани монохромная, они могут быть черно-белыми [52,70, 95]. Однако для правильной ориентации в операционном поле хирургу требуется одновременно с ИЦЗ-изображением видеть обычную картину (в белом свете). Для этого используются различные технические приемы, позволяющие отображать на одном цветном экране и флуоресцентное изображение, и изображение в белом свете [28,44]. Специфические требования предъявляются также к источникам освещения – они должны обеспечивать освещение объекта инфракрасными лучами достаточно высокой плотности мощности и спектральной чистоты, что необходимо для возбуждения относительно слабой ИЦЗ флуоресценции. Для этих целей в основном используются ИК светодиоды и полупроводниковые лазеры с длиной волны излучения около 800 нм [52, 60].

1.4 Концепция сторожевых лимфатических узлов при онкологических заболеваниях

Концепция СЛУ базируется на двух основных принципах:

- 1) существование упорядоченного и предсказуемого дренажа лимфы в региональные ЛУ;
- 2) функционирование первого (сторожевого) ЛУ как эффективного фильтра для опухолевых клеток [55].

Из этого, теоретически, следует, что если СЛУ не поражены метастатическим процессом, то и все остальные регионарные лимфоузлы должны быть интактны. Интраоперационное выявление СЛУ может позволить ограничить объем лимфодиссекции у пациентов без поражения лимфоузлов [3]. Также биопсия выявленных СЛУ дает возможность их досконального изучения путем целенаправленного применения наиболее чувствительных патоморфологических и молекулярных методов для обнаружения их микрометастатического поражения, определения тактики лечения и прогноза.

1.5 Сторожевой лимфатический узел: историческая справка

Развитие концепции о СЛУ базируется на работах R.Virchow, который высказал мысль, что лимфатические узлы являются первым барьером на пути распространения опухоли, и W.Halsted, разработавшего технику радикальной мастэктомии [46]. Накопленный в последующем опыт свидетельствовал, что широкое иссечение клетчатки с лимфатическими коллекторами при многих первичных опухолях увеличивает частоту интра- и послеоперационных осложнений [4]. В связи с этим, некоторые исследователи предлагали выполнять лимфодиссекцию только при наличии метастазов и избегать так называемой профилактической диссекции. Для определения барьерной функции ЛУ исследователи вводили инородные вещества или опухолевые клетки в определенные лимфатические протоки и узлы. Изучая брыжейку собак и кроликов, R.K. Gilchrist наблюдал задержку суспензии угля в лимфоузлах [37]. I. Zeidman и J.M. Buss вводили окрашенные клетки карциномы в ЛУ подколенной группы у кроликов [105] и обнаружили, что эмболы опухолевых клеток накапливались в субкапсулярных пазухах узлов и не распространялись на следующие узлы в течение, как минимум, трех недель. Впервые концепцию СЛУ применил в клинической практике E.A. Gould в 1951 году у больных раком околоушной железы. Интраоперационное исследование ЛУ, располагающихся в области слияния передней и задней лицевых вен, стало руководством для решения вопроса о проведении радикальной лимфодиссекции при удалении околоушной железы [42]. R.M. Cabanas одним из первых широко применял концепцию СЛУ в клинической практике после того, как ему удалось идентифицировать первый лимфатический узел, через который оттекала лимфа от опухоли полового члена. Он подтвердил эту концепцию путем сопоставления результатов гистологического исследования СЛУ с отдаленными результатами. У 40 пациентов раком полового члена без вовлечения СЛУ пятилетняя выживаемость составила 90%, что оказалось достоверно выше, чем у пациентов с метастазами в «сторожевые» и другие лимфоузлы - 50% [25]. Труды R.M.

Cabanas стали основой методики интраоперационного выявления СЛУ при помощи лимфографии с применением метиленового синего [57] и радиоактивного коллоида серы [29].

Термин «сторожевой» ЛУ ввели L. Weissbach и E.A. Boedefeld в 1987 г. в процессе изучения возможности, ограниченной лимфодиссекции при раке яичка [101].

Концепция СЛУ, в том виде, в каком обсуждается сегодня, стала популярна после публикации работ D.L. Morton et al. в 1989 г. Они провели пилотные исследования с использованием синего красителя на кошках и затем применили методику в клиническом исследовании у пациента с меланомой [73]. Полученные результаты свидетельствовали, что биопсия и исследование СЛУ достаточно точно характеризовали степень лимфогенного распространения опухоли. Вскоре эта методика была применена у больных раком молочной железы [40]. Последующие исследования подтвердили значение биопсии СЛУ для выявления больных с высоким риском местного рецидива и метастазирования.

Большую роль в развитии техники выявления и биопсии СЛУ при новообразованиях разных первичных локализаций сыграли сотрудники онкологического центра Джона Уэйна (John Wayne Cancer Center). К 1998 году группа исследователей из этого центра опубликовала результаты применения концепции СЛУ при опухолях пищеварительного тракта, молочной железы, щитовидной железы, гинекологических опухолях, плоскоклеточном раке головы и шеи [21, 23, 40, 59, 73]. СЛУ удалось выявить, в целом, у 96% пациентов, что стало стимулом для широкого применения метода в других центрах при различных опухолях [23].

1.6 Определение сторожевых лимфатических узлов при немелкоклеточном раке легкого

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. Причинами этого являются технические сложности выявления узлов, нередкие антракозные поствоспалительные изменения, не всегда удовлетворительная интраоперационная визуализация зон лимфогенного метастазирования. Определенное значение имеют и особенности анатомии легкого, грудной полости.

Наличие метастазов в лимфатических узлах является наиболее важным прогностическим фактором при локализованной форме НМРЛ [7]. В случае вовлечения в опухолевый процесс ЛУ можно ожидать снижение выживаемости в два раза по сравнению с больными N0. По мнению многих онкологов, адъювантная химиотерапия рекомендована всем пациентам с гистологически верифицированным поражением ЛУ после радикального оперативного лечения. Все это подтверждает актуальность выявления и оценки СЛУ при раке легкого.

Дренаж лимфы из легкого крайне разнообразен и не всегда точно определяем. К примеру, не менее чем в 20% наблюдений СЛУ могут находиться не в корне легкого, как можно было бы предположить, а в средостении (N2). При этом поражение лимфоузлов группы N1 может отсутствовать [82,94]. С другой стороны, даже если ЛУ удален правильно, рутинное гистологическое исследование далеко не всегда может выявить наличие в нем метастазов и, особенно, так называемых «микрочелюстных метастазов» (метастазы до 2 мм в диаметре) [61]. Около 16% больных раком легкого с гистологически неверифицированным поражением узлов и до 27% пациентов аденокарциномой легкого размером до 1 см имеют признаки именно микрочелюстного поражения СЛУ [61]. В этом аспекте знание о «сторожевом» характере узла может быть особенно полезным, так как позволит на одном ЛУ сконцентрировать временные и материальные

ресурсы иммуногистохимического и молекулярно-биологического исследования. Главная же причина, из-за которой концепция СЛУ не реализуется при раке легкого – отсутствие высокоинформативных методов визуализации.

1.6.1 Применение красителей

К настоящему времени предложены несколько методик с использованием красителей для выявления СЛУ при НМРЛ [66, 75, 92].

В 1999 году A.G.Little первым сообщил об интраоперационном окрашивании лимфоузлов при раке легкого с использованием специального лимфотропного красителя изосульфана синего [66]. К сожалению, уровень определения СЛУ был клинически незначим - 47%.

K.Sugi et al.(2003) изучали возможность красителя ИЦЗ, однако уровень идентификации СЛУ оказался еще ниже - 6,3% [92].

В японское исследование N.Ito et al.(2004) включено 38 пациентов раком легкого cN0. После торакотомии вокруг опухоли инъекционно вводилось 5 мл ИЦЗ и 400 ЕД гиалуронидазы, затем интраоперационно определяли окрашенные ЛУ. СЛУ были выявлены интраоперационно макроскопически лишь у 7 (18,4%) больных, при этом визуализация путей лимфооттока была достигнута у всех пациентов [51].

В настоящее время красители с целью диагностики СЛУ не применяются в связи с низкой степенью их идентификации.

1.6.2 Применение радиоактивных веществ

M. Liptay et al. в 2000 году впервые описали технику определения СЛУ при НМРЛ с помощью радиоизотопов [64]. После торакотомии вокруг опухоли в легочную ткань вводили коллоид серы меченый изотопом технеция (Tc^{99}) с радиоактивностью 2 милликюри через фильтр с порами 20 нанометров. Оценка степени радиоактивности первичной опухоли, так и ЛУ осуществлялась с помощью ручного гамма-счетчика. Выполнялась анатомическая резекция с лимфаденэктомией «меченых» узлов, СЛУ определялся как узел любой

локализации с уровнем радиоактивности в 3 раза выше, чем фоновые измерения в области грудной клетки. Среднее время миграции изотопа до СЛУ составило 63 минуты (диапазон 23-170 минут). СЛУ удалось выявить у 87% пациентов. Примерно у трети больных с выявленными СЛУ эти узлы оказались единственными, содержащими метастазы. Чувствительность метода в определении степени лимфогенного метастазирования составила 82%, а уровень ложноотрицательных результатов - 5,4%. Авторы отметили, что 25% выявленных СЛУ оказались лимфоузлами группы N2 [74]. Относительный успех исследования эффективности радионуклидного метода определил проведение многоцентрового изучения интраоперационного применения Tc^{99} при раке легкого у больных с I стадией. К сожалению, сложности с набором пациентов и низкая выявляемость СЛУ у включенных в исследование (51%) не позволили завершить эту работу [65]. Исследователи отмечали сложность организации применения радиоизотопов, наличие ложноположительного сигнала от места введения и др. Стало ясно, что необходима разработка другого метода обнаружения СЛУ в грудной полости.

Исходя из предположения, что лимфатические протоки могут повреждаться при самом введении радиоизотопа, а также при диссекции структур корня легкого, некоторые авторы разрабатывали методику предоперационной перитуморальной инъекции препарата под контролем компьютерной томографии (КТ), а также трансбронхиального введения радиоизотопа. Н. Nomogі в 2009 году предложил технику предоперационного введения от 6 до 8 милликюри меченного Tc^{99} коллоидного олова в одну точку перитуморальной области под контролем КТ с последующим интраоперационным обнаружением СЛУ с помощью счетчика Гейгера [78]. Результаты оказались схожими с результатами работ М. Liptau. Выявляемость СЛУ составила 81%. D. Lardinois et al. изучали методику предоперационного трансбронхиального введения радиофармпрепарата в группе из 20 пациентов с T1-3 N0-1 NMPЛ. Информативность метода составила 95%, а осложнений,

связанных с процедурой, не наблюдалось [62]. Расширение показаний к применению радиоактивных препаратов привело к организационным и правовым сложностям. Например, в Японии запретили применять радиоизотопы в операционной комнате [38]. Были описаны осложнения предоперационного введения препарата, такие как кровотечения, пневмоторакс и т.д. [38]. Следует отметить, что применение радиоизотопа сопровождается существенным риском для медицинского персонала, больного, патоморфолога. Для большого количества больных раком легкого этот метод вряд ли может считаться приемлемым. До настоящего времени опубликовано очень небольшое число работ по выявлению СЛУ при раке легкого. Результаты исследований чрезвычайно противоречивы. В 2013 году представлен мета-анализ 47 исследований [93]. Средний уровень обнаружения СЛУ при использовании красителей составил 64,4%, а при использовании радионуклидных методик – 84,4%. Максимальной оказалась чувствительность при сочетании применения красителя и радиоизотопа, достигая 95%, однако такая технология достаточно сложно воспроизводима, причем разброс информативности оказался очень большим. К примеру, F.E. Schmidt et al. применили интраоперационное введение и красителя (метиленовый синий), и радиоизотопа, частота идентификации СЛУ составила 81% [84]. O. Tiffet et al. также исследовали комбинацию этих методов, но обнаружили СЛУ лишь у 13 из 24 пациентов (54%) [96]. Такой комбинированный подход должен иметь преимущества, так как с одной стороны, визуализация красителя в антракозных лимфоузлах может быть затруднительна, а с другой, в силу анатомических особенностей подвести счетчик Гейгера к некоторым зонам в грудной полости достаточно сложно. Авторы мета-анализа справедливо делают вывод о необходимости поиска новых путей выявления СЛУ [93].

1.6.3 Применение флуоресцентной диагностики

Надежды на развитие концепции СЛУ при раке легкого в настоящее время связаны с применением методов флуоресцентной диагностики [93,96]. Методика ИК флуоресцентной визуализации ИЦЗ в лимфатических сосудах и ЛУ предложена Н. Limand N. Soter еще в 1993 г. [62]. Однако клиническое использование метода начато совсем недавно. S. Yamashita et al. в 2011 году представили результаты применения флуоресцентной ИЦЗ диагностики СЛУ при раке легкого I стадии [102]. Раствор ИЦЗ инъецировался вокруг опухоли в количестве 2 мл в концентрации 5 мг/мл. Выявляемость СЛУ составила 81% у 31 пациента. В среднем, визуализировались 1,3 СЛУ на пациента. Только у одного пациента выявленный при флуоресценции СЛУ был визуализирован макроскопически в белом свете.

Американские исследователи D.M. Gilmore et al отмечают простоту методики флуоресцентной визуализации ИЦЗ, отсутствие недостатков, характерных для применения радиоизотопного метода, а также сопоставимую с ним выявляемость СЛУ. Раствор ИЦЗ в различных концентрациях вводился в четырех точках вокруг опухоли у 33 больных НМРЛ I и II стадии. Информативность оказалась максимальной при большей из сравниваемых концентраций введенного ИЦЗ (2,5 мг – 100%). У 15 пациентов идентифицировано 26 СЛУ, при этом семь из них были из группы N2. Из 26 СЛУ в семи были обнаружены метастазы. Ни у одного из пациентов без метастатического поражения СЛУ метастазы в других ЛУ выявлены не были [38]. Авторы, однако, акцентируют внимание на необходимости тщательного анализа методики, ставят вопрос о кратковременной искусственной вентиляции легкого после инъекции ИЦЗ для лучшего его распространения по лимфатическим сосудам; необходимости выждать до 5 минут после инъекции для профилактики повреждения лимфатических протоков и др.

Глава 2

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Изучение особенностей накопления индоцианина зеленого в опухолевой ткани в эксперименте

Экспериментальная работа на животных проводилась с 2016 – 2018 год на кафедре клинической анатомии и оперативной хирургии имени профессора М.Г. Привеса ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова. Опыты выполнялись на 18 крысах-самцах линии Вистар массой 200-250г, 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). После депиляции правого и левого бедра, под кожу правого бедра, инъецировался гомогенат ткани лимфосаркомы Плиса (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. Все крысы разделены на 3 группы по 6 в каждой в зависимости от состава введенного раствора, что продемонстрировано в таблице 1.

Таблица 1 – Группы крыс и состав введенного раствора

Группа 1 (6 крыс)	Группа 2(6 крыс)	Группа 3(6 крыс)
Раствор ИЦЗ в дистиллированной воде	Раствор ИЦЗ в бычьей сывороточном альбумине (БСА) в весовом отношении ИЦЗ/ БСА = 1:40	Раствор ИЦЗ в 20% растворе альбумина человека

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), рассчитывался диагностический контраст $K = F_0/F_3$ (F_0 – яркость флуоресценции в зоне поражения, F_3 – яркость флуоресценции в контрольной зоне).

2.2 Разработка методики ближней инфракрасной лимфографии в эксперименте

Работа проводилась на 7 кроликах-самцах породы Шиншилла (ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово» НИЦ «Курчатовский институт»), массой $3,0 \pm 0,1$ кг.

У пяти кроликов с целью 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 вводили альбуминовый раствор ИЦЗ (0,01-0,02 мл, 0,1мг/мл) в эпидермальный слой кожи в различных анатомических зонах. Во время инъекции препарата с помощью системы «FLUM-808» регистрировался его ток по лимфатическим сосудам и накопление в лимфатических коллекторах, проводилась фото- и видеосъемка.

С целью изучения лимфооттока легких двум кроликам в качестве премедикации внутримышечно вводили 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 стенки и брюшной полости. 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» визуализировали 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.

Используя систему FLUM-808, визуализировали лимфоотток от места введения флуоресцирующего контраста, а также зоны его локального накопления на отдалении. Подобные участки выделяли острым путем и направляли на патоморфологическое исследование. Проводилась фото- и видеосъемка.

2.3 Клиническое исследование. Характеристика пациентов с немелкоклеточным раком легкого

Включение пациентов в клиническую часть работы осуществлялось проспективно на базе онкологического отделения №4 (торакальной хирургии) НИИ хирургии и неотложной медицины ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ в период с сентября 2015 по январь 2019 года.

Критериями для включения в исследование явились: возраст больного старше 18 лет; наличие у больного гистологически верифицированного НМРЛ; проведение анатомической резекции легких с регионарной ипсилатеральной лимфодиссекцией.

Критерии исключения: отказ больного от участия в исследовании.

Принципы Хельсинкской декларации 2013 г. были соблюдены. Перед включением в исследование у пациентов получено информированное согласие. Протокол клинического обследования утвержден локальным этическим комитетом Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета имени академика И. П. Павлова.

Критериям включения соответствовали 92 больных НМРЛ.

Средний возраст больных, включенных в исследование, составил $63,2 \pm 6,3$ лет. Среди пациентов было 52 мужчины (59,8%) и 40 женщин (40,2%) (таблица 2).

Все больные, в соответствии со стандартами всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), условно были разделены на три возрастные группы: молодой возраст – до 40 лет, зрелый – 40 – 59 лет и пожилой – старше 60 лет. Большая часть пролеченных больных – 68,4% – входила в возрастную категорию 40–59 лет (см. таблицу 2).

Таблица 2 – Распределение больных раком легкого по полу и возрасту

Пол	Возраст, лет			Всего
	до 40	40–59	60 и старше	
Мужчины	5	13	34	52
Женщины	2	9	29	40
Всего	7	22	63	92
Частота	8%	24%	68%	100%

Курение в анамнезе имело место у 65 больных (70,6%). Большинство некурящих были женщинами (всего некурящих пациентов 27 – 18 женщин и 9 мужчин). Сопутствующая хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) диагностирована у 69 больных (75%), причем женщин с подобной патологией было 18 (42,8% от общего числа лиц женского пола).

Основными жалобами больных были одышка (53 пациента, 57,6%), кашель (41 пациент из 92, 44,5%), кровохарканье (4 пациента, 4,3%). Общие симптомы интоксикации, слабость, похудание, повышение температуры тела и другие имели место у 12 (13%). У 32 пациентов (34,7%) жалоб на момент постановки диагноза не было, заболевание было выявлено случайно при рентгенологическом обследовании (скрытое течение).

Опухоль локализовалась в правом легком у 39 пациентов (42,3%), в левом – у 53 больных (57,7%).

На рисунке 5 приведено распределение больных согласно гистологическому варианту рака легкого.

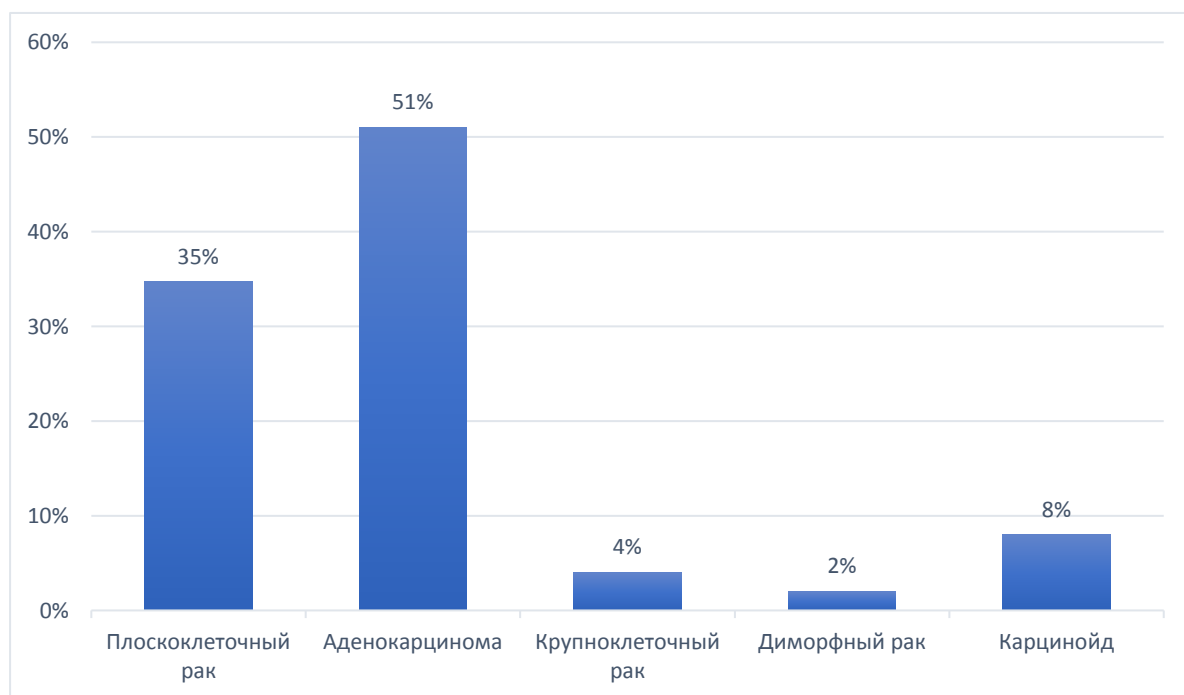


Рисунок 5 – Распределение больных согласно гистологическому варианту рака легкого, в % к общему числу пациентов, включенных в исследование

Сопутствующие заболевания отмечены у 68% больных, причем чаще всего это были хронические заболевания органов дыхания и сердечно-сосудистая патология.

Классификация больных по стадиям злокачественного новообразования легкого осуществлялась согласно Международной системе стадирования рака легкого 7 редакции (2009).

На рисунке 6 представлено распределение больных по стадиям рака легкого.

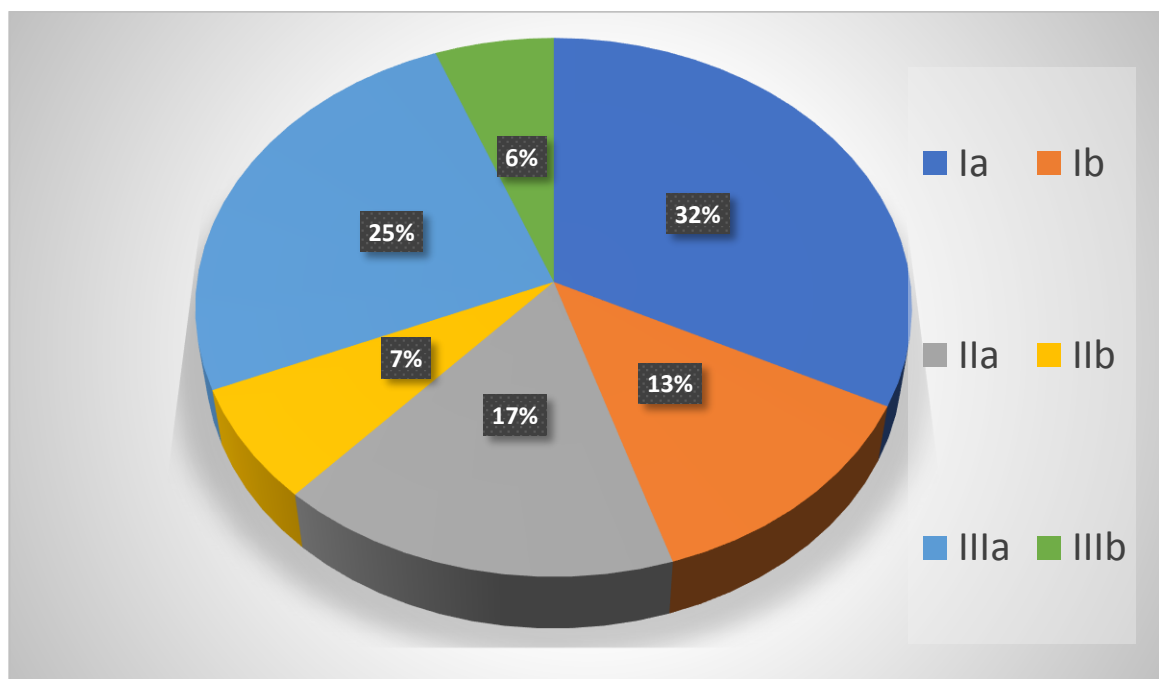


Рисунок 6 –Распределение больных по стадиям рака

Подробная характеристика больных, включенных в исследование, представлена в соответствующих разделах главы 5.

2.4 Методы обследования больных

У всех больных при поступлении в клинику и в динамике в процессе лечения выполняли общеклинические исследования.

Лучевые методы исследования включали в себя рентгенографию органов грудной клетки в двух проекциях, КТ органов грудной клетки в ангиорежиме.

Видеотрахеобронхоскопия с помощью приборов «Olympus» и/или «Pentax», в зависимости от поставленных задач, производили всем пациентам. Биопсия выполнялась при визуализации опухолевого роста в бронхах с

помощью инструментария как механического захвата, так и захват-коагуляции с подключением блока электрохирургии.

Поиск отдаленных метастазов осуществлялся с помощью УЗИ органов брюшной полости, ЛУ шейно-надключичной области, КТ органов брюшной полости в ангиорежиме. Магнитно-резонансная томография головного мозга и радионуклидное исследование скелета применялись в основном при наличии клинических проявлений возможного метастатического процесса.

Функция внешнего дыхания, шестиминутный тест, кардио-респираторное тестирование выполняли с целью уточнения функциональной операбельности и оценивалась у всех пациентов. Всем пациентам производилась эхокардиография с определением показателей гемодинамики.

2.5 Методика исследования лимфатических узлов

Сразу после торакотомии или введения в плевральную полость троакаров при торакоскопии конъюгат ИЦЗ с 20% АЧ в количестве 3 мл и концентрации 0,1 мг/мл вводился перитуморально в 3-4 точках. 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 7).



Рисунок 7 – Регистрация флуоресценции ИЦЗ в ЛУ бифуркационной группы (№7), стрелкой отмечено место накопления ИЦЗ и его флуоресценция в ИК свете

Все ЛУ, которые флуоресцировали, расценивались как СЛУ. Производилось сопоставление локализации первичной опухоли в той или иной доле легкого и локализации СЛУ, оценка наличия метастазов в регионарных ЛУ, в том числе и в СЛУ. Изучение групп ЛУ проводилось согласно классификации T. Naruke et al. [76] в модификации C. Mountain and C. Dresler [74].

2.6 Методы статистического анализа результатов исследования

Статистическая обработка полученных результатов производилась с помощью точного теста Фишера, с использованием критерия X^2 , критерия Стюдента при наличии нормального распределения, теста Mann-Whitney при отсутствии такового. Разница значений анализируемых показателей признавалась статистически достоверной при уровне $p < 0,05$. Расчеты выполнялись с использованием статистической программы BMDP Medical Statistical-Software (Los Angeles, CA).

Глава 3

ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ ИНФРАКРАСНОЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ЛИМФАТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ

3.1 Аппаратное обеспечение

Исследования компонентов ЛС проводили с помощью первой отечественной экспериментально/инструментальной системы «FLUM-808», разработанной в Первом Санкт-Петербургском государственном медицинском университете им. акад. И. П. Павлова (П СПб ГМУ им. И.П. Павлова), которая предназначена для решения широкого круга биомедицинских задач, в том числе методами флуоресцентной диагностики в БИК области как в эксперименте, так и в клинических условиях. Разработка системы длилась несколько лет, причем ее совершенствование и доработка проводились с учетом проводимых регулярно экспериментальных исследований на кафедре клинической анатомии и оперативной хирургии, что соответствовало принципам трансляционной медицины, реализуемым в П СПб ГМУ им. И.П. Павлова.

Как отмечено выше, для визуализации в ИК области требуется специальная аппаратура. В настоящее время имеются коммерчески доступные системы, а также продолжаются работы над созданием экспериментальных образцов. Для работы с мелкими животными применяется мультиспектральная система визуализации Caliper IVIS Lumina II производства Perkin Elmer [86.1]. Спектральная селекция осуществляется набором полосовых интерференционных светофильтров, среди которых предусмотрены фильтры для работы с ИЦЗ. Из-за большого времени экспозиции обусловленного слабой яркостью используемого источника возбуждающего излучения (галогенная лампа) изображения можно регистрировать только в виде фотографий, что неприемлемо для клинических условий.

Условиям клинического использования соответствует система FLARE, с помощью которой выполнен широкий круг исследований в области ИК флуоресцентной диагностики [49]. В выносной головке системы, которая подвешивается над операционным столом, расположены две монохромные телевизионные (ТВ) камеры и одна цветная. Там же находится комбинированный светодиодный осветитель, включающий светодиоды с длинами волн излучения 670 и 760 нм, предназначенные для возбуждения флуоресценции, и белые светодиоды для проведения обычного наблюдения. Спектральный состав излучений, воспринимаемых монохромными камерами, определяется двумя полосовыми фильтрами (689–725 и 800–848 нм). Разделение излучения по ТВ каналам осуществляется дихроичным светоделителем. Система может проводить одновременный захват всех трех изображений в режиме реального времени с разрешением 640×480 пикселей. При дистанции до объекта 45 см поле зрения, в зависимости от установленного фокусного расстояния объектива, составляет 2,2–15 см.

Светодиодное освещение применяется также в более компактных ручных приборах, разработанных для проведения ИЦЗ-мониторинга при открытых операциях и амбулаторном осмотре – PDE (*Hamamatsu*) [48] и *Hyper Eye* (*Mizuho Medical Co. Ltd*) [103]. Габаритные размеры *Hyper Eye*– 102×188×102 мм, масса 0,5 кг. Для возбуждения ИК флуоресценции используют светодиоды, излучающие в диапазоне 690–780 нм. Поле зрения – 10–13 см при дистанции до объекта наблюдения 12–20 см. Приемником излучения служит сенсор ПЗС, созданный с использованием технологии LOD, позволяющий принимать изображения одновременно в видимой и ИК областях. С использованием светодиодного освещения функционирует так же ручной прибор *Quest Spectrum TM Platform* (*Quest Medical Imaging, Netherlands*), в котором для спектральной селекции используется система цветоделительных призм, обеспечивающих работу трехматричной камеры [50]. В системе SPY (*NovadaqTech, Canada*), предназначенной для открытых операций, ИК возбуждение проводится

матрицей лазерных диодов (806 нм), освещающих поле $18,5 \times 13,5$ см². Для приема используется только черно-белая камера с разрешением 750×480 пикселей. Изображение рассматривается на экране в процессе видеозаписи, длящейся от 0,5 до 4,5 мин [45]. Эта же компания выпускает системы для лапароскопической хирургии и для оснащения эндохирургического роботизированного комплекса *daVinci*.

Комбинация из стандартного ксенонового осветителя и обычной цветной ТВ камеры с переключаемыми ИК фильтрами используется при флуоресцентной ангиографии в специализированных операционных микроскопах для нейрохирургии *Leica FL800* и *ZEISS OPMIPENTERO 800*, а также в видеозендоскопической стойке фирмы “*Karl Storz*”. Наблюдать флуоресцентные и обычные изображения в этом случае можно только порознь.

Особенность современного этапа ИК флуоресцентной диагностики определяется тем, что разрешённый для применения препарат ИЦЗ еще недостаточно совершенен в отношении специфичности как диагностический агент, а новые более совершенные препараты находятся в стадии разработки. На стадии становления метода особенно желательно, чтобы аппаратура для его реализации наряду с высокими техническими характеристиками обладала определённой универсальностью и гибкостью, что позволит решать разнообразные текущие задачи экспериментальной и клинической медицины.

Именно этим условиям отвечает ориентированный на проведение широкого круга исследований многофункциональный комплекс «FLUM-808».

Комплекс позволяет проводить исследования как в экспериментах на животных, так и в клинической практике – в амбулаторных условиях и при выполнении открытых и эндоскопических операций, позволяет отображать на одном экране ИК изображение одновременно с обычным изображением в белом свете с возможностью выбора врачом способа отображения, наиболее соответствующего особенностям текущей задачи.

Комплект устройств, используемых для освещения объекта и

формирования его изображения в каждом конкретном случае, зависит от особенностей объекта и методики его исследования.

Возможны следующие варианты:

«Макро» – изображение образуется обычным ТВ объективом с увеличением, обеспечивающим наблюдение нужного поля зрения на заданной дистанции. Этот вариант применялся при выполнении открытых операций, а также при проведении экспериментальных исследований на животных или при наружном осмотре во время амбулаторного обследования. Возбуждение ИК флуоресценции излучением длиной волны 808 нм осуществляется диодным лазером через оптоволоконный кабель 8ϕ , подключаемый к световодному каналу ТВ камеры 4. При использовании наружного освещения в нем должна отсутствовать ИК компонента. Для этих целей могут подойти операционная лампа на светодиодах или имеющиеся в помещении люминесцентные лампы.

«Микро» – изображение формируется с помощью операционного микроскопа. В этом случае для освещения применяется комбинированная лазерно-ламповая система, которая строится на основе специализированного лампового осветителя 9, имеющего сумматор излучений 13 от лампы 14 и лазера 8ϕ . Такое устройство (волоконный сумматор) есть в осветителе ОРЛ (НПК «ВОЛО», Санкт-Петербург) и в осветителе, входящем в комплекс для флуоресцентной кольпоскопии [88] (сумматор на интерференционном светофильтре). Смешанное излучение подводится к осветительному порту операционного микроскопа по кабелю 10, представляющему собой жидкостный световод. В зависимости от положения переключателя светофильтров 15 осуществляется освещение объекта возбуждающим излучением или белым светом.

«Эндо» – изображение формируется с помощью телескопической системы какого-либо жесткого эндоскопа. Эндоскопическому применению благоприятствует небольшой размер камерной головки 4, которая подключается к эндоскопу через оптический адаптер вместо стандартной камеры. В этом

случае, также, как и в варианте “Микро”, освещение может осуществляться с помощью комбинированной лазерноламповой системы б и осветительного канала эндоскопа, либо освещение лазером происходит с помощью волоконного световода, устанавливаемого в инструментальном канале эндоскопа, а для освещения белым светом используется его собственный осветитель. Проводить возбуждение ультрафиолетом и излучением с длиной волны 808 нм можно как порознь, так и совместно. Последнее позволяет исследовать видимую и ИК флуоресценцию одновременно.

Наблюдать картину распределения флуоресцирующего агента в исследуемом органе, не видя его в обычном свете, чаще всего недостаточно, поскольку это затрудняет идентификацию места его сосредоточения. Для анатомической привязки в системе «FLUM-808» предусмотрено три способа одновременного отображения монохромного и цветного кадров, из которых врач в зависимости от сюжета и решаемой задачи выбирает наиболее подходящий [9].

В первом способе формируются парные кадры, которые располагаются рядом друг с другом. Такое отображение обеспечивает наилучшие условия наблюдения каждого из них. Трудности в этом случае возникают при попытке точной привязки зон повышенной флуоресценции к определенным структурным элементам, поскольку обе картины находятся на некотором расстоянии друг относительно друга.

Этого недостатка лишен второй способ, при котором кадр с ИК изображением накладывается на кадр, полученный в видимом свете. Для того чтобы ИК изображение можно было отличить от полученного в видимом свете, проводится его представление в псевдоцвете. Применение синего цвета обеспечивает наиболее высокий цветовой контраст благодаря тому, что этот цвет слабо представлен в живой биологической ткани.

Встречаются сюжеты, на которых флуоресцирующие участки малы. Их можно не заметить, особенно при эндоскопическом обследовании, когда быстро меняются поля зрения. В этом случае применяется третий способ,

использующий особенность глаза реагировать, прежде всего, на быстрые изменения в наблюдаемой картине. Для реализации этого способа лазер переводится в импульсно-периодический режим с частотой 1–2 Гц. Возникающий эффект мигания заметно облегчает обнаружение зон повышенной ИК флуоресценции.

В качестве источника возбуждения БИК флуоресценции использовали медицинский диодный лазер «ЛАХТА-МИЛОН» (1); длина волны - 808 нм, максимальная выходная мощность 9 Вт. Доставку излучения производили с помощью кварцевого моноволокна (2). По сравнению с ламповыми и светодиодными осветителями, применение лазерного источника позволяет увеличить плотность мощности возбуждения, облегчает задачу подавления возбуждающего излучения в системе регистрации изображения и способствует созданию систем различного целевого назначения, в том числе для открытых операций.

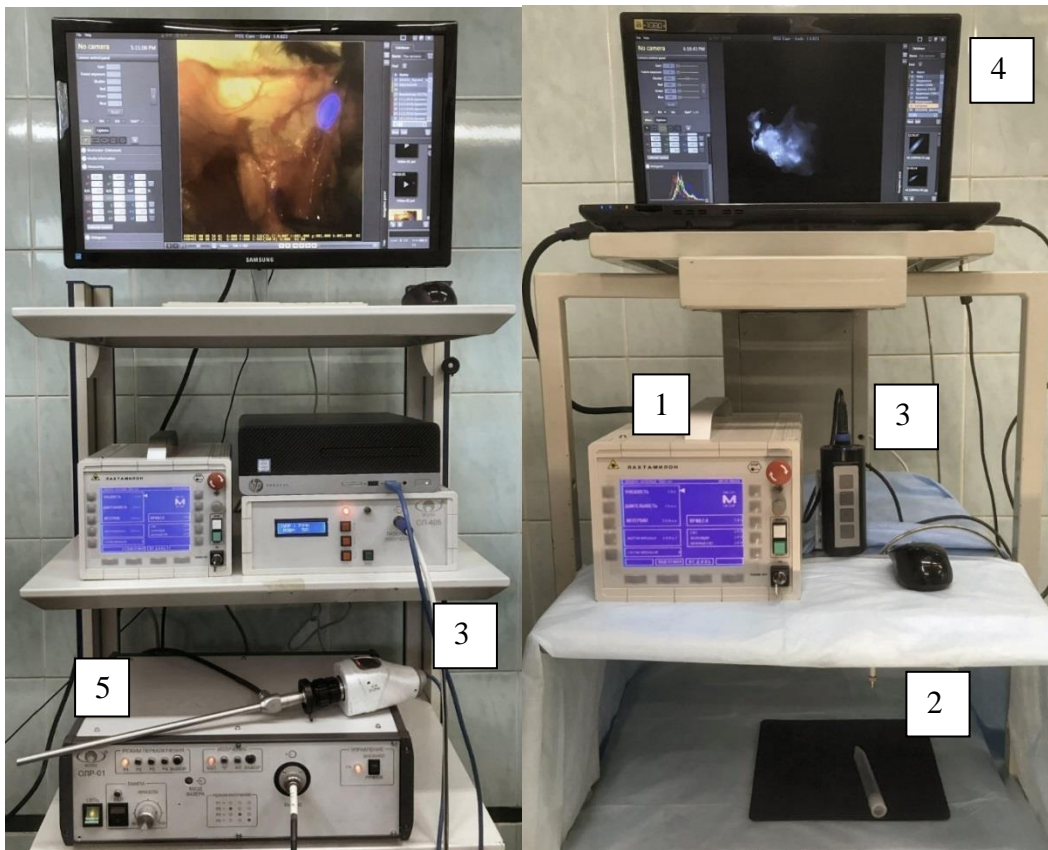


Рисунок 8 – Экспериментально-инструментальная система FLUM-808 слева – эндоскопический вариант; справа. - для проведения лимфографических

исследований на back-table: 1 – лазерный аппарат «Лахта-Милон 808/9»; 2 – световод; 3 - ТВ-камера; 4 – ноутбук; 5 – торакоскоп

Задачу регистрации решали с помощью телевизионно-компьютерной системы, включающей мультиспектральную телевизионную (ТВ) камеру ICG-Skope (960x960 пикс) (3) и ноутбук ACER V3-772G (4). 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 цели исследования использовали вариант комплекса, ориентированный на оперативные вмешательства (на рисунке представлен его эндоскопический вариант с торакоскопом (5), либо вариант для исследований операционного материала на back-table. В операционной, наблюдение флуоресцентных и обычных белых картин в реальном масштабе времени проводили, для удобства, на экране двух мониторов разных размеров: ноутбука (17,3``) и подключенного к нему телевизора SAMSUNG UEJ6390 (40``) (рисунок9). Производили видео- и фотосъемку.



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

К преимуществам «FLUM-808» также относится возможность количественной оценки яркости флуоресценции объекта и возможность одновременной работы с несколькими флуоресцентными красителями БИК и видимого диапазонов.

Регистрацию накопления и движения флуоресцирующего агента с использованием установки «FLUM-808» проводили различными способами. В экспериментальной работе на животных наблюдение за распространением контраста проводилось чаще всего с наложенным монохромным изображением на картину в белом свете (рисунок 14) [54]. Она позволяет точно определить место сосредоточения флуоресцирующего вещества и дифференцировать от соседних анатомических структур. Клиническое исследование требовало регистрации факта накопления флуоресцирующего вещества в лимфатических

узлах, что удобнее осуществлять в монохромном режиме и позволяет визуализировать даже минимальное накопление ИЗЦ (рисунок 10). При попадании контрастного вещества в определенный ЛУ программное обеспечение позволяет в выбранной зоне интереса количественно определить степень интенсивности флуоресценции. С целью стандартизации получаемых данных использовался образец, относительно которого производилась калибровка. Подобным «стандартом» служил водный раствор ИЗЦ в концентрации 0,25 мг/мл и 20% раствор АЧ в соотношении числа молекул 1/1.

Необходимость вычисления степени флуоресценции относительно стандарта связана с тем, что регистрируемый сигнал зависит от многих параметров системы, которые от эксперимента к эксперименту могут неконтролируемо меняться [47].

Пример получаемого изображения при помощи системы «FLUM–808» показан на рисунке 10. В области ЛУ бифуркационной группы отмечается зона флуоресценции, что свидетельствует о попадании конъюгата ИЗЦ + АЧ. В этом месте при помощи программного обеспечения выбрана область интереса, в которой произведено количественное измерение степени флуоресценции.

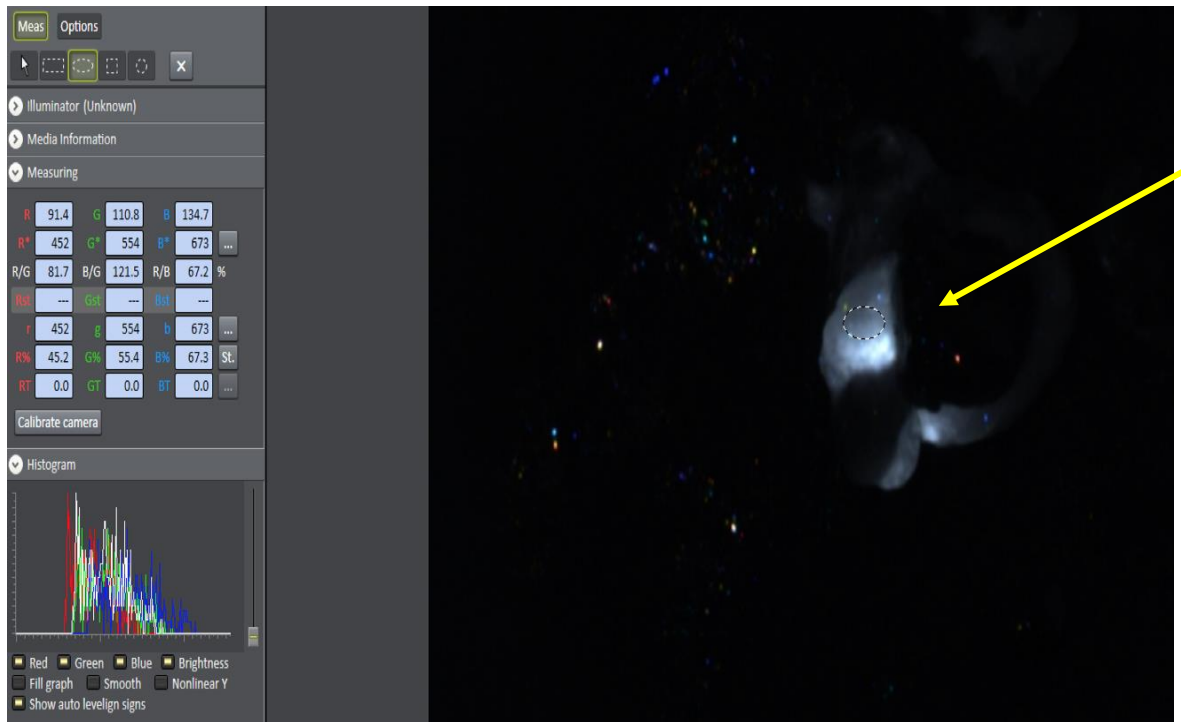


Рисунок 10 – Изображение фиксации флуоресценции в лимфатическом узле 7 группы. Стрелкой указано количественное отображение флуоресценции в измеряемом участке

3.2 Методологические особенности использования индоцианина зеленого с целью лимфографии

С целью инфракрасной визуализации лимфатической системы использовался разрешенный к клиническому применению в Российской Федерации –индоцианин зеленый ИЗЦ (PULSION Medical Systems, Германия) (рисунок11).



Рисунок 11 – Флаконы ИЦЗ и стерильной воды для смешивания

Свойства ИЦЗ в растворе существенным образом зависят от микроокружения. В воде молекулы ИЦЗ склонны к образованию агрегатов. Благодаря амфифильности ИЦЗ может связываться с различными молекулами, как липофильными, так и гидрофильными. При попадании в кровяное русло ИЦЗ быстро связывается с белками плазмы крови, 95 % ИЦЗ переносится β -липопротеидами. Выведение его из крови проходит в две фазы. Период полувыведения при первой фазе составляет 3-4 минуты, при второй 60-80 минут. ИЦЗ выводится клетками паренхимы печени со скоростью около 0,1 мг/мин/кг с желчью в неметаболизированном, несвязанном виде. Максимальная его концентрация в желчи наблюдается через 0.5-2 часа после введения [9].

Конъюгация ИЦЗ с белками приводит к улучшению его свойств в качестве флуоресцирующего маркера - увеличению интенсивности флуоресценции. Максимум поглощения и флуоресцентной эмиссии сдвигается в длинноволновую сторону по сравнению с водным раствором, что облегчает ее регистрацию [104]. ИЦЗ считается перспективным в развитии наномедицинских технологий и тераностики (сочетание диагностического и лечебного подходов в рамках одной процедуры или одного химического соединения) в качестве флуоресцентной метки и фотосенсибилизатора [89].

Органическими наноносителями для ИЦЗ могут служить природные наночастицы, такие как сывороточный альбумин (рисунок 12), который является удобным для конъюгации с ИЦЗ [79]. Альбумин является транспортером различных эндогенных и экзогенных соединений в пределах сосудистой системы [15]. Так как в очаге воспаления или опухолевой ткани альбумин легко выходит за пределы сосудистой стенки, он имеет потенциал для направленной доставки лекарственных препаратов, а связанный с ним ИЦЗ может служить флуоресцентной меткой для их обнаружения.

В данном разделе работы представлены результаты экспериментальных исследований по разработке конъюгата на основе ИЦЗ и белков для ИК флуоресцентной диагностики, который характеризовался бы лучшими

флуоресцентными качествами по сравнению с чистым ИЦЗ и высокой степенью накопления в патологической опухолевой и воспалительной ткани.



Рисунок 12 – Раствор 20% раствора АЧ

Ex-vivo, в пробирке эппендорф производили изучение влияния раствора АЧ на флуоресцирующие свойства водного раствора ИЦЗ. К исходному водному раствору ИЦЗ в концентрации 0,33 мг/мл добавляли 20% раствор АЧ, график титрования представлен на рисунке 13.

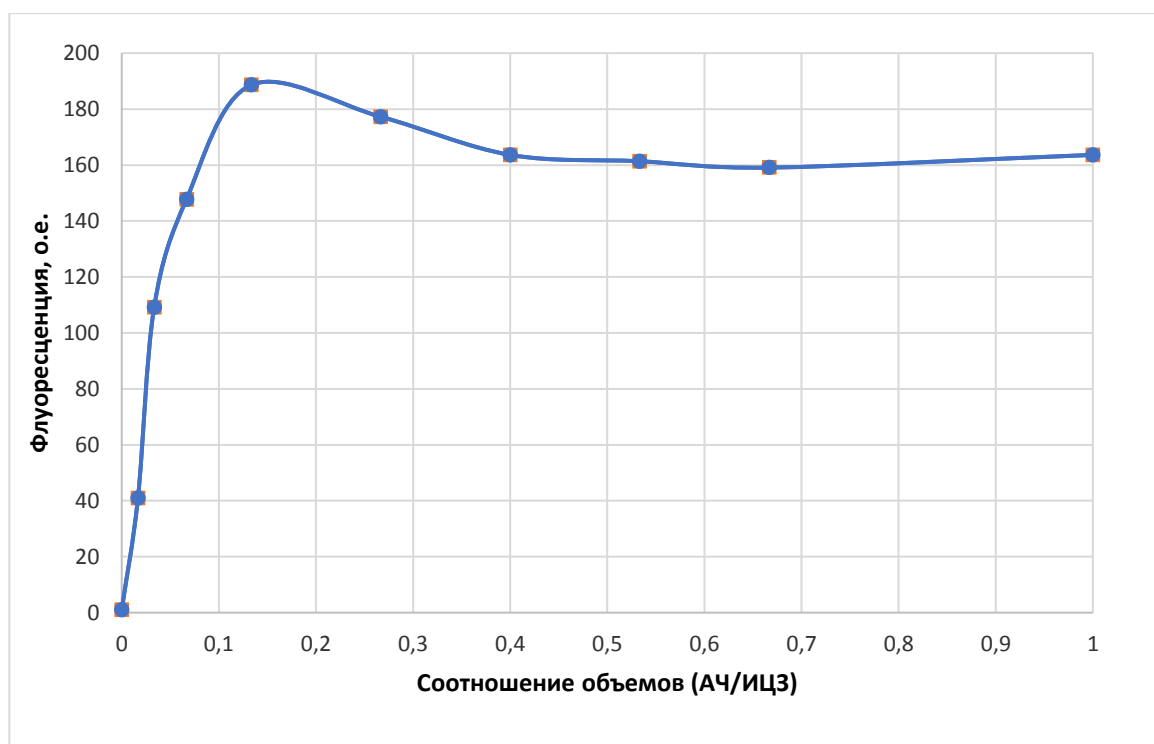


Рисунок 13 – Кривая титрования раствора ИЦЗ в присутствии 20% АЧ. По оси ординат - нормированная относительно исходного свежего водного раствора (0,33 мг/мл) интенсивность флуоресценции. По оси абсцисс – соотношение объема АЧ (20%) к массе ИЦЗ в растворе. Максимум флуоресценции зафиксирован при АЧ (20%)/ИЦЗ = 0,12 мл/мг.

Из графика следует, что предварительное связывание АЧ и ИЦЗ увеличивает его флуоресцирующие свойства более чем в 180 раз по сравнению с водным раствором. При проведении исследований проявилась и другая полезная особенность конъюгата – его высокая 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°C .

Глава 4

ПРИЖИЗНЕННАЯ ЛИМФОГРАФИЯ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ

4.1 Разработка методики флуоресцентной лимфографии в экспериментальных условиях

Визуализация лимфатических сосудов уха кролика при помощи флуоресценции осуществлялась после введения препарата (ИЦЦ + АЧ) в точку № 1 (рисунок 14). За счет абсорбции ИЦЦ в течение нескольких секунд визуализировались лимфатические сосуды диаметром 0,3–1,0 мм (преколлекторы и коллекторы) 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 14.

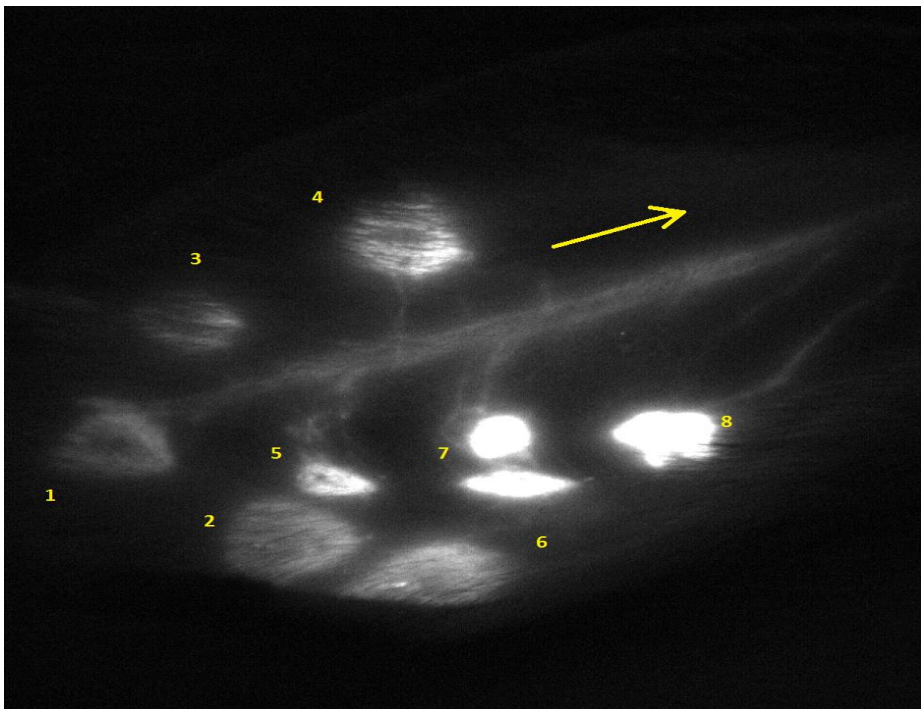


Рисунок 14 – Картина в свете ИЦЦ флуоресценции, полученная на ухе кролика в результате ввода микродоз препарата. Цифрами обозначены место и последовательность вколов, стрелкой показано направление тока лимфы

После введения конъюгата ИЗЦ и АЧ в эпидермальный слой кожи межфалангового пространства правой нижней конечности кролика удалось зафиксировать движение лимфы по правой нижней конечности в проксимальном направлении и последующее накопление контрастного вещества в ЛУ, собирающий лимфу от правой нижней конечности (рисунок 15).



Рисунок 15 –Лимфография задней конечности кролика при помощи системы «FLUM-808»: 1 – лазерный аппарат «Лахта-Милон 808/9»; 2 – световод; 3 - ТВ-камера; 4 – ноутбук; 5 – штатив. Слева изображение в белом свете. Справа получаемое изображение в БИК свете. Стрелкой указано направление тока лимфы и его накопление в лимфатическом коллекторе.

4.2 Визуализация лимфатических сосудов и лимфатических узлов внутренних органов в эксперименте

После выполнения срединной лапаротомии при введении конъюгата ИЗЦ+АЧ в стенку желудка кроликов удалось визуализировать флуоресценцию места введения контрастного вещества, путь оттока лимфы и контрастного вещества от него и дальнейшее накопление его в лимфатическом коллекторе. Пример получаемых изображений показан на рисунке 16. Гистологическое исследование флуоресцирующего материала подтвердило наличие в флуоресцирующих областях ЛУ.

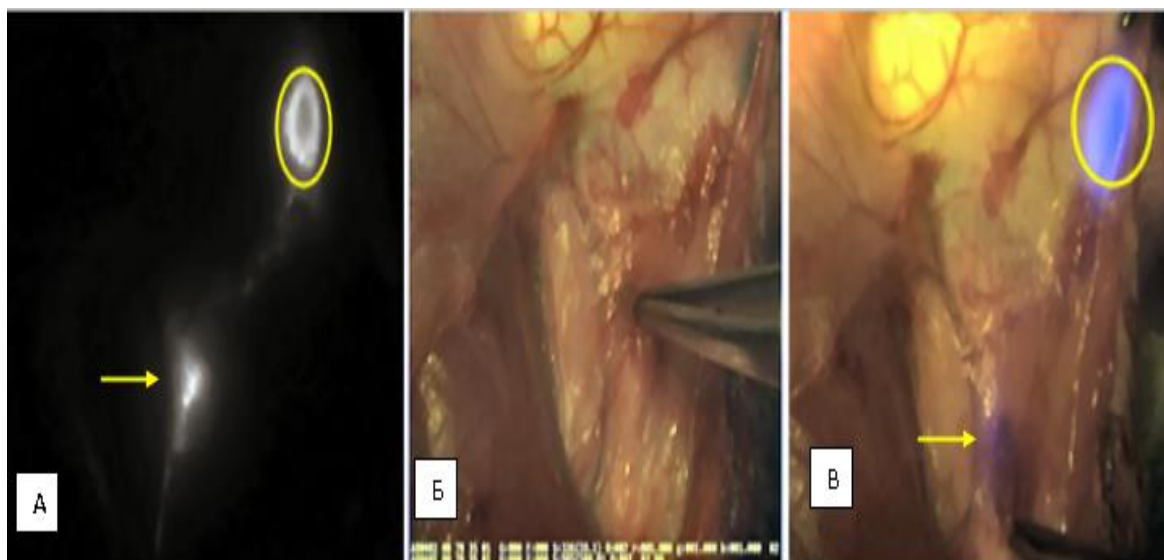


Рисунок 16 –Изображение одного и того же участка с ЛУ, сформированное системой FLUM-808: А) БИК флуоресценция, Б) белый свет, В) совмещенное (комбинированное) изображение. Стрелкой показано место введения препарата ИЦЗ, кружком – место расположение лимфатического узла

Двум кроликам после депиляции передней поверхности грудной стенки выполнялась двусторонняя переднебоковая торакотомия с поперечным пересечением грудины (по типу «clamshell»). В паренхиму легкого в трех точках вводился конъюгат ИЦЦ + АЧ в количестве по 1 мл в каждое место введения (суммарно 3 мл) в концентрации 0,1 мг/мл. От места введения с помощью системы «FLUM-808» регистрировалось движение лимфы вместе с флуоресцирующим раствором по лимфатическим путям в направлении корня легкого, что показано на рисунок 17. Количество мест введения и суммарный объем в 3 мл выбран из расчета наименьшего количества введенного контрастного вещества в паренхиму исследуемого органа, при котором удается визуализировать ток лимфы. При введении красителя в меньшем объеме визуализировать ток лимфы удавалось не всегда.

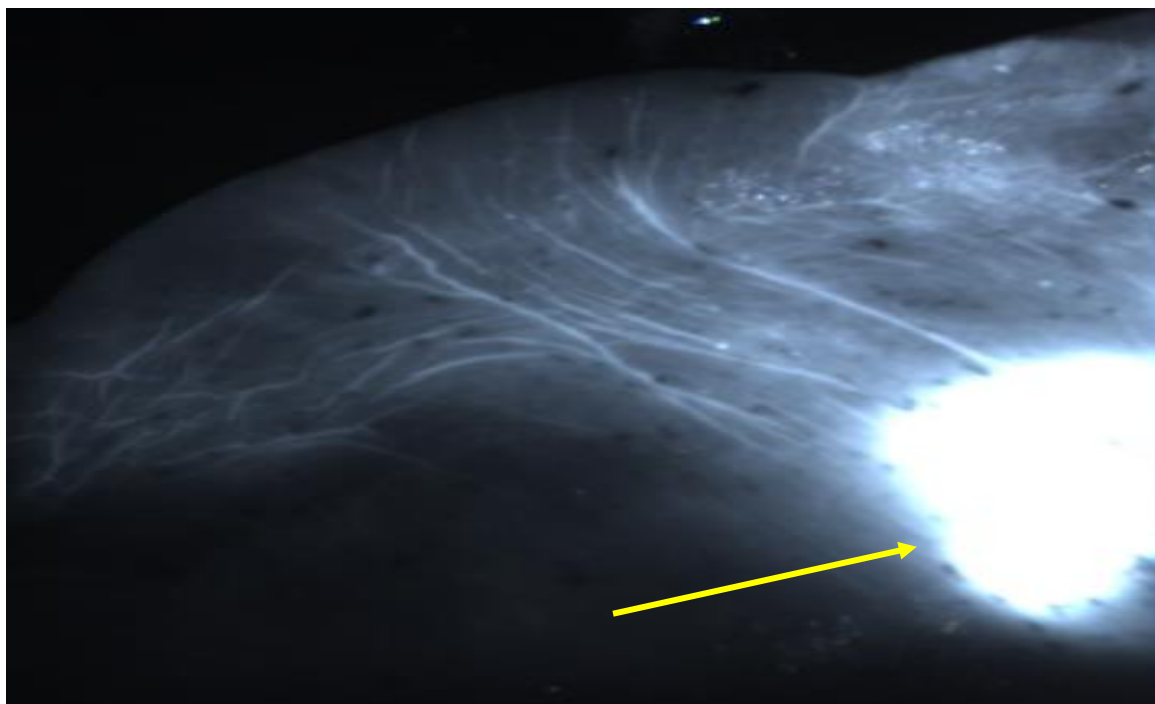


Рисунок 17 –Фотография в БИК спектре верхней доли левого легкого кролика. Стрелка указывает место введения раствора ИЗЦ + АЧ в паренхиму легкого. Визуализируются пути распространения препарата по лимфатическим путям в направлении корня легкого

В последующем, при помощи системы «FLUM-808», выявлены участки локального накопления флуоресцирующего вещества в области легочной связки и парааортальной клетчатки (рисунок 18). При гистологическом исследовании вышеописанных участков доказано наличие в них ЛУ.

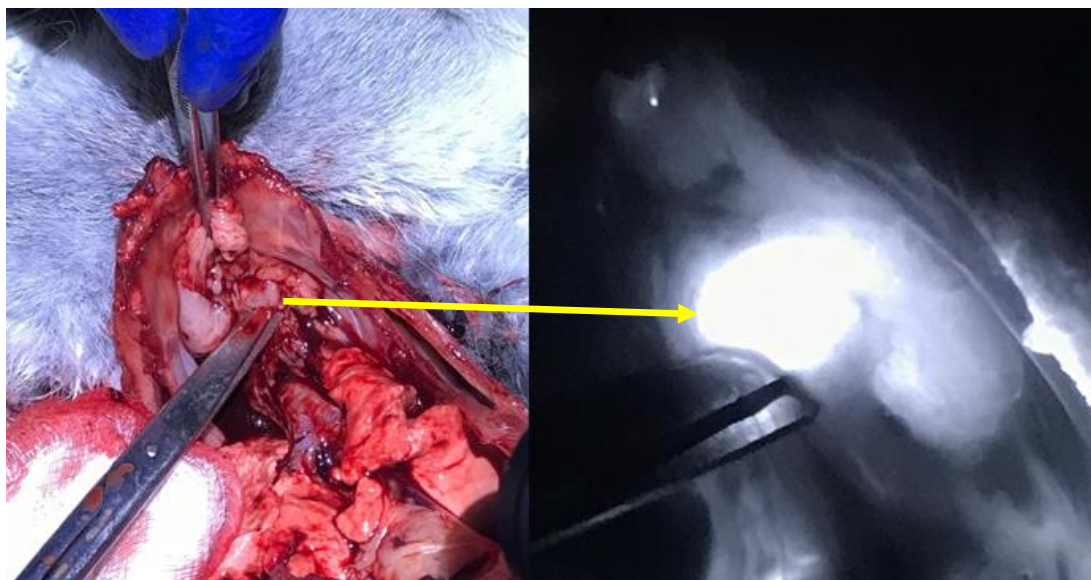


Рисунок 18 – Изображение одного и того же участка в белом свете (слева) и БИК флуоресценции (справа). Стрелкой обозначено место накопления ИЦЗ в парааортальной клетчатке

Таким образом, в результате экспериментальной части работы показаны возможности отечественной инструментальной системы «FLUM-808» в визуализации ИК флуоресценции ИЦЗ; разработаны методики флуоресцентной визуализации лимфатических сосудов и обнаружения регионарных ЛУ; оценена возможность усиления флуоресценции раствора ИЦЗ при конъюгации с АЧ; доказано длительное и интенсивное накопление конъюгата ИЦЗ и АЧ в опухолевой ткани.

Разработанные методики, аппаратное обеспечение позволили перенести технологию в клиническую практику для изучения ЛС у больных раком легкого.

4.3 Определение особенностей накопления индоцианина зеленого в патологической и нормальной ткани в эксперименте на крысах

С целью решения задачи определения особенностей накопления ИЦЗ в опухолевой ткани проведен эксперимент на 18 крысах-самцах линии Вистар массой 200-250г, разведения «ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово» НИЦ «Курчатовский институт». Животные содержались на неограниченном потреблении корма (стандартный рацион для лабораторных крыс ПК-120, ООО «Лабораторкорм», Москва, Россия) и воды. Работа с

животными проводилась в соответствии с «Правилами этического обращения с лабораторными животными при проведении экспериментальных работ». Животных вводили в наркоз используя хлоралгидрат 350 мг/кг внутривенно в 0,9 % стерильном растворе хлорида натрия, объем введения 10 мл/кг. Для выведения из эксперимента (эвтаназии) использовали хлоралгидрат в дозе 860 мг/кг внутривенно в 0,9 % стерильном растворе хлорида натрия, объем введения 20 мл/кг.

После депиляции правого и левого бедра 18 крысам (60%) под кожу правого бедра, инъецировался гомогенат ткани лимфосаркомы Плиса (ЛП) в дозе 0,2 мл с целью индукции роста опухоли [17]. 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 ([Pulsion medical systems, AG](#), Германия) в дозе около 1 мг/кг веса животного. Все крысы разделены на 3 группы по 6 в каждой в зависимости от состава введенного раствора:

Группа 1 (крысы с ЛП) – раствор ИЦЗ в дистиллированной воде;

Группа 2 (крысы с ЛП) – раствор ИЦЗ в БСА в весовом отношении ИЦЗ/БСА=1:40;

Группа 3 (крысы с ЛП) – раствор 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), рассчитывался диагностический контраст $K=F_0/F_3$ (F_0 – яркость флуоресценции в зоне поражения, F_3 – яркость флуоресценции в контрольной зоне).

Лазерное излучение на объекте имело форму круглого пятна диаметром 20-40 мм в зависимости от расстояния от дистального конца световода до

объекта исследования. Соотношение яркости в центре и на периферии не более, чем 2.5:1. Регистрирующая система обеспечивала возможность визуализации и измерения флуоресценции объекта в БИК спектра 820-880 нм с одновременной визуализацией в видимой области для идентификации места свечения.

Через 1 час после введения раствора ИЦЗ в хвостовую вену крыс, в центре перевивки опухоли наблюдалось яркое свечение. При этом на контрольном участке степень флуоресценции была минимальной (рисунок 19). 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.

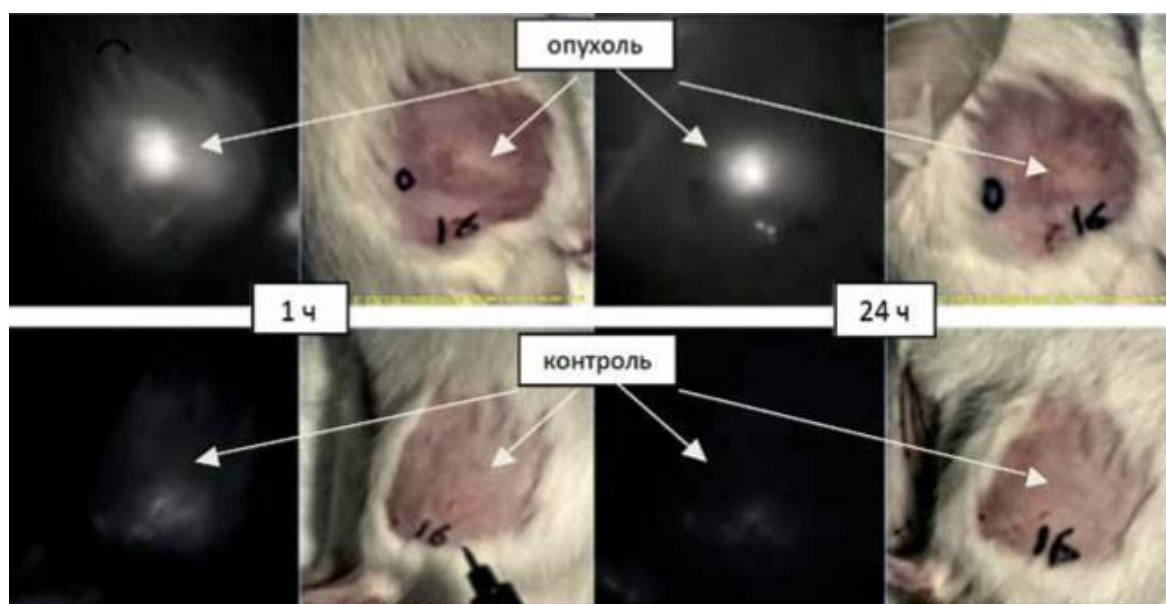


Рисунок 19 – Экспериментальная работа на крысах. Парные фотографии результатов визуализации опухолевого участка лимфосаркомы Плисса и симметричного здорового участка в свете индоцианиновой флуоресценции и обычном свете. Вверху опухолевый участок, внизу контрольный участок. Слева картина через 1 час после введения препарата ИЦЗ + АЧ, справа – через 24 часа

В первый час после введения раствора ИЦЗ + АЧ у каждой крысы из групп наблюдалась наибольшая по сравнению с последующими днями яркость свечения в области, пораженного опухолью бедра.

Через 24 часа интенсивность ИК флуоресценции уменьшилась во всех группах (в 6-8 раз). В последующие сутки интенсивность ИК флуоресценции продолжала снижаться, но зона развития патологического процесса визуализировалась в ИК свете у крыс, где использовался конъюгат ИЦЗ и АЧ, вплоть до 6-х суток, что продемонстрировано в таблице 3.

Наиболее интересной оказалась динамика интенсивности контрастирования между зоной патологического процесса и контрольным левым бедром. Флуоресценция в группе 1, где использовался чистый раствор ИЦЗ, была постоянной в течение первые суток после введения, а затем постепенно снижалась (с 3,5 до 1,3). Во всех других группах степень флуоресценции, наоборот, возросла через 24 часа (с 4,2-5,8 до 5,3-9,2) и удерживалась на высоком уровне в течение последующих 2-3 суток. Через 24 часа в группе 1 диагностический контраст был почти в 2 раза ниже, чем в других группах. Существенных различий в интенсивности флуоресценции в группах 2 и 3 не обнаружено, уровень контраста удерживался на высоком уровне в течение 72 часов. Также не выявлены различия в группах крыс с конъюгатами ИЦЗ с БСА и АЧ.

Таблица 3 – Уровень флуоресценции и диагностического контраста в группах крыс в разные сроки после введения ИЦЗ (средние значения)

Срок после перевивки (сутки)	Срок после введения ИЦЗ (часы)	Группа 1		Группа 2		Группа 3	
		ИЦЗ		ИЦЗ+БСА		ИЦЗ+АЧ	
		F ₀	К	F ₀	К	F ₀	К
1	1	7,9	3,0	9,0	4,2	8,6	4,8
2	24	1,1	3,5	1,5	6,8	1,1	5,3
3	48	0,3	2,4	0,4	5,0	0,3	4,3
4	72	0,2	1,8	0,3	2,8	0,3	2,6
6	120	0,1	1,3	0,2	2,2	0,2	2,0

Примечание: F₀ – яркость флуоресценции в зоне поражения; К – диагностический контраст

Из представленных данных следует, что с помощью ИК флуоресценции можно выявлять измененные опухолью и или воспалительным процессом ткани с высокой яркостью и контрастом, причем контраст при использовании конъюгата ИЦЗ с АЧ выше, чем при использовании только ИЦЗ. Кроме того, при интерстициальном введении использование препарата в тех же высоких концентрациях, что и при системном вводе не только бесполезно, но и нежелательно, поскольку способно ухудшить визуализацию структур ЛС. Связано это с тем, что излишне интенсивная флуоресценция не позволяет визуализировать лимфатические сосуды мелкого калибра. Оптимальной концентрацией ИЦЗ, обеспечивающей наибольший контраст при наблюдении этих структур при местном введении, является величина около 0,1 мг/мл. Для

интерстициального введения использовался конъюгат, в который входило 25 мг индоцианина зеленого, его смешивали с 240 мл воды для инъекций и 10 мл 20% раствора альбумина человека. Реализовывалась концентрация ИЦЗ в растворе равная 0,1 мг/мл. Это послужило существенным сокращением расходов ИЦЗ, а также раствор становится более стабильным и сохраняет свои свойства в течение, как минимум, двух месяцев. Водный раствор напротив требует приготовления перед каждым использованием. Снижение количества введенного в организм ИЦЗ уменьшает риск возникновения аллергической реакции.

Глава 5

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТОРОЖЕВЫХ ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЛЕГКОГО

5.1. Результаты исследования сторожевых лимфатических узлов

С сентября 2015 года по январь 2019 года методика ИК флуоресцентной лимфографии реализована в процессе 92 анатомических резекций легких у больных НМРЛ. 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 зафиксирована не была (рисунок 20), проводился анализ возможных причин непопадания контрастного вещества в ЛУ.

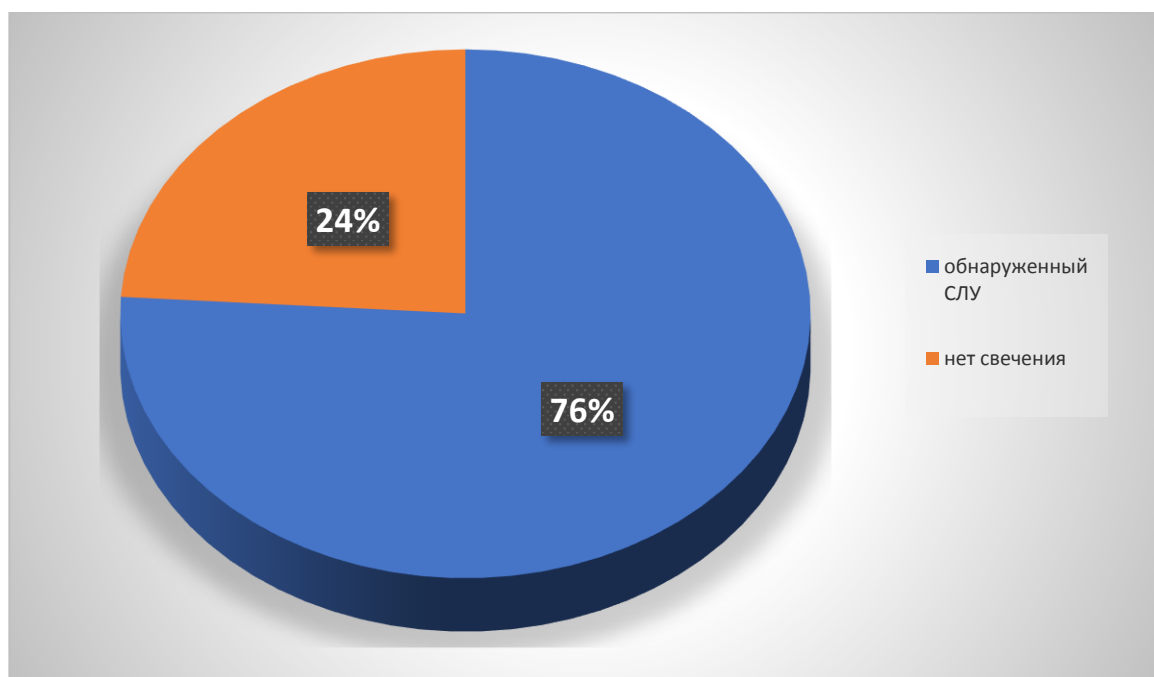


Рисунок 20 – Соотношение пациентов с выявленным СЛУ при помощи ИК флуоресценции

Среди 70 пациентов у которых выявлена флуоресценция СЛУ, патоморфологически 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 – 17 больных (26%), IIIb стадия – 4 больных (6%) (Рисунок 21).

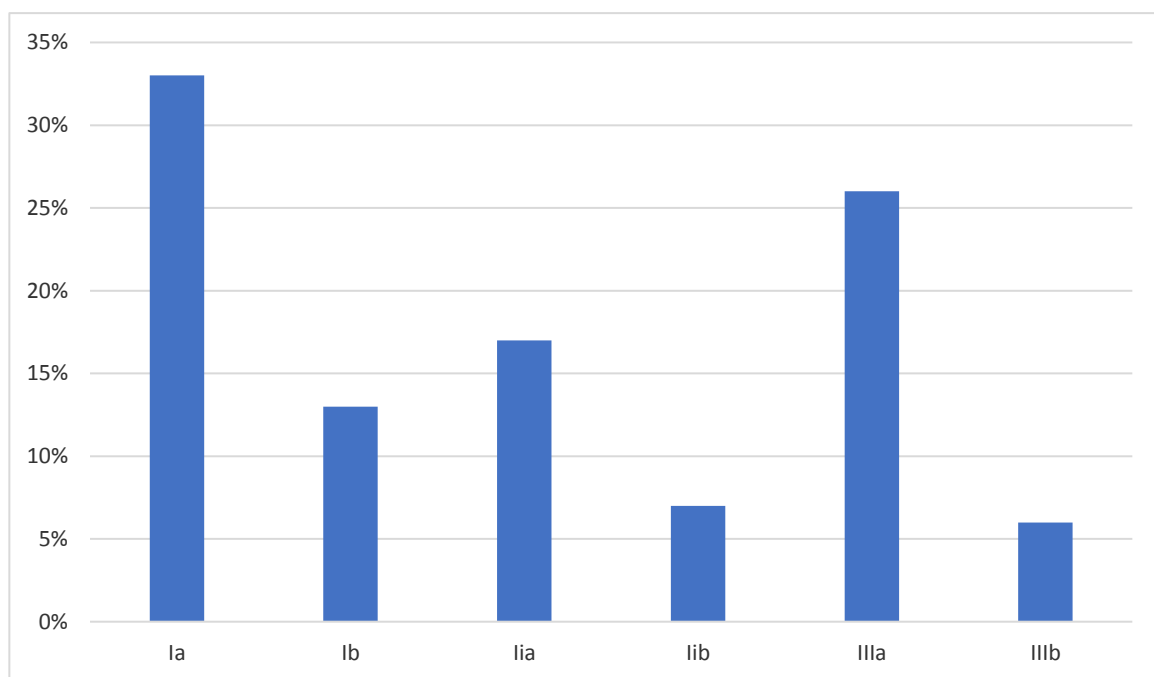


Рисунок 21 – Стадии НМРЛ у пациентов с выявленными СЛУ при помощи ИК флуоресценции

Плоскоклеточный рак легкого диагностирован у 25 пациентов (36%), аденокарцинома – у 36 больных (52%), другие виды НМРЛ – у 9 пациентов (12%). (рисунок 22).

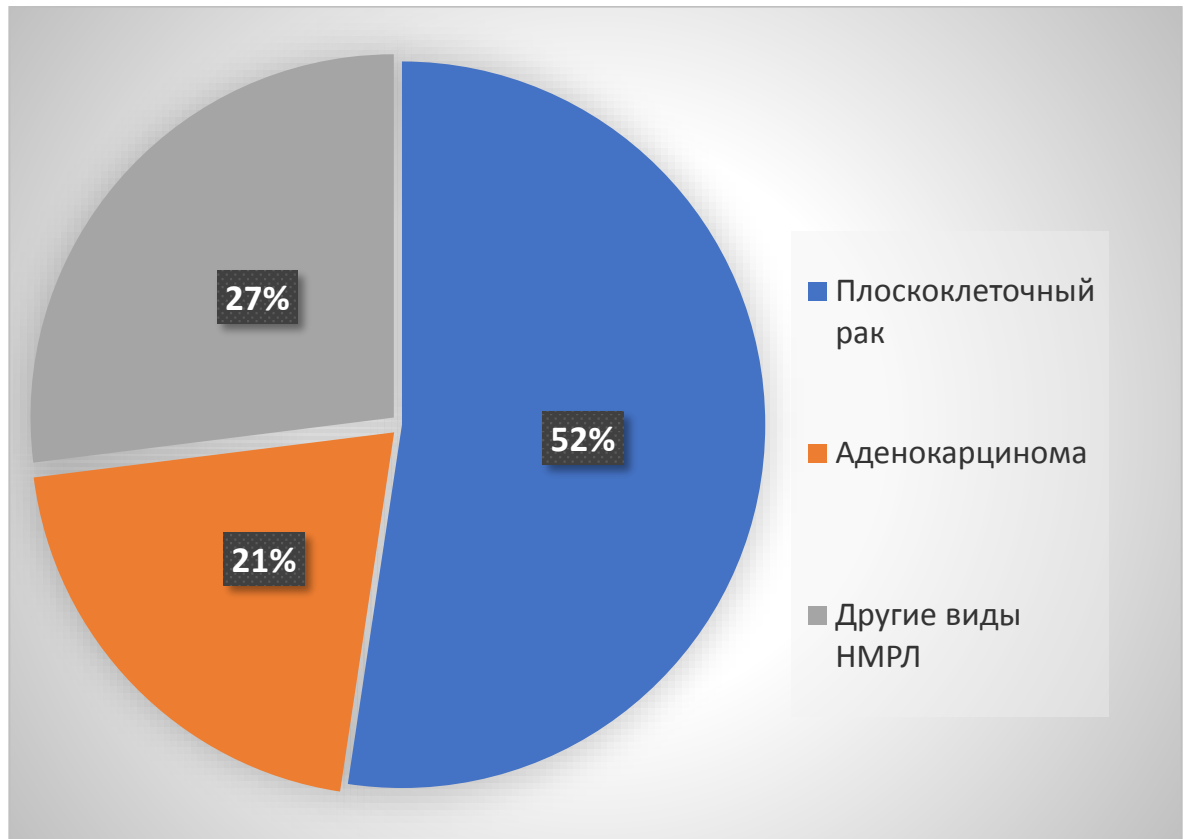


Рисунок 22 – Гистологический тип НМРЛ у пациентов с выявленными СЛУ

Лобэктомия выполнена 49 пациентам (70%), билобэктомия - 5 пациентам (7%), пневмонэктомия - 16 пациентам (23%).

В ходе обследования перед операцией согласно рекомендациям по обследованию и лечению пациентов с НМРЛ [5] оценивалось распространение заболевания при помощи МСКТ органов грудной клетки с внутривенным контрастированием, фибротрехеобронхоскопия, УЗИ ЛУ шейной над- и подключичной зоны, УЗИ брюшной полости и забрюшинного пространства. При выявлении изменений по данным УЗИ брюшной полости, забрюшинного пространства и почек пациенту выполнялось МСКТ органов брюшной полости с внутривенным контрастированием.

В случае распространения опухоли в ЛУ средостения (критерий N2) или переход первичного очага на соседние органы (трахея, грудная стенка) пациентам проводилась химиотерапия в неoadьювантном режиме.

Среди всех пациентов, включенных в исследование, неоадьювантная полихимиотерапия (НПХТ) проводилась у 15 (16%) больных.

После проведенного лечения проводилось контрольное обследование, включающее МСКТ органов грудной клетки, фибротрехеобронхоскопию, УЗИ брюшной полости и забрюшинного пространства, шейной, над- и подключичной зоны с целью оценки динамики. У 14 пациентов (93%) отмечен регресс опухоли (уменьшение размеров ЛУ средостения, уменьшение первичного очага в размере). У одного пациента отмечена стабилизация опухолевого распространения. На основании вышеизложенного выставлялись показания к оперативному лечению.

После операции, в которую входила стандартная анатомическая резекция легкого и прикорневая, ипсилатеральная медиастинальная лимфаденэктомия, материал направлялся для гистологического исследования. Общее число исследованных патоморфологически групп ЛУ составило 312, в каждой группе содержалось от 1 до 7 ЛУ. Сторожевыми (флуоресцирующими) являлись 171 группа ЛУ (55%), в среднем 2,7 у одного больного. Если флуоресценция фиксировалась в нескольких ЛУ одной группы, то это расценивалось 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 одной группе ЛУ, у 18 больных (26%) – в 2 группах ЛУ, у 20 больных (28%) – в 3 группах ЛУ, у 12 больных (18%) – в 4 группах ЛУ, у 5 пациентов (7%) – в 5 группах ЛУ, и 1 больного (1%) – в 7 группах регионарных ЛУ, что продемонстрировано на рисунке 23.

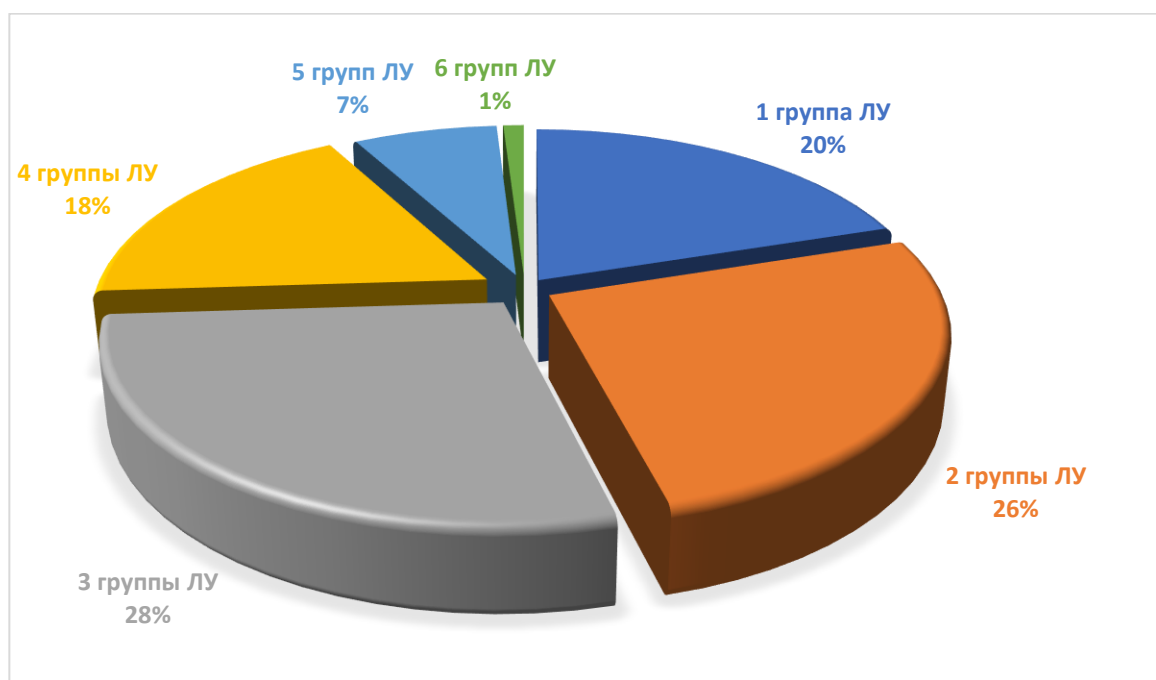


Рисунок 23 –Количество групп ЛУ, в которых регистрировалась флуоресценция

Среди флуоресцирующих 171 ЛУ прикорневыми являлись у 10%, медиастинальными – у 27 %, и в корне, и в средостении у 63% пациентов (рисунок 24).

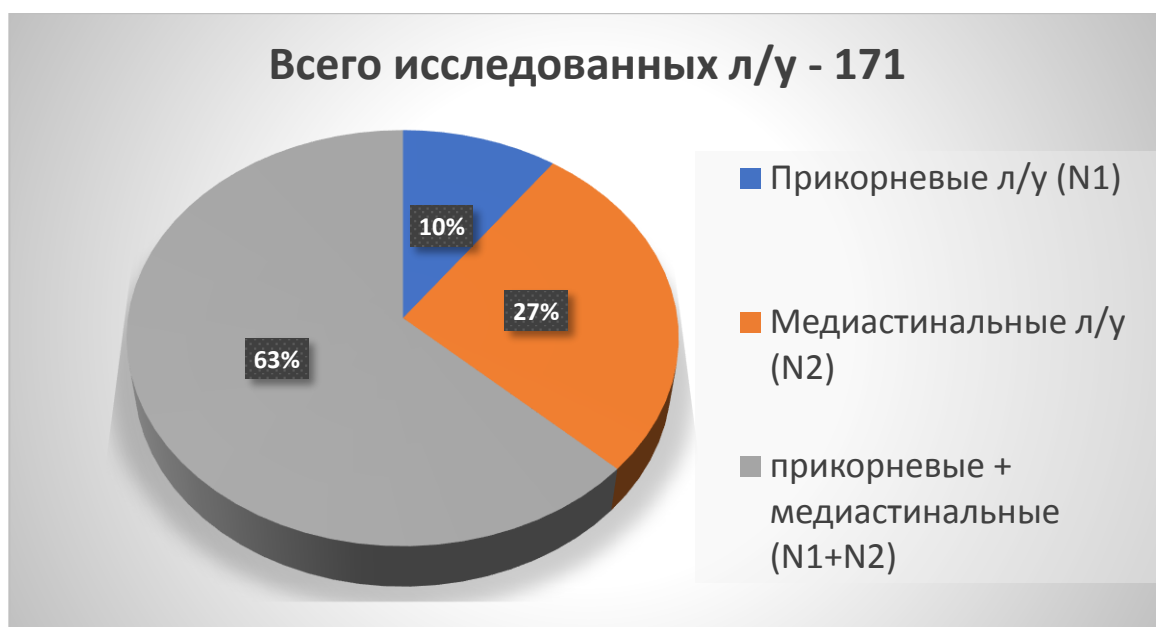


Рисунок 24 –Флуоресценция в группах лимфатических узлов (критерий N)

При плановом патоморфологическом исследовании метастазы в ЛУ (при исследовании всех групп регионарных лимфоузлов, как СЛУ, так и не СЛУ) диагностированы у 32 из 70 (43%) 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 лимфатических узлах обнаружены у 8 пациентов (25%) (Рисунок 25).

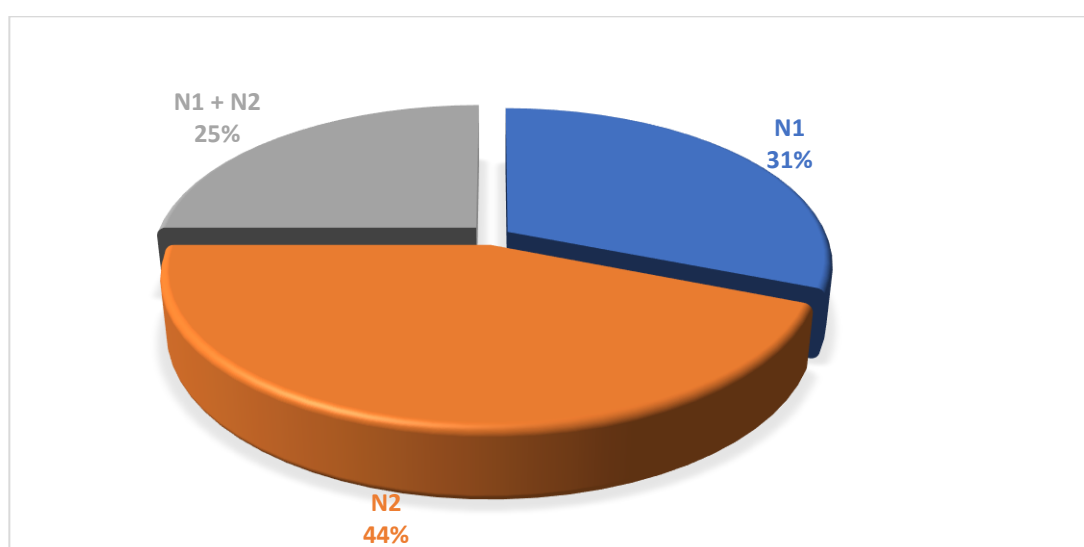


Рисунок 25 – Регионарное метастазирование в группы ЛУ

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 (Рисунок 26).

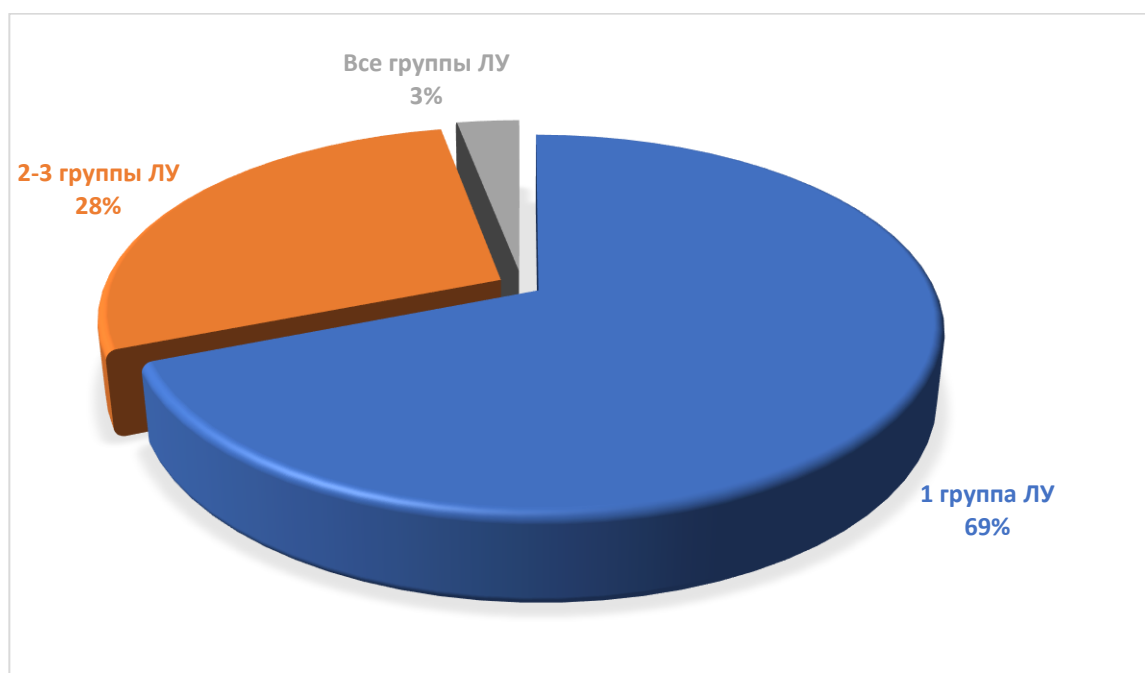


Рисунок 26 – Количество групп СЛУ с гистологически верифицированным метастатическим поражением

Ни в одном клиническом наблюдении метастазы в регионарных ЛУ не выявлялись в случае, если в СЛУ не определялась флуоресценция. То есть, ток лимфы, содержащей метастазы, всегда имел место через СЛУ, и лишь затем опухолевые клетки могли попасть в другие регионарные лимфатические узлы. Более того, если методом флуоресценции определялся хоть один СЛУ, при наличии метастазов в регионарных лимфатических узлах во всех пораженных узлах имела место флуоресценция. Иными словами, лимфоток от доли легкого можно было проследить, используя данную методику, при непораженных метастатическим процессом структурах ЛС. Но если лимфатический узел поражен метастазами, то в него в 100% случаев попадало флуоресцирующее вещество. И наоборот, не было ни одного случая, когда лимфатический узел поражен опухолевыми клетками и в нем не определяется флуоресценция.

5.2. Пути лимфогенного метастазирования при различных локализациях первичной опухоли

Как отмечено выше, наличие флуоресценции в ЛУ свидетельствовало о попадании в него введенного перитуморально ИЦЗ. Соответственно,

устанавливая локализацию «светящихся» 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 проводилась 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 наиболее частые (более 30%) группы ЛУ накопившие ИЦЗ показаны в таблице 4.

Таблица 4 –Частота накопления ИЦЗ в регионарных ЛУ в зависимости от локализации зон инъекции препарата в легкое (указаны значения более 30%)

	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 4). 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 (рисунок 27).

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 4). Флуоресценция в 3 и 7 группах у 3 из 4 пациентов (75 %) выявлена при отсутствии флуоресценции в 10 группе ЛУ (рисунок 27).

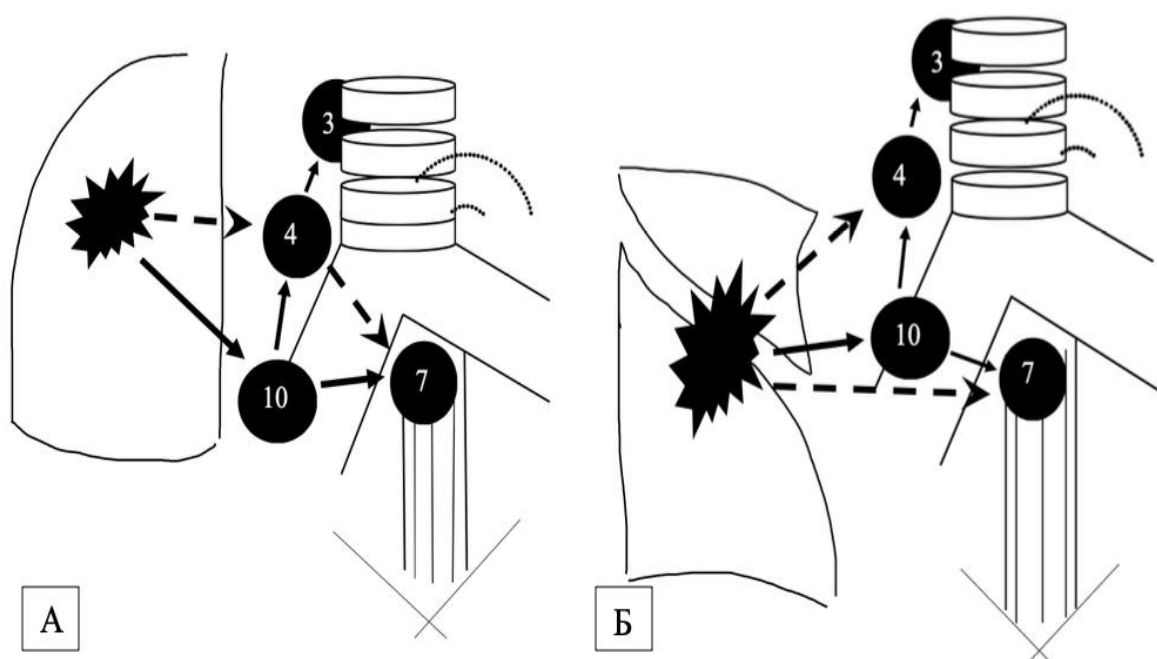


Рисунок 27 – Направление тока лимфы правого легкого. А. от верхней доли правого легкого. Б. от средней и нижней долей правого легкого. Сплошная стрелка – основной путь лимфооттока; пунктирная стрелка – дополнительный путь лимфооттока

При локализации опухоли в верхней доле левого легкого (18 пациентов) наиболее часто, в 67% наблюдений, зоны флуоресценции локализовались в 10 и 11 группах ЛУ, в 44% наблюдений – в 7 группе ЛУ, у 33%

исследуемых отмечалось наличие флуоресцирующих ЛУ в 6 группе и у 28% больных - в 5 группе ЛУ (таблица 4). У 5 из 18 (28%) больных накопление ИЦЗ не было зарегистрировано в прикорневых группах ЛУ, при этом у 3 из этих 5 пациентов (60%) ИЦЗ накопился в 6 группе ЛУ, а у 2 больных - в 7 группе ЛУ (рисунок 28).

При первичном поражении опухолью нижней доли левого легкого (12 пациентов) флуоресценция зафиксирована в 58% наблюдений в 10 и 11 группах ЛУ, в 58% наблюдений – в 7 группе ЛУ, в 50% наблюдений – в 6 группе ЛУ, в 42% наблюдений – в 9 группе ЛУ (таблица 4). Накопление ИЦЗ в медиастинальных ЛУ (группы 6, 9) у 2 больных имело место при отсутствии накопления в прикорневых ЛУ (рисунок 28).

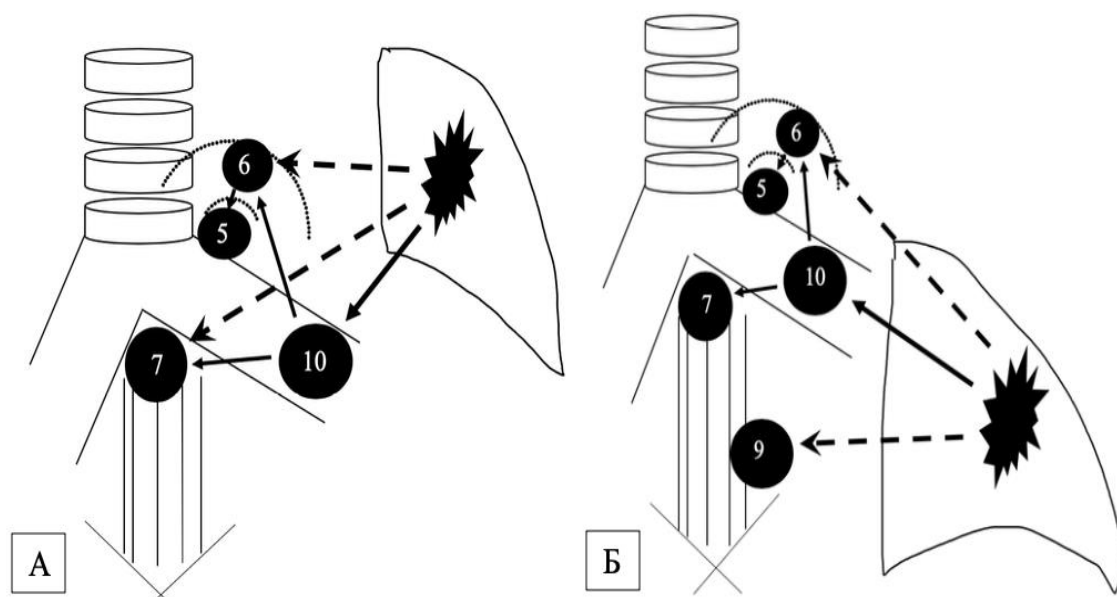


Рисунок 28 – Направление тока лимфы от долей левого легкого. А. от верхней доли левого легкого. Б. от нижней доли левого легкого. Сплошная стрелка – основной путь лимфооттока; пунктирная стрелка – дополнительный путь лимфооттока

5.3 Возможные причины отсутствия флуоресценции в регионарных лимфатических узлах

У 22 пациентов (24%) из 92 включенных в исследование отсутствовала флуоресценция в ЛУ. При анализе возможных причин выявлено, что у 12

пациентов (55%) была проведена НПХТ в связи с распространенностью основного заболевания. Учитывая данный факт, можно сделать предположение о влиянии химиопрепаратов на отток лимфы от легкого.

Таблица 5 – Пациенты, которым проведена предоперационная химиотерапия

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

У 100% больных которым проводилась ПХТ был плоскоклеточный рак. У 9 (75%) пациентов после проведенного лечения при контрольном инструментальном обследовании отмечался регресс опухоли, у 3 больных (25%) стабилизация заболевания (рисунок 30).

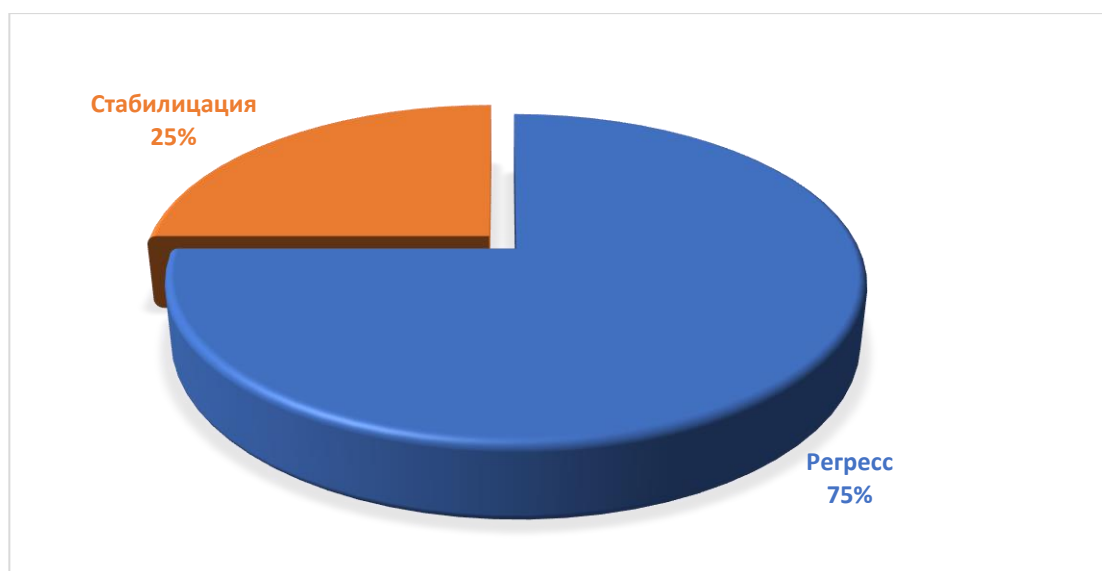


Рисунок 29 – Эффект от проведенной неоадьювантной полихимиотерапии

Лимфаденопатия средостения определенная на основании данных, полученных при МСКТ органов грудной клетки (сN), после проведенной НПХТ,

выявлена при патоморфологическом исследовании (pN) у 2 пациентов (17%) и не подтверждена в 10 случаях (83%).

Рестадирование по критерию N, при клинической и патоморфологической оценке распространения опухоли по лимфатическим путям, произведено у 10 пациентов (83%). У 2 пациентов (17%) при гистологическом исследовании подтверждено наличие метастазов в ЛУ средостения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Флуоресцентная диагностика в БИК области привлекает все большее внимание специалистов благодаря важным преимуществам – безопасности, простоте, высокой информативности. Для ее реализации необходимо наличие соответствующего оборудования. С целью проведения широкого круга клинических исследований разработан многофункциональный комплекс «FLUM-808», обеспечивающий возможность визуализации БИК флуоресценции и измерения ее интенсивности одновременно с наблюдением той же картины в белом свете при выполнении открытых, эндоскопических и микрохирургических операций. Такой подход существенно облегчает локализацию флуоресцирующих тканей в процессе проведения операций. Однако некоторые аспекты методики ИК-флуоресцентной лимфографии до настоящего времени остаются неизученными. Например, остается открытым вопрос об оптимальной концентрации ИЦЗ при лимфографических исследованиях, производимых при подкожном вводе препарата.

В экспериментальной работе на крысах была поставлена задача определения особенностей накопления ИЦЗ в опухолевой ткани. Опыты выполнялись на 18 крысах-самцах линии Вистар массой 200-250г, питомник «Рапполово». Крысам под кожу правого бедра, инъецировался гомогенат ткани 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 веса животного. 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 – раствор ИЦЗ в БСА в весовом отношении ИЦЗ/БСА=1:40;

Группа 3 – раствор 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 ИК 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 (питомник «Рапполово») весом $3 \pm 0,1$ 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 (0,01-0,02 мл, 0,025мг/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 при выполнении лимфографии легких от места введения конъюгата ИЦЗ и АЧ в 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». Перед разрезом в кожу грудной стенки в области предполагаемого разреза вводили новокаин (10 мл 1% раствора). После депиляции передней поверхности грудной стенки выполнялась двусторонняя переднебоковая торакотомия с поперечным пересечением грудины (по типу «clamshell») и вскрывались обе плевральные

полости. В паренхиму легкого в трех точках вводился конъюгат ИЦЗ и АЧ в количестве 3 мл и концентрации 0,1 мг/мл. От места введения с помощью системы FLUM-808 регистрировался ток лимфы вместе с раствором ИЦЗ + АЧ по лимфатическим путям в направлении корня легкого.

Отличительными особенностями ИЦЗ и АЧ являются безопасность и возможность медицинского применения. ИЦЗ – единственный разрешенный к медицинскому применению препарат, позволяющий реализовать принцип флуоресцентной диагностики скрытых от глаз изменений. Создание конъюгата ИЦЗ с альбумином, не требующее специальных условий, приводит к усилению флуоресценции и химической стабилизации ИЦЗ [94,98,99].

Сывороточные белки, и в частности, альбумин, привлекают внимание исследователей в качестве переносчика лекарственных средств. Имеют место попытки применения альбумина с целью направленной доставки противоопухолевых препаратов, а также создание конъюгатов с экзогенными флуорофорами и фотосенсибилизаторами для контроля доставки и фотодинамической терапии рака [89]. Однако существует ряд нерешенных проблем, связанных, в том числе, со специфичностью накопления флуорофоров в патологической ткани.

Проведен экспериментальный анализ уровня накопления в опухолевой и воспалительной ткани одного из наиболее доступных флуорофоров ИЦЗ в комбинации с разными альбуминами. Полученные в ходе исследования результаты свидетельствуют, что с помощью ИК флуоресценции можно выявлять пораженные участки ткани с высокой яркостью и контрастом, причем контраст при использовании конъюгатов ИЦЗ с альбуминами выше, чем при использовании только ИЦЗ. Этот эффект можно объяснить более медленным выведением конъюгата из пораженной ткани по сравнению с водным раствором ИЦЗ, а также существенно большим накоплением ИЦЗ с белками в патологической ткани, чем в здоровой [9, 68]. Причем, такая диагностика не является специфической для опухолевой ткани. Сходную картину

демонстрируют и воспаленные участки. Оба этих патологических процесса объединяет повышенная проницаемость сосудов, что может служить объяснением общего механизма выявления пораженных тканей. Флуоресценцию обуславливают молекулы ИЦЗ, вышедшие из сосудов в ткань. Они там задерживаются на большее время, чем в кровеносной системе, где их концентрация за короткое время резко падает из-за утилизации в печени (время полувыведения быстрой стадии составляет около нескольких минут). Предварительное связывание ИЦЗ с альбумином позволяет повысить его концентрацию в крови в связанном с белками виде, по сравнению с той, которая достигается естественным образом при внутривенном введении раствора, содержащего только ИЦЗ [33]. Вид альбумина при этом не сказывается на этом эффекте. Очевидно, что для клинических целей предпочтительнее применять альбумин человека.

Методика ИК флуоресцентной лимфографии реализована в процессе 92 анатомических резекций легких у больных НМРЛ. Достоверно визуализировать флуоресценцию ИЦЗ как минимум в 1 регионарном ЛУ корня легкого или средостения удалось у 70 пациентов (76%). У 22 пациентов флуоресценция ЛУ узлов зафиксирована не была.

Общее число исследованных патоморфологически групп ЛУ составило 312, в каждой группе содержалось от 1 до 7 ЛУ. Сторожевыми (флуоресцирующими) являлись 171 ЛУ (55%), в среднем 2,7 у одного больного. 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 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.

При плановом патоморфологическом исследовании метастазы в ЛУ диагностированы у 32 из 70 (43%) больных, степень регионарного лимфогенного метастазирования N1 имела место в 15 наблюдениях (47%), N2 – в 17

наблюдениях (53%). 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 7 пациентов (22%) выявлено 2-3 группы пораженных метастатическим процессом СЛУ. В остальных 24 наблюдениях (75%) метастазы выявлены лишь в одной группе СЛУ.

Так как перитуморальная инъекция раствора ИЦЗ во всех наблюдениях проводилась в доли легкого, в которых локализовалась первичная опухоль, сопоставление путей лимфооттока с локализацией первичной опухоли позволяло исследовать путь тока лимфы у каждого больного.

Так, при локализации первичной опухоли в верхней доле левого легкого (18 пациентов) наиболее часто, в 65% наблюдений, СЛУ локализовались в 10 и 11 группах ЛУ, в 45% наблюдений – 7 группе ЛУ, у 35% исследуемых отмечалось наличие СЛУ в 6 группе и 30% в 5 группах ЛУ.

При расположении первичной опухоли в верхней доле правого легкого (24 больных) наиболее часто, в 70% наблюдений, СЛУ локализовались в 4 группе ЛУ, в 60% наблюдений – в 10 и 11 группах ЛУ, в 50% случаев зафиксировано свечение в 7 группе, в 30% – в 3 группе.

Методика ИК-флуоресцентного выявления СЛУ позволила установить некоторые закономерности тока лимфы в зависимости от локализации первичной опухоли. Например, при локализации первичной опухоли в верхней доле правого легкого, в качестве СЛУ наиболее часто идентифицированы трахеобронхиальные лимфоузлы (у 70% больных), затем прикорневые и бифуркационные лимфоузлы (60 и 50% соответственно). При локализации опухоли в верхней доле левого легкого в качестве СЛУ наиболее часто определялись прикорневые лимфоузлы (75%) и бифуркационные (50%). Попадание ИЦЗ зарегистрировано в группах лимфатических узлов и средостения, и корня легкого у 63% флуоресцирующих групп ЛУ, только в медиастинальных ЛУ - в 27%, только в прикорневых ЛУ – в 10%. Полученные

результаты свидетельствуют об отсутствии четкой закономерности поражения различных групп ЛУ в зависимости от инъекции ИЦЗ в ту или иную долю легкого. Возможно, это связано с первичным поражением различных сегментов одной доли, лимфоотток от которых может быть разным, этот вопрос ранее практически не изучался. Другой вероятной причиной variability лимфооттока могут являться индивидуальные анатомические особенности строения лимфатической системы, а также приобретенные изменения в ней, накопленные в течение жизни пациентов. Никаким другим методом прижизненно определить направление тока лимфы от легких во внутригрудные лимфатические узлы не представляется возможным.

Таким образом, ток лимфы от легкого характеризуется variability. Говорить об одном СЛУ, 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 конъюгатов 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. Интерстициальное введение конъюгата ИЦЗ и АЧ позволяет визуализировать лимфатических сосуды и регионарные лимфатические узлы путем инфракрасной флуоресцентной диагностики
2. Для флуоресцентной визуализации лимфатических сосудов, оптимальным является использование лиофилизата ИЦЗ, растворенного в дистиллированной воде и смешанного с 20% альбумином человека в пропорции, обеспечивавшей соотношению числа молекул 1:1.
3. Отечественная инструментальная система для инфракрасной флуоресцентной визуализации может быть рекомендована для проведения широкого круга экспериментальных и клинических интраоперационных исследований лимфатической системы, 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, установить влияние тех или иных факторов оказывающие влияние на лимфоотток.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АЧ – альбумин человека

БИК – ближний инфракрасный

БСА – бычий сывороточный альбумин

ИК – инфракрасный

ИЦЗ – индоцианин зеленый

ИЦЗ – индоцианин зеленый

КТ – компьютерная томография

ЛП – лимфосаркомаплисса

ЛС – лимфатическая система

ЛУ – лимфатические узел

НМРЛ – немелкоклеточный рак легкого

НПХТ - неoadъювантнаяполихимиотерапия

СЛУ – сторожевые лимфатические узлы

ТВ – телевизионная

УЗИ – ультразвуковое исследование

ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акопов, А.Л. Интраоперационное определение сторожевых лимфатических узлов при раке легкого / А.Л. Акопов, Г.В. Папаян, И.В. Чистяков // Вестник хирургии им. И.И. Грекова. – 2015. – Т. 174, № 1. – С. 96-102.
2. Акопов, А.Л. Интраоперационное определение "сигнальных" лимфатических узлов при помощи системы инфракрасной визуализации при местно-распространённом немелкоклеточном раке лёгкого / А.Л. Акопов, Г.В. Папаян, И.В. Чистяков [и др.] // Вестник хирургии им. И.И. Грекова. – 2015. – Т. 174, № 4. – С. 13-17.
3. Акопов, А.Л. Недостатки и противоречия современной системы стадирования рака легкого / А.Л. Акопов // Вопросы онкологии. - 2006. - №1. - С.107-114.
4. Акопов, А.Л. Операционная диагностика степени лимфогенного метастазирования рака легкого / А.Л. Акопов // Вестник хирургии им. И. И. Грекова. - 2007. – Т. 166, №2. – С. 105-109.
5. Горбунова, В.А. Практические рекомендации по лекарственному лечению немелкоклеточного рака легкого / В.А. Горбунова, Е.В. Артамонова, В.В. Бредер [и др.] // Злокачественные опухоли: Практические рекомендации. – 2017. – Т. 7. – С. 28–42.
6. Давыдов, М.И. Систематическая медиастинальная лимфатическая диссекция - стандарт в хирургическом лечении больных немелкоклеточным раком легкого I, II и IIIa стадии / М.И. Давыдов, Б.Е. Полоцкий, А.К. Аллахвердиев // Пульмонология. – 2007. – № 3. – С.72-76.
7. Ерофеев, Н.П. Лимфатическая система - необходимый элемент жидкостного гомеостаза организма человека: новый взгляд на старые проблемы (обзор литературы) / Н.П. Ерофеев, Р.С. Орлов // Вестник СПбГУ. Медицина. – 2008. – 11 (№4). – С. 78–85.

8. Жданов, Д.А. Функциональная анатомия лимфатической системы / Д.А. Жданов. – Горький: 1940. – 110 с.
9. Кочубей, В.И. Спектральные характеристики индоцианина зеленого при его взаимодействии с биологическими тканями / В.И. Кочубей, Т.В. Кулябина, В.В. Тучин [и др.] // Оптика и спектроскопия. – 2005. – № 4. – С. 582–588.
10. Кузнецов, И.М. Рак легкого, осложненный воспалительными и гнойно-деструктивными изменениями в легочной паренхиме и грудной полости: дис. ... канд. мед. наук: 14.00.27 / Кузнецов Игорь Михайлович. – СПб., 2005. – 213.
11. Левашев, Ю.Н. Хирургическое лечение рака легкого в сочетании с хронической обструктивной болезнью легких и туберкулезом / Ю.Н. Левашев, А.Л. Акопов, А.В. Елькин [и др.] // Вестник РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. – 2003. – 14(1). – С. 25-28.
12. Папаян, Г.В. Инфракрасная флуоресцентная лимфография в экспериментальных и клинических условиях / Г.В. Папаян, А.Л. Акопов, П.А. Антонян [и др.] // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2018. – 17(2). – С. 84-91.
13. Папаян, Г.В. Флуоресцентная диагностика в ближнем инфракрасном диапазоне; аппаратура, применение / Г.В. Папаян, А.Л. Акопов // Оптический журнал. – 2016. – Т.63, №9. – С. 33-42.
14. Пищик, В.Г. Первый опыт применения флуоресценции с индоцианином зелёным для определения сегментарных границ при торакоскопических сегментэктомиях / В.Г. Пищик, А.И. Коваленко, Е.И. Зинченко [и др.] // Вестн. хир. – 2017. – №4. – С. 75-82.
15. Пшенкина, Н.Н. Сывороточный альбумин: структура и транспортная функция / Н.Н. Пшенкина // Фармакология. – 2011. – №12. – С. 1067–1091.

16. Седов, В.М. Роль сигнального лимфатического узла в хирургическом лечении рака желудка / В.М. Седов, М.Г. Рыбакова, А.Н. Яицкий [и др.] // Вестн. хир. – 2009. – №2. – С.18-21.

17. Чернов, В.И. Радионуклидные методы исследования в выявлении «сторожевых» лимфатических узлов / В.И. Чернов, С.Г. Афанасьев, И.Г. Синилкин [и др.]. – ГУ «НИИ онкологии Томского научного центра СО РАМН»: Томск, 2008. – № 4 (28). – С. 5-10.

18. Яблонский, П. К. Оценка регионарного метастазирования немелкоклеточного рака лёгких, осложнённого вторичным воспалительным процессом / П. К. Яблонский, Е. В. Павлушков, А. С. Петров [и др.]. // Новости хирургии. - 2010. - №3. -С.103-111.

19. Abels, C. Indocyanine green and laser light for the treatment of AIDS-associated cutaneous Kaposi's sarcoma / C. Abels, S. Karrer, W. Bäumlner [et al.] // British Journal of Cancer. - 1998. - Vol.77. - P.1021–1024.

20. Alander, J. A Review of Indocyanine Green Fluorescent Imaging in Surgery [Электронный ресурс] /J. Alander, I. Kaartinen, A. Laakso [et al.] // Int J Biomed Imaging. – 2012. – P. 1-26. – Режим доступа: <https://doi.org/10.1155/2012/940585>

21. Alex, J.C. Gamma-probe-guided lymph node localization in malignant melanoma / J.C. Alex, D.L. Weaver, J.T. Fairbank [et al.] // Surg Oncol.- 1993. - Vol.2. - P.303-308.

22. Baumler, W. Photo-oxidative killing of human colonic cancer cells using indocyanine green and infrared light /W. Baumler, C. Abels, S. Karrer [et al.] // British Journal of Cancer. - 1999. – Vol. 80. - P. 360–363.

23. Bilchik, A.J. Universal application of intraoperative lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy in solid neoplasms /A.J. Bilchik, A. Giuliano, R. Essner[et al.] // Cancer J Sci Am. - 1998. - Vol.4. - P. 351-358.

24. Bollinger, A. Fluorescence microlymphography: diagnostic potential in lymphedema and basis for the measurement of lymphatic pressure

and flow velocity / A. Bollinger, B.R. Amann-Vesti // *Lymphology*. – 2007. – 40(2). – P. 52–62.

25. Cabanas, R.M. An approach for the treatment of penile carcinoma / R.M. Cabanas // *Cancer*. – 1977. – Vol. 39. – P. 456-466.

26. Cerfolio, R. Complete Thoracic Mediastinal Lymphadenectomy Leads to a Higher Rate of Pathologically Proven N2 Disease in Patients With Non-Small Cell Lung Cancer / R. Cerfolio, A. Bryant, D. Minnich // *Ann Thorac Surg*. – 2012. – № 94 (3). – P. 902-906.

27. Cerfolio, R. Distribution and Likelihood of Lymph Node Metastasis Based on the Lobar Location of Nonsmall-Cell Lung Cancer [Электронный ресурс] / R. Cerfolio, A. Bryant // *Ann Thorac Surg*. – 2006. – 81(6). – P. 1969-1973. – Режим доступа: <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2005.12.067>. (дата обращения: 22.02.2019)

28. Chen, Z. Single camera imaging system for color and near-infrared fluorescence image guided surgery / Z. Chen, N. Zhu, S. Pacheco [et al.] // *Biomedical optics express*. – 2014. – Vol.5. – P. 2791-2797.

29. Christensen, B. Reliability of axillary lymph node scintigraphy in suspected carcinoma of the breast / B. Christensen, M. Blichert-Toft, O.J.Siemssen // *Br J Surg*.-1980.-Vol.67.-P.667-668.

30. Crane, L.M. Intraoperative multispectral fluorescence imaging for the detection of the sentinel lymph node in cervical cancer: a novel concept / L.M. Crane, G. Themelis, R.G. Pleijhuis [et al.] // *Mol Imaging Biol*. – 2011. – Vol.13. – P. 1043–1049.

31. Crane, L.M. Intraoperative near-infrared fluorescence imaging for sentinel lymph node detection in vulvar cancer: first clinical results / L.M.Crane, G. Themelis, H.J. Arts [et al.] // *Gynecologic Oncology*. – 2011. – Vol.120. – P. 291-295.

32. Cueni, LN. New insights into the molecular control of the lymphatic vascular system and its role in disease / LN. Cueni, M. Detmar // *J Invest Dermatol*. – 2006. – 126. – P. 2167–2177.

33. Davies-Venn, S. Albumin-binding domain conjugate for near-Infrared fluorescence lymphatic imaging / S. Davies-Venn, B. Angermille, N. Wilganowski[et al.] // *Mol Imaging Biol.* – 2012. – Vol. 14. – P. 301-304.

34. De Leyn, P. European trends in preoperative and intraoperative nodal staging [Электронный ресурс] / P. De Leyn, D. Lardinois, P. Van Schil [et al.] // *ESTS Guidelines. Journal of Thoracic Oncology.* – 2007. – 2(4). – P. 357-361. – Режим доступа: <https://doi.org/10.1097/01.jto.0000263722.22686.1c> (дата обращения: 22.02.2018)

35. Dixon, JM. Twenty-five years of change in the management of the axilla in breast cancer [Электронный ресурс] / JM. Dixon, CWJ. Cartlidge // *Breast J.* – 2020. – 26 (1). – P. 22-26. – Режим доступа: doi: 10.1111/tbj.13720. (дата обращения: 02.07.2018)

36. Garbe, C. European Dermatology Forum (EDF), the European Association of Dermato-Oncology (EADO), and the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) / C. Garbe, T. Amaral, K. Peris, [et al.] // *Eur J Cancer.* – 2012. – № 48 (15). – P. 2375-2390.

37. Gilchrist, R.K. Fundamental factors governing lymphatic spread of carcinoma / R.K. Gilchrist // *Ann Surg.* – 1940. – Vol. 111. – P. 630–639.

38. Gilmore, D.M. Identification of metastatic nodal disease in a phase 1 dose-escalation trial of intraoperativesentinel lymph node mapping in non-small cell lung cancer using near-infrared imaging / D.M. Gilmore, O.V. Khullar, M.T. Jaklitsch[et al.] // *J Thorac Cardiovasc Surg.* – 2013. – Vol.146. – P. 562-570.

39. Gioux, S. Image-guided surgery using invisible near-infrared light: fundamentals of clinical translation / S. Gioux // *Molecular Imaging.* – 2010. – Vol. 9. – P. 237–255.

40. Giuliano, A.E. Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer / A.E. Giuliano, D.M. Kirgan, J.M. Guenther [et al.] // *Ann Surg.* – 1994. – Vol.220. – P. 391–401.

41. Goldstraw, P. Report on the international workshop on intrathoracic staging [Электронный ресурс] / P. Goldstraw // Lung Cancer. – 1997. – 18(1). – P. 107-111. – Режим доступа: doi:10.1016/s0169-5002(97)00051-2
42. Gould, E.A. Observations on a «sentinel node» in cancer of the parotid / E.A. Gould, T. Winship, P.H. Philbin [et al.] // Cancer. – 1960. – № 13. – P. 77-78.
43. Goyal, A. New technologies for sentinel lymph node detection [Электронный ресурс] / A. Goyal // Breast Care. – 2018. – 13(5). – P. 349-353. – Режим доступа: <https://doi.org/10.1159/000492436> (дата обращения: 27.05.2017)
44. Gray, D.C. Dual-mode laparoscopic fluorescence image-guided surgery using a single camera / D.C. Gray, E.M. Kim, V.E. Coterо [et al.] // Biomedical optics express. – 2012. – Vol.3. – P. 1880-1189.
45. Gurtner, G.C. Intraoperative laser angiography using the SPY system: Review of the literature and recommendations for use / G.C. Gurtner, G.E. Jones, P.C. Neligan [et al.] // Ann. Surg. In- nov. Res. – 2013. – Vol. 7, No 1. – P. 1–14.
46. Halsted, W.S. The results of operations for the cure of cancer of the breast performed at the Johns Hopkins Hospital from June 1889 to January 1894 / W.S. Halsted // Johns Hopkins Hosp Bull. – 1894. – №4. – P. 297–323.
47. Howington, J. Treatment of stage I and II Non-small Cell Lung Cancer [Электронный ресурс] / J. Howington, M. Blum, A. Chang [et al.] // Chest. – 2013. – 143(5). – e278S-e313S. – Режим доступа: <https://doi.org/10.1378/chest.12-2359> (дата обращения: 12.04.2020)
48. Hamamtsu: photon is our business: сайт. — Япония. — URL <http://www.hamamatsu.com/jp/en/C9830.html> (дата обращения: 22.03.2019) — Текст: электронный
49. Perkinelmer: сайт. — США. — URL <http://www.perkinelmer.com/product/ivis-lumina-lt-inst-series-iii-120v-cls136331> (дата обращения: 22.02.2019) — Текст: электронный

50. Quest Medical Imaging Germany: — Германия. — URL <http://www.quest-mi.com/spectrum-overview> (дата обращения: 22.09.2019) — Текст: электронный

51. Ito, N. Sentinel node navigation surgery using indocyanine green in patients with lung cancer / N. Ito, M. Fukuta, T. Tokushima [et al.] // *Surgery Today*. – 2004. – Vol.34. – P. 581–585.

52. Jain, V. Sentinel lymph node detection using laser-assisted indocyanine green dye lymphangiography in patients with melanoma / V. Jain, B.T. Phillips, N. Conkling [et al.]// *Int J Surg Oncol*. – 2013. – Vol.13. – P.1-4.

53. Jiang, J.X. Optimization of the enhanced permeability and retention effect for near- infrared imaging of solid tumors with indocyanine green / J.X. Jiang, J.J. Keating, E.M. Jesus [et al.] // *Am J nucl Med Mol Imaging*. – 2015. – Vol. 5(4). – P. 390-400.

54. Kang, U. Apparatus and method for detecting NIR fluorescence at sentinel lymph node / U. Kang, G.V. Papayan// *US Patent Application*. – 2015. - No 2015/0018690.

55. Kapteijn, B.A.E. Identification and biopsy of the sentinel lymph node in breast cancer / B.A.E. Kapteijn, O.E. Nieweg, J.L. Peterse [et al.] // *Eur J Surg Oncol*. – 1998. – Vol.24. – P.427–430.

56. Kessous, R. Triple tracer (blue dye, indocyanine green, and Tc99) compared to double tracer (indocyanine green and Tc99) for sentinel lymph node detection in endometrial cancer: a prospective study with random assignment / R. Kessous, J. How, Abitbol // *Int J Gynecol Cancer*. – 2019. – 29(7). – P. 1121-1125.

57. Kett, K. Direct lymphography of the breast / K. Kett, G. Varga, L. Lukács // *Lymphology*. – 1970. – №1. – P. 3–12.

58. Kitai, T. Fluorescence navigation with indocyanine Green for detecting sentinel lymph nodes in breast cancer / T. Kitai, T. Inomto, M. Miwa, [et al.] // *Breast Cancer*. – 2005. – 12. – P. 211–215.

59. Krag, D.N. Surgical resection and radiolocalization of the sentinel lymph node in breast cancer using a gamma probe / D.N. Krag, D.L. Weaver, J.C. Alex [et al.] // *Surg Oncol.* – 1993. – Vol.2. – P. 335-339.
60. Kubota, K. Application of the hypereye medical system for esophageal cancer surgery: a preliminary report / K. Kubota, M. Yoshida, J. Kuroda [et al.]// *Surg Today.* – 2013. – Vol.43. – P. 215-220.
61. Kubuschok, B. Disseminated tumor cells in lymph nodes as a determinant for survival in surgically resected non–small cell lung cancer / B. Kubuschok, B. Passlick, J.R. IzbickiSuzuki [et al.]// *J Clin Oncol.* – 1999. – Vol.17. – P.19-24.
62. Lardinois, D. Bronchoscopic radioisotope injection for sentinel lymph-node mapping in potentially resectable non-small-cell lung cancer / D. Lardinois, T. Brack, A. Gaspert [et al.] // *Eur J Cardiothorac Surg.* – 2003.-Vol.23.-P.824–827
63. Lim, H. *Clinical Photomedicine* / H. Lim, N. Soter. – Marcel Dekker Inc; New York, 1993.
64. Liptay, M.J. Intraoperative radioisotope sentinel lymph node mapping in non-small cell lung cancer / M.J. Liptay, G.A. Master, D.J. Winchester [et al.] // *Ann Thorac Surg.* – 2000. – Vol.70. – P. 384-389.
65. Liptay, M.J. Intraoperative sentinel node mapping with technitium-99 in lung cancer: results of CALGB 140203 multicenter phase II trial / M.J. Liptay, T.A. D’Amico, C. Nwogu [et al.] // *J Thorac Oncol.* – 2009. – Vol.4. – P.198-202.
66. Little, A. Intraoperative lymphatic mapping for non-small cell lung cancer: the sentinel node technique / A. Little, A. DeHoyos, D.M. Kirgan[et al.]// *J Thorac Cardiovasc Surg.* – 1999. – Vol.117. – P. 220-224.
67. Maniwa, T. Recurrence of mediastinal node cancer after lobe-specific systematic nodal dissection for non-small-cell lung cancer [Электронныйресурс]/ T. Maniwa, T. Okumura, M. Isaka, K. Nakagawa [et al.] // *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery.* – 2013. – 44(1). - e59-e64. –

Режимдоступа: <https://doi.org/10.1093/ejcts/ezt195> (дата обращения: 20.08.2018)

68. Marshall, M.V. Near- infrared fluorescence imaging in humans with indocyanine green: a review and update / M.V. Marshall, J.C. Rasmussen, I-Chih tan [et al.]// *Open surg oncol J.* – 2012. – Vol. 2(2). – P. 2–23.

69. Matsuura, Y. Recent fluorescence imaging technology applications of indocyanine green in general thoracic surgery [Электронный ресурс]/Y. Matsuura , J. Ichinose, M. Nakao [et al.]// *Surg Today.* –2019. – Режим доступа: doi: 10.1007/s00595-019-01906-6. (дата обращения: 10.03.2019)

70. McGreevy, J.M. Minimally invasive lymphatic mapping using fluorescently labeled vitamin B12 / J.M. McGreevy, M.J. Cannon, C.B. Grissom // *J Surg Res.* – 2003. – Vol.111. – P. 38–44.

71. Miyoshi, S. Intraoperative nodal staging: role of sentinel node technology [Электронный ресурс]/ Т. Mizukami, M. Fujiwara, A. Suzuki [et al.] // *Thorac Surg Clin.* –2013. – 23(3). – P. 357-68. – Режим доступа: doi: 10.1016/j.thorsurg.2013.04.002. (дата обращения: 22.02.2019)

72. Mizukami, T. Sentinel Lymph Node Detection by Indocyanine Green Fluorescence Imaging in Skin Cancer Patients: Technical Refinement / Т. Mizukami, M. Fujiwara, A. Suzuki [et al.]// *The Open Surgical Oncology Journal.* – 2010. – Vol.2. – P.57-61.

73. Morton, D.L. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma / D.L. Morton, D.R. Wen, J.H. Wong [et al.] // *Arch Surg.* – 1992. – Vol.127. – P. 392–399.

74. Mountain, C. Regional lymph node classification for lung cancer staging [Электронный ресурс] / C. Mountain, C. Dresler // *Chest.* – 1997. – 111(6). – P. 1718-1723. – Режим доступа: <https://doi.org/10.1378/chest.111.6.1718>. (дата обращения: 26.01.2019)

75. Nakagawa, T. A novel method for sentinel lymph node mapping using magnetite in patients with non-small cell lung cancer / Т. Nakagawa, Y.

Minamiya, Y. Katayose [et al.]// J Thorac Cardiovasc Surg. – 2003. – Vol.126. – P. 563–567.

76. Naruke, T. Lymph node mapping and curability at various levels of metastasis in resected lung cancer / T. Naruke, K. Suemasu, S. Ishikawa // J Thoracic Cardiovasc Surg. – 1978. – 76. – P. 832–839.

77. Naruke, T. Lymph node sampling in lung cancer: how should it be done? [Электронный ресурс] / Т. Naruke // European Journal of Cardio-Thoracic Surgery. – 1999. – 16. – S17-S24. – Режим доступа: [https://doi.org/10.1016/S1010-7940\(99\)00178-5](https://doi.org/10.1016/S1010-7940(99)00178-5) (дата обращения: 18.07.2018)

78. Noromi, H. Sentinel lymph node mapping in lung cancer: the Japanese experience / H. Noromi // Semin Thorac Cardiovasc Surg. – 2009. – Vol.21. – P. 316-322.

79. Oh, Y. Intraoperative combined color and fluorescent images-based sentinel node mapping in the porcine lung: comparison of indocyanine green with or without albumin premixing / Y. Oh, Y.H. Quan, Y. Choi [et al.]// J Thorac Cardiovasc Surg. – 2013. – 146. – P. 1509-1515.

80. Reintgen, D.S. The orderly progression of melanoma nodal metastases / D.S. Reintgen, C.W. Cruse, K.E. Wells [et al.] // Ann Surg. – 1994. – Vol.220. – P. 759–767

81. Riquet, M. Anatomic basis of lymphatic spread from carcinoma of the lung to the mediastinum: Surgical and prognostic implications [Электронный ресурс] / M. Riquet // Surgical and Radiologic Anatomy. – 1993. – 15(4). – P. 271-277. – Режим доступа: <https://doi.org/10.1007/bf01627878>. (дата обращения: 18.04.2019)

82. Riquet, M. Direct lymphatic drainage of lung segments to the mediastinal nodes. An anatomic study on 260 adults / M.Riquet, G. Hidden, B. Debess // J Thorac Cardiovasc Surg. – 1989. – Vol.97. – P. 623-632.

83. Riquet, M. Is the lymphatic drainage of lung cancer lobe-specific? A surgical appraisal [Электронный ресурс] / M. Riquet, C. Rivera, C. Pricopi [et al.] // European Journal of Cardio-Thoracic Surgery. – 2014. – 47(3). – P. 543-

549. – Режим доступа: <https://doi.org/10.1093/ejcts/ezu226>. (дата обращения: 12.02.2019)

84. Schmidt, F.E. Sentinel nodal assessment in patients with carcinoma of the lung / F.E. Schmidt, E.A. Woltering, W.R. Webb [et al.]// *Ann Thorac Surg.* – 2002. – Vol.74. – P. 870-875.

85. Sentinel node biopsy for staging lung cancer / *Surg Clin North Am.*– 2002. – 82(3). – P. 561-571.

86. Sevick-Muraca, E. Emerging lymphatic imaging technologies for mouse and man. *Journal of Clinical Investigation* [Электронный ресурс] / E. Sevick-Muraca, S. Kwon // J. Rasmussen. – 2014. – 124(3). – P. 905-914. – Режим доступа: <https://doi.org/10.1172/jci71612> (дата обращения: 22.06.2020)

87. Sharma, R. Quantitative imaging of lymph function / R. Sharma, W. Wang, J.C. Rasmussen [et al.]// *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* –2007. – 292. – H3109–H3118.

88. Sharma, R. New Horizons for Imaging Lymphatic Function / R. Sharma, A.J. Wendt, J.C. Rasmussen [et al.]//*Ann N Y Acad Sci.* – 2008. – № 1131. – P.13–36

89. Sheng, Z. Indocyanine green nanoparticles for theranostic Applications / Z. Sheng, D. Hu, M. Xue [et al.] // *Nano-Micro Lett.* – 2013. – Vol. 5(3). – P. 145-150.

90. Shimada, Y. Retrospective Analysis of Nodal Spread Patterns According to Tumor Location in Pathological N2 Non-small Cell Lung Cancer [Электронный ресурс] / Y. Shimada, H. Saji, M. Kakihana [et al.]// *World J Surg.* – 2012. – 36(12). – P. 2865-2871. – Режим доступа: <https://doi.org/10.1007/s00268-012-1743-5> (дата обращения: 22.02.2019)

91. Shersher, D.D. Status of sentinel lymph node mapping in non-small cell lung cancer [Электронный ресурс]/ D.D. Shersher, M.J. Liptay//

Cancer J. – 2015. – 21(1). – P. 17-20. – Режим доступа: doi: 10.1097/PPO.0000000000000089 (дата обращения: 12.04.2019)

92. Sugi, K. Comparison of three tracers for detecting sentinel lymph nodes in patients with clinical N0 lung cancer / K. Sugi, M. Fukuda, H. Nakamura [et al.]// *Lung Cancer.* – 2003. – Vol.39. – P. 37–40.

93. Taghizadeh Kermania, A. Accuracy of sentinel node biopsy in the staging of non-small cell lung carcinomas: Systematic review and meta-analysis of the literature / A. Taghizadeh Kermania, R. Bagheri, S. Tehranian et al. // *Lung Cancer.* – 2013. – Vol.80. – P. 5–14.

94. Takizawa, T. Lymph node metastasis in small peripheral adenocarcinoma of the lung / T. Takizawa, M. Terashima, T. Koike [et al.] // *Thorac Cardiovasc Surg.* – 1998. – Vol.116. – P. 276-280.

95. Tanaka, E. Image-guided oncologic surgery using invisible light: completed pre-clinical development for sentinel lymph node mapping / E. Tanaka, H.S. Choi, H. Fujii [et al.] // *Annals of Surgical Oncology.* – 2006. – Vol.13, Vol.12. – P. 1671–1681.

96. Tiffet, O. Feasibility of the detection of the sentinel lymph node in peripheral non-small cell lung cancer with radio isotopic and blue dye techniques / O. Tiffet, A.G. Nicholson, A. Khaddage [et al.] // *Chest.* – 2005. – Vol.127. – P. 443-448.

97. Torre, LA. Global cancer statistics [Электронный ресурс] / LA. Torre, F. Bray, RL. Siegel [et al.] // *CA Cancer J Clin.* – 2015. – 65. – P. 87-108. – Режим доступа: <https://doi.org/10.3322/caac.21262> (дата обращения: 22.02.2020)

98. Troyan, S.L. The FLARE intraoperative near-infrared fluorescence imaging system: A first-in-human clinical trial in breast cancer sentinel lymph node mapping / S.L. Troyan, V. Kianzad, S.L. Gibbs-Strauss [et al.]// *Ann. Surg. Oncol.* – 2009. – Vol. 16, No 10. – P. 1–10.

99. Unno, N. Preliminary experience with novel fluorescence lymphography using indocyanine green in patients with secondary lymphedema

/ N. Unno, K. Inuzuka, M. Suzuki [et al.] // J Vasc Surg. – 2007. – 45. – P. 1016–1021.

100. Van der Poel, H.G. Intraoperative laparoscopic fluorescence guidance to the sentinel lymph node in prostate cancer patients: clinical proof of concept of an integrated functional imaging approach using a multimodal tracer / H.G. Van der Poel, T. Buckle, O.R. Brouwer [et al.] // Eur Urol. – 2011. – Vol. 60. – P. 826-833.

101. Weissbach, L. Localization of solitary and multiple metastases in stage II nonseminomatous testis tumor as basis for a modified staging lymph node dissection in stage I / L. Weissbach, E.A. Boedefeld // J Urol. - 1987. - Vol.138. - P. 77–82.

102. Yamashita, S.I. Sentinel node navigation surgery by thoracoscopic fluorescence imaging system and molecular examination in non-small cell lung cancer / S.I. Yamashita, K. Tokuishi, M. Miyawaki [et al.] // Ann Surg Oncol. – 2012. – Vol.19. – P. 728–733.

103. Yoshida, M. Indocyanine green injection for detecting sentinel nodes using color fluorescence camera in the laparoscopy-assisted gastrectomy / M. Yoshida, K. Kubota, J. Kuroda [et al.] // J. Gastroenterol. Hepatol. – 2012. – Suppl. 3. – P. 29–33.

104. Yuan, B. Emission and absorption properties of indocyanine green in intralipid solution / B. Yuan, n-G. Chen, Q. Zhu // J Biomed opt. – 2004. – Vol. 9(3). – P. 497–503.

105. Zeidman, I. Experimental studies of the spread of cancer in the lymphatic system / I. Zeidman, J.M. Buss // Cancer Res. – 1954. – Vol.14. –P. 403–405.