

Применение конфокальной лазерной микроскопии для контроля сеточных имплантатов в герниологии

В.П.Захаров, В.И.Белоконев, И.А.Братченко, П.Е.Тимченко,
Ю.В.Пономарева, А.В.Вавилов, Л.Т.Волова

Методом лазерной конфокальной микроскопии исследовано состояние поверхности сеточных имплантатов и зоны их инкапсуляции в герниологии. Экспериментально показана корреляция между вероятностью развития рецидивов и размерами и плотностью микродефектов имплантата. На основании модельных численных экспериментов установлены границы применимости метода дифференциального обратного рассеяния для мониторинга послеоперационного состояния имплантата и прилегающих тканей.

Ключевые слова: лазерная конфокальная микроскопия, микродефекты поверхности, сеточный имплантат, зона инкапсуляции, герниопластика, математическое моделирование, метод Монте-Карло.

1. Введение

Многочисленные исследования и применение различных имплантатов (из полипропилена, политетрафлюорэтилена, углеродных волокон) связаны с попыткой найти идеальный материал, который бы обеспечивал сочетание высоких биомеханических показателей с эффективностью процесса трансплантации и отсутствием послеоперационных последствий и рецидивов [1]. Сеточные имплантаты относятся к группе эндопротезов, получаемых сплетением искусственных волокон различного химического состава и толщины с помощью тонких моно- и комплексных нитей [2]. Данные имплантаты имеют толщину порядка несколько сотен микрон, а диаметр их волокон колеблется в диапазоне 50–200 мкм. Как правило, основными показателями, используемыми при выборе того или иного имплантата, являются отсутствие токсичности, совместимость с тканями организма, быстрая и надежная стерилизация. Вместе с тем эффективность процесса трансплантации во многих практически значимых случаях зависит от реакции тканей организма на используемые имплантаты, их расположения между различными анатомическими структурами, стимулирования регенерации, изменения физико-механических свойств трансплантатов в процессе эксплуатации. Сравнительная оценка реакций тканей на имплантацию синтетических материалов, обладающих различными физико-химическими свойствами, имеет важное практическое значение для прогнозирования возможных осложнений.

Следует отметить, что процессы вживления трансплантата зависят от его плотности, сроков резорбции,

топологии, наличия микродефектов поверхности, влияющих на процесс инкапсуляции элементов имплантата, образования сосудистых и нервных связей между тканевыми слоями. Детальный анализ процесса трансплантации с учетом указанных параметров возможен только на клеточном уровне. Традиционно для морфологического исследования тканей применяют гистологические методы с использованием широкопольной микроскопии [3], методы электромиографии [4] и ультразвукографии [5]. Однако эти методы не обладают достаточным пространственным разрешением. Для детального анализа процесса трансплантации требуется обеспечить разрешение на уровне ~ 1 мкм в слое ткани, заведомо включающем в себя исследуемый эндопротез, т.е. необходимы неразрушающий трехмерный анализ и контроль с высоким разрешением. Данное требование может быть удовлетворено при использовании метода конфокальной лазерной микроскопии [6], позволяющего получить изображение с высоким контрастом и обеспечить разрешение объектов, интенсивности которых различаются в 200 раз.

Цель настоящей работы – изучение особенностей применения метода конфокальной лазерной микроскопии в герниологии, определение закономерностей, проявляющихся при изменении свойств сеточных протезов в зависимости от формы, типа плетения и химического состава в ходе срачивания с тканями организма, выявление возможностей детектирования различных патологий раневого процесса, возникающих в зоне эндопротеза.

2. Материалы и методы исследования

Конфокальная лазерная система была собрана на основе инвертированного оптического микроскопа Olympus IX71 со сканирующим модулем Yokogawa[®] CSU-X1, работающим по принципу диска Нипкова [7]. В качестве лазерного источника использовался модуль ALC-400 с волоконным акустооптическим управлением излучением твердотельных DPSS-лазеров с длинами волн 488 и 532 нм. Регистрация изображений осуществлялась с помощью EMCCD-камеры Andor iXON^{EM} и программного обеспечения Andor iQ. Данная система обеспечивала

В.П.Захаров, И.А.Братченко, П.Е.Тимченко Самарский государственный аэрокосмический университет им. акад. С.П.Королева, Национальный исследовательский университет, Россия, 443086 Самара, Московское ш., 34

В.И.Белоконев, Ю.В.Пономарева, А.В.Вавилов, Л.Т.Волова Самарский государственный медицинский университет, Россия, 443099 Самара, ул. Чапаевского, 89; e-mail: info@samsmu.ru

Поступила в редакцию 25 февраля 2011 г.

регистрацию до 2000 оптических срезов в секунду при поперечном и продольном разрешении 800 нм.

В процессе исследований контролировались как микроскопические характеристики имплантатов, так и процесс формирования тканей при наличии эндопротеза, т.е. взаимодействие имплантат – ткань.

Материалы и свойства исследованных имплантатов приведены в табл.1.

3. Микроскопический анализ сеточных имплантатов

Исследования проводились для двух основных групп имплантатов, используемых в медицинской практике (табл.1): моноволоконных полипропиленовых сеток и сеток, образованных комбинированными волокнами, включающими наряду с синтетическими полипропиленовыми волокнами рассасывающиеся нити (викрил). Топология и жесткость данных сеток определяется как материалом и диаметром используемого волокна, так и типом плетения.

Характерные микродефекты поверхности различных типов сеточных имплантатов представлены на рис.1. Установлено, что поверхность сеток Prolene имеет гладкую структуру, однако встречаются отдельные достаточно крупные неоднородности размером до 10 мкм, которые занимают до 2 % от общей поверхности сетки. Для сеток Линтекс Эсфил характерно наличие множественных мелкокомасштабных дефектов поверхности (средние размеры дефектов лежат в диапазоне 4–6 мкм), плотность которых повышается в области плетения. Эсфил – моноволоконная сетка, состоящая из двух параллельно идущих волокон диаметром 90 (легкий), 120 (стандартный) и 140 мкм (тяжелый); причем если для легкого Эсфила характерны поверхностные «плоские» дефекты площадью

20 × 100 мкм и высотой до 15 мкм, то для стандартного Эсфила неоднородности имеют вид ворсинок, колбочек и шарообразных вкраплений со средним размером, лежащим в диапазоне 30–40 мкм. Аналогичная картина характерна и для тяжелого Эсфила, однако средний размер неоднородностей увеличивается до 40–60 мкм. Доля неоднородностей от общей площади поверхности составляет менее 1 % для всех типов сеток Эсфил. Следует, однако, иметь в виду, что узлы плетения данного типа сеток занимают значительную долю протеза (от 10 % до 40 % его объема), что увеличивает неоднородность строения имплантата.

Моноволоконные полипропиленовые сетки Optilene® Mesh характеризуются неоднородностями порядка 30–40 мкм. Доля неоднородностей от общей площади поверхности не превышает 1 %.

Эндопротез Premilene® Mesh обладает наилучшей чистотой поверхности среди исследованных полипропиленовых моноволоконных сеток. Неоднородности представляют собой редко встречающиеся шипообразные образования длиной до 30 мкм и диаметром менее 15 мкм (занимают менее 0.1 % от площади поверхности).

Для эндопротезов на основе моноволокна терефталата полиэтилена (сетка Mersilene) зарегистрировано отслоение отдельных нитей, образующих дефект в виде острия. Размеры остриеподобных дефектов колеблются в диапазоне 15–25 мкм. Наряду с дефектами в виде острия поверхность сетки Mersilene также содержит отдельные крупные неоднородности диаметром 20–40 мкм, что приводит к увеличению доли поверхности, занимаемой неоднородностями, до 10 % – 12 %.

Для эндопротезов на основе поливинилиденфторидной мононити (Унифлекс) характерны два типа неоднородностей – небольшие дефекты порядка нескольких микрометров, по всей видимости, связанные с технологи-

Табл.1. Основные типы сеточных имплантатов и их характеристики

Тип имплантата	Состав	Плотность (г/м ²)	Пористость(%)	Средний размер дефектов (мкм)
Prolene Ethicon	Моноволокна изотактического кристаллического стереоизомера полипропилена (диаметр 115 мкм)	56	60	2–3
Mersilene	Моноволокна терефталат полиэтилена (диаметр 130 мкм)	66	68	15–25
Vipro	Композитные волокна пролен-викрила	93	73	5–40
Эсфил легкий	Моноволокна полипропилена (диаметр 90 мкм, толщина 380 мкм)	34	92	15–20
Эсфил стандартный	Моноволокна полипропилена (диаметр 120 мкм, толщина 500 мкм)	62	85	30–40
Эсфил тяжелый	Моноволокна полипропилена (диаметр 140 мкм, толщина 650 мкм)	95	80	до 60
Унифлекс	Поливинилиденфторидные мононити (диаметр 120 мкм, толщина 480 мкм)	160	85	до 10
Фторэкс	Лавсановые комплексные нити с фторполимерным покрытием (диаметр 420 мкм)	48	88	20–25
Optilene® Mesh	Моноволокна полипропилена (диаметр 160 мкм)	60	89	40
Optilene® Mesh LP	Моноволокна полипропилена (диаметр 140 мкм)	36	89	30
Optilene® Mesh Elastic	Моноволокна полипропилена (диаметр 190 мкм)	48	85	40
Premilene® Mesh	Моноволокна полипропилена (диаметр 130 мкм)	82	75	15

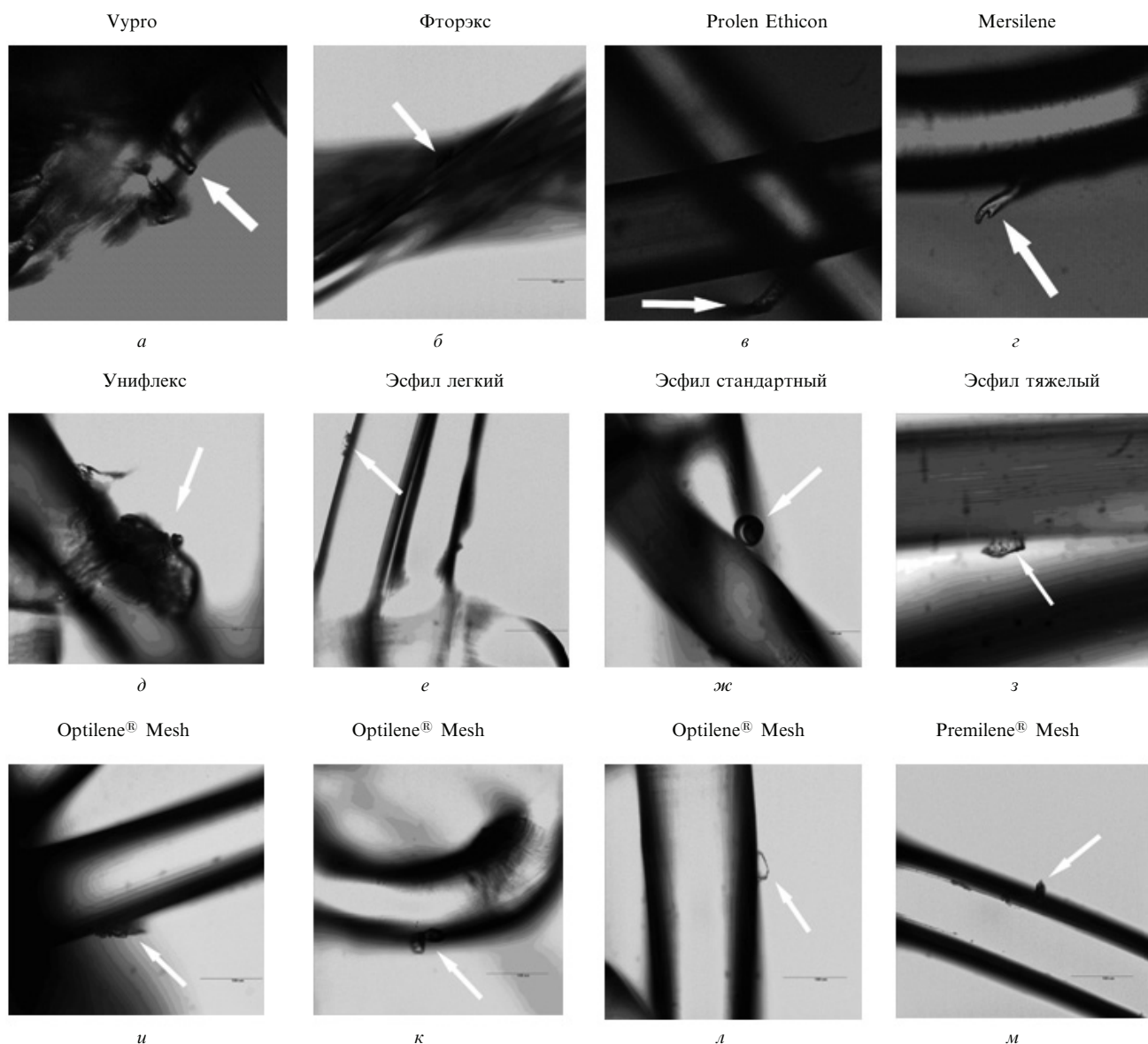


Рис.1. Характерные микродефекты поверхности различных имплантатов. Размеры изображений 250×250 (а, в и г) и 400×400 (б, д–м) мкм.

ей вытягивания сетки, и довольно большие неоднородности (60–100 мкм), сопоставимые по размерам с диаметром волокна сетки. Неоднородности занимают 5%–7% от общей поверхности имплантата.

Комплексные многоволоконные сетчатые имплантаты, как правило, характеризуются большей степенью неоднородности. При этом можно выделить неоднородности двух качественно разных типов: микронарушения в виде структурных дефектов поверхности и неоднородности в виде острия (оборванные микроволокна жгута). Так, имплантат Фторэкс представляет собой жгут диаметром порядка 100 мкм, образованный лавсановыми нитями с фторполимерным покрытием диаметром ~ 20 мкм. Средний размер неоднородностей типа острия составляет 4–5 мкм, а структурных неоднородностей поверхности – от 20 до 25 мкм. Неоднородности занимают 2%–3% от площади поверхности эндопротеза.

Для комплексной сетки Вурго характерны дефекты плетения, приводящие к структурным дефектам поверхности и микронарушениям ее топологии. Структура данной сетки представляет собой сплетение множества отдельных волокон (диаметром около 15 мкм) в большие

жгуты (100–150 мкм в диаметре), вследствие чего наблюдается большое количество выступающих частей.

4. Клинические исследования имплантатов

Оценка цитотоксичности и биосовместимости синтетических эндопротезов проводилась на первичных культурах дермальных фибробластов человека [8]. Исследовались эндопротезы Prolen Ethicon, Вурго и Эсфил стандартный. Каждый из эндопротезов размером 5×5 мм помещался в чашку Петри, в которой находился сформированный равномерный монослой клеток. Помещение имплантата Вурго приводило к выраженной альтерации и массовой гибели клеток. Время удвоения культуры клеток в ростовой среде составило 27 ч, а количество «спуленных» клеток было в 3.5 раза выше, чем в контрольном образце. Образцы имплантата Эсфил за счет своей монофиламентной структуры оказывали умеренное повреждающее воздействие на культуру клеток. Наиболее выраженное замедление (в 1.5 раза по сравнению с контрольным) нарастания плотности монослоя наблюдалось в области дефектов поверхности и переплетения

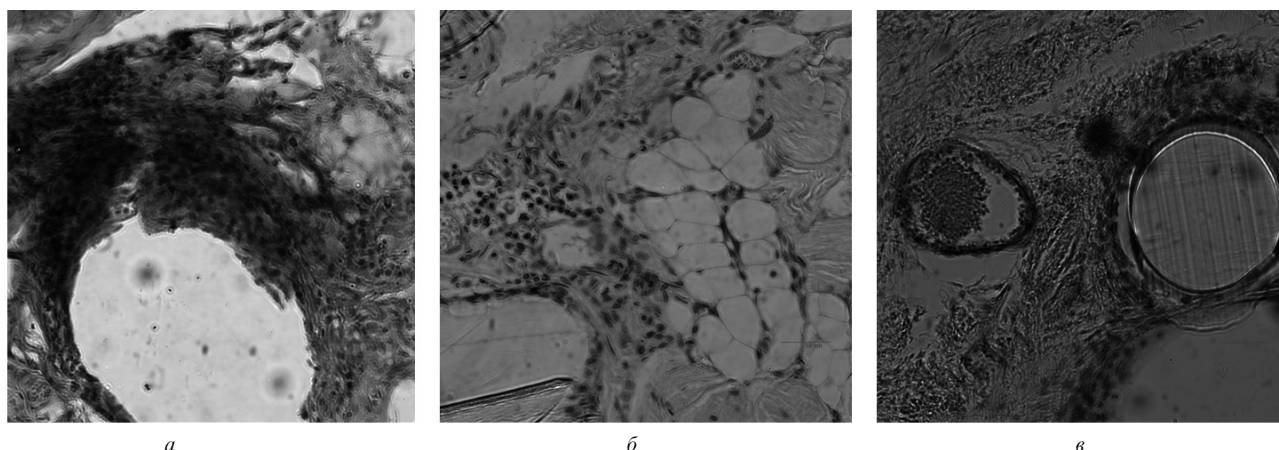


Рис.2. Микроскопические снимки (400×400 мкм) патологий в тканях, вызванные наличием сеточного эксплантата: микрокровоизлияние (а), образование жировой ткани (б) и люфт (в).

волокон. Наименьшее повреждающее воздействие на культуру клеток оказывал имплантат Prolene Ethicon. Для него наблюдалась выраженная адгезия клеток к поверхности имплантата с ориентацией отростков фибробластов вдоль волокон.

Экспериментальные исследования выполнены на 16 белых лабораторных крысах обоего пола, массой от 180 до 230 г, которым под эфирным наркозом в брюшную стенку имплантировали пропиленовые имплантаты Prolene Ethicon или Эсфил стандартный. Контрольная группа состояла из четырех животных. Животных наблюдали в течение девяти месяцев после проведения операций, затем их выводили из эксперимента с помощью передозировки эфирного наркоза. Для микроскопических исследований забирали брюшную стенку с полипропиленовым имплантатом и прилегающей к нему тканью. Забранный материал фиксировался в 10 %-ном нейтральном формалине. Изготавливались серийные срезы, которые окрашивали гемактоксином и эозином, пикрофуксином по методу Ван-Гизона; шик-реакция по Мак Манусу.

Через девять месяцев ячейки сетки имплантата Эсфил окружены мощной соединительной тканью, которая плотно охватывает нити полипропилена. Зрелые коллагеновые волокна расположены концентрично, непосредственно к поверхности волокон прилегают крупные клетки округлой формы с большими ядрами. Можно наблюдать отдельные участки лимфоцитарной инфильтрации, свидетельствующей об микрокровоизлияниях и развитии некроза (рис.2,а).

При использовании эндопротеза Prolene Ethicon наблюдались признаки аутоиммунного процесса. Мышечная ткань отечная, отмечается разрастание эндомизия, некоторые волокна с признаками миоцитолита. Около атрофированных мышечных волокон встречаются макрофаги. Форма мышечных тканей изменена с полигональной на округлую. В области имплантата наблюдается неравномерное разрастание коллагеновых волокон (незрелая грануляционная ткань) вокруг нитей полипропилена. Между коллагеновыми волокнами расположено большое количество жировых клеток с истонченной цитолеммой и большим количеством сосудов микроциркуляторного русла (рис.2,б). В жировых клетках вакуоль занимает практически всю цитоплазму. Наблюдается полнокровие в сосудах микроциркуляторного русла.

Для обоих типов имплантатов в зоне инкапсуляции сетки отмечается разрастание эндомизия и жировой тка-

ни, в которой встречается большое количество сосудов микроциркуляторного русла. На отдельных участках между соединительной тканью и волокном наблюдаются пустоты, свидетельствующие о смещении имплантата по типу люфта, приводящего к микротравме в зоне имплантации (рис.2,в).

Развитие люфта в области границы ткань – волокно имплантата представляет угрозу целостности всей зоны инкапсуляции. При наличии люфта движение имплантата внутри ткани приводит к ее механическому повреждению, прорезанию ткани и развитию микротравмы. Вероятность развития микротравмы растет с увеличением размеров, количества и плотности микродефектов поверхности эндопротеза. Данные повреждения не только увеличивают область люфта и препятствуют прорастанию имплантата, но и способны вызывать более серьезные повреждения тканей, такие как кровоизлияния. Контроль сеточных имплантатов до их вживления в ткани организма обеспечивает определение проблемных зон, содержащих крупные неоднородности и способных приводить к образованию люфтов, что позволяет уменьшить риски возникновения патологических образований в зоне инкапсуляции.

По результатам клинических исследований можно сделать вывод, что однородность плетения и состояние поверхности волокон эндопротеза, обусловленные технологическими особенностями производства, существенным образом влияют на процессы инкапсуляции сеточного имплантата. Образование новых тканей вблизи протеза, скорость заживления раны, возможности кровоизлияний – все эти процессы напрямую зависят от размеров и плотности неоднородностей поверхности имплантата. Вблизи неоднородностей замедляется рост новых тканей, повышается вероятность некротического образования, а наличие крупных неоднородностей (сопоставимых по размерам с диаметром волокна) может приводить к механическим повреждениям ткани и образованию люфта в области инкапсуляции.

5. Оценка возможности оптического мониторинга процесса трансплантации

Проведенные микроскопические исследования показывают, что в процессе заживления и образования зоны инкапсуляции основные патологические изменения тканей связаны с замещением нормальной ткани жировыми

клетками и образованием некротической ткани вблизи волокон эндопротеза. В случае появления микрокровоизлияния и жировых клеток в зоне инкапсуляции ткани теряют нормальную эластичность, следствием чего являются механические повреждения и возможный сдвиг эндопротеза. Своевременная и точная диагностика развития рассмотренных патологий на ранних стадиях их появления позволяет начать своевременное лечение и снизить опасность развития рецидивов. Следует отметить, что ввиду обширного раневого поля мониторинг послеоперационного раневого процесса и детектирование возможного развития патологии могут быть проведены на основе дифференциального анализа рассеянного оптического излучения и выявления неоднородностей, связанных с наличием некротической ткани и/или дистрофических изменений в ткани, прилегающей к области расположения волокон имплантата.

Для оценки возможности мониторинга раневого процесса указанным методом в математическую модель многослойной биологической среды [9] была добавлена зона инкапсуляции, содержащая сеточный эндопротез. Распределение интенсивности рассеянного излучения определялось методом Монте-Карло [10], численные значения оптических коэффициентов поглощения и рассеяния выбирались на основании анализа экспериментальных данных работы [11] с последующей аттестацией в численных модельных экспериментах. Форма, топология и размеры сеточных протезов выбирались на основе реально используемых в медицинской практике образцов, приведенных в табл.1.

Фактически эндопротез представляет собой распределенный рассеиватель с резкой границей, помещенный на определенной глубине в мышечную ткань. В этом случае коэффициент рассеяния излучения на эндопротезе практически полностью определяется коэффициентами Френеля, а возможность его детектирования – коэффициентами поглощения и рассеяния ткани. Среднеквадратичная погрешность вычислений составляла 6.2 %.

Так, на рис.3 представлена зависимость предельной глубины, на которой возможно разрешение сетки эндопротеза по критерию Рэлея, от эффективного размера ячейки. Кривые 1 (коэффициенты рассеяния и поглощения – 60 и 0.34 мм^{-1}) и 2 (соответственно 45 и 0.44 мм^{-1})

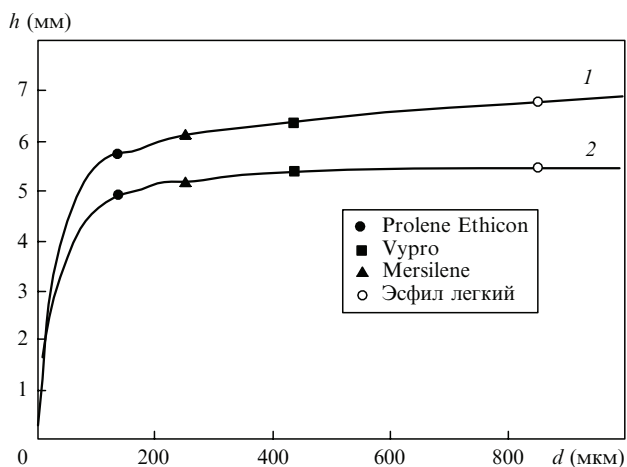


Рис.3. Зависимость предельной глубины визуализации структуры сеточного имплантата от эффективного диаметра ячеек и характеристик среды. Коэффициент рассеяния 60 (1) и 45 мм^{-1} (2), коэффициент поглощения 0.34 (1) и 0.44 мм^{-1} (2).

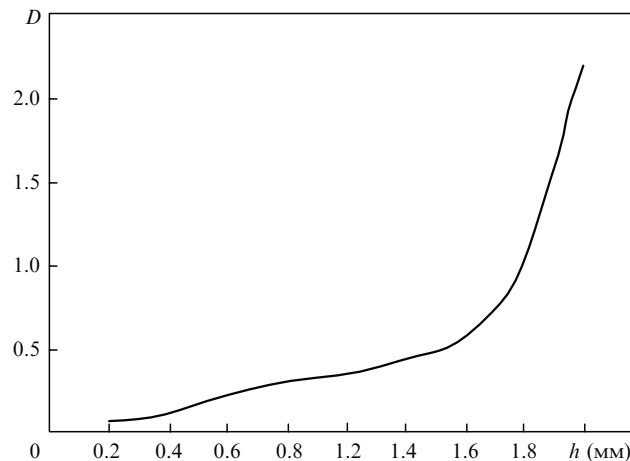


Рис.4. Зависимость минимального разрешаемого эффективного диаметра некротических образований на поверхности волокон имплантата, нормированного на диаметр волокна сетки, от глубины ее залегания.

на рисунке фактически ограничивают область визуализации, соответствующую существующему разбросу коэффициентов поглощения и рассеяния для нормальной мышечной ткани. Видно, что эти кривые имеют две качественно различные области: первая – вблизи малых значений диаметра ячейки сетки, где глубина визуализации сетки в основном связана с расплыванием изображения в отраженном от эндопротеза свете за счет многократного рассеяния; вторая – область насыщения, начинающаяся с $h \approx 5 \text{ мм}$, когда превалирующим эффектом является поглощение.

Видно, что для большинства используемых сеточных эндопротезов глубина визуализации может превышать 4 мм. Однако наиболее интересным с точки зрения практики является обнаружение патологических образований в зоне инкапсуляции имплантата, которые приводят к неоднородно распределенным вдоль волокон областям поглощения в спектральном диапазоне 440–600 нм. Согласно микроскопическим исследованиям существенное влияние на процесс инкапсуляции оказывают образования, размер которых сравним с диаметром используемого волокна. Тогда для характеристики процессов удобно ввести эффективный диаметр некротического образования D , определяемый как отношение среднего диаметра некротического образования к диаметру волокна сеточного имплантата.

На рис.4 представлена зависимость минимального эффективного диаметра D для модели имплантата Prolene Ethicon от глубины его залегания. Видно, что до глубины 1.4 мм зависимость имеет линейный характер, причем величина минимального видимого эффективного диаметра образования не превосходит диаметр волокна эндопротеза, а начиная с глубины $h \sim 1.5 \text{ мм}$ становится существенно нелинейной, что связано с возрастанием роли поглощения излучения.

6. Заключение

Показана возможность применения метода конфокальной лазерной микроскопии для анализа физического состояния эндопротезов и зоны инкапсуляции. Установлено, что существенное влияние на вероятность развития рецидивов в герниопластике может оказывать

состояние поверхности сеточных имплантатов и дефектов их плетения, причем с увеличением размеров, количества и плотности микродефектов возможно качественное изменение микротравмы – образование люфта вблизи поверхности имплантата. С целью исключения данных эффектов и развития патологий следует проводить предоперационный микроскопический контроль имплантатов. Послеоперационный контроль и мониторинг процесса заживления раны и инкапсуляции эндопротеза возможны с помощью методов дифференциального обратного рассеяния с глубиной их визуализации вплоть до 5 мм.

Работа выполнена при поддержке Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (2009–2013 гг.).

1. Кирпичев А.Г., Сурков Н.А. *Использование сетки из пролена при*

- пластике передней брюшной стенки* (М.: Медиа Сфера, 2001).
- William S. C., Kent W. K. *Surg. Innovation*, **12**, 63 (2005).
 - Барский И.Я., Грамматин А.П., Иванов А.В. *Оптич. журн.*, **11**, 83 (1999).
 - Васильева-Линецкая Л.Я., Роханский А.О., Галацан А.В., Черепашук Г.А., Степанов А.М., Шабалдас Д.А. *Открытые информационные и компьютерные информационные технологии*, **2**, 215 (1998).
 - Yabe M., Suzuki M., Hiraoka N., Nakada K., Tsuda T. *Radiat. Med.*, **18** (5), 319 (2000).
 - Rajadhyaksha M. *J. Invest. Dermatol.*, **113**, 293 (1999).
 - Egger M.D., Petrán M. *Science*, **157**, 305 (1967).
 - Lefranc S. *Hernia*, **13**, 64 (2009).
 - Захаров В.П., Братченко И.А., Синдяева А.Р., Тимченко Е.В. *Оптика и спектроскопия*, **107**, 957 (2009).
 - Словецкий С.Д. *Радиотехника*, **7**, 654 (1994).
 - Tuchin V.V. *Tissue Optics: Light Scattering Methods and Instruments for Medical Diagnosis* (SPIE Tutorial Text in Optical Engineering, 2000).