

МЕТОД НЕЛИНЕЙНОЙ МИКРОСКОПИИ В ИЗУЧЕНИИ СОСТОЯНИЯ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ ПРИ ТЯЖЕЛЫХ ОСЛОЖНЕНИЯХ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ ЖЕНСКОЙ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ

DOI: 10.17691/stm2017.9.2.02

УДК 577.15:612.467.1:618.17–006.6–06:615.849.1

Поступила 12.01.2017 г.



О.С. Стрельцова, д.м.н., профессор кафедры урологии им. Е.В. Шахова¹;
А.В. Масленникова, д.м.н., профессор кафедры онкологии, лучевой терапии, лучевой диагностики¹;
 профессор кафедры биофизики²;
К.Э. Юнусова, к.м.н., доцент кафедры патологической анатомии¹;
В.В. Дуденкова, младший научный сотрудник лаборатории изучения оптической структуры биотканей
 НИИ биомедицинских технологий¹; аспирант кафедры общей физики радиофизического факультета²;
Е.Б. Киселева, к.б.н., научный сотрудник лаборатории изучения оптической структуры биотканей
 НИИ биомедицинских технологий¹;
М.В. Кочуева, аспирант кафедры онкологии, лучевой терапии, лучевой диагностики¹;
Е.А. Тарарова, к.м.н., врач-онколог³;
Д.К. Маликов, врач-уролог⁴;
А.С. Воробьева, врач-уролог⁵;
В.Н. Крупин, д.м.н., профессор, зав. кафедрой урологии им. Е.В. Шахова¹

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

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

³Нижегородский областной клинический онкологический диспансер, Н. Новгород, 603126,
 ул. Родионова, 190;

⁴ООО «Визус-1», Н. Новгород, 603126, ул. Родионова, 198б;

⁵Нижегородская областная клиническая больница им. Н.А. Семашко, Н. Новгород, 603126,
 ул. Родионова, 190

Цель исследования — оценка возможностей изучения особенностей состояния внеклеточного матрикса мочевого пузыря после проведения лучевой терапии по поводу рака шейки матки и рака тела матки с помощью метода нелинейной микроскопии.

Материалы и методы. Исследованы две группы больных. 1-ю группу (n=75) составили пациентки, у которых после сочетанной лучевой терапии по поводу рака шейки матки или рака тела матки в сроки от одного года до одиннадцати лет развились побочные эффекты облучения тяжелой степени со стороны мочевого пузыря. Во 2-ю группу (n=80) вошли пациентки, страдающие хроническим циститом бактериальной этиологии с анамнезом заболевания более трех лет. Проведен сравнительный анализ цистоскопической картины слизистой оболочки и данных морфологического анализа биоптатов мочевого пузыря.

Впервые выполнено исследование состояния внеклеточного матрикса соединительной ткани мочевого пузыря после лучевой терапии методом нелинейной микроскопии в режимах генерации второй гармоники — для коллагена и двухфотонного возбуждения автофлуоресценции — для эластина. Для верификации полученных изображений исследованы параллельные гистологические срезы с окрашиванием гематоксилином и эозином, а также пикросириусом красным.

Результаты. Методом нелинейной микроскопии при лучевом и хроническом цистите выявлена сходная картина воспалительных изменений и фиброза ткани. Выраженность радиационных изменений мочевого пузыря напрямую зависела от времени после облучения, они были существенно более выраженными и грубыми по сравнению с хроническим циститом. Этот метод позволил выявить разницу в состоянии коллагеновых и эластических структур при лучевом поражении мочевого пузыря различной степени тяжести. При II степени тяжести лучевых осложнений структура коллагеновых волокон сохраняется на фоне их значительного уплотнения, а при III степени наблюдается их выраженная дезорганизация.

Заключение. Комбинация оптических методов (нелинейной микроскопии в сочетании со специфической окраской гистологических препаратов на коллаген) позволяет объективно оценить структурные изменения внеклеточного матрикса мочевого пузыря и определить степень их выраженности после воздействия ионизирующего излучения.

Для контактов: Стрельцова Ольга Сергеевна, e-mail: strelzova_uro@mail.ru

Полученные данные могут служить основой при разработке подходов к визуальной и количественной оценке результатов неинвазивных оптических методов мониторинга радиационно-индуцированного повреждения в мочевом пузыре, например поляризационными вариантами оптической когерентной томографии.

Ключевые слова: состояние внеклеточного матрикса; лучевое повреждение мочевого пузыря; нелинейная микроскопия; коллаген; эластин.

Как цитировать: Streltsova O.S., Maslennikova A.V., Yunusova K.E., Dudenkova V.V., Kiseleva E.B., Kochueva M.V., Tararova E.A., Malikov D.K., Vorobieva A.S., Krupin V.N. Nonlinear microscopy in studying extracellular matrix state of the urinary bladder in severe complications after radiation therapy of female pelvic tumors. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2017; 9(2): 19–28, <https://doi.org/10.17691/stm2017.9.2.02>

English

Nonlinear Microscopy in Studying Extracellular Matrix State of the Urinary Bladder in Severe Complications after Radiation Therapy of Female Pelvic Tumors

O.S. Streltsova, MD, DSc, Professor, Urology Department named after E.V. Shakhov¹;
A.V. Maslennikova, MD, DSc, Professor, Oncology, Radiotherapy, Radiodiagnosis Department¹;
 Professor, Biophysics Department²;
K.E. Yunusova, MD, PhD, Associated Professor, Department of Pathological Anatomy¹;
V.V. Dudenkova, Junior Researcher, Laboratory of Studying Optical Structure of Biotissues,
 Institute of Biomedical Technologies¹; PhD Student, Department of General Physics, Radiophysics Department²;
E.B. Kiseleva, PhD, Researcher, Laboratory of Studying Optical Structure of Biotissues, Institute
 of Biomedical Technologies¹;
M.V. Kochueva, PhD Student, Oncology, Radiotherapy, Radiodiagnosis Department¹;
E.A. Tararova, MD, PhD, Oncologist³;
D.K. Malikov, Urologist⁴;
A.S. Vorobieva, Urologist⁵;
V.N. Krupin, MD, DSc, Professor, Head of Urology Department named after E.V. Shakhov¹

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;

³Nizhny Novgorod Regional Oncologic Hospital, 190 Rodionova St., Nizhny Novgorod, 603126, Russian Federation;

⁴Visus-1, 198B Rodionova St., Nizhny Novgorod, 603126, Russian Federation;

⁵N.A. Semashko Nizhny Novgorod Regional Hospital, 190 Rodionova St., Nizhny Novgorod, 603126, Russian Federation

The study aimed to assess the characteristics of the urinary bladder extracellular matrix after radiotherapy for cervical cancer and hysterocarcinoma using nonlinear microscopy.

Materials and Methods. Two groups of patients were studied. The first group (n=75) involved female patients with severe complications after combined radiotherapy for cervix cancer or endometrial cancer. Adverse events of urinary bladder developed within the period from a year to eleven years. The second group (n=80) consisted of female patients suffering from chronic cystitis of bacterial etiology, their past history being over 3 years. We carried out a comparative analysis of the cystoscopic pattern of mucosa and the morphological analysis findings of urinary bladder biotates.

For the first time there was studied the extracellular matrix state of the bladder connective tissue after radiotherapy by nonlinear microscopy carried out in the modes: second harmonic generation and two-photon excited autofluorescence to examine the state of collagen and elastin, respectively. To verify the obtained images we studied parallel histological sections stained by hematoxylin and eosin and picrosirius red.

Results. Nonlinear microscopy in radiation and chronic cystitis revealed similar inflammatory changes and tissue fibrosis. The intensity of radiation changes of the urinary bladder tissues depended directly on time after radiation, they being more intense and gross compared to those in chronic cystitis. Nonlinear microscopy enabled to reveal the difference in collagen and elastin structures after urinary bladder radiation damage of various severity. The structure of collagen fibers in II severity degree of radiation was preserved, the fibers being more packed, while III degree was characterized by marked disarrangement of collagen fibers.

Conclusion. The combination of optical methods (nonlinear microscopy combined with specific staining of histological preparations)

enables to assess objectively structural changes of the urinary bladder extracellular matrix and determine the intensity of alterations after ionizing radiation.

The findings can serve as the basis to develop the approaches to visual and quantitative evaluation of the results of noninvasive optical techniques (e.g., polarization modifications of optical coherence tomography) to monitor radiation-induced damage in the urinary bladder.

Key words: extracellular matrix state; urinary bladder radiation damage; nonlinear microscopy; collagen; elastin.

Несмотря на развитие методов конформного облучения, изменения нормальных тканей, возникающие после проведения лучевой терапии по поводу злокачественных новообразований, до сих пор остаются нерешенной проблемой современной радиационной онкологии. К поздним относят лучевые повреждения, которые появляются в сроки более 100 дней после окончания облучения, часто спустя многие годы после лучевой терапии [1, 2]. Они имеют наиболее существенное клиническое значение, а их выраженность может варьировать от относительно незначительных функциональных нарушений до тяжелых осложнений, оказывающих влияние на качество жизни пациентов и в некоторых случаях угрожающих жизни [3, 4]. Мочевой пузырь и прямая кишка являются основными органами риска при лучевом лечении злокачественных новообразований органов малого таза. Развитию осложнений с их стороны способствуют более агрессивные схемы лучевой терапии и сочетание химиотерапии и облучения [5–8], а также использование нестандартных методов фракционирования [9–11]. Повышенный риск развития тяжелых радиационно-индуцированных повреждений имеют пациенты с хроническими воспалительными заболеваниями кишечника и мочевого пузыря [12, 13], сахарным диабетом [14], патологией сердечно-сосудистой системы [15], заболеваниями, передаваемыми половым путем, в анамнезе, в том числе с ВИЧ-инфекцией [16] и системными заболеваниями соединительной ткани [17].

Основным проявлением поздних радиационных изменений мочевого пузыря является формирование патологического постлучевого фиброза, которое обусловлено сосудистыми повреждениями, увеличением синтеза коллагена (преимущественно I и III типов) и последовательной активацией ключевых фиброгенных факторов роста и цитокинов, главным образом TGF β 1 и CTGF [18].

Исследование морфофункциональных изменений мочевого пузыря после воздействия ионизирующего излучения показало, что позднее прогрессирующее повреждение органа проявляется денудацией уротелиальных клеток, образованием язв и некрозов, телеангиэктазий в слизистой оболочке и подслизистой основе и развитием фиброза [19, 20]. Эти изменения, как правило, возникают в сроки от 2 до 3 лет после облучения и могут привести к постоянному снижению емкости мочевого пузыря, что в некоторых случаях требует тотальной цистэктомии [21].

В большинстве исследований информация о состоянии соединительнотканного матрикса мочевого пузыря после облучения получена с использованием стандартных методов гистологического исследования. Появление современных высокоразрешающих методов визуализации коллагена и эластина — нелинейной микроскопии в режимах регистрации сигнала генерации второй гармоники (ГВГ) и двухфотонно-возбуждаемой автофлуоресценции (ДВАФ) — дает возможность оценивать эти изменения на новом уровне, позволяет разрабатывать неинвазивные оптические инструменты мониторинга радиационно-индуцированных повреждений для использования в клинической практике.

Цель исследования — оценка возможностей изучения особенностей состояния внеклеточного матрикса мочевого пузыря после проведения лучевой терапии по поводу рака шейки матки и рака тела матки с помощью метода нелинейной микроскопии.

Материалы и методы. Для выявления особенностей повреждения внеклеточного матрикса мочевого пузыря после воздействия ионизирующего излучения и в результате хронического воспаления проведено исследование двух групп больных. 1-ю группу (n=75) составили пациентки, у которых после сочетанной лучевой терапии по поводу рака шейки матки или рака тела матки развились побочные эффекты облучения тяжелой степени со стороны мочевого пузыря. Данные осложнения развивались в сроки от 1 года до 11 лет после проведения облучения. Во вторую группу (n=80) вошли пациентки, страдающие хроническим циститом бактериальной этиологии с анамнезом заболевания более 3 лет.

Исследование проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией, принятой в июне 1964 г. (Хельсинки, Финляндия) и пересмотренной в октябре 2000 г. (Эдинбург, Шотландия), и одобрено Этическим комитетом НижГМА. От каждой пациентки получено информированное согласие.

Всем пациенткам было проведено цистоскопическое исследование. У 33 пациенток из 1-й группы и у 28 из 2-й выполнена биопсия мочевого пузыря. Образцы ткани мочевого пузыря для морфологического исследования брали из слизистой оболочки задней и боковых стенок мочевого пузыря, как визуально измененных, так и неизмененных. Сведения о пациентках, которым выполнялось морфологическое исследование слизистой оболочки мочевого пузыря, представлены в таблице.

Характеристика пациентов, которым выполнялось морфологическое исследование слизистой оболочки мочевого пузыря

Показатели	1-я группа (лучевой цистит)	2-я группа (хронический цистит)
Средний возраст, лет (Me [min–max])	54 (36–86)	51 (25–75)
Длительность анамнеза, лет	1–11	Более 3
Рак шейки матки/тела матки, случаев	27/6	—
Стадия онкологического заболевания (I/II/III)	1/24/8	—
Сочетанная лучевая терапия/Из них расщепленный курс, случаев	19/4	—
Комбинированное лечение (операция + послеоперационная лучевая терапия), случаев	14	—
Количество больных с II/III/IV степенью тяжести лучевого цистита	15/14/4	—
Количество выполненных биопсий/Количество образцов для исследования методом нелинейной микроскопии/Количество изображений, полученных методом нелинейной микроскопии	33/9/86	28/4/29

В качестве контрольных использовались образцы неизмененного мочевого пузыря (секционный материал, 3 образца).

Нелинейную микроскопию и гистологическое исследование выполняли по следующей методике. Образцы ткани мочевого пузыря для обоих исследований фиксировали в течение 24 ч в 10% растворе нейтрального формалина. Затем проводили заливку образцов в парафин (среда Histomix-extra; «БиоВитрум», Россия) с последующей монтировкой парафиновых блоков. На ротационном микротоме Leica 450 RM (Leica Microsystems, Германия) с полученных блоков последовательно изготавливали срезы толщиной 10 и 0,1 мкм. Образцы толщиной 10 мкм депарафинировали и исследовали методом нелинейной микроскопии без дополнительного окрашивания. Для верификации полученных изображений срезы толщиной 0,1 мкм, приготовленные с тех же блоков, окрашивали гематоксилином и эозином, а также пикросириусом красным.

Нелинейную микроскопию проводили на инвертированном лазерном сканирующем микроскопе LSM Axiovert 510 Meta (Carl Zeiss, Германия). В качестве источника возбуждающего излучения использовали короткоимпульсный фемтосекундный лазер MAI TAI HP (Spectra Physics, США) с частотой следования импульсов 80 МГц и длительностью порядка 100 фс. Возбуждение осуществляли на длине волны 800 нм, регистрацию сигнала ГВГ от коллагеновых структур проводили в диапазоне 362–415 нм (изображение в зеленом цвете), сигнала ДВАФ от эластических волокон — в диапазоне 480–555 нм (изображение в красном цвете). При совмещении сигналов ГВГ и ДВАФ получалось третье изображение, по которому было легче оценить вклад каждого компонента в общий сигнал от объекта.

Окрашенные гистологические препараты изучали с помощью микроскопа Leica DMLS (Leica Microsystems, Германия). Гистологические препараты, окрашенные гематоксилином и эозином, использовали для описания характера воспалительного процесса и его выраженности. На данных препаратах производили подсчет количества сосудов микроциркуляторного русла в поле зрения. Для этого использовали морфометрическую сетку Автандилова с количеством пересечений 289. Подсчет сосудов проводили при увеличении объектива — 40, окуляра — 5 с последующим нормированием их количества на единицу площади. Гистологические препараты, окрашенные пикросириусом красным, оценивали методом поляризационной микроскопии, что позволило прицельно наблюдать изменения в состоянии коллагеновых волокон [22].

Результаты

Цистоскопическое исследование. У пациенток с осложнениями лучевой терапии при

цистоскопии была выявлена характерная очаговая гиперемия на задней стенке мочевого пузыря, иногда с наличием петехиальных кровоизлияний — 47 случаев (62,7%). Гиперемия и отек в мочепузырном треугольнике присутствовали несколько чаще — 54 случая (72,0%). Тяжелое (III и IV степени) поражение мочевого пузыря зафиксировано у 20 пациенток, у 14 из них выявлены субтотальные телеангиэктазии, петехии, эрозированные очаги. Изменения обнаружены преимущественно в области задней стенки, мочепузырного треугольника («горячих» зон для лучевой терапии) и устьев мочеточников. Язвы с некрозами и иногда с инкрустацией солями наблюдались чаще на задней стенке. В 4 случаях имел место пузырно-влагалищный свищ.

У пациенток с хроническим циститом в процессе цистоскопии визуально не измененный мочевой пузырь выявлен в 5 случаях (6,25%), выраженное усиление сосудистого рисунка — в 46 случаях (57,5%), отек и гиперемия в зоне мочепузырного треугольника на фоне усиления сосудистого рисунка — в 19 случаях (23,75%), а картина лейкоплакии — в 37 случаях (46,25%).

Гистологическое исследование. В образцах ткани мочевого пузыря в сроки более одного года после лучевого лечения выявлены фиброзные изменения различной степени выраженности. Отмечали склероз стенок большей части мелких сосудов (диаметр их просвета был заметно уменьшен), а также значительный фиброз подслизистых структур. Практически во всех случаях в слизистой оболочке и подслизистой основе мочевого пузыря на фоне очаговых воспалительных инфильтратов, расположенных по большей части периваскулярно, наблюдали образование грубоволокнистой рубцовой ткани. При этом окрашива-

ние пикросириусом красным выявило ярко-красное и желтое свечение коллагеновых волокон (коллаген I типа) преимущественно вокруг сосудов, что является признаком начинающегося склероза сосудистой стенки (рис. 1, а). Потеря эластичности распределительных сосудов микроциркуляторного русла вследствие подобных изменений может приводить к развитию одного из грозных осложнений лучевой терапии органов малого таза — интенсивных кровотечений из мочевого пузыря. В большей части препаратов облученного мочевого пузыря в различные сроки после лучевой терапии среди участков фиброза в подслизистой основе выявлены небольшие участки грануляционной ткани, что служит свидетельством несовершенства процессов регенерации на фоне протекающих про-

цессов альтерации. В мышечной оболочке обнаруживали фиброзную ткань в виде единичных прослоек в сочетании с очаговой атрофией мышечных элементов. На гистологическом препарате, окрашенном пикросириусом красным, видны плотно уложенные толстые пучки коллагеновых волокон, образующие фиброзную ткань не только в подслизистой основе, но и в мышечной оболочке. Красно-оранжевый цвет волокон свидетельствует о преобладании коллагена I типа, пучки волокон имеют параллельную укладку (рис. 1, в).

Сравнительный микроскопический анализ образцов из визуально не измененных и визуально измененных зон мочевого пузыря при лучевом цистите показал, что степень повреждения тканей в них раз-

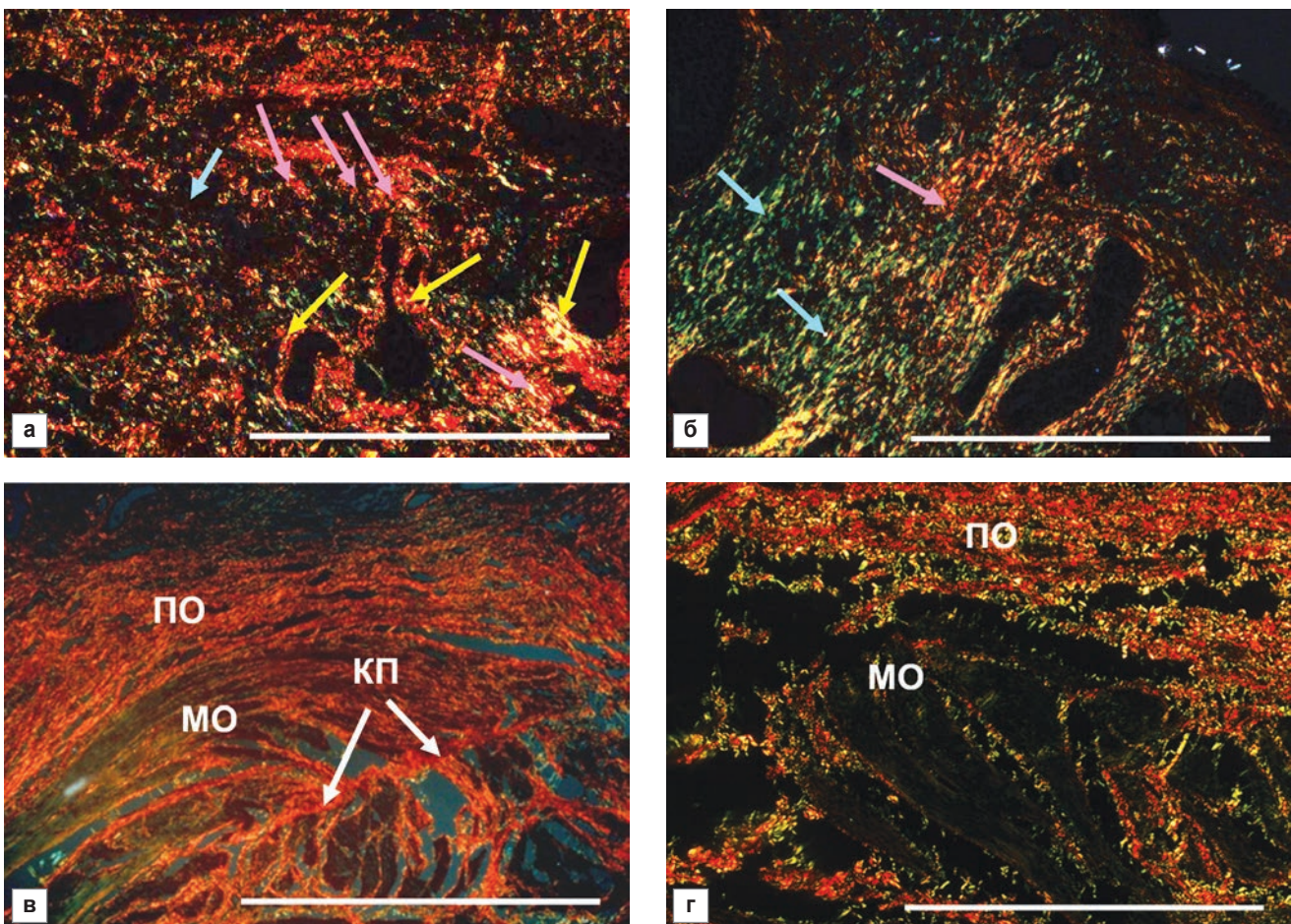


Рис. 1. Сравнительный гистологический анализ состояния внеклеточного матрикса мочевого пузыря при лучевом (а, в) и хроническом (б, г) циститах:

при лучевом цистите в подслизистой основе (а) выявлены начинающийся склероз сосудистой стенки (стрелки желтого цвета), участки фиброза (стрелки розового цвета) и небольшие участки грануляционной ткани (стрелка голубого цвета); в мышечной оболочке (в) видны плотно уложенные толстые пучки коллагеновых волокон, образующие фиброзную ткань, в сочетании с очаговой атрофией мышечных элементов; при хроническом цистите в подслизистой основе (б) очаги фиброза (утолщенные коллагеновые волокна красно-оранжевого цвета) определялись только на отдельных участках (стрелка розового цвета) на фоне преобладающих воспалительных процессов (тонкие коллагеновые волокна зеленого цвета) (стрелки голубого цвета); в мышечной оболочке (г) разрастаний соединительной ткани не замечено; окраска пикросириусом красным, микрофото сделано в поляризованном свете; ПО — подслизистая основа; МО — мышечная оболочка; КП — коллагеновые пучки; бар — 1 мм

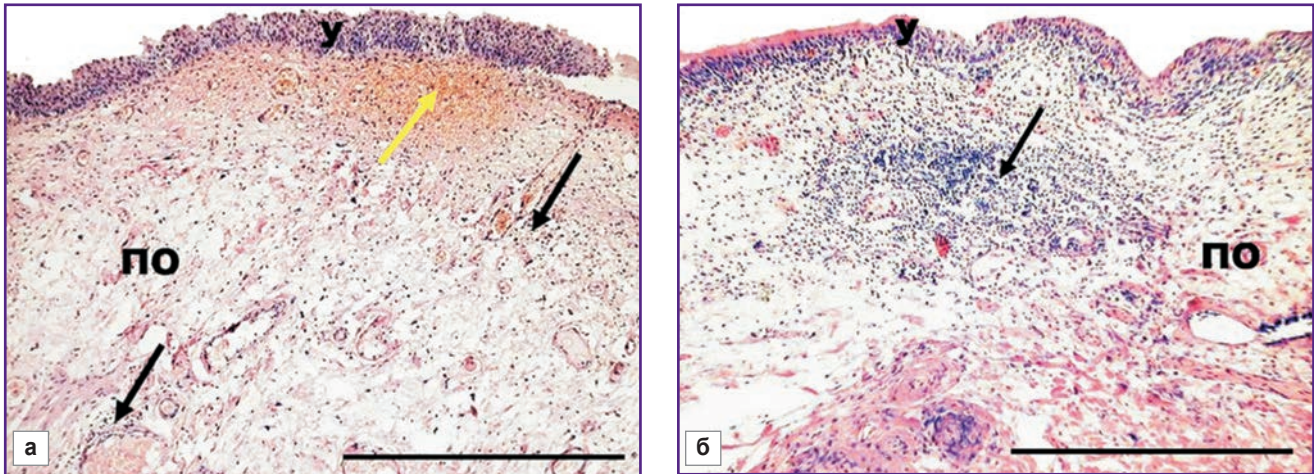


Рис. 2. Стенка мочевого пузыря при лучевом цистите:

сравнительный гистологический анализ визуально измененных (а) и визуально не измененных (б) зон; окраска гематоксилином и эозином; У — уротелий, ПО — подслизистая основа; черные стрелки указывают на очаги инфильтратов; желтая стрелка — на очаг геморрагии; бар — 1 мм

лична. В биоптатах из зон кровоизлияний на задней стенке в периваскулярных зонах выявлен эритродиapedез. Покровный уротелий имел разную толщину: встречались участки атрофии, очаговой гиперплазии, местами — заметные дистрофические изменения. В подэпителиальной ткани обнаруживались резкое полнокровие, выраженный отек, кровоизлияния (рис. 2, а, стрелка желтого цвета), периваскулярно — очаговые инфильтраты из лимфоцитов, плазматических клеток, гистиоцитов (рис. 2, а, стрелки черного цвета), что соответствует картине экссудативно-инфильтративного воспаления. Важно, что в слизистой оболочке визуально не измененных боковых стенок мочевого пузыря также обнаруживались подобные изменения, но меньшей степени выраженности. В нескольких препаратах в подслизистой основе выявлены очаги лимфоцитарной инфильтрации (рис. 2, б, стрелка), что характерно для хронического воспалительного процесса.

В образцах ткани мочевого пузыря пациенток с хроническим циститом отмечаются разноплановые изменения покровного уротелия в виде участков атрофии, местами — гиперплазии, акантоза, с формированием очагов Брунна, неравномерное разрастание фиброзной ткани, в том числе в стенках сосудов, воспалительные лимфоплазмозитарные инфильтраты преимущественно во внутренних оболочках стенки. Красно-оранжевое окрашивание коллагеновых волокон, которому соответствуют очаги фиброза (рис. 1, б, стрелка розового цвета), определялось только на отдельных участках на фоне преобладающих воспалительных процессов (тонкие коллагеновые волокна зеленого цвета) (рис. 1, б, стрелки голубого цвета). В мышечной оболочке разрастания соединительной ткани не замечено (рис. 1, в).

Таким образом, при хроническом цистите сроком

более трех лет и при лучевом цистите сроком более одного года наиболее выраженные изменения формируются в подслизистой основе стенки мочевого пузыря. После проведения лучевой терапии участки выраженного фиброза обнаруживаются также и в мышечной оболочке. Отмечается тенденция к уменьшению общего количества сосудов микроциркуляторного русла на единицу площади ткани в случае радиационных осложнений по сравнению с хроническим циститом: 62 ± 12 на 1 мм^2 и 73 ± 8 на 1 мм^2 соответственно, хотя статистически значимых различий не выявлено. Основным отличием состояния ткани мочевого пузыря при радиационном поражении было существенно более выраженное нарушение структуры во всех оболочках стенки органа.

Исследование методом нелинейной микроскопии. Использование этого метода позволило более детально изучить состояние соединительнотканного матрикса мочевого пузыря. В нормальном мочевом пузыре коллагеновые волокна четко визуализируются, имеют извитую форму, расположены рыхло и сопровождаются эластическими волокнами. Местами коллагеновые волокна собраны в пучки диаметром 10–15 мкм (рис. 3, ряд 1, а–в).

При радиационном поражении мочевого пузыря состояние внеклеточного матрикса зависит от степени тяжести побочных эффектов лучевой терапии. При II степени тяжести коллагеновые волокна собраны в четко очерченные, организованные, компактно упакованные пучки с выделенным направлением (рис. 3, ряд 2, а). Эластические волокна — тонкие, имеют направление, аналогичное коллагеновым пучкам (рис. 3, ряд 2, б). При III степени тяжести лучевых повреждений коллагеновые волокна — размытые, дезорганизованные, сильно извитые, без выделенного направления (рис. 3, ряд 3, а).

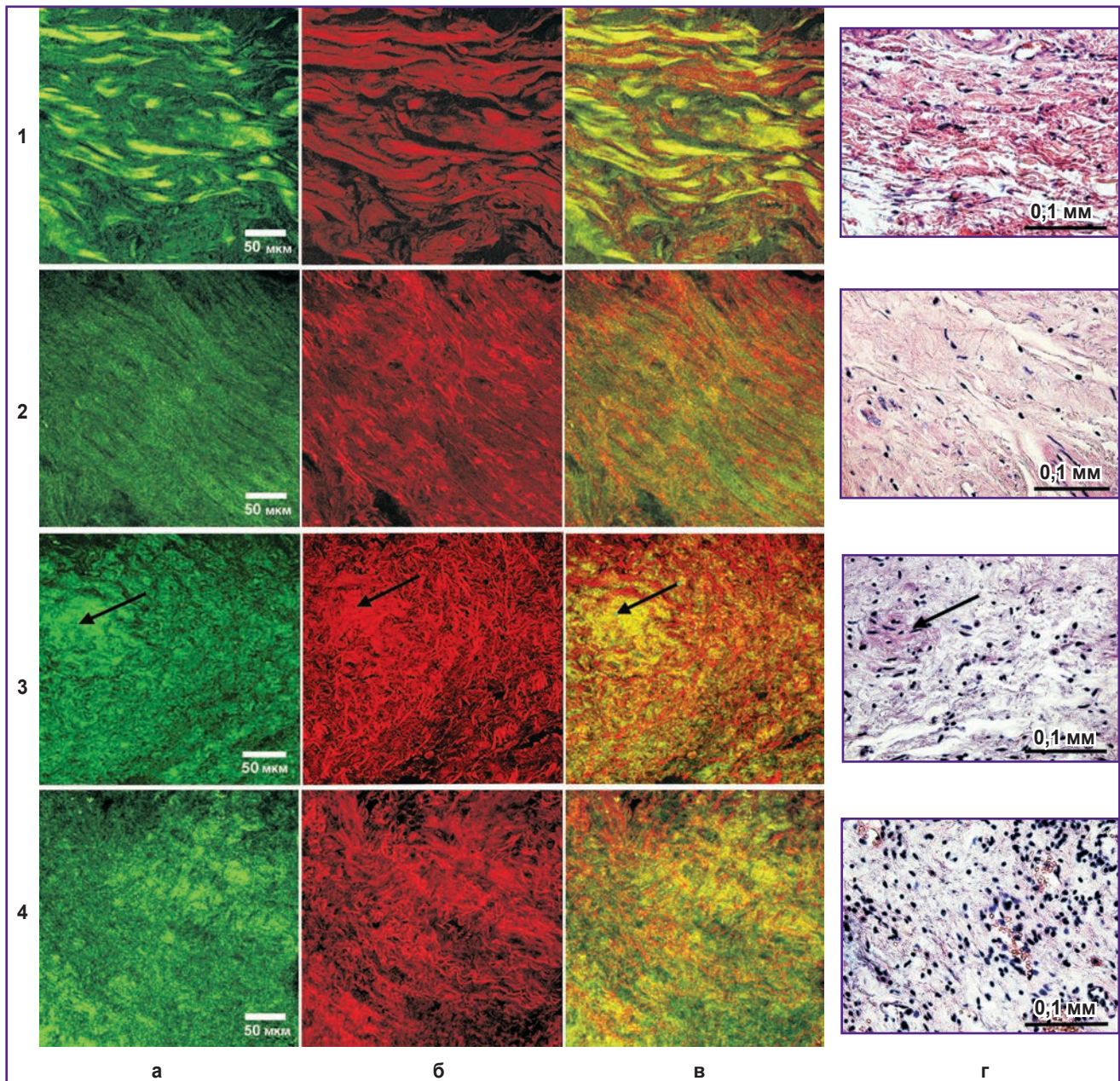


Рис. 3. Нелинейная микроскопия и гистологическое исследование соединительной ткани мочевого пузыря: норма (ряд 1), лучевой цистит II степени тяжести (ряд 2), лучевой цистит III степени тяжести (ряд 3), хронический цистит (ряд 4); изображения нелинейной микроскопии в режиме ГВГ (столбец а), ДВАФ (столбец б), комбинированное изображение ГВГ + ДВАФ (столбец в); соответствующие гистологические препараты (столбец г), окраска гематоксилином и эозином; черные стрелки указывают на очаг бесструктурной ткани с высоким сигналом ГВГ (ряд 3, а, б, в), что может соответствовать очагу формирующегося гиалиноза (ряд 3, г)

Эластические волокна — тонкие, четко очерченные, не имеют преобладающего направления, при этом мозаично встречаются сильно разветвленные участки. Наблюдается потеря характерной в норме для эластических волокон извитой формы укладки (рис. 3, ряд 3, б). В подавляющем большинстве изученных препаратов при тяжелой степени лучевых поражений выявлены очаги бесструктурной ткани с высоким сигналом ГВГ (рис. 3, ряд 3, а, стрелка),

что свидетельствует о высокой степени анизотропии и плотности данных образований, но без признаков данной организации. Такая особенность регистрируемого сигнала ГВГ может соответствовать гиалинозу, однако при сопоставлении описанных участков с гистологическими препаратами выявлено, что они при окраске гематоксилином и эозином четко не дифференцируются на фоне фиброзной ткани (рис. 3, ряд 3, г, стрелка).

На изображениях мочевого пузыря при хроническом цистите, полученных методом нелинейной микроскопии, подобных очагов не выявлено. Распределение сигнала ГВГ от коллагена визуализирует размытые, дезорганизованные, плотные пучки без выделенного направления (рис. 3, ряд 4, а). При гистологическом исследовании выявлена фиброзная ткань с воспалительными инфильтратами (рис. 3, ряд 4, в). Эластические волокна — тонкие, их количество заметно уменьшено (рис. 3, ряд 4, б), что может влиять на функциональность мочевого пузыря.

Обсуждение. Основные морфофункциональные особенности, характеризующие ткань мочевого пузыря после воздействия ионизирующего излучения на опухоли женской репродуктивной системы, были выявлены в эксперименте более 30 лет назад: формирование лучевого фиброза, тяжелая эпителиальная гиперплазия, которая чередуется с очагами денудации, фокальный некроз гладкомышечных клеток и их замещение коллагеновыми волокнами за счет гиперплазии последних [20, 23]. В дальнейших исследованиях было показано [24], что в основе формирования ранних и поздних лучевых повреждений лежит нарушение уротелиального барьера за счет гибели узкоспециализированных полиплоидных поверхностных клеток. Также было показано, что одну из ключевых ролей в развитии радиационного повреждения органа играет прогрессирующее нарушение микроциркуляции [21, 25]. Указанные исследования проводились на животных моделях в условиях однократного облучения, что не позволяет в полной мере экстраполировать полученные результаты на оценку состояния мочевого пузыря пациентов, у которых данный орган является органом риска при проведении лучевой терапии.

Особенностью нашей работы стало использование нескольких методик оценки состояния коллаген- и эластинсодержащих структур мочевого пузыря. Стандартное гистологическое исследование с окрашиванием гематоксилином и эозином выявило атрофию и очаговую гиперплазию уротелия, в подлежащей соединительнотканной строме — полнокровие, выраженный отек, кровоизлияния, очаговые инфильтраты из лимфоцитов, плазматических клеток, гистиоцитов, что соответствует изменениям, описанным в работе [24]. Окрашивание пикросирусом красным дает возможность выявить коллагеновые волокна различных типов, что позволяет более детально изучить их структурную и пространственную организацию и помогает в интерпретации изображений, полученных методом нелинейной микроскопии.

Нелинейная микроскопия с детектированием сигнала ГВГ позволяет детально изучить состояние коллагенсодержащих структур биологических тканей без дополнительного окрашивания. Проведенные ранее с использованием данного метода экспериментальные исследования [26, 27] показали, что снижение интенсивности сигнала ГВГ является основным проявлени-

ем радиационного повреждения коллагена на ранних сроках после воздействия. В нашем исследовании с помощью нелинейной микроскопии впервые в клинике были изучены особенности состояния коллагенсодержащих структур мочевого пузыря после воздействия ионизирующего излучения по сравнению с хроническим воспалением.

Основным проявлением последствий облучения мочевого пузыря служит формирование фиброза, существенно более выраженного по сравнению с изменениями, наблюдаемыми при хроническом цистите. В поздние сроки после облучения проявления фиброза нарастают по сравнению с более ранними сроками, что также соответствует данным литературы. Была выявлена разница в состоянии коллагеновых и эластических структур при лучевом поражении мочевого пузыря различной степени тяжести, что не удается сделать при стандартном гистологическом исследовании и специфическом окрашивании коллагена пикросирусом красным.

Основным проявлением II степени тяжести лучевых осложнений было образование более плотной и «жесткой» упорядоченной структуры коллагеновых волокон, что является свидетельством преобладания процессов неоколлагеногенеза, т.е. формирования «классического» фиброза. При клинической картине, соответствующей III степени побочных эффектов облучения, наблюдалась выраженная дезорганизация коллагенсодержащих структур, что проявлялось как диффузное снижение сигнала ГВГ, размытость и нечеткость структуры волокон. Кроме того, на изображениях, полученных с помощью нелинейной микроскопии, были выявлены небольшие очаги бесструктурной ткани с высоким сигналом ГВГ, изменения в которых при традиционном гистологическом исследовании четко интерпретировать не удалось. Известно, что в процессе дезорганизации соединительной ткани происходит деполимеризация гликозаминогликанов, разрушение коллагеновых волокон и пропитывание их плазменными белками. По данным В.Н. Павловой с соавт. [28], коллаген при этом образует с фибриногеном и другими веществами плотные нерастворимые соединения. Можно предположить, что на ГВГ-изображениях так проявляют себя очаги деструкции соединительной ткани с развитием фибриноидного некроза [29].

Полученные результаты могут стать основой для разработки новых подходов к визуальной и количественной оценке состояния соединительнотканного матрикса мочевого пузыря после воздействия ионизирующего излучения с помощью неинвазивных оптических инструментов, например кросс-поляризационной оптической когерентной томографии [30].

Заключение. Использование метода нелинейной микроскопии позволяет детально изучить структурные изменения коллагена при лучевом и хроническом циститах и выявить отличия состояния соединительнотканного матрикса в случае неспецифического

воспаления и радиационно-индуцированного поражения. Этот метод дает возможность выявить особенности состояния соединительной ткани в зависимости от степени тяжести радиационного поражения, что было невозможно при использовании рутинных методов гистологического исследования.

Финансирование исследования. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ №16-07-00655.

Конфликт интересов. У авторов нет конфликта интересов.

Литература/References

- Dörr W. Radiation effect in normal tissue — principles of damage and protection. *Nuklearmedizin* 2010; 49(Suppl 1): S53–S58.
- Dörr W., Hendry J.H. Consequential late effects in normal tissues. *Radiother Oncol* 2001; 61(3): 223–231, [https://doi.org/10.1016/s0167-8140\(01\)00429-7](https://doi.org/10.1016/s0167-8140(01)00429-7).
- Dörr W. Pathogenesis and repair of normal tissue damage. *Radiother Oncol* 2011; 99: S135, [https://doi.org/10.1016/s0167-8140\(11\)70460-1](https://doi.org/10.1016/s0167-8140(11)70460-1).
- Cancer Therapy Evaluation Program. Common terminology criteria for adverse events (CTCAE) (version 4.03). 2010. URL: https://evs.nci.nih.gov/ftp1/CTCAE/CTCAE_4.03_2010-06-14_QuickReference_5x7.pdf.
- Stone H.B., Coleman C.N., Anscher M.S., McBride W.H. Effects of radiation on normal tissue: consequences and mechanisms. *Lancet Oncol* 2003; 4 (9): 529–536, [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(03\)01191-4](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(03)01191-4).
- Haie-Meder C., de Crevoisier R., Bruna A., Lhomme C., Pautier P., Morice P., Castaigne D., Bourhis J. Concomitant chemoradiation in patients with cervix cancer. *Bull Cancer* 2005; 92(12): 1032–1038.
- Tan L.T., Zahra M. Long-term survival and late toxicity after chemoradiotherapy for cervical cancer — the addenbrooke's experience. *Clin Oncol* 2008; 20(5): 358–364, <https://doi.org/10.1016/j.clon.2008.03.001>.
- Болтенко А.И. Современное лечение рака шейки матки. Новые подходы к комплексному лечению. Вестник Российского научного центра рентгенорадиологии 2008; 8. Boltenko A.I. Modern treatment of cervix uteri carcinoma, new methods of combined therapy. *Vestnik Rossiyskogo nauchnogo tsentra rentgenoradiologii* 2008; 8. URL: http://vestnik.rncrr.ru/vestnik/v8/papers/boltenko_v8.htm.
- Moonen L., van der Voet H., Horenblas S., Bartelink H. A feasibility study of accelerated fractionation in radiotherapy of carcinoma of the urinary bladder. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997; 37(3): 537–542, [https://doi.org/10.1016/s0360-3016\(96\)00541-x](https://doi.org/10.1016/s0360-3016(96)00541-x).
- Horwich A., Dearnaley D., Huddart R., Graham J., Bessell E., Mason M., Bliss J. A randomised trial of accelerated radiotherapy for localised invasive bladder cancer. *Radiother Oncol* 2005; 75(1): 34–43, <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2004.11.003>.
- Soete G., Arcangeli S., De Meerleer G., Landoni V., Fonteyne V., Arcangeli G., De Neve W., Storme G. Phase II study of a four-week hypofractionated external beam radiotherapy regimen for prostate cancer: Report on acute toxicity. *Radiother Oncol* 2006; 80(1): 78–81, <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2006.06.005>.
- Willett C.G., Ooi C.J., Zietman A.L., Menon V., Goldberg S., Sands B.E., Podolsky D.K. Acute and late toxicity of patients with inflammatory bowel disease undergoing irradiation for abdominal and pelvic neoplasms. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000; 46(4): 995–998, [https://doi.org/10.1016/s0360-3016\(99\)00374-0](https://doi.org/10.1016/s0360-3016(99)00374-0).
- Каприн А.Д., Титова В.А., Крейнина Ю.М., Костин А.А. Урологические осложнения в онкогинекологической практике: диагностика, интервенционная и консервативная коррекция. М; 2011; 168 с. Kaprin A.D., Titova V.A., Kreynina Yu.M., Kostin A.A. *Urologicheskie oslozhneniya v onkoginekologicheskoy praktike: diagnostika, intervencionnaya i konservativnaya korrektsiya* [Urologic complications in oncogynecological practice: diagnostics, interventional and conservative correction]. Moscow; 2011; 168 p.
- Herold D.M., Hanlon A.L., Hanks G.E. Diabetes mellitus: a predictor for late radiation morbidity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1999; 43(3): 475–479, [https://doi.org/10.1016/s0360-3016\(98\)00460-x](https://doi.org/10.1016/s0360-3016(98)00460-x).
- Hamstra D.A., Stenmark M.H., Ritter T., Litzenberg D., Jackson W., Johnson S., Albrecht-Unger L., Donaghy A., Phelps L., Blas K., Halverson S., Marsh R., Olson K., Feng F.Y. Age and comorbid illness are associated with late rectal toxicity following dose-escalated radiation therapy for prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2013; 85(5): 1246–1253, <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2012.10.042>.
- Eifel P.J., Jhingran A., Bodurka D.C., Levenback C., Thames H. Correlation of smoking history and other patient characteristics with major complications of pelvic radiation therapy for cervical cancer. *J Clin Oncol* 2002; 20(17): 3651–3657, <https://doi.org/10.1200/jco.2002.10.128>.
- Shadad A.K. Gastrointestinal radiation injury: prevention and treatment. *World J Gastroenterol* 2013; 19(2): 199–208, <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i2.199>.
- Yarnold J., Brotons M.-C. Pathogenetic mechanisms in radiation fibrosis. *Radiother Oncol* 2010; 97(1): 149–161, <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2010.09.002>.
- Antonakopoulos G.N., Hicks R.M., Hamilton E., Berry R.J. Early and late morphological changes (including carcinoma of the urothelium) induced by irradiation of the rat urinary bladder. *Br J Cancer* 1982; 46(3): 403–416, <https://doi.org/10.1038/bjc.1982.217>.
- Stewart F.A. Mechanism of bladder damage and repair after treatment with radiation and cytostatic drugs. *Br J Cancer Suppl* 1986; 7: 280–291.
- 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, <https://doi.org/10.1016/j.icrp.2012.02.001>.
- Lattouf R., Younes R., Lutowski D., Naaman N., Godeau G., Senni K., Changotade S. Picrosirius red staining: a useful tool to appraise collagen networks in normal and pathological tissues. *J Histochem Cytochem* 2014; 62(10): 751–758, <https://doi.org/10.1369/0022155414545787>.
- Antonakopoulos G.N., Hicks R.M., Berry R.J. The subcellular basis of damage to the human urinary bladder induced by irradiation. *J Pathol* 1984; 143(2): 103–116, <https://doi.org/10.1002/path.1711430205>.

24. Jaal J., Dörr W. Radiation-induced damage to mouse urothelial barrier. *Radiother Oncol* 2006; 250–256, <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2006.07.015>.
25. Jaal J., Dörr W. Radiation effects in mouse urinary bladder: changes in vascular volume. *Radiother Oncol* 2003; 67(Suppl 1): S8, [https://doi.org/10.1016/s0167-8140\(03\)80560-1](https://doi.org/10.1016/s0167-8140(03)80560-1).
26. Maslennikova A., Kochueva M., Ignatieva N., Vitkin A., Zakharkina O., Kamensky V., Sergeeva E., Kiseleva E., Bagratashvili V. Effects of gamma irradiation on collagen damage and remodeling. *Int J Radiat Biol* 2015; 91(3): 240–247, <https://doi.org/10.3109/09553002.2014.969848>.
27. 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, <https://doi.org/10.17691/stm2016.8.2.04>.
28. Павлова В.Н., Копьева Т.Н., Слуцкий Л.И., Павлов Г.Г. Хрящ. М: Медицина; 1988; 320 с. Pavlova V.N., Kop'eva T.N., Slutskiy L.I., Pavlov G.G. *Khryashch* [Cartilage]. Moscow: Meditsina; 1988; 320 p.
29. Гистология. Под ред. Улумбекова Э.Г., Челышева Ю.А. М: ГЭОТАР-Мед; 2001; 670 с. *Gistologiya* [Histology]. Pod red. Ulumbekova E.G., Chelysheva Yu.A. [Ulumbekov E.G., Chelyshev Yu.A. (editors)]. Moscow: GEOTAR-Med; 2001; 670 p.
30. 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>.