

# КОМПЛЕМЕНТАРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТОЯНИЯ КОЛЛАГЕНА ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ МЕТОДАМИ КРОСС-ПОЛЯРИЗАЦИОННОЙ ОПТИЧЕСКОЙ КОГЕРЕНТНОЙ ТОМОГРАФИИ, НЕЛИНЕЙНОЙ И АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

DOI: 10.17691/stm2017.9.1.01

УДК 577.3:616.62–006.6–018.23–073.756.8

Поступила 24.11.2016 г.



**Е.Б. Киселева**, к.б.н., научный сотрудник лаборатории изучения оптической структуры биотканей НИИ биомедицинских технологий<sup>1</sup>;

**Е.В. Губарькова**, к.б.н., младший научный сотрудник лаборатории изучения оптической структуры биотканей НИИ биомедицинских технологий<sup>1</sup>;

**В.В. Дуденкова**, младший научный сотрудник лаборатории изучения оптической структуры биотканей НИИ биомедицинских технологий<sup>1</sup>; аспирант радиофизического факультета<sup>2</sup>;

**П.С. Тимашев**, д.х.н., руководитель отдела современных биоматериалов<sup>3</sup>; старший научный сотрудник лаборатории лазерной химии<sup>4</sup>;

**С.Л. Котова**, к.х.н., старший научный сотрудник лаборатории модифицированных полимерных систем<sup>5</sup>; ведущий научный сотрудник отдела современных биоматериалов<sup>4</sup>;

**Л.Б. Тимофеева**, к.б.н., ассистент кафедры гистологии с цитологией и эмбриологией<sup>1</sup>;

**М.Ю. Кириллин**, к.ф.-м.н., старший научный сотрудник лаборатории биофотоники<sup>6</sup>;

**Г.В. Белкова**, к.х.н., старший научный сотрудник лаборатории модифицированных полимерных систем<sup>5</sup>;

**А.Б. Соловьева**, д.х.н., зав. лабораторией модифицированных полимерных систем<sup>5</sup>;

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

**Н.Д. Гладкова**, д.м.н., профессор, зам. директора по науке НИИ биомедицинских технологий<sup>1</sup>

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

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

<sup>3</sup>Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва, 119991, ул. Трубецкая, 8/2;

<sup>4</sup>Институт фотонных технологий, Федеральный научно-исследовательский центр «Кристаллография и фотоника» Троицк, РАН, Москва, 142190, ул. Пионерская, 2;

<sup>5</sup>Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва, 119991, ул. Косыгина, 4;

<sup>6</sup>Институт прикладной физики РАН, Н. Новгород, 603950, ул. Ульянова, 46

**Цель исследования** — демонстрация потенциала кросс-поляризационной оптической когерентной томографии (КП ОКТ) как минимально инвазивного метода, работающего в режиме реального времени, для диагностики рака мочевого пузыря на фоне выраженного воспаления.

**Материалы и методы.** Для верификации диагностических данных, полученных с помощью КП ОКТ, проводили их сравнение и вычисляли корреляцию с количественной оценкой состояния коллагена методами высокоразрешающей микроскопии. КП ОКТ-исследование выполнено на образцах ткани, полученных в ходе операции цистэктомии с деривацией мочи в кишечный резервуар по поводу мышечно-инвазивной формы уротелиального рака  $T_{2-3}N_{0-x}M_0$  (G2, 3) от 18 пациентов в возрасте от 50 до 64 лет. Всего было

**Для контактов:** Киселева Елена Борисовна, e-mail: kiseleva84@gmail.com

выбрано 60 зон интереса, которые по результатам гистологической оценки разделены на четыре группы: со слабо выраженным воспалением (1-я группа — контрольная) — 12 зон; с выраженным воспалением (2-я группа) — 18 зон; с низкодифференцированным уротелиальным раком с инвазией в мышечную оболочку (3-я группа) — 24 зоны; с рецидивом рака на послеоперационном рубце (4-я группа) — 6 зон. Методами высокоразрешающей микроскопии (нелинейная микроскопия и атомно-силовая микроскопия) детализировали тканевые изменения на микроструктурном уровне, которые фиксирует метод КП ОКТ. Для объективизации полученных данных и возможности их сопоставления использована количественная обработка всех видов изображений.

**Результаты.** С помощью двух высокоразрешающих методов и классической гистологии показаны особенности пространственной и структурной организации внеклеточного матрикса мочевого пузыря при разных патологиях. Карты фактора деполяризации, построенные по КП ОКТ-изображениям инвазивного рака и рецидива рака в области послеоперационного рубца, отражают кросс-рассеивающие свойства соединительной ткани мочевого пузыря при этих состояниях и демонстрируют статистически значимое различие уровня интегрального фактора деполяризации при карциноме с его значением при выраженном хроническом воспалении ( $p < 0,05$ ). Показана высокая статистически значимая положительная корреляция между измерениями интегрального фактора деполяризации и параметром согласованности распределения сигнала генерации второй гармоники от коллагена на уровне слизистой оболочки ( $r = 0,867$ ;  $p < 0,001$ ; корреляция Спирмена). Это указывает на высокую степень соответствия между способностью к кросс-рассеянию и согласованностью укладки волокон коллагена. При выраженном воспалении, инвазивном росте уротелиального рака и рецидиве рака в области послеоперационного рубца выявлена структурная дезорганизация волокнистых структур на тканевом уровне в подповерхностной области мочевого пузыря.

**Заключение.** Сравнение КП ОКТ-изображений с данными методов высокого разрешения (нелинейной микроскопии в режиме генерации второй гармоники и атомно-силовой микроскопии) показало, что КП ОКТ может стать мощным минимально инвазивным инструментом, работающим в режиме реального времени, для диагностики рака мочевого пузыря на фоне выраженного воспаления и в области послеоперационного рубца. Представленные результаты могут стимулировать дальнейшее развитие КП ОКТ-техники и способствовать ее активному внедрению в клиническую практику.

**Ключевые слова:** кросс-поляризационная оптическая когерентная томография; КП ОКТ; уротелиальный рак; рецидив уротелиального рака; состояние коллагена; нелинейная микроскопия; генерация второй гармоники; атомно-силовая микроскопия.

**Как цитировать:** Kiseleva E.B., Gubarkova E.V., Dudenkova V.V., Timashev P.S., Kotova S.L., Timofeeva L.B., Kirillin M.Yu., Belkova G.V., Solov'eva A.B., Strel'tsova O.S., Gladkova N.D. Complementary study of collagen state in bladder diseases using cross-polarization optical coherence tomography, nonlinear and atomic force microscopy. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2017; 9(1): 7–20, <https://doi.org/10.17691/stm2017.9.1.01>

English

## Complementary Study of Collagen State in Bladder Diseases Using Cross-Polarization Optical Coherence Tomography, Nonlinear and Atomic Force Microscopy

**E.B. Kiseleva**, PhD, Researcher, Laboratory of Biotissue Optical Structure, Institute of Biomedical Technologies<sup>1</sup>;

**E.V. Gubarkova**, PhD, Junior Researcher, Laboratory of Biotissue Optical Structure, Institute of Biomedical Technologies<sup>1</sup>;

**V.V. Dudenkova**, Junior Researcher, Laboratory of Biotissue Optical Structure, Institute of Biomedical Technologies<sup>1</sup>; PhD Student, Faculty of Radiophysics<sup>2</sup>;

**P.S. Timashev**, DSc, Head of the Novel Biomaterial Unit<sup>3</sup>; Senior Researcher, Laboratory of Laser Chemistry<sup>4</sup>;

**S.L. Kotova**, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Modified Polymer Systems<sup>5</sup>; Leading Researcher, Department of Modern Biomaterials<sup>4</sup>;

**L.B. Timofeeva**, PhD, Assistant, Department of Histology with Cytology and Embryology<sup>1</sup>;

**M.Yu. Kirillin**, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Biophotonics<sup>6</sup>;

**G.V. Belkova**, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Modified Polymer Systems<sup>5</sup>;

**A.B. Solov'eva**, DSc, Head of the Laboratory of Modified Polymer Systems<sup>5</sup>;

**O.S. Strel'tsova**, MD, DSc, Professor, Department of Urology named after E.V. Shahov<sup>1</sup>;

**N.D. Gladkova**, MD, DSc, Professor, Vice Director for Science, Institute of Biomedical Technologies<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod, 23 Prospect Gagarina, Nizhny Novgorod, 603950, Russian Federation;

<sup>3</sup>I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, 8/2 Trubetskaya St., Moscow, 119991, Russian Federation;

<sup>4</sup>Institute of Photon Technologies, Federal Scientific Research Center "Crystallography and Photonics" of the Russian Academy of Sciences, 2 Pionerskaya St., Moscow, Troitsk, 142190, Russian Federation;

<sup>5</sup>Semenov Institute of Chemical Physics of the Russian Academy of Sciences, 4 Kosygina St., Moscow, 119991, Russian Federation;

<sup>6</sup>Institute of Applied Physics of the Russian Academy of Sciences, 46 Ul'yanova St., Nizhny Novgorod, 603950, Russian Federation

**The aim of the study** is to demonstrate the potential of cross-polarization optical coherence tomography (CP OCT) as a minimally invasive real-time technique for detection of bladder cancer against a background of severe inflammation.

**Materials and Methods.** For the verification of CP OCT diagnostic data related to the condition of collagen comparison with high-resolution microscopy inspection was performed and correlation of the results was calculated. The CP OCT study was performed on samples of tissue with muscle-invasive urothelial carcinoma T<sub>2-3</sub>N<sub>0-1</sub>M<sub>0</sub> (G2, 3) in 18 patients ranging in age from 50 to 64 obtained in course of cystectomy with urine diversion into the intestinal vessel. In total, 60 regions of interest were selected and divided into four groups in accordance with the results of the histological analysis: areas with mild inflammation (group 1, control), 12 areas; areas with severe inflammation (group 2), 18 areas; areas with poorly differentiated urothelial carcinoma with invasion into the muscular layer (group 3), 24 areas; areas with cancer recurrence at the post-operative scar (group 4), 6 areas. Tissue changes at micro-structural level registered by CP OCT were investigated in detail with high-resolution microscopy (nonlinear microscopy and atomic force microscopy). Quantitative processing of all the obtained images enabled their direct comparison.

**Results.** By two high-resolution techniques and classical histology the spatial and structural features of the bladder extracellular matrix organization exhibiting different pathologies were demonstrated. Depolarization factor maps derived from CP OCT images of both invasive carcinoma and carcinoma recurrence in the area of post-operative scar tissue characterize the cross-scattering properties of the bladder connective tissue in these conditions and demonstrate a statistically significant difference in the integral depolarization factor value for carcinoma and severe chronic inflammation ( $p < 0.05$ ). A high statistically significant positive correlation ( $r = 0.867$ ,  $p < 0.001$ ; Spearman correlation) between the integral depolarization factor and the conformance parameter of the second harmonic signal distribution detected from collagen at the level of the mucous membrane was demonstrated. This is indicative of a high level of correspondence between the level of cross-scattering and the collagen fibers ordering. In cases of severe inflammation, invasive growth of urothelial carcinoma, and cancer recurrence in the area of the surgical scar the structural disorganization of fiber structures determined at tissue level in the subsurface region of the bladder was revealed.

**Conclusion.** The comparison of CP OCT images with data from the high-resolution techniques (nonlinear microscopy in second harmonic generation mode and atomic force microscopy) demonstrated that CP OCT have the potential to become a powerful, minimally invasive, real-time tool for detection of bladder cancer against a background of severe inflammation in the area of the post-operative scar. These results will stimulate further development of CP OCT technique and promote its active introduction into clinical practice.

**Key words:** cross-polarization optical coherence tomography; CP OCT; urothelial carcinoma; urothelial carcinoma recurrence; collagen state; nonlinear microscopy; second harmonic generation; atomic force microscopy.

Совершенствование прижизненных технологий диагностики в режиме реального времени, в частности мониторинга инвазии рака, основанных на оценке микроструктурных изменений, остается основным направлением развития методов эндоскопической визуализации [1, 2].

Метод оптической когерентной томографии (ОКТ) в урологии применяется преимущественно для обнаружения и дифференциальной диагностики уротелиального рака, а количественная обработка ОКТ-сигнала позволяет объективизировать найденные изменения. Показано, что количественная обработка трехмерных ОКТ-изображений существенно повышает диагностические показатели метода для выявления карциномы *in situ* мочевого пузыря [3–5]. В то же время проведенный N.E. Hale с соавт. [6] анализ множества работ по современным ОКТ-технологиям визуализации рака мочевого пузыря показал, что для ОКТ довольно часты случаи ложноположительной диагностики рака на фоне выраженного воспаления,

а также при диагностике рака в области послеоперационного рубца.

Поляризационно-чувствительная ОКТ как одна из модификаций ОКТ позволяет оценить состояние коллагена и потенциально способна повысить эффективность обнаружения рака мочевого пузыря [7, 8]. В работе нашей группы [9], использующей кросс-поляризационную ОКТ (КП ОКТ), показано, что этот вариант поляризационно-чувствительной ОКТ оценивает состояние внеклеточного матрикса стенки мочевого пузыря по кросс-поляризационному обратному рассеянию. Уровень и характер кросс-рассеяния определяется главным образом состоянием коллагеновых волокон и зависит от выраженности воспаления и/или стадии развития рака. По нашим данным, диагностическая эффективность КП ОКТ в выявлении поверхностного рака мочевого пузыря с учетом кросс-рассеивающих свойств слизистой оболочки выше по сравнению с традиционной ОКТ: диагностическая точность КП ОКТ составила 93,6%, чувствительность —

96,4%, специфичность — 92,1% против 72,1, 74,5 и 70,8% для традиционной ОКТ.

Развитие высокоразрешающих методов микроскопии открыло новые возможности для изучения изменений пространственной организации внеклеточного матрикса в ходе воспаления и инвазии рака [10–13]. Метод нелинейной микроскопии в режиме генерации второй гармоники (ГВГ) позволяет получать изображения коллагеновых волокон в норме и наблюдать изменения их структуры при воспалении и развитии неоплазии [10, 14]. Однако этот метод микроскопии имеет серьезные ограничения для прижизненного эндоскопического использования [12, 15].

Метод атомно-силовой микроскопии (АСМ) считается перспективным для диагностики различных патологий, в том числе заболеваний соединительной ткани и онкологических заболеваний [16, 17]. За счет трехмерной визуализации рельефа поверхности исследуемых объектов с нанометровым разрешением, превосходящим разрешение оптической микроскопии [18], метод АСМ может существенно дополнить и углубить знания о механизмах проявления патологии на тканевом (микро) уровне.

В настоящем исследовании проведено сравнение данных количественной обработки изображений слизистой и подслизистой оболочек мочевого пузыря, полученных методами КП ОКТ, нелинейной и атомно-силовой микроскопии, при хроническом воспалении и развивающемся на его фоне уротелиальном раке. Выбранное сочетание методов дает возможность проследить состояние коллагена на различных уровнях его организации: на тканевом (изменение кросс-рассеяния на КП ОКТ-изображениях), волоконном (изменение геометрического распределения волокон на ГВГ-изображениях) и фибриллярном уровне (нарушение упаковки коллагеновых фибрилл на АСМ-изображениях).

**Цель исследования** — демонстрация потенциала КП ОКТ как минимально инвазивного метода, работающего в режиме реального времени, для диагностики рака мочевого пузыря на фоне выраженного воспаления путем верификации полученных диагностических данных с помощью сравнения и вычисления корреляции с количественной оценкой состояния коллагена методами высокоразрешающей микроскопии.

#### Материалы и методы

**Послеоперационные образцы стенки мочевого пузыря пациентов.** КП ОКТ-исследование проведено на образцах ткани, полученных в ходе операции цистэктомии с деривацией мочи в кишечный резервуар по поводу мышечно-инвазивной формы уротелиального рака  $T_{2-3}N_{0-x}M_0$  (G2, 3) от 18 пациентов в возрасте от 50 до 64 лет. Всего было выбрано 60 зон интереса, которые по результатам гистологической оценки разделены на четыре группы: со слабо выраженным воспалением (1-я группа — контрольная) — 12 зон; с выраженным воспалением (2-я группа) — 18 зон; с низкодифференцированным уротелиальным

раком с инвазией в подслизистую основу и мышечную оболочку (3-я группа) — 24 зоны; с рецидивом рака в области послеоперационного рубца (4-я группа) — 6 зон. Поскольку исследование выполнено на материале удаленных органов по поводу мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря, протекающего на фоне многолетнего хронического воспаления (длительность хронического воспаления в среднем составила  $17 \pm 6$  лет), зон неизменной слизистой оболочки нами не обнаружено. Контрольной группой служили образцы со слабо выраженным воспалением (1-я группа), в которых изменение структуры соединительной ткани было минимальным.

Послеоперационный материал помещали в марлевые салфетки, смоченные физиологическим раствором, и доставляли в течение 2 ч для исследования. После получения КП ОКТ-изображений на образце мочевого пузыря гистологической тушью отмечали область сканирования, из ткани маркированной области готовили серийные срезы. На проведение экспериментальных исследований на *ex vivo* образцах человека получено разрешение Этического комитета Нижегородской государственной медицинской академии, протокол №7 от 14 августа 2014 г.

**Кросс-поляризационная оптическая когерентная томография.** В работе использована спектральная модификация КП ОКТ-прибора с общим оптическим путем для опорной и сигнальной волн (common path), которая позволяет визуализировать в реальном масштабе времени карты обратного рассеяния света от оптических неоднородностей ткани. Прибор имеет два канала: ко-поляризационный и кросс-поляризационный, что позволяет разделить волны, которые после обратного рассеяния в ткани сохранили исходное состояние поляризации или изменили его на ортогональное. Вследствие этого формируемое на экране персонального компьютера КП ОКТ-изображение состоит из двух изображений: в ко- и кросс-поляризации [19–21]. Размер каждого изображения  $4 \times 2$  мм (ширина  $\times$  на высоту). В приборе используется зондирующее излучение с длиной волны 1310 нм, шириной спектра 100 нм и мощностью на объекте 20 мВт. Разрешение по глубине (в воздухе) составляет  $\sim 10$  мкм, поперечное разрешение  $\sim 15$  мкм, глубина сканирования в воздухе  $\sim 1,7$  мм, скорость сканирования — 20 000 А-сканов в секунду, частота получения В-сканов для каждой пары изображений составляет 40 кадров/с.

Количественная оценка КП ОКТ-изображений ткани мочевого пузыря была проведена путем построения карт фактора деполяризации с вычислением интегрального фактора деполяризации (ИФД). Размер каждой карты составил  $2 \times 1$  мм (ширина  $\times$  на высоту) и включал основную интересующую область исследования. Алгоритм расчета фактора деполяризации был разработан нашей группой ранее для оценки состояния коллагеновых волокон в различных тканях (слизистой оболочке мочевого пузыря и аорты) [22, 23]. В основе вычисления ИФД лежит отношение уровней

ОКТ-сигнала в кросс- и ко-поляризационных каналах, усредненное по выбранным областям интереса.

**Гистологическое исследование.** После получения КП ОКТ-изображений образцы стенки мочевого пузыря фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина в течение 48 ч, затем заливали в парафин. С маркированного участка приготавливали серийные срезы толщиной 7 мкм, часть из них окрашивали гематоксилином и эозином и по Ван-Гизону, другие после депарафинирования исследовали методами нелинейной микроскопии в режиме ГВГ и АСМ. Гистологические препараты оценивали с помощью микроскопа Leica DM2500 (Leica Microsystems, Германия), оснащенного цифровой камерой DFC 245C.

**Нелинейная микроскопия.** Исследование проведено на многофотонном лазерном сканирующем микроскопе LSM 710 (Carl Zeiss, Германия). Источником возбуждающего излучения служил Ti:Sapphire фемтосекундный лазер Chameleon Vision II (Coherent, США) с частотой следования импульсов ~80 МГц и длительностью  $140 \pm 20$  фс. Депарафинированные 7-микронные срезы образцов мочевого пузыря наблюдались на покровном стекле толщиной 170 мкм. Изображения тонкой структуры строились с помощью водно-иммерсионного объектива C-Apochromat с сорокакратным увеличением и числовой апертурой 1,2, что позволило получить поле зрения  $212 \times 212$  мкм с разрешением  $1024 \times 1024$  пикселей.

Для исследования была выбрана длина волны возбуждения 800 нм с мощностью ~4 мВт. Руководствуясь данными литературы [13], детектирование сигнала ГВГ осуществляли с использованием спектральной селекции в диапазоне длин волн 371–415 нм. В качестве параметров количественной оценки состояния коллагеновых волокон с точки зрения их целостности/дезорганизации, ориентации, формы и плотности расположения были выбраны среднее значение интенсивности сигнала ГВГ и согласованность распределения сигнала ГВГ (когерентность).

Величина среднего значения интенсивности отражает относительное количество волокон коллагена в поле зрения. Согласованность прямо пропорционально зависит от степени упорядоченности укладки коллагеновых волокон и оценивает изотропные свойства изображения. Она определяется как отношение между разностью и суммой наибольшего и наименьшего собственных значений матрицы  $2 \times 2$ , полученной из частных производных по горизонтальному и вертикальному направлениям изображения. Значение параметра согласованности ограничено в пределах от 0 до 1, где 1 соответствует высоко ориентированным структурам, а 0 — изотропным областям [24]. Для оценки среднего значения интенсивности сигнала ГВГ от коллагена на выделенных областях интереса использовали стандартную функцию вычисления среднего значения программы ImageJ (NIH, США) [25]. Для оценки локальной ориентации коллагеновых волокон применяли плагин

на основе анализа структурных тензоров OrientationJ программы ImageJ.

Параметры средней интенсивности и согласованности распределения вычисляли путем усреднения значений, полученных для набора областей интереса исследуемого образца. Области интереса выбирались экспертом на основе гистологического заключения и содержали типичную тканевую структуру.

**Атомно-силовая микроскопия.** Гистологические срезы на стеклянных слайдах были исследованы методом АСМ на воздухе, в полуконтактной моде измерений с получением изображений в режиме топографии и фазового контраста. АСМ-изображения были получены на микроскопе Solver P47 (НТ-МДТ, Россия), использовали сканер Solver и зонды TESP (Bruker, США) с номинальной константой жесткости 42 Н/м, номинальной резонансной частотой 320 кГц и номинальным радиусом закругления 8 нм. Были получены обзорные изображения размером  $14 \times 14$  мкм с различных участков среза ткани путем ориентирования образца на основании соответствующих изображений ткани в оптическом микроскопе, совмещенном с АСМ, и фотографий гистологических препаратов. Обзорные изображения позволяют выявить топографию коллагеновых волокон и их пучков.

Также были получены изображения с высоким разрешением размером  $6 \times 6$  и  $3 \times 3$  мкм в режимах топографии и фазового контраста. Изображения с высоким разрешением позволяют выявить укладку коллагеновых фибрилл и охарактеризовать индивидуальные фибриллы.

В качестве количественных параметров ультраструктуры внеклеточного матрикса были использованы показатели фликкер-шумовой спектроскопии (ФШС), полученные на основе оцифрованных данных АСМ-изображений поверхности. Первоначально получали АСМ-изображения срезов соединительной ткани в окнах  $14 \times 14$  мкм, а затем из этой области выбирали фрагменты структуры в окнах  $6 \times 6$  и  $3 \times 3$  мкм, поскольку на этих масштабах уже проявляются фибриллы. Для всех изображений, получаемых в таких окнах (обычно это было 5–8 изображений), определяли ФШС-параметры структуры [26]. Ранее было показано [6], что среди вводимых трехмерных параметров структуры в указанном диапазоне пространственных размеров наиболее чувствительными к патологическим изменениям в ткани оказываются следующие параметры:  $\sigma$ , являющийся мерой нерегулярностей скачков исследуемых хаотических профилей поверхности относительно «базовых» низкочастотных профилей, определяется как «фактор ступенчатости» хаотической составляющей высот профиля; и  $S(L_0^{-1})$ , являющийся мерой высокочастотных, наиболее резко изменяющихся нерегулярностей исследуемого профиля, определяется как «фактор остринности» структуры поверхности. Эти два параметра рассматривались как основные при ФШС-параметризации АСМ-изображений ткани мочевого пузыря.

**Выбор областей интереса при количественной оценке изображений.** Области интереса для количественной оценки изображений КП ОКТ, ГВГ и АСМ выбирались вручную и имели определенный размер для каждого метода визуализации. Эти области были расположены на двух глубинах от поверхности ткани и включали только соединительную ткань (кровеносные сосуды и пучки мышечных волокон исключались).

Для КП ОКТ-изображений были выбраны две области интереса размерами 200×2000 и 300×2000 мкм на глубинах соответственно 100–300 мкм — уровень слизистой оболочки, где преимущественно разворачивается воспалительный процесс и начинается инвазия раковых клеток; 300–600 мкм — уровень подслизистой основы, по которой можно судить о предшествующем воспалении или состоянии послеоперационного рубца.

Для ГВГ-изображений также выбрано две области интереса размерами 60×60 мкм на глубинах 100–300 мкм и 300–600 мкм, что дало возможность сравнивать результаты с данными КП ОКТ.

Для АСМ-изображений была выбрана одна область интереса размером 6×6 мкм непосредственно под уротелием на глубине до 300 мкм (область, где наблюдаются более выраженные морфологические изменения).

Ручной выбор областей интереса использован для прицельного анализа изменений в соединительной ткани, где преимущественно разыгрывается патологический процесс (воспаление, инвазия рака). В дальнейшем это поможет продвинуться в направлении автоматизированной дифференциальной диагностики патологий мочевого пузыря по характеристике состояния коллагеновых волокон.

**Статистическая обработка.** Результаты анализировали с использованием пакета Statistica 10.0 (StatSoft, Inc., США) и программы Prism 6 (GraphPad Software, США). Проводили определение средних значений ( $M$ ) измеряемых величин и стандартных отклонений среднего ( $\pm SD$ ). Достоверность различий между группами рассчитывали с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни. Для выявления корреляции ( $r$ ) применяли коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Во всех случаях достоверными считали различия при уровне значимости  $p < 0,05$ .

#### Результаты исследования

**Визуальная оценка состояния коллагена при заболеваниях мочевого пузыря при использовании КП ОКТ, нелинейной микроскопии в режиме ГВГ, АСМ и гистологического метода.** КП ОКТ, нелинейная микроскопия в режиме ГВГ и гистологический метод использовались нами ранее по отдельности для оценки содержания, пространственной и структурной организации коллагеновых волокон в стенке мочевого пузыря [22]. АСМ использована для анализа соединительной ткани мочевого пузыря впервые. В данном исследовании проведена сравнительная оценка состояния коллагена этими методами в четырех группах, описанных ранее (рис. 1).

1. При слабо выраженном воспалении (1-я группа — контрольная) визуальное КП ОКТ-изображение (рис. 1, а) в ко-поляризации (верхняя часть изображения) имеет слоистую структуру: слой с высоким уровнем сигнала соответствует слизистой и подслизистой оболочкам мочевого пузыря, нижележащий слой с более низким уровнем сигнала — мышечной оболочке. В кросс-поляризации (нижняя часть изображения) наблюдается высокий уровень ОКТ-сигнала, который отражает относительно упорядоченное, плотное расположение коллагеновых волокон в слизистой и подслизистой оболочках мочевого пузыря, что видно и по гистологическим препаратам, окрашенным по Ван-Гизону (рис. 1, д).

На ГВГ-изображениях коллагеновые волокна хорошо визуализируются, имеют характерную волнистую форму, толщину порядка 2–3 мкм. В целом можно говорить о наличии выделенного направления в их расположении (рис. 1, и), в то время как глубже, в подслизистой основе, преобладают пучки волокон толщиной 12–17 мкм, извитая структура которых не позволяет говорить о наличии выделенного направления (рис. 1, н).

На обзорных АСМ-изображениях визуализированы коллагеновые волокна и их пучки, местами обнаженные, местами покрытые аморфным (бесструктурным) материалом. Внутри коллагеновых волокон четко просматриваются плотно уложенные короткие коллагеновые фибриллы с параллельной укладкой (рис. 1, с). Коллагеновые фибриллы характеризуются однородной толщиной и хорошо различимым D-периодом, как видно из фазовых АСМ-изображений, полученных с высоким разрешением (рис. 1, х).

2. При выраженном воспалении (2-я группа) визуальное на КП ОКТ-изображении в ко-поляризации (рис. 1, б, верхняя часть изображения) уровень ОКТ-сигнала ниже по сравнению с уровнем сигнала при слабо выраженном воспалении за счет наличия в слизистой оболочке отека и инфильтрации ткани воспалительными клетками (лимфоцитами) (рис. 1, е). Затухание сигнала происходит примерно на одной глубине вдоль всего изображения. В кросс-поляризации (рис. 1, б, нижняя часть изображения) уровень сигнала существенно ниже, что указывает на снижение поляризационных свойств внеклеточного матрикса за счет истончения коллагеновых волокон слизистой оболочки и их значительного мукоидного набухания в подслизистой основе, что подтверждается методами высокоразрешающей микроскопии (ГВГ и АСМ).

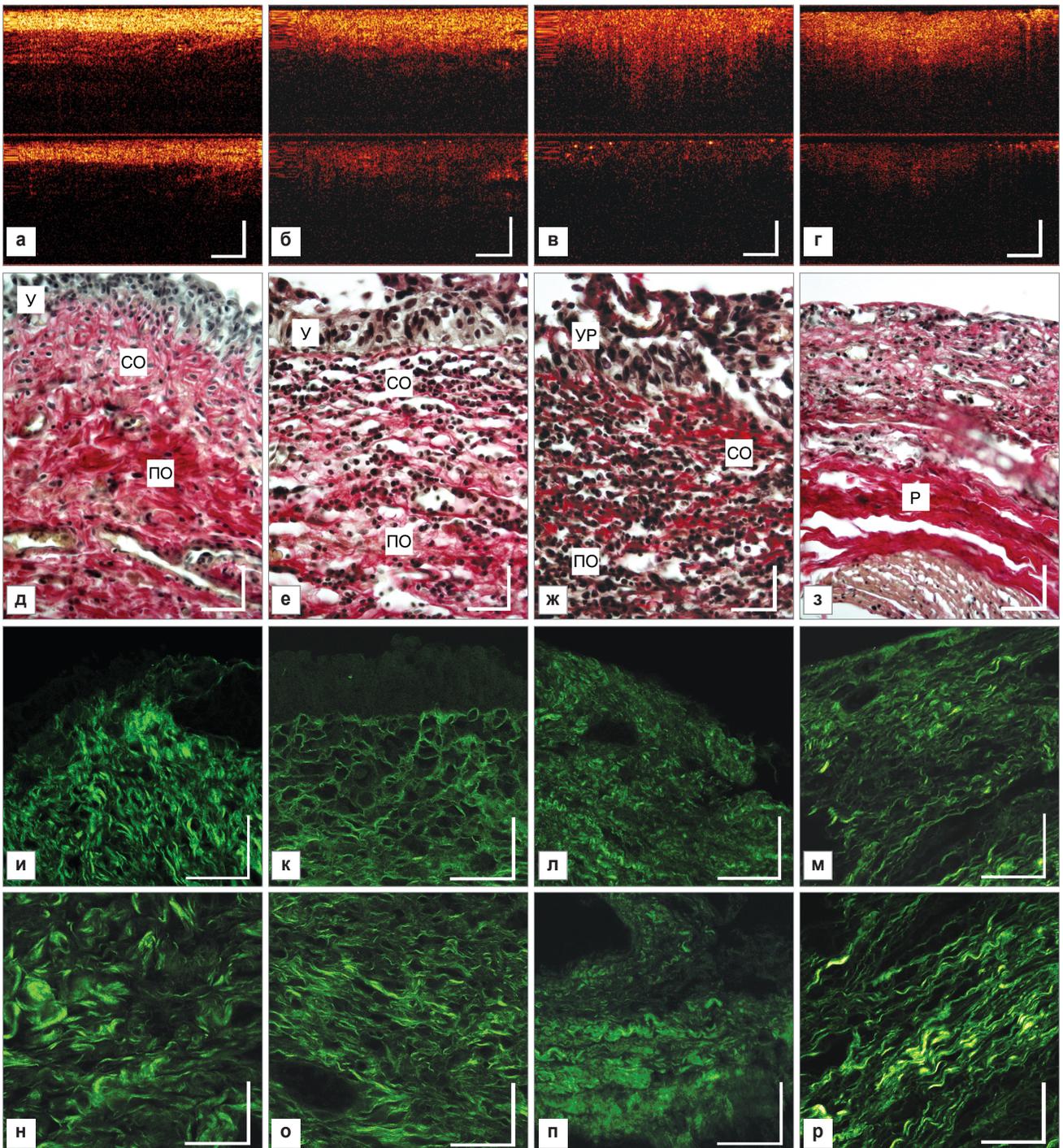
Сигнал ГВГ от коллагеновых волокон имеет меньшую интенсивность (рис. 1, к, о) по сравнению с контрольной группой (см. рис. 1, и, н). В слизистой оболочке волокон коллагена истончены (средняя толщина 1–1,5 мкм), имеют нечеткие границы, что указывает на нарушение их структуры. Обращает внимание неравномерность распределения волокон по всему объему ткани. Волокна располагаются рыхло, что не позволяет говорить о наличии выделенного направления в их ориентации (см. рис. 1, к). В подслизистой основе

Слабо выраженное  
воспаление стенки  
мочевого пузыря  
(1-я группа)

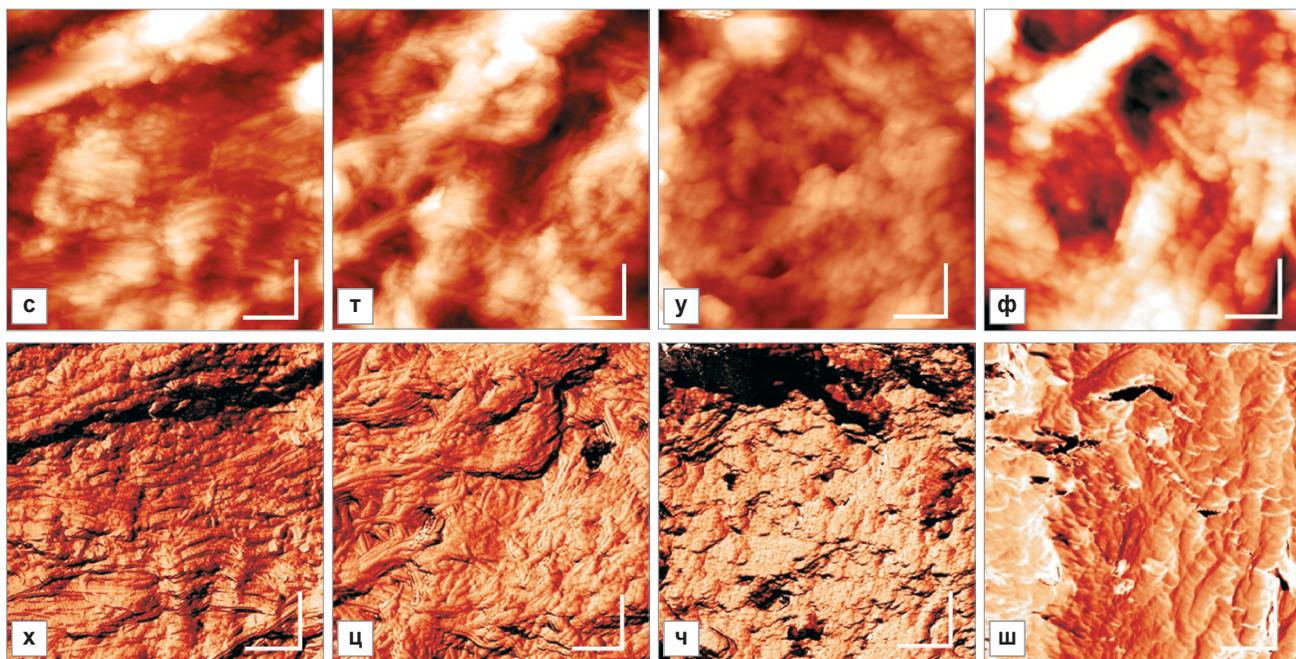
Выраженное воспаление  
стенки мочевого пузыря  
(2-я группа)

Низкодифференцированный  
уротелиальный инвазивный  
рак мочевого пузыря  
(3-я группа)

Рецидив рака мочевого  
пузыря в области  
послеоперационного рубца  
(4-я группа)



**Рис. 1.** Визуализация коллагена при заболеваниях мочевого пузыря с применением разных методов: КП ОКТ-изображения стенки мочевого пузыря (первый ряд); соответствующие гистологические препараты, окраска по Ван-Гизону (второй ряд); ГВГ-изображения слизистой оболочки (третий ряд); ГВГ-изображения подслизистой основы (четвертый ряд); АСМ-изображения слизистой оболочки топографические (пятый ряд); АСМ-изображения слизистой оболочки фазовые (шестой ряд). На КП ОКТ-изображениях: верхняя часть — изображения в ко-поляризации, нижняя часть — в кросс-поляризации. Вертикальный и горизонтальный бар: на КП ОКТ-изображениях — 500 мкм; на ГВГ- и гистологических изображениях — 50 мкм; на АСМ-изображениях — 1 мкм. Здесь: У — уротелий, СО — слизистая оболочка, ПО — подслизистая основа, УР — уротелиальный рак, Р — рубцовая ткань; обозначения *a–ш* см. в тексте



Продолжение рис. 1

коллагеновые волокна утолщаются вследствие мукоидного набухания и располагаются более плотно (см. рис. 1, о), приближаясь по характеристикам к образцам 1-й группы на данной глубине.

На АСМ-изображениях при выраженном воспалении упаковка коллагеновых волокон матрикса не меняется, в то время как упаковка коллагеновых фибрилл в волокнах изменена — наблюдается плотное переплетение хаотично ориентированных фибрилл, формирующее «сетку» (рис. 1, т, ц).

3. При низкодифференцированном инвазивном уротелиальном раке (3-я группа) КП ОКТ-изображение в ко-поляризации (рис. 1, в, верхняя часть изображения) — бесструктурное, уровень ОКТ-сигнала низкий. Обращает внимание сильно неравномерное затухание сигнала по поперечной координате, выраженная вертикальная направленность сигнала. Такой характер ОКТ-сигнала обусловлен инфильтративным ростом рака. По гистологическим препаратам, окрашенным по Ван-Гизону (рис. 1, ж), видно, что основная масса опухолевых клеток расположена в слизистой оболочке, и это сильно нарушает структуру соединительной ткани. Скопления опухолевых клеток наблюдаются и в подслизистой основе, но здесь преобладает воспалительная инфильтрация. В кросс-поляризации (рис. 1, в, нижняя часть изображения) сигнал крайне слабый или полностью отсутствует. Эти признаки КП ОКТ-изображений инвазивного рака мочевого пузыря описаны нашей группой и ранее [9].

На ГВГ-изображениях видно, что в зависимости от расстояния от поверхности ткани коллагеновые волокна находятся в разном состоянии: на уровне слизистой оболочки эти волокна или преимущественно

разрушены, или в состоянии фрагментации (рис. 1, л), что вызвано инвазивным ростом уротелиального рака; в подслизистой основе наблюдается объединение коллагеновых волокон в пучки, местами сильно утолщенные, границы пучков и волокон размытые (нечеткие) (рис. 1, л) вследствие длительно текущего воспаления.

При анализе АСМ-изображений выявлена следующая закономерность: на обзорных изображениях, демонстрирующих микроструктуру внеклеточного матрикса, коллагеновые волокна не имеют четких контуров и сплошь покрыты неволоконистым аморфным материалом, который при большем разрешении (рис. 1, у, ч) представлен в виде «бусин» другого белка (белково-протеогликановых комплексов), целиком покрывающих коллагеновые фибриллы. Таким образом, по данным АСМ, инвазивный рак меняет соотношения между коллагеновыми волокнами и неволоконистыми элементами матрикса — доля коллагеновых волокон в матриксе уменьшается, что отчетливо коррелирует с низким уровнем кросс-рассеяния на КП ОКТ-изображении.

4. При рецидиве низкодифференцированного инвазивного уротелиального рака в области послеоперационного рубца (4-я группа) КП ОКТ-изображение в ко-поляризации (рис. 1, г, верхняя часть изображения) так же бесструктурно, как и в группе с инвазивным раком, однако уровень ОКТ-сигнала в целом выше за счет фиброза соединительной ткани (рис. 1, з). Затухание сигнала по поперечной координате в целом равномерное, сохраняется вертикальная направленность сигнала, хотя и в меньшей степени. В то же время изображение в кросс-поляризации в данном

случае не является классическим для инвазивного низкодифференцированного рака. Отсутствие ОКТ-сигнала на поверхности отражает наличие опухоли, не обладающей кросс-рассеянием. Ниже наблюдается неравномерный по поперечной координате ОКТ-сигнал разной интенсивности (рис. 1, *з*, нижняя часть изображения). Наличие участков с высоким и низким уровнем ОКТ-сигнала морфологически объясняется присутствием областей с плотно уложенными сохраненными коллагеновыми волокнами и пучками послеоперационного рубца и участков дезорганизованных волокон коллагена под влиянием катепсинов и протеиназ, выделяемых опухолевыми клетками в областях выраженной инфильтрации рубцовой ткани этими клетками (см. рис. 1, *з*).

Неравномерно затухающий по глубине ОКТ-сигнал в кросс-поляризации при раке в области рубца подтвержден различием сигналов ГВГ на разных глубинах. У поверхности, в зоне выраженной инфильтрации рубцовой ткани раковыми клетками (рис. 1, *м*) наблюдается дезорганизация коллагена, границы пучков и волокон размытые (нечеткие). Глубже, на уровне подслизистой основы, имеются участки, где структура рубцовой ткани сохранена: преобладают пучки коллагеновых волокон с четкими границами, с наличием выделенного направления в расположении, интенсивность сигнала ГВГ от волокон высокая (рис. 1, *р*).

На соответствующих обзорных АСМ-изображениях видны пучки коллагеновых волокон, частично обнаженные, частично покрытые слоем аморфного материала. При визуализации в режиме топографии (рис. 1, *ф*) и фазового контраста (рис. 1, *ш*) просматривается плотная упаковка фибрилл и их характерная поперечная исчерченность (D-период), отражающая процессы формирования фиброзной (рубцовой) ткани в области послеоперационной раны.

Таким образом, визуальная сравнительная оценка КП ОКТ-изображений и изображений высокоразрешающей микроскопии обнаруживает высокую степень соответствия данных и позволяет обосновать характер ОКТ-сигнала на КП ОКТ-изображениях мочевого пузыря при описанных патологиях с учетом изменений, происходящих с коллагеновыми волокнами на разных уровнях организации. Однако проведение визуальной оценки изображений трудоемко, требует детальных знаний и потому малодоступно для применения в реальной клинической практике. По этим причинам более целесообразной представляется количественная оценка проанализированных видов изображений.

#### **Количественная оценка КП ОКТ-изображений.**

В данном исследовании проведена количественная оценка кросс-рассеяния путем построения по КП ОКТ-изображениям карт фактора деполяризации. Цветовая кодировка значений фактора деполяризации от 0 до 0,3 облегчает визуальную оценку кросс-рассеивающих свойств соединительнотканной стромы мочевого пузыря по исходным (яркостным) КП ОКТ-изображениям, требующую попиксельного со-

отнесения уровней сигналов в кросс- и ко-поляризациях. Выделение на картах фактора деполяризации областей интереса на разных глубинах от поверхности ткани с вычислением ИФД делает оценку КП ОКТ-изображений объективной.

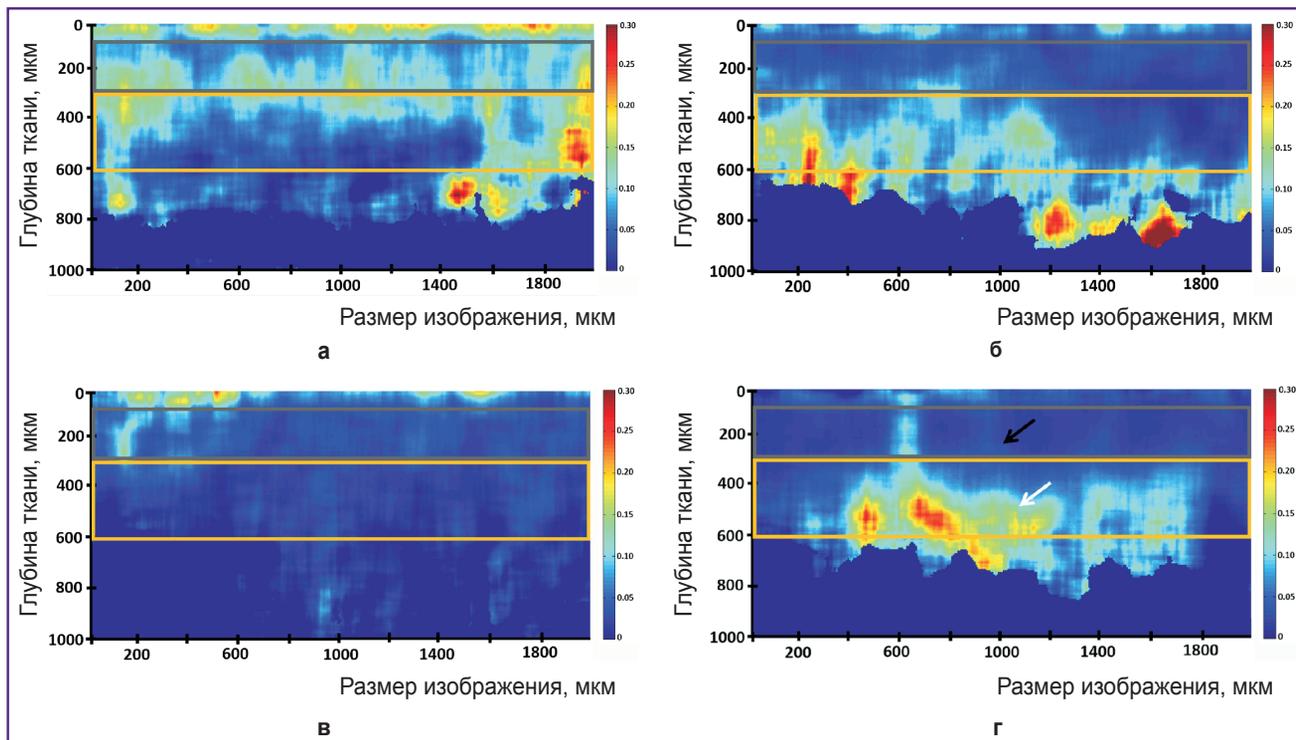
Характерные для исследуемых четырех групп патологий мочевого пузыря карты фактора деполяризации представлены на рис. 2, интегральные (усредненные) по выделенным областям интереса значения фактора деполяризации (ИФД) — на рис. 3. Область, выделенная на рис. 2 прямоугольником серого цвета, морфологически соответствует слизистой оболочке мочевого пузыря; область, выделенная прямоугольником оранжевого цвета, — подслизистой основе.

В группе слабо выраженного воспаления (1-я группа) значения фактора деполяризации на уровне слизистой оболочки статистически значимо выше, чем при остальных патологиях (2–4-я группы) (рис. 2, *а–г*, серый прямоугольник; рис. 3, серые столбики), что соответствует полученной при ГВГ, АСМ и гистологическом исследовании информации о сохранности структуры большей части коллагеновых волокон при данном состоянии (см. рис. 1, *и, н*) на данной глубине.

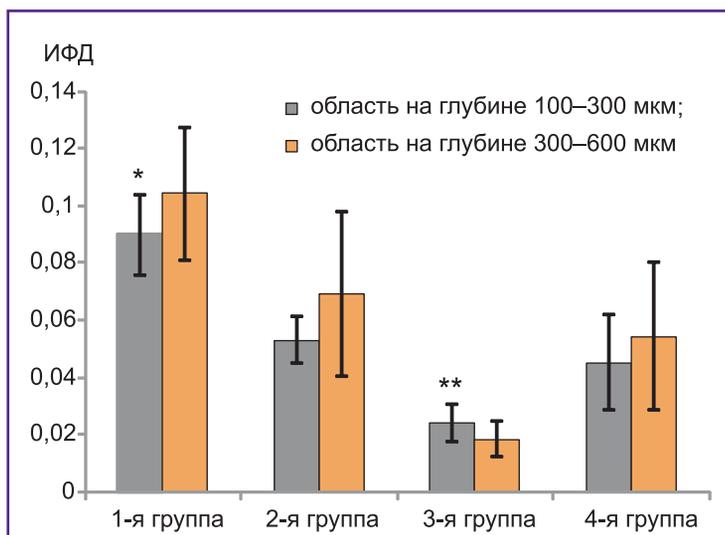
При сравнении значений фактора деполяризации на картах и вычисленных значений в области на глубине 300–600 мкм только в группе уротелиального инвазивного рака (3-я группа) наблюдается достоверное снижение этого параметра. В остальных группах (1, 2 и 4-я) значения ИФД остаются высокими, статистически значимого отличия не достигается (рис. 2, *а–г*, оранжевый прямоугольник; рис. 3, оранжевые столбики), что также согласуется с результатами параллельно проведенных исследований высокоразрешающими методами. Только при инвазивном уротелиальном раке, развивающемся на фоне выраженного воспаления, коллагеновые волокна и фибриллы на данной глубине в большей степени дезорганизованы и фрагментированы. При слабо выраженном и выраженном воспалении, а также рецидиве уротелиального рака в области послеоперационного рубца на уровне подслизистой основы коллагеновые волокна находятся преимущественно в состоянии мукоидного набухания, утолщены и расположены плотно, что обеспечивает эффективное кросс-рассеяние.

Важно, что результаты вычисления ИФД демонстрируют статистически значимое различие значений между группами с выраженным воспалением и уротелиальным раком (см. рис. 3,  $p < 0,05$ ), что подтверждает диагностическую эффективность КП ОКТ в этих ситуациях.

Таким образом, статистически значимое снижение значений ИФД, вычисленных по КП ОКТ-изображениям рака мочевого пузыря на фоне хронического воспаления и рецидива рака в области послеоперационного рубца, подтверждает существенную дезорганизацию волокон коллагена (отвечающего за поляризационные свойства ткани) при инвазии карциномы в соединительную ткань. Следовательно,



**Рис. 2.** Карты фактора деполяризации при слабо выраженном (а) и выраженном (б) воспалении стенки мочевого пузыря; низкодифференцированном инвазивном уротелиальном раке (в) и рецидиве уротелиального рака в области послеоперационного рубца (г); черная стрелка — область опухоли, белая стрелка — область рубца; шкалы даны в микрометрах; радужные шкалы — цветовая кодировка значений интегрального фактора деполяризации



**Рис. 3.** Гистограмма распределения значений интегрального фактора деполяризации (ИФД) при слабо выраженном (1-я группа) и выраженном (2-я группа) воспалении стенки мочевого пузыря, при низкодифференцированном инвазивном уротелиальном раке (3-я группа) и рецидиве уротелиального рака в области послеоперационного рубца (4-я группа); \* — статистически значимое различие между контрольной группой и всеми группами патологий,  $p < 0,05$  (критерий Манна–Уитни); \*\* — между уротелиальным раком и другими патологиями,  $p < 0,05$  (критерий Манна–Уитни)

ИФД может с высокой достоверностью обнаруживать уротелиальный рак на фоне выраженного воспаления, а также рецидив рака в области послеоперационного рубца.

**Количественная оценка ГВГ-изображений.** Для количественной оценки состояния коллагена на ГВГ-изображениях предложены два параметра: среднее значение интенсивности сигнала и согласованность его распределения. Результаты по четырем группам

патологий мочевого пузыря представлены на рис. 4. Установлено, что на разной глубине от поверхности мочевого пузыря данные параметры имеют различные характерные значения, что говорит о гетерогенности исследуемой ткани.

Следует обратить внимание на тот факт, что согласованность распределения сигнала ГВГ в целом в мочевом пузыре низкая — порядка 0,125, что свидетельствует об отсутствии выделенного направле-

ния расположения коллагеновых волокон внеклеточного матрикса стенки мочевого пузыря. Наивысшие значения средней интенсивности и согласованности сигнала ГВГ можно наблюдать в случае слабо выраженного воспаления стенки мочевого пузыря непосредственно под уротелием (рис. 4, серые столбики). Выявлено статистически значимое различие значений этих двух показателей в контрольной группе по сравнению с группами выраженного воспаления, низкодифференцированного рака и рака в области послеоперационного рубца (см. рис. 4,  $p < 0,05$ ). Однако на большей глубине (300–600 мкм) в контрольной группе наблюдается значимое снижение вычисленных параметров сигнала ГВГ, что говорит о структурной неоднородности и разнонаправленности в расположении волокон коллагена на уровне подслизистой основы. Это связано, по-видимому, с вплетением на этой глубине в соединительную ткань мышечных волокон.

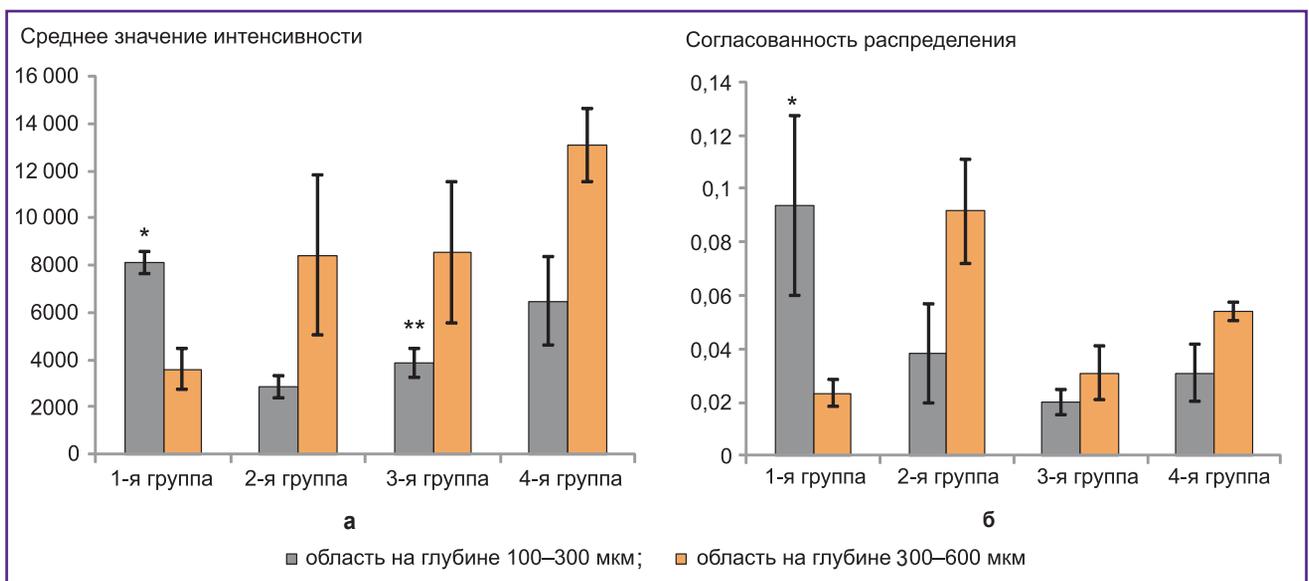
Наиболее низкие значения двух вычисленных параметров сигнала ГВГ на глубине 100–300 мкм от поверхности ткани установлены при выраженном воспалении и низкодифференцированном уротелиальном раке, что говорит об отсутствии преобладающего направления волокон коллагена в подповерхностной зоне при этих состояниях. Важным результатом работы является факт выявления статистически значимого различия ( $p < 0,05$ ) среднего значения интенсивности сигнала ГВГ между группами выраженного воспаления и уротелиального рака (рис. 4, а). При этом найти

закономерности изменения с глубиной среднего значения интенсивности сигнала ГВГ при изученных состояниях не удается.

Значения согласованности распределения сигнала ГВГ на уровне слизистой оболочки повторяли закономерности, обнаруженные для ИФД, т.е. были максимальными при слабо выраженном воспалении и минимальными в случае инвазивного рака (рис. 4, б). На глубине 300–600 мкм найти закономерности изменения значения согласованности сигнала ГВГ, как и его интенсивности, при изученных состояниях не удается.

Таким образом, предложенные параметры — среднее значение интенсивности сигнала ГВГ и согласованность его распределения — позволили оценить пространственное расположение и организацию волокон коллагена стенки мочевого пузыря на разных глубинах и при разных патологических процессах.

Для верификации диагностических данных, полученных с помощью КП ОКТ, проведен корреляционный анализ с параметрами сигнала ГВГ в выбранных областях интереса. Получена высокая статистически значимая положительная корреляция между измерениями ИФД и параметром согласованности распределения сигнала ГВГ от коллагена на уровне слизистой оболочки ( $r = 0,867$ ;  $p < 0,001$ ; корреляция Спирмена). Это указывает на высокую степень соответствия между способностью к кросс-рассеянию и согласованностью укладки волокон коллагена, что определяет структурную дезорганизацию волокнистых структур на тканевом уровне в подповерхностной области мо-



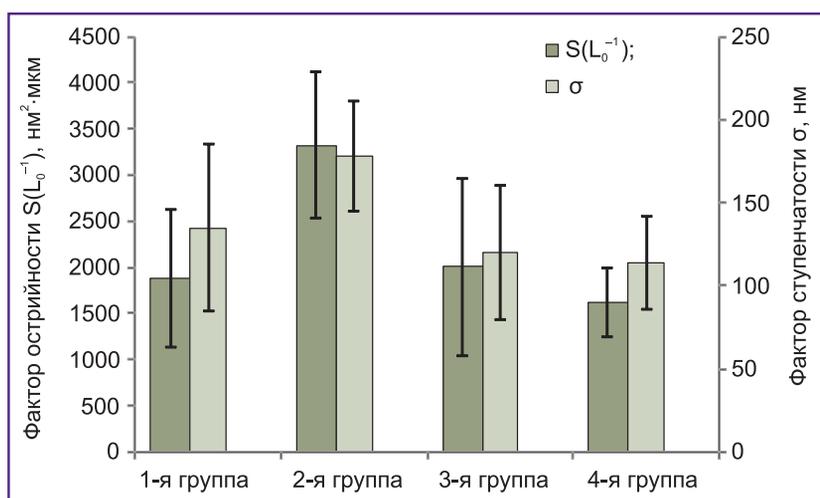
**Рис. 4.** Гистограммы среднего значения интенсивности (а) и согласованности распределения (б) сигнала генерации второй гармоники при слабо выраженном (1-я группа) и выраженном (2-я группа) воспалении стенки мочевого пузыря; низкодифференцированном инвазивном уротелиальном раке (3-я группа) и рецидиве уротелиального рака в области послеоперационного рубца (4-я группа); \* — статистически значимое различие значений параметров сигнала генерации второй гармоники в слизистой оболочке, вычисленных на той же глубине, в 1-й группе по сравнению с другими патологиями,  $p < 0,05$  (критерий Манна–Уитни); \*\* — значений средней интенсивности сигнала генерации второй гармоники в слизистой оболочке в 2-й и 3-й группах,  $p < 0,05$  (критерий Манна–Уитни)

чевого пузыря. Однако наблюдается существенное снижение степени корреляция между указанными параметрами на уровне подслизистой основы ( $r=0,127$ ;  $p=0,648$ ; корреляция Спирмена).

Между значениями ИФД и параметром интенсивности сигнала ГВГ от коллагена на уровне слизистой оболочки получена низкая и статистически незначимая корреляция ( $r=0,464$ ;  $p=0,081$ ; корреляция Спирмена). На уровне подслизистой основы корреляция между указанными параметрами полностью отсутствовала ( $r=-0,116$ ;  $p=0,682$ ; корреляция Спирмена). Следовательно, корреляционный анализ количественных параметров обнаруживает только безусловную их связь, в то время как визуальная оценка фиксирует менее очевидные взаимоотношения.

**ФШС-параметризация АСМ-изображений.** Были получены ФШС-параметры для АСМ-изображений внеклеточного матрикса ткани мочевого пузыря при всех изученных состояниях. В случае слабо выраженного и выраженного воспаления наблюдали существенный разброс ФШС-параметров (1-я и 2-я группы на рис. 5), что свидетельствует о крайней неоднородности внеклеточного матрикса в этих случаях. В случае уротелиального рака мочевого пузыря ФШС-параметры либо не изменялись, либо слегка уменьшались по сравнению с контрольной группой, при этом разброс их значений не был существенным (3-я и 4-я группы на рис. 5). Очевидно, что наблюдаемая тенденция для опухолевого процесса отражает сглаживание рельефа поверхности, связанное с увеличением содержания неволоконистых элементов матрикса, покрывающих разрушенные коллагеновые структуры. Корреляции изученных ФШС-параметров с показателями КП ОКТ и ГВГ не обнаружено.

**Обсуждение.** Проведенное исследование демон-



**Рис. 5.** Параметры фликкер-шумовой спектроскопии поверхности для АСМ-изображений ткани мочевого пузыря со слабо выраженным воспалением (1-я группа), выраженным воспалением (2-я группа), с низкодифференцированным уротелиальным раком (3-я группа) и рецидивом рака в области послеоперационного рубца (4-я группа)

стрирует потенциал КП ОКТ в качестве прижизненного метода для оценки состояния коллагеновых волокон, который может быть использован для надежной диагностики рака мочевого пузыря, развивающегося на фоне выраженного воспаления, и рецидива рака в области послеоперационного рубца.

Использованные три вида высокоразрешающих технологий обеспечивают визуализацию и комплексную оценку коллагеновых волокон — преобладающего компонента соединительной ткани — и отражают изменения их состояния в стенке мочевого пузыря при изученных патологиях. Примененные подходы позволили оценить коллагеновые волокна с точки зрения их целостности/дезорганизации, ориентации, формы и плотности расположения, охарактеризовать состояние коллагена на нескольких уровнях его структурной организации (от тканевого до фибриллярного) и сделать заключение о том, что ОКТ-сигнал в кросс-поляризации чувствителен к степени изменения состояния коллагеновых волокон. Показано, что визуально оптические структуры на КП ОКТ-изображениях хорошо коррелируют с результатами традиционной гистопатологии, а также с оценкой коллагена методами ГВГ и АСМ.

Количественная обработка изображений, полученных методами КП ОКТ и высокоразрешающей микроскопии (нелинейной микроскопии в режиме ГВГ и АСМ), позволила объективно оценить изменения пространственной организации внеклеточного матрикса на микроструктурном уровне при разной степени выраженности воспалительного процесса и инвазивном раке мочевого пузыря.

Результаты вычисления ИФД (оценивающего состояние коллагеновых волокон посредством их способности к кросс-рассеянию) продемонстрировали возможность автоматической диагностики патологии мочевого пузыря. Достоверное снижение ИФД при инвазивном раке мочевого пузыря, развившемся на фоне хронического воспаления, и при рецидиве рака в области послеоперационного рубца, подтверждает существенную дезорганизацию волокон коллагена при инвазии рака, тем самым с высокой значимостью обнаруживает уротелиальный рак на фоне выраженного воспаления, а также рецидив рака в области послеоперационного рубца ( $p<0,05$ ).

Изучение двух параметров сигнала ГВГ — среднего значения интенсивности и согласованности его распределения на уровне слизистой и подслизистой оболочек стенки мочевого пузыря — показало, что наиболее низкие их значения непосредственно под уротелием (слизистой оболочкой) обнаруживаются в зоне

выраженного воспаления и низкодифференцированного уротелиального рака, что говорит об отсутствии преобладающего направления волокон коллагена в подповерхностной зоне при этих состояниях. Важен факт статистически значимого различия ( $p < 0,05$ ) среднего значения интенсивности сигнала ГВГ в группах выраженного воспаления и уротелиального рака. Значения согласованности распределения сигнала ГВГ на уровне слизистой оболочки повторяли закономерности, обнаруженные для ИФД, т.е. были максимальными при слабо выраженном воспалении и минимальными в случае инвазивного рака.

Расчет ИФД дает важную информацию о степени дезорганизации коллагена стромы при инвазии, что коррелирует с данными нелинейной микроскопии в режиме ГВГ. Для ИФД и согласованности распределения ГВГ-сигнала коэффициент корреляции Спирмена составил  $r = 0,867$ ;  $p < 0,001$ .

Характер изменений, происходящих в мочевом пузыре при воспалении и развивающемся на его фоне раке, подтвержден методом АСМ с использованием количественной оценки ФШС-параметров. Участие всех уровней организации коллагена неизменно оказывает влияние на рельеф поверхности образца. Значительный разброс ФШС-показателей при воспалении (вне зависимости от его выраженности) свидетельствует о крайней неоднородности внеклеточного матрикса в этих случаях. В случае опухолей мочевого пузыря ФШС-параметры мало менялись по сравнению с контрольной группой, при этом разброс их значений не был существенным. Очевидно, что наблюдаемая тенденция для опухолевого процесса отражает сглаживание рельефа поверхности, связанное с увеличением содержания неволоконистых элементов матрикса (белково-протеогликановых комплексов), которые покрывают коллагеновые структуры.

Проведенная комплексная численная оценка изображений КП ОКТ и высокоразрешающей микроскопии (ГВГ и АСМ) при воспалении и карциноме мочевого пузыря позволяет проследить дезорганизацию коллагена на нескольких уровнях его организации: на тканевом (снижение обратного кросс-поляризационного рассеяния, которое численно характеризуется ИФД), волоконном (выраженное мукоидное набухание и фрагментация на ГВГ-изображениях, которые численно характеризуются средним значением интенсивности и согласованностью распределения сигнала ГВГ) и фибриллярном (нарушение укладки фибрилл, преобладание сетчатого переплетения фибрилл, наличие аморфного вещества на АСМ-изображениях, которые численно характеризуются ФШС-параметрами).

В отличие от ОКТ, использование в клинической эндоскопической практике нелинейной микроскопии в режиме ГВГ и АСМ до сих пор остается недоступным. В данной работе методы высокоразрешающей микроскопии рассматривались как средства проверки изменений микроструктуры внеклеточного матрикса

мочевого пузыря при воспалении и раке, улучшающие понимание наблюдаемых особенностей на КП ОКТ-изображениях.

**Заключение.** Сравнение КП ОКТ-изображений с данными методов высокого разрешения (нелинейной микроскопии в режиме генерации второй гармоники и атомно-силовой микроскопии) показало, что КП ОКТ может стать мощным минимально инвазивным инструментом, работающим в режиме реального времени, для диагностики рака мочевого пузыря на фоне выраженного воспаления и в области послеоперационного рубца. Представленные результаты могут стимулировать дальнейшее развитие КП ОКТ-техники и способствовать ее активному внедрению в клиническую практику.

**Финансирование исследования.** Работа была поддержана Российским научным фондом, соглашение №14-15-00538 (ЕВГ, ЕБК, ВВД, СЛК, ЛБТ, МЮК, ГВБ, НДГ).

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

#### Литература/References

1. Leggett C.L., Gorospe E.C. Application of confocal laser endomicroscopy in the diagnosis and management of Barrett's esophagus. *Ann Gastroenterol* 2014; 27(3): 193–199.
2. Wessels R., De Bruin D.M., Faber D.J., Van Leeuwen T.G., Van Beurden M., Ruers T.J. Optical biopsy of epithelial cancers by optical coherence tomography (OCT). *Lasers Med Sci* 2014; 29(3): 1297–1305, <https://doi.org/10.1007/s10103-013-1291-8>.
3. Zhou C., Tsai T.H., Lee H.C., Kirtane T., Figueiredo M., Tao Y.K., Ahsen O.O., Adler D.C., Schmitt J.M., Huang Q., Fujimoto J.G., Mashimo H. Characterization of buried glands before and after radiofrequency ablation by using 3-dimensional optical coherence tomography (with videos). *Gastrointest Endosc* 2012; 76(1): 32–40, <https://doi.org/10.1016/j.gie.2012.02.003>.
4. Pande P., Shrestha S., Park J., Gimenez-Conti I., Brandon J., Applegate B.E., Jo J.A. Automated analysis of multimodal fluorescence lifetime imaging and optical coherence tomography data for the diagnosis of oral cancer in the hamster cheek pouch model. *Biomed Opt Express* 2016; 7(5): 2000–2015, <https://doi.org/10.1364/boe.7.002000>.
5. Ren H., Yuan Z., Waltzer W., Shroyer K., Pan Y. Enhancing detection of bladder carcinoma in situ by 3-dimensional optical coherence tomography. *J Urol* 2010; 184(4): 1499–1506, <https://doi.org/10.1016/j.juro.2010.05.087>.
6. Hale N.E., Deem S. Advances in cystoscopic surveillance of superficial bladder cancer: detection of the invisible tumor. *Medical Instrumentation* 2013; 1(1): 6, <https://doi.org/10.7243/2052-6962-1-6>.
7. Burns J.A., Kim K.H., deBoer J.F., Anderson R.R., Zeitels S.M. Polarization-sensitive optical coherence tomography imaging of benign and malignant laryngeal lesions: an in vivo study. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2011; 145(1): 91–99, <https://doi.org/10.1177/0194599811403078>.
8. Villiger M., Lorensen D., McLaughlin R.A., Quirk B.C., Kirk R.W., Bouma B.E., Sampson D.D. Deep tissue volume imaging of birefringence through fibre-optic needle probes

for the delineation of breast tumour. *Sci Rep* 2016; 6: 28771, <https://doi.org/10.1038/srep28771>.

9. 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>.

10. Bredfeldt J.S., Liu Y., Pehlke C.A., Conklin M.W., Szulczewski J.M., Inman D.R., Keely P.J., Nowak R.D., Mackie T.R., Eliceiri K.W. Computational segmentation of collagen fibers from second-harmonic generation images of breast cancer. *J Biomed Opt* 2014; 19(1): 016007, <https://doi.org/10.1117/1.jbo.19.1.016007>.

11. König K., Raphael A.P., Lin L., Grice J.E., Soyer H.P., Breunig H.G., Roberts M.S., Prow T.W. Applications of multiphoton tomographs and femtosecond laser nanoprocessing microscopes in drug delivery research. *Adv Drug Deliv Rev* 2011; 63(4–5): 388–404, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.03.002>.

12. Cicchi R., Kapsokalyvas D., Troiano M., Campolmi P., Morini C., Massi D., Cannarozzo G., Lotti T., Pavone F.S. In vivo non-invasive monitoring of collagen remodelling by two-photon microscopy after micro-ablative fractional laser resurfacing. *J Biophotonics* 2014; 7(11–12): 914–925, <https://doi.org/10.1002/jbio.201300124>.

13. Cicchi R., Matthäus C., Meyer T., Lattermann A., Dietzek B., Brehm B.R., Popp J., Pavone F.S. Characterization of collagen and cholesterol deposition in atherosclerotic arterial tissue using non-linear microscopy. *J Biophotonics* 2014; 7(1–2): 135–143, <https://doi.org/10.1002/jbio.201300055>.

14. Campagnola P. Second harmonic generation imaging microscopy: applications to diseases diagnostics. *Anal Chem* 2011; 83(9): 3224–3231, <https://doi.org/10.1021/ac1032325>.

15. Seidenari S., Arginelli F., Dunsby C., French P., König K., Magnoni C., Manfredini M., Talbot C., Ponti G. Multiphoton laser tomography and fluorescence lifetime imaging of basal cell carcinoma: morphologic features for non-invasive diagnostics. *Exp Dermatol* 2012; 21(11): 831–836, <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2012.01554.x>.

16. Stolz M., Gottardi R., Raiteri R., Miot S., Martin I., Imer R., Stauer U., Raducanu A., Duggelin M., Baschong W., Daniels A.U., Friederich N.F., Aszodi A., Aebi U. Early detection of aging cartilage and osteoarthritis in mice and patient samples using atomic force microscopy. *Nat Nanotechnol* 2009; 4(3): 186–192, <https://doi.org/10.1038/nnano.2008.410>.

17. Lekka M., Laidler P., Gil D., Lekki J., Stachura Z., Hryniewicz A.Z. Elasticity of normal and cancerous human bladder cells studied by scanning force microscopy. *Eur*

*Biophys J* 1999; 28(4): 312–316, <https://doi.org/10.1007/s002490050213>.

18. Timashev P.S., Kotova S.L., Belkova G.V., Gubar'kova E.V., Timofeeva L.B., Gladkova N.D., Solovieva A.B. Atomic force microscopy study of atherosclerosis progression in arterial walls. *Microsc Microanal* 2016; 22(2): 311–325, <https://doi.org/10.1017/S1431927616000039>.

19. Gelikonov V., Gelikonov G., Shilyagin P. Linear-wavenumber spectrometer for high-speed spectral-domain optical coherence tomography. *Opt Spectrosc* 2009; 106: 459–465, <https://doi.org/10.1134/s0030400x09030242>.

20. 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* 2016; 9(10): 1009–1020, <https://doi.org/10.1002/jbio.201500223>.

21. Moiseev A.A., Gelikonov G.V., Terpelov D.A., Shilyagin P.A., Gelikonov V.M. Noniterative method of reconstruction optical coherence tomography images with improved lateral resolution in semitransparent media. *Laser Physics Letters* 2013; 10(12): 125601, <https://doi.org/10.1088/1612-2011/10/12/125601>.

22. 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>.

23. Gubarkova E.V., Kirillin M.Yu., Sergeeva E.A., Kiseleva E.B., Snopova L.B., Prodanets N.N., Sharabrin E.G., Shakhov E.B., Nemirova S.V., Gladkova N.D. Cross-polarization optical coherence tomography in evaluation of atherosclerotic plaque structure. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2013; 5(4): 45–55.

24. Rezakhaniha R., Agianniotis A., Schrauwen J.T.C., Griffa A., Sage D., Bouten C.V.C., van de Vosse F.N., Unser M., Stergiopoulos N. Experimental investigation of collagen waviness and orientation in the arterial adventitia using confocal laser scanning microscopy. *Biomech Model Mechanobiol* 2012; 11: 461, <https://doi.org/10.1007/s10237-011-0325-z>.

25. Rasband W.S. ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA (1997–2008). *Image J Image Processing and Analysis in Java*. URL: <http://rsb.info.nih.gov/ij/>.

26. Mirsaidov U., Timashev S.F., Polyakov Y.S., Misurkin P.I., Musaev I., Polyakov S.V. Analytical method for parameterizing the random profile components of nanosurfaces imaged by atomic force microscopy. *Analyst* 2011; 136(3): 570–576, <https://doi.org/10.1039/c0an00498g>.