

СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ МЕТИЛЕНОВОГО СИНЕГО ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ПУТЕЙ ЛИМФООТТОКА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

В. В. Коваленко¹, О. В. Баринов¹, Е. Е. Фуфаев¹, И. В. Дмитроченко¹, И. В. Куракевич²,
А. П. Овчаренко¹

¹ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова» МО РФ, г. Санкт-Петербург, Россия

²Филиал № 1 ФГКУ "439 военный госпиталь" МО РФ, Приморский Край, Пограничный, Россия

COMPARISON OF EFFICIENCY OF METHYLENE BLUE DRUGS FOR VISUALIZATION OF LYMPHOTOUS WAYS IN THE EXPERIMENT

V. V. Kovalenko¹, O. V. Barinov¹, E. E. Fufaev¹, I. V. Dmitrochenko¹, I. V. Kurakevich²,
A. P. Ovcharenko¹

¹S. M. Kirov Military Medical Academy of the Russian Defense Ministry, Saint Petersburg, Russia

²Branch N 1 "439 Military Hospital" of the Russian Defense Ministry, Primorskiy Krai, Pogranichny, Russia

Резюме

Цель исследования. Сравнить и оценить эффективность использования препаратов метиленового синего для маркирования путей лимфооттока у лабораторных животных (крыса беспородная).

Материалы и методы. В эксперименте использовано 16 самок беспородных крыс в возрасте около 40 дней с начальной массой тела 180–220 г, содержащихся в стандартных условиях вивария. Для анестезии использовался препарат «Золазепам» (Zoletil®100). Животные рандомизированы в 2 группы по 8 особей в каждой. Первой группе подкожно в левое бедро вводился 1%-ный водный раствор метиленового синего, второй — метиленовый синий с человеческим сывороточным альбумином. В зависимости от времени экспозиции препарата животные случайным образом разделены на 4 подгруппы — 15, 30, 45 и 60 мин. Оценивалась эффективность маркирования путей лимфооттока от места инъекции.

Результаты. В результате исследования продемонстрировано, что использование 1%-ного раствора метиленового синего позволяет визуализировать пути лимфооттока при экспозиции препарата в течение 30 мин. При увеличении времени экспозиции происходит окрашивание лимфатических узлов следующего порядка. Раствор метиленового синего в сочетании с человеческим сывороточным альбумином окрашивает первый узел на пути лимфооттока спустя 30 мин после введения. Препарат характеризуется замедленной миграцией из лимфатических узлов первого порядка (>60 мин).

Заключение. Использование раствора метиленового синего в сочетании с сывороточным альбумином характеризуется замедленной миграцией из лимфатических узлов первого порядка, что делает его применение предпочтительным при оперативных вмешательствах (8 рис., 1 табл., библи.: 14 ист.).

Ключевые слова: метиленовый синий, микрометастаз, немелкоклеточный рак легкого, N-стадирование, сигнальный лимфатический узел, сторожевой лимфатический узел, человеческий сывороточный альбумин.

Статья поступила в редакцию 13.03.2020 г.

Summary

Objective. compare and evaluate the effectiveness of using methylene blue solutions to visualize lymphatic outflow pathways in laboratory animals (outbred rat).

Materials and methods. In the experiment were used 16 female outbred rats aged about 40 days with an initial body weight of 180–220 g contained in standard vivarium conditions. For anesthesia was used "Zolazepam" (Zoletil®100). Animals were randomized into 2 groups — 8 in each. The first group was injected subcutaneously in the left thigh with a 1% aqueous solution of methylene blue, the second group — solution of methylene blue with human serum albumin. Depending on the time of exposure, animals were divided randomly into 4 subgroups — 15, 30, 45 and 60 minutes. There was evaluated the effectiveness of marking the pathways of lymph outflow from the injection site.

Results. As a result of the study, it was demonstrated that the use of a 1% methylene blue solution allows visualizing of the lymphatic outflow paths during drug exposure for 30 minutes. Staining of the lymph nodes of the next order occurs with an increase in exposure time. A solution of methylene blue in combination with human serum albumin stains the first node in the lymph drainage path 30 minutes after administration. The drug is characterized by slow migration from the first order lymph nodes (>60 minutes).

Conclusion. The use of methylene blue solution in combination with serum albumin characterized by slow migration from the first order lymph nodes, which makes its use preferable in surgical interventions (8 figs, 1 table, bibliography: 14 refs).

Key words: human serum albumin, methylene blue, micrometastasis, non-small cell lung cancer, N-staging, sentinel lymph node, signal lymph node.

Article received 13.03.2020.

ВВЕДЕНИЕ

Рак легкого на протяжении последних лет занимает лидирующую позицию в структуре онкологической заболеваемости и смертности. Ежегодно во всем мире диагностируется более 2 000 000 новых случаев этого заболевания, 85–90% которого представлены немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) [1]. Кроме того, более 1 700 000 человек погибают ежегодно в связи с прогрессированием онкологического процесса. Несмотря на стремительное развитие медицины и онкологии в частности, отдаленная выживаемость среди мужчин и женщин по разным источникам остается около 19% [2]. Адекватное лечение НМРЛ ранних стадий (I–II) позволяет увеличить долю пациентов, переживающих 5-летний рубеж, до 64% и более [3].

Предоперационное выявление метастазов в регионарных лимфатических узлах (ЛУ) является важнейшим диагностическим этапом для определения прогнозов и тактики дальнейшего лечения [4]. У 20–30% пациентов, прошедших лечение по поводу НМРЛ I–II стадии, наблюдается местный или отдаленный рецидив заболевания, а 5-летняя выживаемость у этих больных варьирует от 40 до 85,5% [5]. Одной из причин неудовлетворительных результатов является распространение опухолевых клеток в регионарные узлы в виде микрометастазов, которые не выявлены при лучевой диагностике и рутинном гистологическом исследовании [3].

Активное использование низкодозовой компьютерной томографии (НДКТ) в качестве метода скрининга рака легкого позволило увеличить долю пациентов с подозрением на наличие злокачественного новообразования в легких [6, 7]. При I–II стадии НМРЛ должна быть использована активная хирургическая тактика для диагностики и лечения патологического процесса [8]. Стандартным объемом вмешательства является лобэктомия. Однако в последнее время предложены органосохраняющие анатомические резекции (сегментэктомии). Данный объем вмешательства может выполняться исключительно при доказанном отсутствии поражения регионарных ЛУ, что должно подтверждаться интраоперационно при определении индивидуальных путей лимфооттока.

В связи с вышесказанным создаются предпосылки для поиска новых методов, которые позволят усовершенствовать результаты диагностики поражения ЛУ у пациентов с НМРЛ. Одной из таких методик является интраоперационное выявление «сигнального ЛУ» (СЛУ), а также определение индивидуального типа лимфооттока. Данный подход

позволяет определить первый лимфатический коллектор на пути лимфогенного распространения онкологического процесса и выполнить его прицельную биопсию с целью определения состояния остальных регионарных ЛУ [9–11]. Однако на сегодняшний день отсутствует «идеальный» метод выявления СЛУ. Предложено использовать биологические красители, радиоизотопные препараты, флюоресцирующие и радиоконтрастные вещества. Но каждый из перечисленных методов имеет недостатки при использовании в клинической практике, что делает актуальной проблему поиска оптимального метода интраоперационного маркирования путей лимфооттока [12, 13].

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сравнить эффективность использования 1%-ного водного раствора метиленового синего (МС) и 1%-ного водного раствора метиленового синего с сывороточным человеческим альбумином (МС + альбумин) в эксперименте.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании проводились оценка и сравнение эффективности использования анилиновых красителей синего цвета для маркирования путей лимфооттока у лабораторных животных (крыса беспородная). В эксперименте использовано 16 самок беспородных крыс (ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово», Ленинградская область, РФ) в возрасте около 40 дней с начальной массой тела 180–220 г, содержащихся в стандартных условиях вивария. Для анестезии использовался препарат «Золазепам» (Zoletil®100). Все экспериментальные работы выполнялись в соответствии с требованиями международной конвенции. Получено разрешение этического комитета Военно-медицинской академии имени С. М. Кирова.

Животные рандомизированы в 2 группы по 8 особей в каждой. Первой группе для маркирования путей лимфооттока вводился 1%-ный водный раствор МС, второй — смесь 1%-ного водного раствора МС с 20%-ным раствором человеческого сывороточного альбумина (МС + альбумин). Введение препаратов осуществлялось по одинаковой методике: после предварительной анестезии маркирующий раствор вводился подкожно в бедренный сегмент левой задней конечности. После инъекции в течение 15 с выполнялись круговые массирующие движения в месте введения препарата. Далее

животные случайным образом разделены на 4 подгруппы в зависимости от времени экспозиции растворов — 15, 30, 45 и 60 мин.

По истечении времени животные выводились из эксперимента. Производилось вскрытие с целью определения эффективности маркирования ЛУ. ЛУ верифицированы на основании схемы, представленной в литературе [14]. Выполнялась биопсия СЛУ с последующим гистологическим исследованием. Его целью являлось изучение микроскопических изменений, наблюдаемых в маркированном ЛУ.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

У всех лабораторных животных проведена оценка эффективности интраоперационной визуализации путей лимфооттока от места введения хромолимфотропных препаратов МС + альбумин). По результатам визуальной оценки определялась эффективность введенного препарата для окраски путей лимфооттока (табл. 1).

При экспозиции препаратов в течение 15 мин в группах с использованием МС и МС + альбумин не обнаружено каких-либо различий. Вероятно, это

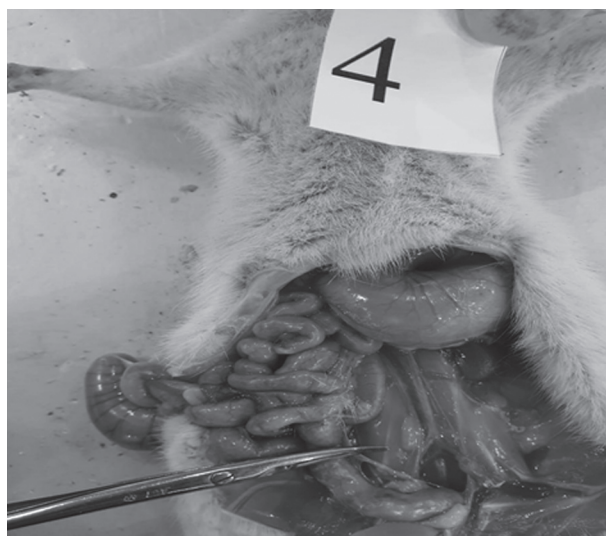


Рис. 1. Интраоперационная фотография: животное из группы МС. СЛУ не обнаружен



Рис. 2. Интраоперационная фотография: животное из группы МС + альбумин. СЛУ не обнаружен



Рис. 3. Интраоперационная фотография: животное из группы МС. Визуализирован СЛУ



Рис. 4. Интраоперационная фотография: животное из группы МС + альбумин. Визуализирован СЛУ

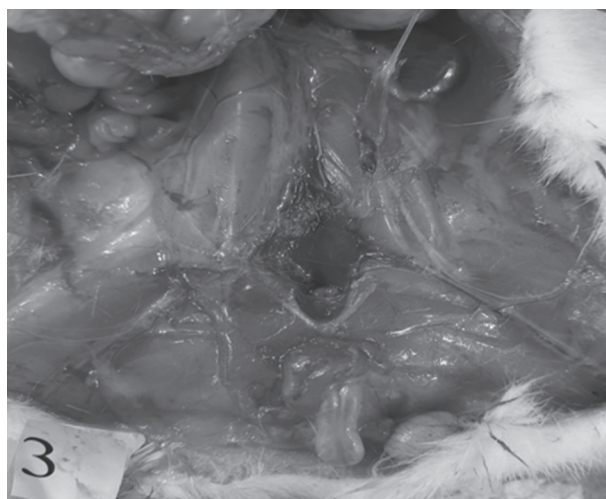


Рис. 5. Интраоперационная фотография: животное из группы МС. Визуализированы 3 ЛУ разных порядков



Рис. 6. Интраоперационная фотография: животное из группы МС + альбумин. Визуализирован СЛУ



Рис. 7. Интраоперационная фотография: животное из группы МС. СЛУ не визуализирован

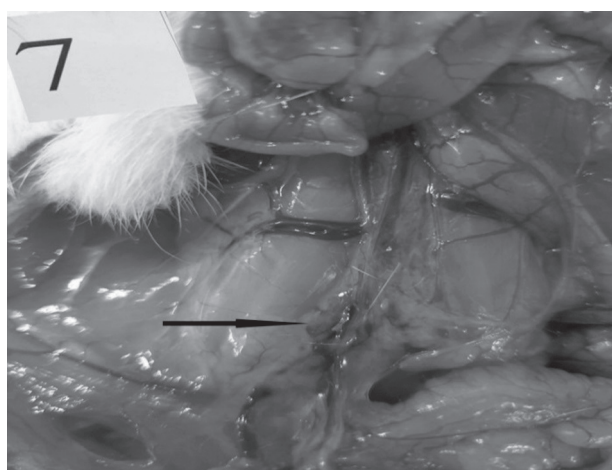


Рис. 8. Интраоперационная фотография: животное из группы МС + альбумин. Визуализирован СЛУ

Таблица 1

Результаты выявления СЛУ у крыс

Группа	15 мин	30 мин	45 мин	60 мин
1-я группа (МС)	—	+	++	—
2-я группа (МС + альбумин)	—	+	+	+

Примечание. «—» — окрашенные узлы отсутствуют; «+» — единственный окрашенный узел; «+ +» — несколько окрашенных узлов.

связано с недостаточным временем для миграции препарата из точки введения (рис. 1, 2).

Далее исследованы результаты маркирования СЛУ при экспозиции в течение 30 мин. В группах МС и МС + альбумин у всех 4 животных определялся единственный окрашенный ЛУ, который был расценен как сигнальный (рис. 3, 4).

На 45-й минуте экспозиции препарата в группе животных, которым вводился МС, наблюдалась миграция красителя в ЛУ следующего порядка, что делало невозможным обнаружение СЛУ. Во второй группе выявлялся единственный окрашенный лимфатический узел. (рис. 5, 6).

При экспозиции длительностью 60 мин результаты в группе МС + альбумин были получены аналогичные предыдущим, однако окраска узла оказалась чуть менее интенсивной, чем спустя 30 и 45 мин. Напротив, в группе, которой вводился МС, по истечении 60 мин окрашенных узлов не обнаружено (рис. 7, 8).

Из полученных маркированных ЛУ изготовлены микропрепараты. Структура ЛУ оставалась не измененной, а также не определялась гистологических признаков окрашивания МС. Таким образом, маркирование ЛУ синими красителями не изменяет микроструктуры препарата, что является важным критерием при поиске микрометастазов в ЛУ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Siegel R. L. Cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.* 2019; 69 (1): 7–34.
2. Bray F. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* 2018; 68 (6): 394–424.
3. Bille A. Incidence of occult pN2 disease following resection and mediastinal lymph node dissection in clinical stage I lung cancer patients. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 2017; 51 (4): 674–79.
4. Акопов А. Л., Папаян Г. В., Чистяков И. В. Intraoperative determination of “signal” lymph nodes using an infrared imaging system for locally advanced non-small cell lung cancer. *Vestnik khirurgii imeni I. I. Grekova.* 2015; 174 (4): 13–7. Russian (Акопов А. Л., Папаян Г. В., Чистяков И. В. Интраоперационное определение «сигнальных» лимфатических узлов при помощи системы инфракрасной визуализации при местно-распространенном немелкоклеточном раке легкого. *Вестник хирургии имени И. И. Грекова.* 2015; 174 (4): 13–7).
5. Amiraliev A. M., Pikin O. V., Ryabov A. B. Segmentectomy in patients with malignant neoplasms of the lungs. *P. A. Herzen Journal of Oncology.* 2017; 6 (5): 87–95. Russian (Амиралиев А. М., Пикин О. В., Рябов А. Б. Сегментэктомия у больных со злокачественными новообразованиями легких. *Онкология. Журнал им. П. А. Герцена.* 2017; 6 (5): 87–95).
6. Usman A. M., Miller J., Peirson L., Fitzpatrick-Lewis D., Kenny M., Sherifali D., Parminder R. Screening for lung cancer: A systematic review and meta-analysis. *Prev. Med.* 2016; 89 (3): 301–14.
7. Silvestri G. A., Gonzalez A. V., Jantz M. A., Margolis M. L., Gould M. K., Tanoue L. T., Harris L. J., Detterbeck F. C. Methods for staging non-small cell lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American college of chest physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest.* 2013; 143 (5): 211–50.
8. Ettinger D. S., Wood D. E., Aisner D. L., Akerley W., Bauman J. R., Bharat A., Bruno D. S., Chang J. Y., Chirieac L. R. Non-Small Cell Lung Cancer, Version 1.2020, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* 2019; 15 (4): 504–35.
9. Manikhas G. M., Martynyuk V. V., Zin'kevich M. V. Biopsy of the signal lymph node with melanoma of the skin of the limbs and trunk. *Vestnik Sankt-Peterburgskoy gosudarstvennoy meditsinskoy akademii imeni I. I. Mechnikova.* 2008; 1: 107–10. Russian (Манихас Г. М., Мартынюк В. В., Зинькевич М. В. Биопсия сигнального лимфатического узла при меланоме кожи конечностей и туловища. *Вестник Санкт-Петербургской государственной медицинской академии имени И. И. Мечникова.* 2008; 1: 107–10).
10. Ismagilov A. Kh., Asnina N. G., Azarov G. A. Signal lymph node biopsy: history and modernity. *Opukholi zhenskoy reproductivnoy sistemy.* 2018; 14 (1): 38–46. Russian (Исмагилов А. Х., Аснина Н. Г., Азаров Г. А. Биопсия сигнальных лимфатических узлов: история и современность. *Опухоли женской репродуктивной системы.* 2018; 14 (1): 38–46).
11. Tiffet O., Perrot J. L., Gentil-Perret A., Prevot N., Dubois F., Alamrtine E., Cambazard F. Sentinel lymph node detection in primary melanoma with preoperative dynamic lymphoscintigraphy and intraoperative γ probe guidance. *Br. J. Surg.* 2004; 91(7): 886–92.
12. Wishart G. C., Loh S.-W., Jones L., Benson J. R. A feasibility study (ICG-10) of indocyanine green (ICG) fluorescence mapping for sentinel lymph node detection in early breast cancer. *Eur. J. Surg. Oncol.* 2012; 38 (8): 651–6.
13. Hachey K. J., Colson Y. L. Current Innovations in Sentinel Lymph Node Mapping for the Staging and Treatment of Resectable Lung Cancer. *Semin. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2014; 26 (3): 201–9.
14. Treuting P. M., Dintzis S. M., Montine K. Hematopoietic and Lymphoid Tissues. In: *Comparative Anatomy and Histology. Second Edition. A Mouse, Rat, and Human Atlas.* London, UK: Academic Press, Elsevier Publisher; 2018: 365–401.

ВЫВОДЫ

1. Использование 1%-ного раствора МС позволяет адекватно визуализировать пути лимфооттока. Недостатком препарата является миграция в ЛУ следующего порядка при экспозиции длительностью 30 мин.

2. Раствор МС в сочетании с человеческим сывороточным альбумином обладает сравнимым качеством визуализации ЛУ, однако обладает замедленной (>60 мин) миграцией, что является предпочтительным во время операции.

УВЕДОМЛЕНИЕ

Авторы внесли равный вклад в данную работу и сообщают об отсутствии какого-либо конфликта интересов.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Коваленко Владислав Викторович — студент медицинского факультета, ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова» МО РФ, 194044, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 6

Баринов Олег Владимирович — докт. мед. наук, заместитель начальника кафедры госпитальной хирургии, ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова» МО РФ, 194044, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 6

Фуфаев Евгений Евгеньевич — канд. мед. наук, доцент кафедры госпитальной хирургии, ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова» МО РФ, 194044, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 6

Дмитроченко Иван Валерьевич — врач кафедры госпитальной хирургии, ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова» МО РФ, 194044, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 6

Куракевич Игорь Владимирович — старший ординатор, филиал № 1 ФГКУ «439 военный госпиталь» МО РФ, 692584, Россия, Приморский Край, р-н Пограничный, с. Сергеевка, ул. Стрельникова, д. 19, корп. А

Овчаренко Александр Павлович — начальник курса медицинского факультета, ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова» МО РФ, 194044, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 6

ACKNOWLEDGMENT

Authors contributed equally into this work and declare no conflict of interest.

INFORMATION ABOUT AUTHORS

Kovalenko Vladislav V. — medical student, S. M. Kirov Military Medical Academy of the Russian Defense Ministry, bld. 6, Akademika Lebedeva str., Saint Petersburg, Russia, 194044

Barinov Oleg V. — M. D., D. Sc. (Medicine), the Deputy Head of the Hospital Surgery Department, S. M. Kirov Military Medical Academy of the Russian Defense Ministry, bld. 6, Akademika Lebedeva str., Saint Petersburg, Russia, 194044

Fufaev Evgeniy E. — M. D., Ph. D. (Medicine), Associate Professor of the Hospital Surgery Department, S. M. Kirov Military Medical Academy of the Russian Defense Ministry, bld. 6, Akademika Lebedeva str., Saint Petersburg, Russia, 194044

Dmitrochenko Ivan V. — M. D., doctor of the Hospital Surgery Department, S. M. Kirov Military Medical Academy of the Russian Defense Ministry, bld. 6, Akademika Lebedeva str., Saint Petersburg, Russia, 194044

Kurakevich Igor V. — senior resident, Branch N 1 "439 Military Hospital" of the Russian Defense Ministry, bld. 19, Strelnikova str., Sergeevka village, Pogranichniy distr., Primorskiy Krai, Russia, 692584

Ovcharenko Alexandr P. — M. D., the Head of the Medicine Department, S. M. Kirov Military Medical Academy of the Russian Defense Ministry, bld. 6, Akademika Lebedeva str., Saint Petersburg, Russia, 194044