

МНОГОФОТОННАЯ МИКРОСКОПИЯ В ИЗУЧЕНИИ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

DOI: 10.17691/stm2016.8.2.04

УДК 616.62–001–092–08:615.47:576.3

Поступила 16.10.2015 г.

© С.С. Кузнецов, д.м.н., профессор кафедры патологической анатомии¹;
В.В. Дуденкова, младший научный сотрудник НИИ биомедицинских технологий¹;
аспирант кафедры общей физики²;
М.В. Кочуева, аспирант кафедры онкологии, лучевой терапии и лучевой диагностики¹;
Е.Б. Киселева, к.б.н., младший научный сотрудник НИИ биомедицинских технологий¹;
Н.Ю. Игнатъева, д.х.н., доцент кафедры физической химии³;
О.Л. Захаркина, научный сотрудник лаборатории лазерной химии⁴;
Е.А. Сергеева, к.ф.-м.н., старший научный сотрудник отдела радиофизических методов в гидрофизике⁵;
К.В. Бабак, аспирант кафедры биофизики²;
А.В. Масленникова, д.м.н., профессор кафедры онкологии, лучевой терапии и лучевой диагностики¹;
профессор кафедры биофизики²

¹Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород, 603005, пл. Минина и Пожарского, 10/1;

²Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Н. Новгород, 603950, проспект Гагарина, 23;

³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991, Ленинские горы, 1, стр. 3;

⁴Институт проблем лазерных и информационных технологий РАН, Москва, Троицк, 142092, ул. Пионерская, 2;

⁵Институт прикладной физики РАН, Н. Новгород, 603950, ул. Ульянова, 46

Цель исследования — оценить возможности многофотонной микроскопии (МФМ) для изучения динамики структурных изменений мочевого пузыря после однократного гамма-облучения в разных дозах (2, 10 и 40 Гр) в эксперименте.

Материалы и методы. Объектом исследования служили образцы мочевого пузыря крыс (9 групп по две крысы на каждую дозу и срок и две интактные крысы — всего 20 наблюдений) после однократного локального облучения в дозе 2, 10 или 40 Гр. Исследование проводили через 1 сут, 1 нед и 1 мес после радиационного воздействия. Часть гистологических препаратов мочевого пузыря окрашивали пикрофуксином по Ван-Гизону. Другую часть срезов, полученных с этих же блоков, без дополнительного окрашивания исследовали с помощью МФМ. С этой целью использовали лазерный сканирующий микроскоп LSM Axiovert 510 Meta (Carl Zeiss, Германия). Возбуждение осуществляли фемтосекундным титан-сапфировым лазером (MAI TAI HP, Spectra Physics, США) на длине волны 800 нм, регистрацию — в диапазоне 362–415 нм (сигнал второй гармоники от коллагена) и 512–576 нм (сигнал двухфотонно возбуждаемой автофлуоресценции эластана).

Результаты. Использование метода МФМ позволило выявить, что в ранние сроки (1 сут и 1 нед) после радиационного воздействия при всех выбранных дозах ведущим был процесс альтерации коллагенсодержащих структур стенки мочевого пузыря. Через 1 мес после облучения в дозе 2 и 10 Гр было зафиксировано увеличение содержания коллагеновых структур, что свидетельствовало о начале формирования радиационного фиброза. При дозе 40 Гр в экстрацеллюлярном матриксе стенки мочевого пузыря сохранялось снижение сигнала второй гармоники. Это позволило сделать вывод о длительно сохраняющейся дезорганизации коллагена в случае применения высоких доз облучения.

Для контактов: Бабак Ксения Викторовна, e-mail: kseniya9127@mail.ru

Заключение. Метод МФМ дает возможность установить, что разрушение структур экстрацеллюлярного матрикса ткани возникает уже после использования малых доз облучения и в ранние сроки после применения радиационного воздействия, что не удается выявить при стандартной микроскопии. Продолжительность процессов дезорганизации коллагенсодержащих структур зависит от дозы облучения: при использовании высоких доз альтерация носит более продолжительный характер. МФМ позволяет также оценить ход восстановительных процессов.

Ключевые слова: повреждения мочевого пузыря; ионизирующее излучение; многофотонная микроскопия; экстрацеллюлярный матрикс; коллаген.

Как цитировать: Kuznetsov S.S., Dudenkova V.V., Kochueva M.V., Kiseleva E.B., Ignatieva N.Yu., Zakharkina O.L., Sergeeva E.A., Babak K.V., Maslennikova A.V. Multiphoton microscopy in the study of morphological characteristics of radiation-induced injuries of the bladder. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2016; 8(2): 31–39, <http://dx.doi.org/10.17691/stm2016.8.2.04>.

English

Multiphoton Microscopy in the Study of Morphological Characteristics of Radiation-Induced Injuries of the Bladder

S.S. Kuznetsov, MD, DSc, Professor, Department of Pathological Anatomy¹;
V.V. Dudenkova, Junior Researcher, Institute of Biomedical Technologies¹; PhD Student, Department of General Physics²;
M.V. Kochueva, PhD Student, Oncology, Radiotherapy, Radiodiagnosis Department¹;
E.B. Kiseleva, PhD, Junior Researcher, Institute of Biomedical Technologies¹;
N.Yu. Ignatieva, DSc, Associate Professor, Department of Physical Chemistry³;
O.L. Zakharkina, Researcher, Laser Chemistry Laboratory⁴;
E.A. Sergeeva, PhD, Senior Researcher, Department of Radio-Physical Methods in Hydrophysics⁵;
K.V. Babak, PhD Student, Department of Biophysics²;
A.V. Maslennikova, MD, DSc, Professor, Oncology, Radiotherapy, Radiodiagnosis Department¹; Professor, Biophysics Department²

¹Nizhny Novgorod State Medical Academy, 10/1 Minin and Pozharsky Square, Nizhny Novgorod, 603005, Russian Federation;

²Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod, 23 Prospekt Gagarina, Nizhny Novgorod, 603950, Russian Federation;

³Lomonosov Moscow State University, 1, Bldg. 3 Leninskiye Gory, Moscow, 119991, Russian Federation;

⁴Institute on Laser and Information Technologies, Russian Academy of Sciences, 2 Pionerskaya St., Moscow, Troitsk, 142092, Russian Federation;

⁵Institute of Applied Physics, Russian Academy of Sciences, 46 Ulianova St., Nizhny Novgorod, 603950, Russian Federation

The aim of the investigation was to assess the feasibility of multiphoton microscopy (MPM) for studying dynamics of bladder structural changes following a single exposure to gamma-radiation at various doses (2, 10, and 40 Gy) in experiment.

Materials and Methods. Specimens of rat bladders after a single local radiation at the dose of 2, 10, and 40 Gy were the objects of investigation (9 groups with two rats for each dose and term, and two intact rats — 20 observations in all). The study was carried out 1 day, 1 week, and 1 month after radiation exposure. Part of the histological bladder preparations was stained with picrofuchsin according to Van Gieson method. The other part of the sections, obtained from the same blocks, was investigated using MPM without additional staining. For this purpose a laser scanning microscope LSM Axiovert 510 Meta (Carl Zeiss, Germany) was used. Excitation was generated with a femtosecond Ti:Sapphire laser (MAI TAI HP, Spectra Physics, USA) at the wavelength of 800 nm, registration was performed in the range of 362–415 nm (second harmonic signal from collagen) and 512–576 nm (signal of two-photon excited elastin autofluorescence).

Results. Application of MPM method allowed us to find out, that in early terms (1 day and 1 week) after radiation exposure the process of alteration of collagen-containing structures of bladder walls was a leading one at all selected doses. A month after 2 and 10 Gy radiation increase in collagen structures was registered, speaking of the onset of radiation fibrosis formation. At a dose of 40 Gy decrease of second harmonic signal retained in the extracellular matrix of the bladder wall. It allowed us to draw a conclusion on a long-term disorganization of collagen at high radiation doses.

Conclusion. MPM method makes it possible to estimate, that structural destruction of extracellular tissue matrix occurs even after low radiation doses and in early terms after radiation exposure, which is not possible to reveal using standard microscopy. Duration of disorganization process of collagen-containing structures depends on the radiation dose: high doses result in longer-lasting alterations. MPM enables also the assessment of the course of restorative processes.

Key words: bladder injury; ionizing radiation; multiphoton microscopy; extracellular matrix; collagen.

Изменения нормальных тканей, происходящие в различные сроки после проведения лучевой терапии по поводу злокачественных новообразований, представляют собой одну из нерешенных проблем современной радиационной онкологии [1]. Особое значение имеют побочные эффекты облучения для органов малого таза (мочевой пузырь и прямая кишка), когда они возникают у больных с прогнозируемой длительной продолжительностью жизни, для которых сохранение качества жизни является не менее важной задачей, чем излечение от онкологического заболевания [2].

Ключевым моментом в патогенезе радиационно-индуцированных осложнений является формирование фиброзных изменений в зоне облучения вследствие избыточного синтеза коллагена и замещения им поврежденных клеток и фибриллярных структур [3]. В течение последних 10 лет изучены и идентифицированы основные молекулярно-генетические механизмы, ответственные за ранние и поздние радиационные изменения нормальных тканей [3–5]. Исследование радиационно-индуцированных изменений коллагена на модельной среде позволило выявить основные молекулярные и тканевые механизмы процессов деградаци и последующего восстановления его в различные сроки после однократного облучения в возрастающих дозах [6]. Однако остался неизученным вопрос о динамике состояния коллагена на различных уровнях его иерархической организации (молекулы, фибриллы, волокна, пучки) во время этих процессов. Следует подчеркнуть, что в структурной организации фибриллярных элементов внутренних органов участвует не только коллаген, но и эластин. Детального исследования дозо-временных зависимостей состояния коллаген- и эластинсодержащих элементов внутренних органов, подвергнутых воздействию ионизирующего излучения, до настоящего времени также не проводилось.

В последние годы в практику морфологических исследований активно внедряется многофотонная лазерная сканирующая микроскопия (МФМ). Метод дает возможность получения структурных изображений биологических тканей с визуализацией таких компонентов, как никотинамидадениндинуклеотид, флавопротеины, кератин, липофусцин, эластин, меланин и порфирины, по их автофлуоресценции за счет феномена двухфотонного возбуждения [7, 8]. Коллаген визуализируется за счет феномена генерации второй гармоники от молекул, не имеющих центра симметрии [9, 10, 11]. В условиях воздействия короткоимпульсного (~100 фс) лазерного излучения с высокой пиковой мощностью коллаген генерирует нелинейный оптический отклик на удвоенной частоте [12, 13]. Сканирование остро сфокусированным лазерным пучком дает возможность получать изображения, детально отражающие особенности укладки коллагена в ткани. В настоящее время использование феноменов двухфотонного возбуждения и генерации второй гар-

моники позволяет решать большое количество экспериментальных и клинических задач *ex vivo* [14, 15] и *in vivo* [15, 16] в офтальмологии [17, 18], дерматологии [19, 20], кардиологии [21], а также в экспериментальной и клинической онкологии [22–24].

Цель исследования — оценить возможности многофотонной микроскопии для изучения динамики структурных изменений мочевого пузыря после однократного гамма-облучения в разных дозах (2, 10 и 40 Гр) в эксперименте.

Материалы и методы. Эксперименты проведены на белых беспородных крысах (n=20), содержащихся в стандартных условиях вивария. Животные были разделены на 9 групп (по две крысы на каждую дозу и срок и две крысы — необлученные). Исследование выполнено в соответствии с этическими принципами, установленными Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (принятой в Страсбурге 18.03.1986 г. и подтвержденной в Страсбурге 15.06.2006 г.), и одобрено Этическим комитетом НижГМА.

Облучение мочевого пузыря осуществлялось в условиях общей анестезии (Золетил 50 мг/кг) на аппарате для дистанционной лучевой терапии «Терабалт» (энергия пучка — 1,25 МэВ) (UJP, Чешская Республика), однократно, локальным полем, в дозах, эквивалентных 2, 10 и 40 Гр. Через 1 сут, 1 нед и 1 мес после воздействия животных выводили из эксперимента с использованием эфирного наркоза. Мочевой пузырь препарировали, образцы для гистологического исследования и МФМ фиксировали в течение 24 ч в 10% растворе нейтрального формалина. Затем проводили заливку образцов в парафин (использовалась среда Histomix extra, «БиоВитрум», Россия) с последующей монтировкой парафиновых блоков. На ротационном микротоме Leica 450 RM (Leica Microsystems, Германия) с полученных блоков изготавливали срезы толщиной 0,1 и 10 мкм. Срезы толщиной 0,1 мкм окрашивали пикрофуксином по Ван-Гизону. Образцы толщиной 10 мкм, полученные с тех же блоков, депарафинировали и исследовали методом МФМ без дополнительного окрашивания. В качестве контрольных использовали препараты мочевого пузыря необлученных животных.

Исследования проводили на инвертированном лазерном сканирующем микроскопе LSM Axiovert 510 Meta (Carl Zeiss, Германия). В качестве источника возбуждающего излучения использован короткоимпульсный фемтосекундный лазер MAI TAI HP (Spectra Physics, США) с частотой следования импульсов 80 МГц и длительностью порядка 100 фс. Изображения тонкой структуры получали с помощью масляно-иммерсионного объектива EC Plan Neofluar (Carl Zeiss, Германия) с сорокакратным увеличением и числовой апертурой 1,3, что позволило добиться поля зрения 318×318 мкм с разрешением 1024×1024 пикселя.

Использовали следующие спектральные характеристики системы визуализации: возбуждение на длине волны 800 нм, регистрация в двух спектральных диапазонах длин волн: 362–415 нм, который содержит пик нелинейного отклика коллагена на второй гармонике (400 нм) [12], и 512–576 нм, который соответствует диапазону автофлуоресценции эластина при двухфотонном возбуждении [21]. Регистрацию проводили в режиме полностью открытого пинхола.

Результаты. Начальным этапом работы было МФМ-исследование топографических характеристик коллаген- и эластинсодержащих структур мочевого пузыря, не подвергнутого лучевому воздействию. На полученных МФМ-изображениях хорошо различимы слизистая оболочка с ее собственной пластинкой, подслизистая основа и элементы мышечного слоя стенки органа (рис. 1, а, белая стрелка). Эпителий слизистой оболочки мочевого пузыря (уротелий) представлен ровным пластом плотно прилегающих друг к другу клеток, при этом соединительнотканых элементов в межклеточных пространствах не зафиксировано (рис. 1, а, красная стрелка). Базальная мембрана представляет собой совокупность коллагеновых и эластических волокон с преобладанием последних и отличается ровным контуром, повторяющим ход эпителиального пласта (рис. 1, а, желтая стрелка). Ее толщина достигает 21 мкм. В собственной пластинке слизистой оболочки и подслизистом слое, представленных сетью коллагеновых волокон с небольшой примесью эластических и некоторым количеством мышечных элементов, определяются артериолы, венулы и капилляры с содержанием в адвентиции сосудов и базальной мембране эндотелия только коллагеновых волокон. Мышечные волокна формируют пучки приблизительно одинаковой толщины, идущие в разных

направлениях, детерминированных функциональной нагрузкой. Между мышечными пучками располагается небольшое количество коллагеновых волокон с единичными эластическими волокнами, которые представляют собой каркас мышечного слоя (рис. 1, а, голубая стрелка). В интактном мочевом пузыре крыс основными локализациями коллаген- и эластинсодержащих элементов являются: базальная мембрана уротелия, собственная пластинка слизистой оболочки, подслизистая основа, стенки кровеносных сосудов и стромальный каркас мышечной оболочки. Соотношение коллагеновые волокна/эластические волокна в разных структурах — различное. Базальная мембрана эпителиа отличается преобладанием эластических волокон; собственная пластинка слизистой оболочки, подслизистый слой, стенки кровеносных сосудов и стромальный каркас мышечной оболочки демонстрируют преимущественное содержание коллагеновых волокон.

Изменения, обнаруженные в стенке мочевого пузыря через 1 сут после облучения, существенно зависят от величины радиационной нагрузки. После воздействия в дозе 2 Гр на МФМ-изображениях отмечается незначительное снижение четкости контуров базальной мембраны уротелия, а также слабое набухание основного вещества экстрацеллюлярного матрикса, расположенного между коллаген- и эластинсодержащими элементами подслизистого слоя, при этом существенного изменения толщины базальной мембраны и соотношения коллаген/эластинсодержащие структуры не наблюдается (рис. 2, а, верхний ряд). Данные изменения могут служить проявлениями поверхностной дезорганизации экстрацеллюлярного матрикса (мукоидное набухание). Нарушений со стороны соединительнотканых элементов стенок кро-

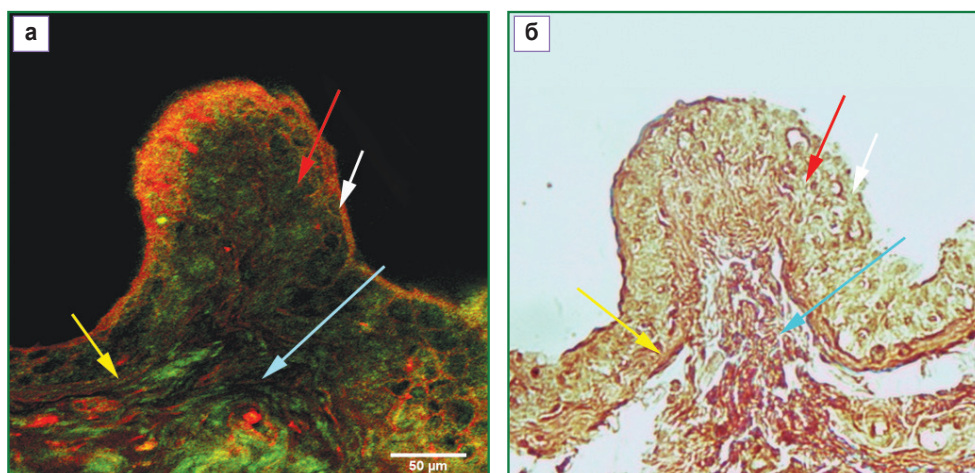


Рис. 1. Интактный мочевой пузырь крысы: а — МФМ-изображение (здесь и на других рисунках: совмещение изображений сигнала второй гармоники и сигнала двухфотонной автофлуоресценции); б — изображение гистологического препарата, окрашенного пикрофуксином по Ван-Гизону, $\times 40$; для получения МФМ-изображений использована масляная иммерсия. Описание см. в тексте

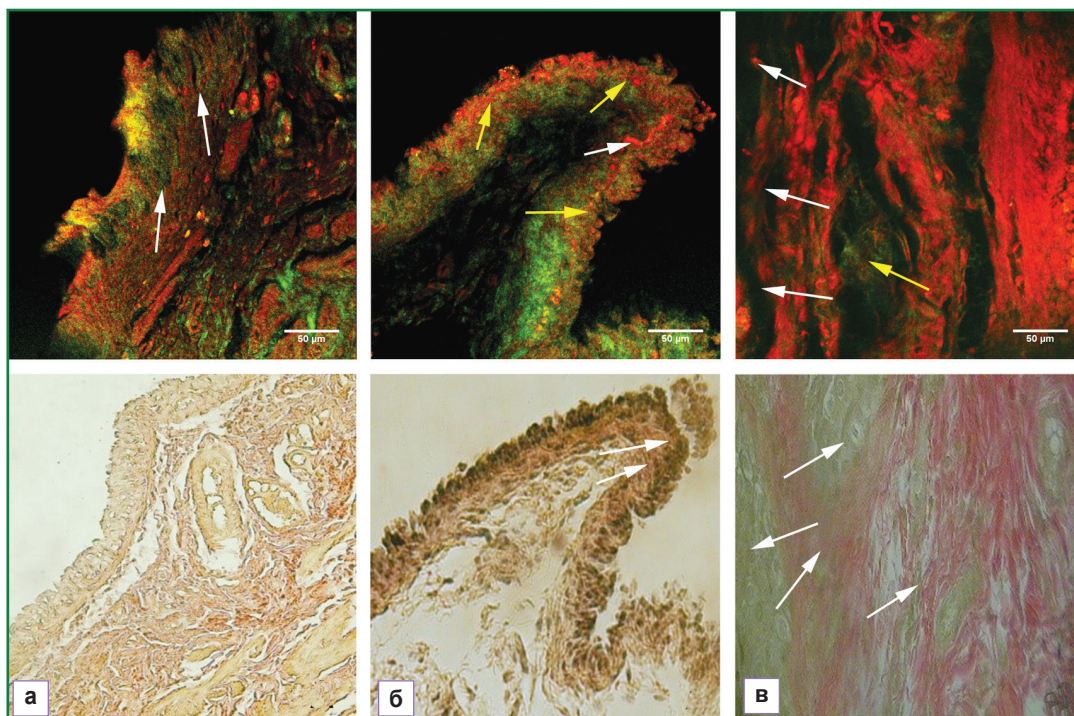


Рис. 2. Морфологические изменения в мочевом пузыре крысы через 1 сут после лучевого воздействия (верхний ряд — МФМ-изображения, нижний ряд — изображения гистологических препаратов, окрашенных по Ван-Гизону): а — после облучения в дозе 2 Гр, снижение четкости контуров базальной мембраны уротелия, а также небольшое расщепление соединительнотканых и эластических элементов подслизистого слоя без изменения толщины базальной мембраны и соотношения коллаген/эластинсодержащие структуры (*белые стрелки*), видимое на МФМ-изображениях; б — после облучения в дозе 10 Гр, утолщение фибрилл и увеличение расстояния между структурными элементами экстрацеллюлярного матрикса свидетельствуют о наличии отека (*белые стрелки*), фрагментация коллагеновых волокон и нарушение взаимоотношения эластин- и коллагенсодержащих структур в базальной мембране уротелия (*желтые стрелки*); в — после облучения в дозе 40 Гр, наличие отека в собственной пластинке слизистой оболочки и подслизистой основе, параллельно в подслизистом слое отмечено очаговое разрушение коллагенсодержащих структур, охватывающее около половины соединительнотканых элементов (*белые стрелки*), в собственной пластинке слизистой оболочки видны мелкие элементы, дающие слабый сигнал генерации второй гармоники от незначительного количества сохранившихся коллагенсодержащих структур

веносных сосудов и мышечного слоя не обнаружено. Следует заметить, что вышеописанные изменения мочевого пузыря через 1 сут после облучения в дозе 2 Гр при рутинной световой микроскопии не определяются (рис. 2, а, нижний ряд).

Через 1 сут после облучения в дозе 10 Гр на МФМ-изображениях был выявлен отек подслизистого слоя, проявившийся в виде утолщения фибрилл и увеличения расстояния между структурными элементами экстрацеллюлярного матрикса (рис. 2, б, верхний ряд). В базальной мембране уротелия отмечается фрагментация коллагеновых волокон и нарушение взаимоотношения эластин- и коллагенсодержащих структур, т.е. происходит разрушение соединительнотканых структур, не видимое при обычной микроскопии (рис. 2, б, нижний ряд).

Через 1 сут после воздействия в дозе 40 Гр на МФМ-изображениях в волокнистом каркасе обнаружены ожидаемо более грубые деструктивные процессы. В собственной пластинке слизистой оболочки и под-

слизистой основе отмечается отек, а в подслизистом слое параллельно — очаговое разрушение коллагенсодержащих структур (рис. 2, в, желтая стрелка), охватывающее около половины соединительнотканых элементов. Обращает на себя внимание практически полное отсутствие сигнала в диапазоне 352–416 нм (см. рис. 2, в, верхний ряд). В собственной пластинке слизистой оболочки определялись мелкие элементы, дающие сигнал генерации второй гармоники, которые являлись, по всей видимости, не до конца разрушенными коллагенсодержащими объектами.

Динамическое наблюдение за состоянием фибриллярных структур было продолжено через 1 нед после лучевого воздействия. После облучения в дозе 2 Гр на МФМ-изображениях определялись неравномерность, прерывистость и ослабление сигнала в диапазоне 362–416 нм, наблюдаемые в зоне уротелия, его базальной мембраны и подслизистом слое (рис. 3, а, верхний ряд). Эти изменения служили отражением альтерации, структурными проявлениями которой

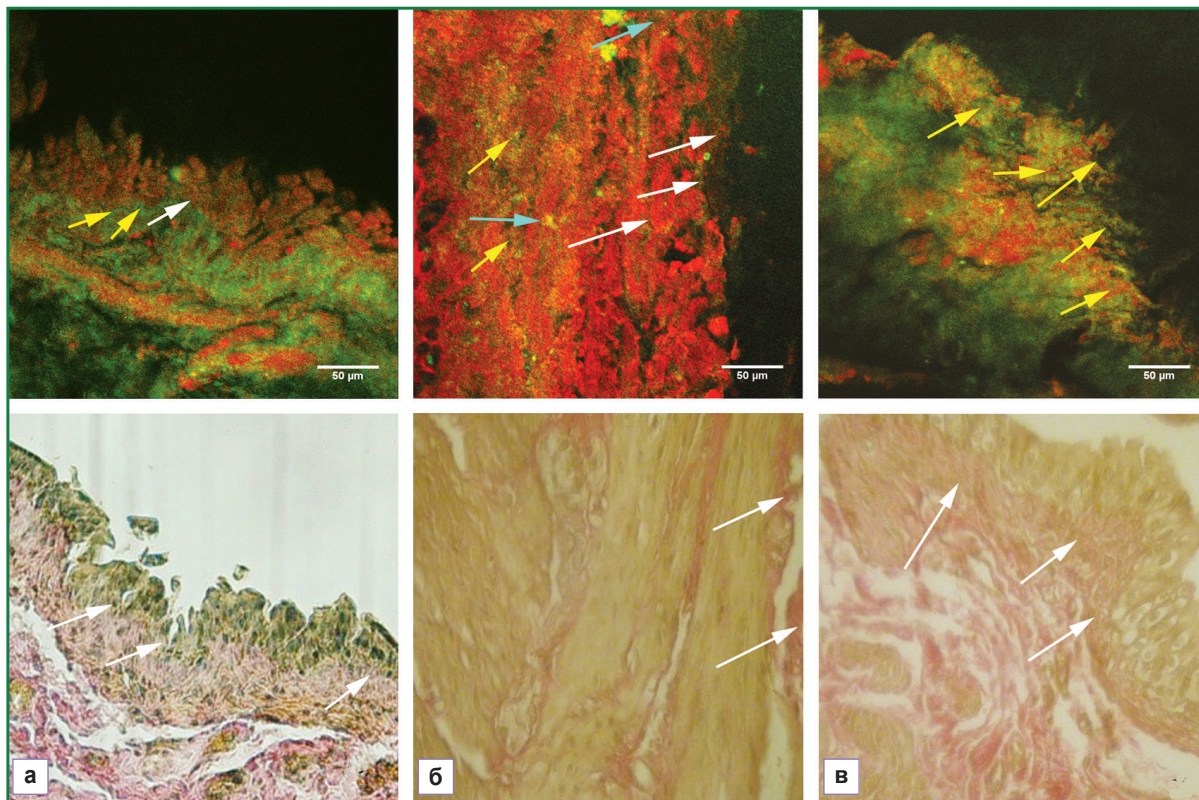


Рис. 3. Морфологические изменения в мочевом пузыре крысы через 1 нед после лучевого воздействия (верхний ряд — МФМ-изображения, нижний ряд — изображения гистологических препаратов, окрашенных по Ван-Гизону): *а* — после облучения в дозе 2 Гр, стирание контуров и разрывы базальной мембраны эпителия (*белые стрелки*), новообразованные тонкие коллагеновые волокна в пределах базальной мембраны (*желтые стрелки*); *б* — после облучения в дозе 10 Гр, отсутствие эпителия, его десквамация, фрагментация волокнистых структур базальной мембраны и подслизистого слоя (*белые стрелки*), разрушение мышечных волокон (*желтые стрелки*), элементы новообразованных коллагеновых волокон (*голубые стрелки*); *в* — после облучения в дозе 40 Гр, грубая деформация коллагеновых волокон с уменьшением их количества (*белые стрелки*), на МФМ-изображениях масштаб разрушений волокнистых структур более значительный: определяются участки с нарушением оптических свойств эпителия и его базальной мембраны, волокнистых структур подслизистого слоя, отражающие их повреждение, не видимое при обычной микроскопии (*желтые стрелки*)

являлись стирание контуров базальной мембраны эпителия, появление в ней разрывов, и в целом совпадали с картиной, наблюдаемой обычно в гистологических препаратах (рис. 3, б, нижний ряд). В пределах базальной мембраны уротелия найдены единичные тонкие коллагеновые волокна, отличающиеся от ранее наблюдаемых интенсивностью МФМ-сигнала, что нами было расценено как проявление неоколлагенеза (начало репаративных процессов) (см. рис. 3, а, верхний ряд). Изменений в волокнистых элементах кровеносных сосудов и каркаса мышечного слоя не было.

Через 1 нед после облучения в дозе 10 Гр во всех отделах стенки мочевого пузыря выявлены альтеративные процессы в виде крупных участков слущивания уротелия, фрагментации волокнистых структур базальной мембраны и подслизистого слоя. При этом на МФМ-изображениях более яркими по сравнению со стандартным окрашиванием были проявления разру-

шения коллагеновых волокон в виде их гомогенизации и фрагментации, что отражалось как диффузное снижение сигнала в диапазоне 362–416 нм (рис. 3, б, верхний ряд). Среди элементов разрушенного коллагена визуализировались тонкие коллагенсодержащие фибриллы без признаков дезорганизации, что позволило отнести их к новообразованным волокнам. Параллельно было выявлено разрушение гладкомышечных волокон, которое не обнаруживалось при рутинном гистологическом исследовании (см. рис. 3, б, нижний ряд).

Картина структурных изменений, обнаруженных через 1 нед после лучевого воздействия при дозе 40 Гр при обычной микроскопии, мало чем отличалась от изменений, отмеченных через 1 сут при той же дозе, и характеризовалась грубой деформацией пучков коллагеновых волокон с уменьшением их количества (рис. 3, в, нижний ряд). На МФМ-изображениях масштаб разрушений волокнистых структур был значи-

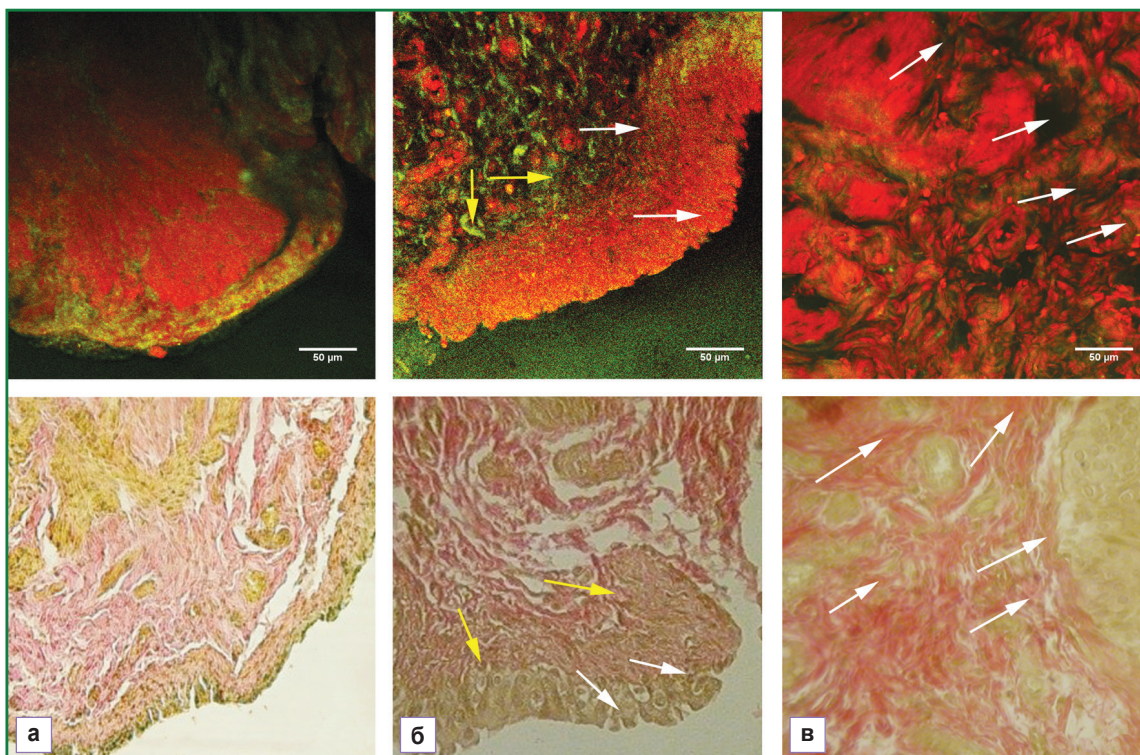


Рис. 4. Морфологические изменения в мочевом пузыре крысы через 1 мес после лучевого воздействия (верхний ряд — МФМ-изображения, нижний ряд — изображения гистологических препаратов, окрашенных по Ван-Гизону): а — после облучения в дозе 2 Гр, признаки альтерации коллаген-, эластинсодержащих элементов отсутствуют как на МФМ-изображениях, так и на препаратах, окрашенных по Ван-Гизону; б — после облучения в дозе 10 Гр, «разрыхление» уротелиального пласта (*белые стрелки*), в подслизистом слое признаки склероза сосудистых стенок с сужением и облитерацией просветов некоторых сосудов соединительной ткани, фиброзные изменения (*желтые стрелки*); в — после облучения в дозе 40 Гр, диффузный склероз базальной мембраны уротелия, подслизистой основы и мышечного слоя с появлением грубоволокнистой соединительной ткани с распространенным гиалинозом коллагеновых волокон, который не дает типичного сигнала на МФМ-изображениях (*белые стрелки*)

тельным: общая анатомическая структура слизистой оболочки нарушена, эпителий слущен, на некоторых участках отчетливо видно полное разрушение базальной мембраны уротелия (сигнал генерации второй гармоники в диапазоне 362–416 нм практически полностью отсутствовал). В мышечном слое наблюдался отек с хаотичным расположением волокон и их фрагментацией. При этом признаков появления новых коллаген- и эластинсодержащих структур не обнаружено (рис. 3, в, верхний ряд). Мы полагаем, что в данном случае имеет место «запаздывание» репаративных процессов, обусловленное блокированием их запуска вследствие использования высокой дозы облучения.

При изучении препаратов мочевого пузыря спустя 1 мес после облучения в дозе 2 Гр признаки альтерации коллаген- и эластинсодержащих элементов отсутствовали как на МФМ-изображениях (рис. 4, а, верхний ряд), так и на препаратах, окрашенных по Ван-Гизону (рис. 4, а, нижний ряд).

Морфологические изменения, обнаруженные через 1 мес после облучения в дозе 10 Гр, характери-

зовались «разрыхлением» уротелиального пласта, что обусловлено, по всей видимости, ослаблением межклеточных взаимосвязей вследствие высокого содержания разрушенных соединительнотканых элементов в базальной мембране, мышечной пластинке слизистой оболочки и подслизистом слое. В свою очередь в подслизистом слое были обнаружены признаки формирующегося фиброза экстрацеллюлярного матрикса и редукция сосудистого русла (развитие склероза сосудистых стенок с сужением и облитерацией просветов некоторых сосудов соединительной ткани).

При исследовании мочевого пузыря через 1 мес после применения дозы 40 Гр в препаратах, окрашенных по Ван-Гизону, обнаружен диффузный склероз базальной мембраны уротелия, подслизистой основы и мышечного слоя с появлением грубоволокнистой соединительной ткани с распространенным гиалинозом коллагеновых волокон (рис. 4, в, нижний ряд). Данный тип коллагена не давал типичного сигнала генерации второй гармоники на МФМ-изображениях (рис. 4, в, верхний ряд).

Обсуждение. В данном исследовании изучение морфологических изменений стенки мочевого пузыря экспериментальных животных в различные сроки после однократного локального гамма-облучения в дозе 2, 10 и 40 Гр выполнено методом МФМ. Основные биомедицинские приложения метода были до настоящего времени связаны с дифференциальной диагностикой нормальных и патологических тканей [25]. В нашем исследовании этот метод был впервые применен для динамической оценки состояния органа, подвергнутого воздействию ионизирующего излучения.

Как при гистологическом исследовании, так и при использовании метода МФМ в мочевом пузыре были установлены два параллельно идущих процесса: разрушение (дезорганизация) и восстановление поврежденных структур коллагенсодержащих элементов. Деорганизация волокнистого каркаса структурных элементов стенки мочевого пузыря при гистологическом исследовании по Ван-Гизону проявлялась в виде набухания, фибриноидных изменений и фрагментации коллагеновых элементов вплоть до их полного разрушения при использовании высоких доз облучения (40 Гр). Этим изменениям соответствовало диффузное снижение сигнала в диапазоне 362–416 нм на МФМ-изображениях. Аналогичные изменения (снижение интенсивности сигнала генерации второй гармоники коллагена) были детектированы при *in vivo* мониторинге состояния кожи после термического ожога [26], а также при системных заболеваниях, характеризующихся дезорганизацией соединительнотканых структур внутренних органов [27]. Наше исследование подтвердило, что данный феномен можно считать универсальным признаком дезорганизации структуры соединительнотканного матрикса. Метод МФМ позволил наблюдать развитие повреждения волокнистых структур в более ранние сроки и при меньших дозах облучения, чем при рутинном гистологическом исследовании (через 1 сут после использования дозы 2 Гр).

Было продемонстрировано, что процессы развития повреждения и последующего ремоделирования экстрацеллюлярного матрикса органа под воздействием ионизирующего излучения носят этапный характер и начинаются с дезорганизации и деградации коллагена на уровне волокон и пучков, что удается обнаружить в ранние сроки уже после облучения в дозе 2 Гр. Следующим этапом ответа ткани на радиационное повреждение является восстановление — процесс неоколлагеногенеза, начало которого было зафиксировано уже через 1 нед после повреждающего воздействия. Кроме того, установлено, что скорость процессов ремоделирования экстрацеллюлярного матрикса зависит от дозы облучения и существенно замедляется при воздействии более высоких доз (40 Гр). Проведенное исследование открывает новые возможности изучения состояния нормальных тканей, подвергнутых воздействию ионизирующего излучения.

Дальнейшая работа в этом направлении связана с разработкой методик мониторинга радиационно-индуцированных повреждений *in vivo* с помощью метода МФМ.

Заключение. Метод многофотонной микроскопии в отличие от традиционного гистологического исследования позволяет обнаружить деградацию коллагена тканей мочевого пузыря и его восстановление в более ранние сроки и при меньшей дозе радиационного воздействия, что дает возможность оценивать и корректировать динамику радиационных изменений в экстрацеллюлярном матриксе.

Финансирование исследования. Работа выполнена при поддержке РНФ (проект №14-25-00055, выполнение исследований радиационно-индуцированных изменений методом лазерной сканирующей микроскопии), РФФИ (проект №16-02-00670, выполнение радиационного воздействия, исследование радиационно-индуцированных изменений методом стандартного гистологического исследования).

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. Fiorino C., Valdagni R., Rancati T., Sanguineti G. Dose-volume effects for normal tissues in external radiotherapy: pelvis. *Radiother Oncol* 2009; 93(2): 153–167, <http://dx.doi.org/10.1016/j.radonc.2009.08.004>.
3. Yarnold J., Brotons M.C.V. Pathogenetic mechanisms in radiation fibrosis. *Radiother Oncol* 2010; 97(1): 149–161, <http://dx.doi.org/10.1016/j.radonc.2010.09.002>.
4. Stewart F.A., Akleyev A.V., Hauer-Jensen M., Hendry J.H., Kleiman N.J., Macvittie T.J., Aleman B.M., Edgar A.B., Mabuchi K., Muirhead C.R., Shore R.E., Wallace W.H. ICRP publication 118: ICRP statement on tissue reactions and early and late effects of radiation in normal tissues and organs — threshold doses for tissue reactions in a radiation protection context. *Ann ICRP* 2012; 41(1–2): 1–322, <http://dx.doi.org/10.1016/j.icrp.2012.02.001>.
5. Brush J., Lipnick S.L., Phillips T., Sitko J., McDonald J.T., McBride W.H. Molecular mechanisms of late normal tissue injury. *Semin Radiat Oncol* 2007; 17(2): 121–130, <http://dx.doi.org/10.1016/j.semradonc.2006.11.008>.
6. 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, <http://dx.doi.org/10.3109/09553002.2014.969848>.
7. Göppert-Mayer M. Über elementarakte mit zwei quantensprüngen. *Ann Phys* 1931; 401(3): 273–295, <http://dx.doi.org/10.1002/andp.19314010303>.
8. Alex A., Weingast J., Weinigel M., Kellner-Höfer M., Nemecek R., Binder M., Pehamberger H., König K., Drexler W. Three-dimensional multiphoton/optical coherence tomography for diagnostic applications in dermatology. *J Biophotonics* 2013; 6(4): 352–362, <http://dx.doi.org/10.1002/jbio.201200085>.

9. Denk W., Strickler J.H., Webb W.W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* 1990; 248(4951): 73–76, <http://dx.doi.org/10.1126/science.2321027>.
10. Theodossiou T.A., Thrasivoulou C., Ekwobi C., Becker D.L. Second harmonic generation confocal microscopy of collagen type I from rat tendon cryosections. *Biophys J* 2006; 91(12): 4665–4677, <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.106.093740>.
11. Seidenari S., Arginelli F., Bassoli S., Cautela J., French P.M., Guanti M., Guardoli D., König K., Talbot C., Dunsby C. Multiphoton laser microscopy and fluorescence lifetime imaging for the evaluation of the skin. *Dermatol Res Pract* 2012; 2012: 810749, <http://dx.doi.org/10.1155/2012/810749>.
12. Williams R.M., Zipfel W.R., Webb W.W. Interpreting second-harmonic generation images of collagen I fibrils. *Biophys J* 2005; 88(2): 1377–1386, <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.104.047308>.
13. Raub C.B., Unruh J., Suresh V., Krasieva T., Lindmo T., Gratton E., Tromberg B.J., George S.C. Image correlation spectroscopy of multiphoton images correlates with collagen mechanical properties. *Biophys J* 2008; 94(6): 2361–2373, <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.107.120006>.
14. Chen J., Wong S., Nathanson M.H., Jain D. Evaluation of Barrett esophagus by multiphoton microscopy. *Arch Pathol Lab Med* 2014; 138(2): 204–212, <http://dx.doi.org/10.5858/arpa.2012-0675-OA>.
15. Dimitrow E., Ziemer M., Koehler M.J., Norgauer J., König K., Elsner P., Kaatz M. Sensitivity and specificity of multiphoton laser tomography for in vivo and ex vivo diagnosis of malignant melanoma. *J Invest Dermatol* 2009; 129(7): 1752–1758, <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2008.439>.
16. 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, <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2582>.
17. Huang A.S., Gonzalez J.M. Jr., Le P.V., Heur M., Tan J.C. Sources of structural autofluorescence in the human trabecular meshwork. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013; 54(7): 4813–4820, <http://dx.doi.org/10.1167/iovs.12-11235>.
18. Morishige N., Yamada N., Zhang X., Morita Y., Yamada N., Kimura K., Takahara A., Sonoda K.H. Abnormalities of stromal structure in the bullous keratopathy cornea identified by second harmonic generation imaging microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012; 53(8): 4998–5003, <http://dx.doi.org/10.1167/iovs.12-10214>.
19. Koehler M.J., König K., Elsner P., Bückle R., Kaatz M. In vivo assessment of human skin aging by multiphoton laser scanning tomography. *Opt Lett* 2006; 31(19): 2879–2881, <http://dx.doi.org/10.1364/ol.31.002879>.
20. Tsai T.H., Jee S.H., Dong C.Y., Lin S.J. Multiphoton microscopy in dermatological imaging. *J Dermatol Sci* 2009; 56(1): 1–8, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdermsci.2009.06.008>.
21. Cicchi R., Matthäus C., Meyer T., Lattermann A., Dietzek B., Brehm B.R., Popp J., Pavone F.S. Non-linear imaging and characterization of atherosclerotic arterial tissue using combined two photon fluorescence, second-harmonic generation and CARS microscopy. *Proc. SPIE* 8948, Multiphoton Microscopy in the Biomedical Sciences XIV, 894807 (February 28, 2014), <http://dx.doi.org/10.1117/12.203701822>.
22. Chen W.S., Wang Y., Liu N.R., Zhang J.X., Chen R. Multiphoton microscopic imaging of human normal and cancerous oesophagus tissue. *J Microsc* 2014; 253(1): 79–82, <http://dx.doi.org/10.1111/jmi.12102>.
23. Paoli J., Smedh M., Ericson M.B. Multiphoton laser scanning microscopy — a novel diagnostic method for superficial skin cancers. *Semin Cutan Med Surg* 2009; 28(3): 190–195, <http://dx.doi.org/10.1016/j.sder.2009.06.007>.
24. Burke K., Tang P., Brown E. Second harmonic generation reveals matrix alterations during breast tumor progression. *J Biomed Opt* 2012; 18(3): 031106, <http://dx.doi.org/10.1117/1.JBO.18.3.031106>.
25. Campagnola P. Second harmonic generation imaging microscopy: applications to diseases diagnostics. *Anal Chem* 2011; 83(9): 3224–3231, <http://dx.doi.org/10.1021/ac1032325>.
26. Yasui T., Tanaka R., Hase E., Fukushima Sh., Araki T. In vivo time-laps imaging of skin-burn wound healing using second-harmonic generation microscopy. *Proc. SPIE* 8948, Multiphoton Microscopy in the Biomedical Sciences XIV, 89480B (February 28, 2014), <http://dx.doi.org/10.1117/12.2038022>.
27. 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, <http://dx.doi.org/10.1364/BOE.6.001464>.