

# КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ СОЕДИНИТЕЛЬНОТКАННОГО МАТРИКСА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ МЕТОДОМ НЕЛИНЕЙНОЙ МИКРОСКОПИИ

DOI: 10.17691/stm2018.10.3.14

УДК 616.62–006–076

Поступила 18.01. 2018 г.



**В.В. Дуденкова**, младший научный сотрудник научной лаборатории оптической когерентной томографии НИИ биомедицинских технологий<sup>1</sup>; ассистент кафедры общей физики радиофизического факультета<sup>2</sup>;

**А.В. Масленникова**, д.м.н., профессор кафедры онкологии, лучевой терапии, лучевой диагностики<sup>1</sup>; профессор кафедры биофизики<sup>2</sup>;

**Е.Б. Киселева**, к.б.н., научный сотрудник научной лаборатории оптической когерентной томографии НИИ биомедицинских технологий<sup>1</sup>;

**Е.А. Тарарова**, к.м.н., врач-онколог<sup>3</sup>;

**К.Э. Юнусова**, к.м.н., доцент кафедры патологической анатомии<sup>1</sup>;

**О.С. Стрельцова**, д.м.н., профессор кафедры урологии им. Е.В. Шахова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Приволжский исследовательский медицинский университет, Н. Новгород, 603005, пл. Минина и Пожарского, 10/1;

<sup>2</sup>Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Н. Новгород, 603950, пр. Гагарина, 23;

<sup>3</sup>Нижегородский областной клинический онкологический диспансер, Н. Новгород, 603126, ул. Родионова, 190

**Цель исследования** — изучить возможности количественной оценки состояния коллагена и эластина мочевого пузыря методом нелинейной микроскопии для определения степени тяжести побочных эффектов лучевой терапии опухолей женской репродуктивной системы.

**Материалы и методы.** Объектом исследования был биопсийный материал от девяти пациенток, имевших в анамнезе лучевую терапию по поводу злокачественных новообразований органов малого таза, и трех пациенток, получавших лечение по поводу хронического цистита бактериальной этиологии. Исследование состояния соединительнотканного внеклеточного матрикса мочевого пузыря выполнено методом нелинейной микроскопии в режимах генерации второй гармоники (ГВГ) и двухфотонно-возбуждаемой автофлуоресценции (ДВАФ) на неокрашенных депарафинированных гистологических срезах толщиной 10 мкм. Проведен качественный и количественный анализ 133 изображений мочевого пузыря, разделенных на 4 группы в соответствии с клинической картиной: 104 изображения при лучевом поражении II (n=24), III (n=40) и IV (n=40) степени тяжести в сравнении с 29 изображениями при хроническом цистите. В качестве показателей количественной оценки (состояние волокон коллагена и эластина с точки зрения их формы и плотности укладки, целостности/дезорганизации и ориентации) выбраны среднее значение интенсивности и параметр неоднородности ГВГ- и ДВАФ-сигналов.

**Результаты.** При рассматриваемой патологии мочевого пузыря степень изменения состояния коллагеновых и эластических волокон нарастает от II к IV степени тяжести лучевого цистита, тогда как при хроническом цистите картина может быть схожа с лучевым циститом как II, так и III степени тяжести. Изменения коллагеновых и эластических волокон с потерей нативной структуры и пространственного расположения проявляются отсутствием на части изображений четкого контура волокон (размытость), дезорганизацией/фрагментацией, появлением областей плотного беспорядочного расположения волокон или бесструктурных областей с высоким сигналом.

Среднее значение интенсивности сигнала ГВГ коллагена и ДВАФ эластина при II степени тяжести статистически значимо выше, чем при III и IV степенях ( $p \leq 0,05$ ). Такое снижение значений отражает заметную дезорганизацию (фрагментацию) волокон по сравнению с их нативной структурой, что ведет к снижению способности волокон к генерации ГВГ- или ДВАФ-сигнала. Возрастание значений параметра неоднородности ГВГ-сигнала при III и IV степенях тяжести лучевого поражения мочевого пузыря по сравнению со II степенью и хроническим циститом отражает ту же тенденцию.

**Заключение.** Метод нелинейной микроскопии позволяет провести не только качественную, но и количественную оценку пространственной и структурной организации экстрацеллюлярного матрикса мочевого пузыря при лучевом поражении и при хроническом цистите, определить степень тяжести осложнений лучевого поражения и дать прогноз их течения.

**Ключевые слова:** внеклеточный матрикс; мочевой пузырь; лучевая терапия; радиационное повреждение мочевого пузыря; хронический цистит; нелинейная микроскопия; коллаген; эластин.

Для контактов: Стрельцова Ольга Сергеевна, e-mail: strelzova\_uro@mail.ru

**Как цитировать:** Dudenkova V.V., Maslennikova A.V., Kiseleva E.B., Tararova E.A., Yunusova K.E., Streltsova O.S. Quantitative assessment of radiation-induced changes in the connective tissue matrix of the urinary bladder by nonlinear microscopy. *Sovremennyye tehnologii v medicine* 2018; 10(3): 118–124, <https://doi.org/10.17691/stm2018.10.3.14>

English

## Quantitative Assessment of Radiation-Induced Changes in the Connective Tissue Matrix of the Urinary Bladder by Nonlinear Microscopy

**V.V. Dudenkova**, Junior Researcher, Scientific Laboratory of Optical Coherence Tomography, Institute of Biomedical Technologies<sup>1</sup>; Assistant, Department of General Physics, Faculty of Radiophysics<sup>2</sup>;  
**A.V. Maslennikova**, MD, DSc, Professor, Oncology, Radiotherapy, Radiodiagnosis Department<sup>1</sup>; Professor, Department of Biophysics<sup>2</sup>;  
**E.B. Kiseleva**, PhD, Researcher, Scientific Laboratory of Optical Coherence Tomography, Institute of Biomedical Technologies<sup>1</sup>;  
**E.A. Tararova**, MD, PhD, Oncologist<sup>3</sup>;  
**K.E. Yunusova**, MD, PhD, Associate Professor, Department of Pathological Anatomy<sup>1</sup>;  
**O.S. Streltsova**, MD, DSc, Professor, Urology Department named after E.V. Shakhov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Privolzhsky Research Medical University, 10/1 Minin and Pozharsky Square, Nizhny Novgorod, 603005, Russia;

<sup>2</sup>Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, 23 Prospekt Gagarina, Nizhny Novgorod, 603950, Russia;

<sup>3</sup>Nizhny Novgorod Regional Oncologic Hospital, 190 Rodionova St., Nizhny Novgorod, 603126, Russia

**The aim of the investigation** was to study the possibilities of the quantitative assessment of the bladder collagen and elastin state using nonlinear microscopy for determining the degree of side effect severity after the radiotherapy of female reproductive system tumors.

**Materials and Methods.** The object of investigation was a biopsy material from nine patients undergone radiotherapy for malignant neoplasms of the small pelvis organs in their past history, and from three patients treated for chronic cystitis of bacterial etiology. The extracellular matrix of the bladder connective tissue was examined by nonlinear microscopy in the modes of the second harmonic generation (SHG) and two-photon excited autofluorescence (TPEF) on 10 µm unstained dewaxed histological sections. 133 urinary bladder images of the patients divided into 4 groups according to their clinical picture (104 images with the radiation damage grade II (n=24), III (n=40), and IV (n=40)) were quantitatively and qualitatively analyzed and compared with 29 bladder images of the patients with chronic cystitis.

Mean value of intensity and a non-uniformity parameter of SHG and TPEF signals were chosen as indices of the quantitative assessment (collagen and elastin state in terms of their form and packing density, integrity/disorganization, and orientation).

**Results.** In the given bladder pathology, the state of the collagen and elastin fibers grows from radiation cystitis grade II to grade IV while in chronic cystitis the picture may be similar with radiation cystitis grade II or III alike. Alterations in the collagen and elastin fibers with the loss of the native structure and spatial arrangement are seen on part of the images as a fuzzy fiber contour (blurring), disorganization/fragmentation, areas with a dense random fiber arrangement or anhistic areas with a high signal.

Mean value of collagen SHG and elastin TPEF signal intensity in severity grade II was statistically significantly higher than in grades III and IV ( $p < 0.05$ ). Such decrease of the values reflects a marked disorganization (fragmentation) of the fibers in comparison with their native structure which results in the lower ability of the fibers to generate SHG or TPEF signal. Increase of the SHG signal non-uniformity values in grade III and IV radiation damage of the urinary bladder compared to grade II and chronic cystitis reflects the same tendency.

**Conclusion.** A nonlinear microscopy method makes it possible to assess both qualitatively and quantitatively spatial and structural organization of the extracellular bladder matrix in radiation damage and chronic cystitis, to determine the severity degree of complications in radiation damage, and to predict their course.

**Key words:** extracellular matrix; urinary bladder; radiotherapy; radiation damage of the urinary bladder; chronic cystitis; nonlinear microscopy; collagen; elastin.

### Введение

В последние годы лечение органов малого таза при злокачественных новообразованиях женской репродуктивной системы проводится с использовани-

ем методов конформного облучения, позволяющего максимально концентрировать дозу на мишени с высоким градиентом по отношению к окружающим опухолевым тканям. Тем не менее побочные эффекты облучения, в частности в отношении мочевого пузы-

ря и прямой кишки, до сих пор остаются нерешенной проблемой современной радиационной онкологии [1]. Степень тяжести побочных эффектов лучевой/химиолучевой терапии может варьировать от незначительных функциональных нарушений до тяжелых повреждений, оказывающих существенное влияние на качество жизни пациентов и приводящих к инвалидизации [2, 3].

Патогенез радиационно-индуцированных повреждений нормальных тканей сложен и включает в себя взаимодействие большого количества тканевых и клеточных факторов [4], развитие сосудистой реакции [5], а также прогрессирующие изменения экстрацеллюлярного матрикса [6, 7]. Последнее является особенно важным, поскольку именно процессы деградации соединительнотканной стромы определяют развитие побочных эффектов III–IV степени (кровотечение, некроз, свищ), которые резко снижают качество жизни больных и представляют угрозу для жизни [8].

Особую актуальность в этой ситуации приобретает вопрос точной количественной оценки радиационно-индуцированных изменений экстрацеллюлярного матрикса нормальных тканей. В основном используемые в настоящее время системы оценки (LENT/SOMA, RTOG/EORTC, CTCAE) основаны на жалобах пациентов и данных визуального осмотра [9]. Развитие оптических методов, таких как оптическая когерентная томография (ОКТ) и многофотонная микроскопия, позволяющих оценить состояние экстрацеллюлярного матрикса на тканевом и клеточном уровнях как *ex vivo* [10, 11], так и *in vivo* [12, 13], открывает новые возможности для изучения и классификации побочных эффектов облучения.

Изучение состояния коллагена на модельной среде на различных уровнях его иерархической организации с помощью оптических и физико-химических методов позволяет выявить основные механизмы его деградации и последующего ремоделирования после воздействия ионизирующего излучения [14]. Проведенные нами ранее методом кросс-поляризационной ОКТ исследования показали, что у пациентов с ранними лучевыми реакциями мочевого пузыря повреждение возникает прежде всего в зоне подуротелиальных соединительнотканых структур [15].

Впервые использованный для изучения лучевых повреждений мочевого пузыря метод нелинейной микроскопии в режимах регистрации сигнала генерации второй гармоники (ГВГ) и двухфотонно-возбуждаемой автофлуоресценции (ДВАФ) позволил получить качественные характеристики состояния соединительнотканного матрикса в случае побочных эффектов различной степени тяжести [16]. Ведущим мировым направлением использования нелинейной микроскопии в изучении состояния соединительнотканного матрикса является переход к количественной оценке изображений, которая позволяет избежать недостатков субъективной визуальной оценки [17], а также си-

стематизировать и дифференцировать клинический материал [18].

**Цель исследования** — методом нелинейной микроскопии провести количественную оценку состояния коллагена и эластина мочевого пузыря при определении степени тяжести побочных эффектов лучевой терапии опухолей женской репродуктивной системы.

## Материалы и методы

Объектом исследования служил биопсийный материал от 9 пациенток (по три пациентки со II, III и IV клинической степени тяжести лучевых повреждений), имевших в анамнезе лучевую терапию по поводу злокачественных новообразований органов малого таза в сроки от 1,5 до 20 лет, и трех пациенток, получавших лечение по поводу хронического цистита (ХЦ) бактериальной этиологии. Известно [19], что повышенный риск развития тяжелых радиационно-индуцированных повреждений органов малого таза имеют пациенты с хроническими воспалительными заболеваниями мочевого пузыря, поэтому в данном исследовании больные с ХЦ служили группой контроля.

Работа выполнена в соответствии с Хельсинкской декларацией (2013). На проведение клинических исследований при лучевом повреждении мочевого пузыря имеется разрешение Этического комитета Приволжского исследовательского медицинского университета. От каждой пациентки получено информированное согласие.

Забор биопсийного материала выполняли резектоскопом (Karl Storz, Германия) из области дна мочевого пузыря — «горячей зоны», максимально подверженной лучевому воздействию.

Исследование состояния соединительнотканного внеклеточного матрикса мочевого пузыря выполнено методом нелинейной микроскопии в режимах ГВГ и ДВАФ на неокрашенных депарафинированных гистологических срезах толщиной 10 мкм. Использован лазерный сканирующий конфокальный микроскоп LSM 510 META (Carl Zeiss, Германия) с выбранной длиной волны 800 нм и мощностью около 4 мВт. Для возбуждающего излучения был применен Ti:Sa фемтосекундный лазер MAI TAI (Spectra Physics, США) с частотой следования импульсов около 80 МГц и длительностью 100 фс.

Детекцию осуществляли одновременно по двум каналам с использованием фильтров в диапазонах 362–415 нм (сигнал ГВГ коллагена, зеленый цвет на изображениях) и 480–554 нм (сигнал ДВАФ эластина, красный цвет на изображениях). Данный подход позволил визуализировать структуру эластина и коллагеновых волокон неокрашенных препаратов. Изображения тонкой структуры строились с помощью масляно-иммерсионного объектива Plan-Neofluar (Carl Zeiss, Германия) с сорокакратным увеличением и чи-



словой апертурой 1.3, что позволило получить поле зрения 318×318 мкм.

Проведен качественный и количественный анализ 133 изображений мочевого пузыря пациентов, разделенных на 4 группы в соответствии с клинической картиной: 104 изображения при лучевом поражении II (n=24), III (n=40) и IV (n=40) степени тяжести в сравнении с 29 изображениями при ХЦ. Для верификации изображений нелинейной микроскопии исследованы полученные параллельно гистологические срезы, окрашенные гематоксилином и эозином по общепринятой стандартной методике. Гистологические препараты изучали с помощью бинокулярного микроскопа Leica DMLS (Leica, Германия).

Количественная оценка сигнала ГВГ/ДВАФ на изображениях проведена с использованием программы ImageJ (NIH, США) [17]. В качестве показателей количественной оценки состояния волокон коллагена и эластина с точки зрения их формы, плотности укладки, целостности/дезорганизации и ориентации выбраны среднее значение интенсивности и параметр неоднородности ГВГ- и ДВАФ-сигналов. Среднее значение интенсивности отражает относительное количество волокон коллагена/эластина в единице поля зрения, параметр неоднородности характеризует степень сохранности волокон в поле зрения. Параметр неоднородности вычислялся как отношение значения стандартного отклонения средней интенсивности сигнала по выбранной области к значению средней интенсивности [18].

Для количественной оценки состояния стромы на изображениях ГВГ и ДВАФ коллагена и эластина выбирались прямоугольные области, имеющие типичную тканевую структуру. На каждом изображении выделялось не менее двух областей интереса (рис. 1).

Показатели средней интенсивности и неоднородности сигналов ГВГ и ДВАФ вычислялись путем усреднения значений, полученных для набора областей интереса исследуемого образца. Для оценки параметра неоднородности ГВГ-сигнала использовали стандартные функции вычисления среднего значения и стандартного отклонения по выбранной области, а затем рассчитывали отношение последнего к первому для каждой области обсчета [17].

Сравнение количественных характеристик ГВГ- и ДВАФ-сигнала между выделенными группами проводили в зависимости от патологического состояния (степень тяжести лучевого повреждения, хронический цистит), что позволило детектировать радиационно-индуцированные изменения структуры коллагена и

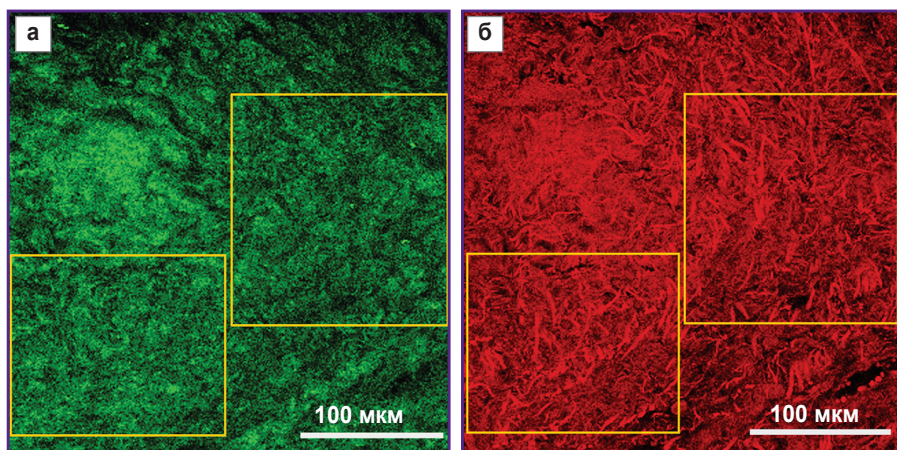


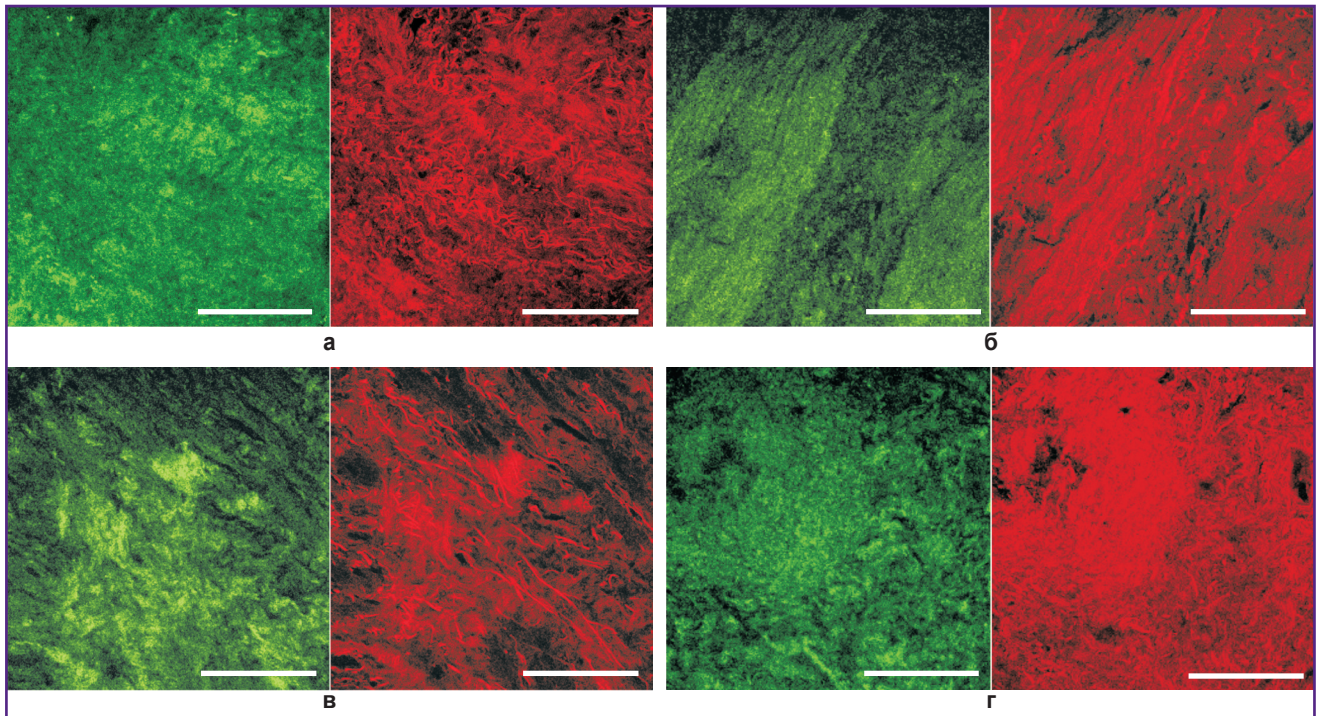
Рис. 1. Пример выделения областей интереса для количественной оценки состояния волокон коллагена (а) и эластина (б) соединительнотканного матрикса

эластина и соотнести их с тяжестью клинических проявлений лучевого поражения ткани мочевого пузыря.

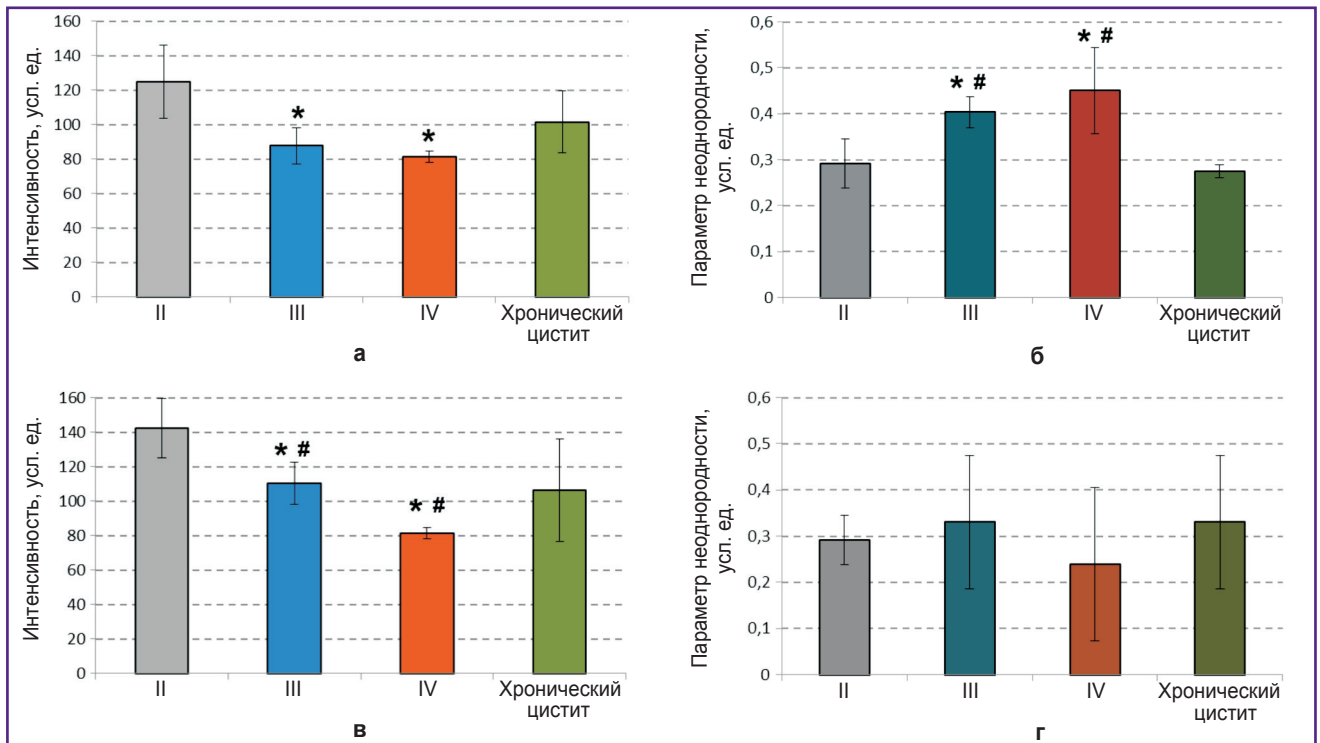
Статистический анализ выполнен с использованием пакета Statistica 10.0. В каждой группе параметры ГВГ- и ДВАФ-сигналов характеризовали средним значением и стандартным отклонением ( $M \pm SD$ ). Для сравнения количественных данных двух независимых групп использован t-критерий Стьюдента. Различия считали статистически достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ .

## Результаты

Типичные для каждой из анализируемых групп изображения в режиме ГВГ и ДВАФ представлены на рис. 2. При визуальном сравнении изображений видны различия в форме волокон и характере их укладки (подробный патоморфологический анализ изображений проведен нашей исследовательской группой в работе [15]). В данной работе установлено, что при рассматриваемых патологических состояниях мочевого пузыря степень изменения состояния коллагеновых и эластических волокон нарастает от II к IV степени тяжести лучевого цистита (рис. 2, б–е), тогда как при ХЦ (рис. 2, а) картина может быть схожа как с лучевым циститом II степени, так и с лучевым циститом III степени тяжести. Изменения коллагеновых и эластических волокон с потерей нативной структуры и пространственного расположения проявляются отсутствием на части изображений четкого контура волокон (размытость) (см. рис. 2, а), дезорганизацией/фрагментацией (см. рис. 2, а–е), появлением областей плотного беспорядочного расположения волокон (см. рис. 2, а, е) или бесструктурных областей с высоким сигналом (см. рис. 2, е). Мы полагаем, что структурные изменения соединительнотканного матрикса являются одной из причин функциональных нарушений мочевого пузыря и непосредственно связаны с выраженностью клинических проявлений заболевания.



**Рис. 2. Изображения слизистой оболочки мочевого пузыря, полученные методом нелинейной микроскопии: а — хронический цистит; б, в, г — II, III и IV степени тяжести осложнений лучевой терапии соответственно; в каждой паре изображений слева — ГВГ, справа — ДВАФ; бар — 100 мкм**



**Рис. 3. Результаты количественной оценки состояния коллагена (а, б) и эластина (в, г) по изображениям нелинейной микроскопии в зависимости от тяжести лучевых осложнений:**

а — средняя интенсивность распределения ГВГ-сигнала коллагена; б — параметр неоднородности распределения ГВГ-сигнала коллагена; в — средняя интенсивность распределения ДВАФ-сигнала эластина; г — параметр неоднородности распределения ДВАФ-сигнала эластина; \* — статистически значимые различия значений между группами тяжелой степени лучевого поражения (III, IV) и II степени тяжести,  $p \leq 0,05$ ; # — между группами лучевого поражения и хронического цистита,  $p \leq 0,05$



Результаты количественной оценки ГВГ- и ДВАФ-изображений представлены на рис. 3. Среднее значение интенсивности сигнала ГВГ коллагена при II степени тяжести ( $124,8 \pm 21,0$  усл. ед.) статистически значимо выше, чем при III и IV степенях ( $87,6 \pm 10,3$  и  $81,3 \pm 3,2$  соответственно;  $p \leq 0,05$ ) (рис. 3, а). Разброс параметра неоднородности сигнала ГВГ от коллагена при III и IV степенях был статистически значимо выше, чем при II степени и ХЦ (соответственно при III и IV степени —  $0,40 \pm 0,03$  и  $0,45 \pm 0,09$ ; при II —  $0,29 \pm 0,05$  и при ХЦ —  $0,28 \pm 0,01$ ;  $p \leq 0,05$ ), что свидетельствует о более выраженном нарушении структурной укладки коллагена (рис. 3, б). При наличии пузырьно-влагалищного свища при IV степени поражения биопсию выполняли из боковых стенок мочевого пузыря, поэтому изменения ткани были менее выраженными, соответствовали изменениям, характерным для II степени тяжести лучевого поражения.

Среднее значение интенсивности ДВАФ-сигнала эластина при II степени тяжести ( $142,3 \pm 17,4$ ) статистически значимо выше, чем при III и IV степенях тяжести ( $110,4 \pm 12,3$  и  $81,3 \pm 3,2$  соответственно) (рис. 3, в). Разброс этого параметра менее выражен и не имеет статистически значимой разницы.

Значения параметра неоднородности распределения ДВАФ-сигнала эластина во всех группах не имеют статистически значимой разницы ( $p \geq 0,05$ ), что можно интерпретировать как факт большей устойчивости эластина к радиационному поражению. Это требует дополнительного изучения.

Таким образом, при III и IV степенях тяжести лучевого поражения мочевого пузыря значения средней интенсивности ГВГ- и ДВАФ-сигналов ниже, чем при II степени тяжести, при ХЦ значения этого параметра — на уровне II–III степеней тяжести. Такое снижение значений отражает заметную дезорганизацию (фрагментацию) волокон по сравнению с их нативной структурой, что ведет к снижению способности волокон к генерации ГВГ- или ДВАФ-сигналов. Возрастание значений параметра неоднородности ГВГ-сигнала при III и IV степенях тяжести лучевого поражения мочевого пузыря по сравнению со II степенью тяжести и ХЦ отражает ту же тенденцию.

## Обсуждение

Одним из научных достижений медицины XXI века стала новая точка зрения на значение соединительной ткани в организме как объединяющей глобальной сети [20, 21]. В ряде работ показана значимая роль соединительной ткани, которая вовлекается в любые патологические процессы, проходящие в органах [22, 23], в том числе при лучевом воздействии [24].

Роль экстрацеллюлярного матрикса в физиологических процессах тканей является основополагающей, поскольку известно, что волокнистый компонент (преимущественно коллагеновые и эластические волокна) и аморфный компонент (гликопротеины, гликозами-

ногликаны, протеогликианы и их агенты) биохимически и функционально связаны. Коллагеновые и эластические волокна играют важнейшую роль в регуляции тканевого метаболизма, являясь для клеток опорными структурами и химическими раздражителями [20]. Деструкция коллагеновых волокон любой природы играет значимую роль в патогенезе повреждения мочевого пузыря и зачастую является причиной последующих функциональных расстройств. Вследствие этого знания об исходном состоянии соединительнотканного матрикса мочевого пузыря до лучевой терапии, а также о его структурных изменениях, возникших после лучевой терапии, важны для своевременной коррекции развившихся осложнений и сохранения функциональных резервов мочевого пузыря.

Традиционное использование стандартных методов гистологического исследования не позволяло получить полную информацию о состоянии ведущего компонента тканевого метаболизма в стенке мочевого пузыря — экстрацеллюлярного матрикса. С помощью метода нелинейной микроскопии стало возможным провести качественную и количественную оценку соединительнотканного матрикса при клинически разных степенях тяжести осложнений лучевой терапии.

Использование нелинейной оптической микроскопии, а также применение компьютерной обработки полученных цифровых изображений стромы в режимах ГВГ и ДВАФ позволили нам выполнить количественный анализ состояния коллагена и эластина мочевого пузыря при осложнениях лучевой терапии опухолей женской репродуктивной системы.

Оценка состояния соединительнотканного матрикса мочевого пузыря до облучения дает возможность выявить группу риска по развитию тяжелых лучевых повреждений. Кроме того, полученные результаты могут служить патогенетической основой для разработки неинвазивных оптических инструментов мониторинга радиационно-индуцированных повреждений в клинической практике. Базовым может стать метод кросс-поляризационной ОКТ, потенциал которого ранее оценен нашей исследовательской группой в ряде исследований [12, 15, 25] как минимально инвазивный метод объективного контроля, работающий в режиме реального времени.

## Заключение

Метод нелинейной микроскопии позволяет провести не только качественную, но и количественную оценку пространственной и структурной организации экстрацеллюлярного матрикса мочевого пузыря при лучевом поражении и при хроническом цистите, определить степень тяжести осложнений лучевого поражения и дать прогноз их течения.

**Финансирование исследования.** Работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований №16-07-00655.

**Конфликт интересов.** У авторов нет конфликта интересов.

## Литература/References

1. Dörr W. Radiation effect in normal tissue — principles of damage and protection. *Nuklearmedizin* 2010; 49(Suppl 1): S53–S58.
2. Dörr W., Hendry J.H. Consequential late effects in normal tissues. *Radiother Oncol* 2001; 61(3): 223–231, [https://doi.org/10.1016/s0167-8140\(01\)00429-7](https://doi.org/10.1016/s0167-8140(01)00429-7).
3. Richie J.P. Онкоурология. М: Издательство БИНОМ; 2011; 896 с. Richie J.P. *Onkourologiya* [Oncourology]. Moscow: Izdatel'stvo BINOM; 2011; 896 p.
4. Denham J.W., Hauer-Jensen M. The radiotherapeutic injury — a complex 'wound'. *Radiother Oncol* 2002; 63(2): 129–145, [https://doi.org/10.1016/s0167-8140\(02\)00060-9](https://doi.org/10.1016/s0167-8140(02)00060-9).
5. Baker D.G., Krochak R.J. The response of the microvascular system to radiation: a review. *Cancer Invest* 1989; 7(3): 287–294, <https://doi.org/10.3109/07357908909039849>.
6. Yarnold J., Brotons M.C. Pathogenetic mechanisms in radiation fibrosis. *Radiother Oncol* 2010; 97(1): 149–161, <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2010.09.002>.
7. Jaal J., Dörr W. Radiation effects on cellularity, proliferation and EGFR expression in mouse bladder urothelium. *Radiat Res* 2010; 173(4): 479–485, <https://doi.org/10.1667/rr1759.1>.
8. Fiorino C., Rancati T., Valdagni R. Predictive models of toxicity in external radiotherapy: dosimetric issues. *Cancer* 2009; 115(13 Suppl): 3135–3140, <https://doi.org/10.1002/cncr.24354>.
9. *Cancer Therapy Evaluation Program, Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) Version 4.0*. 2009.
10. Gubarkova E.V., Dudenkova V.V., Feldchtein F.I., Timofeeva L.B., Kiseleva E.B., Kuznetsov S.S., Shakhov B.E., Moiseev A.A., Gelikonov V.M., Gelikonov G.V., Vitkin A., Gladkova N.D. Multi-modal optical imaging characterization of atherosclerotic plaques. *J Biophotonics* 2015; 9(10): 1009–1020, <https://doi.org/10.1002/jbio.201500223>.
11. Jain M., Robinson B.D., Scherr D.S., Sterling J., Lee M.M., Wysock J., Rubin M.A., Maxfield F.R., Zipfel W.R., Webb W.W., Mukherjee S. Multiphoton microscopy in the evaluation of human bladder biopsies. *Arch Pathol Lab Med* 2012; 136(5): 517–526, <https://doi.org/10.5858/arpa.2011-0147-0a>.
12. Kiseleva E., Kirillin M., Feldchtein F., Vitkin A., Sergeeva E., Zagaynova E., Streltsova O., Shakhov B., Gubarkova E., Gladkova N. Differential diagnosis of human bladder mucosa pathologies in vivo with cross-polarization optical coherence tomography. *Biomed Opt Express* 2015; 6(4): 1464–1476, <https://doi.org/10.1364/boe.6.001464>.
13. Yasui T., Tanaka R., Hase E., Fukushima S., Araki T. In vivo time-lapse imaging of skin burn wound healing using second-harmonic generation microscopy. In: Periasamy A., So P.T.C., König K. (editors). *Multiphoton Microscopy in the Biomedical Sciences XIV*. SPIE; 2014, <https://doi.org/10.1117/12.2038022>.
14. Maslennikova A., Kochueva M., Ignatieva N., Vitkin A., Zakharkina O., Kamensky V., Sergeeva E., Kiseleva E., Bagratashvili V. Effects of gamma irradiation on collagen damage and remodeling. *Int J Radiat Biol* 2015; 91(3): 240–247, <https://doi.org/10.3109/09553002.2014.969848>.
15. Streltsova O.S., Maslennikova A.V., Yunusova K.E., Dudenkova V.V., Kiseleva E.B., Kochueva M.V., Tararova E.A., Malikov D.K., Vorobieva A.S., Krupin V.N. Nonlinear microscopy in studying extracellular matrix state of the urinary bladder in severe complications after radiation therapy of female pelvic tumors. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2017; 9(2): 19, <https://doi.org/10.17691/stm2017.9.2.02>.
16. Rasband W.S. *Image J: Image Processing and Analysis in Java*. U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA; 1997–2016. URL: <http://rsb.info.nih.gov/ij/>.
17. Balu M., Kelly K.M., Zachary C.B., Harris R.M., Krasieva T.B., König K., Durkin A.J., Tromberg B.J. Distinguishing between benign and malignant melanocytic nevi by in vivo multiphoton microscopy. *Cancer Res* 2014; 74(10): 2688–2697, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-13-2582>.
18. Adur J., Pelegati V.B., Costa L.F., Pietro L., de Thomaz A.A., Almeida D.B., Bottcher-Luiz F., Andrade L.A., Cesar C.L. Recognition of serous ovarian tumors in human samples by multimodal nonlinear optical microscopy. *J Biomed Opt* 2011; 16(9): 096017, <https://doi.org/10.1117/1.3626575>.
19. Zhao W., Robbins M. Inflammation and chronic oxidative stress in radiation-induced late normal tissue injury: therapeutic implications. *Curr Med Chem* 2009; 16(2): 130–143, <https://doi.org/10.2174/092986709787002790>.
20. Langevin H.M. Connective tissue: a body-wide signaling network? *Med Hypotheses* 2006; 66(6): 1074–1077, <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2005.12.032>.
21. Stecco C. *Functional atlas of the human fascial system*. Elsevier; 2015.
22. Gladkova N., Kiseleva E., Streltsova O., Prodanets N., Snopova L., Karabut M., Gubarkova E., Zagaynova E. Combined use of fluorescence cystoscopy and cross-polarization OCT for diagnosis of bladder cancer and correlation with immunohistochemical markers. *J Biophotonics* 2013; 6(9): 687–698, <https://doi.org/10.1002/jbio.201200105>.
23. Ganganna K., Shetty P., Shroff S.E. Collagen in histologic stages of oral submucous fibrosis: a polarizing microscopic study. *J Oral Maxillofac Pathol* 2012; 16(2): 162–166, <https://doi.org/10.4103/0973-029x.98446>.
24. Hölscher T., Bentzen S.M., Baumann M. Influence of connective tissue diseases on the expression of radiation side effects: a systematic review. *Radiother Oncol* 2006; 78(2): 123–130, <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2005.12.013>.
25. Kiseleva E., Gladkova N., Streltsova O., Kirillin M., Maslennikova A., Dudenkova V., Yunusova K., Sergeeva E. Cross-polarization OCT for in vivo diagnostics and prediction of bladder cancer. In: *Bladder cancer — management of NMI and muscle-invasive cancer*. InTech; 2017; 43–61, <https://doi.org/10.5772/67473>.