

КРОСС-ПОЛЯРИЗАЦИОННАЯ ОПТИЧЕСКАЯ КОГЕРЕНТНАЯ ТОМОГРАФИЯ В СРАВНИТЕЛЬНОМ *in vivo* и *ex vivo* ИССЛЕДОВАНИИ ОПТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ОПУХОЛЕВЫХ И НОРМАЛЬНЫХ ТКАНЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА

DOI: 10.17691/stm2017.9.4.22
УДК 616.831.001.6–006–073.756.8
Поступила 4.09.2017 г.

© **Е.Б. Киселева**, к.б.н., научный сотрудник лаборатории изучения оптических свойств биотканей НИИ биомедицинских технологий¹;
К.С. Яшин, врач-нейрохирург²; младший научный сотрудник лаборатории высокоразрешающей микроскопии и генных технологий НИИ биомедицинских технологий¹;
А.А. Моисеев, к.ф.-м.н., старший научный сотрудник лаборатории высокочувствительных оптических измерений³;
М.А. Сироткина, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории индивидуальной химиотерапии рака НИИ биомедицинских технологий¹;
Л.Б. Тимофеева, к.б.н., ассистент кафедры гистологии с цитологией и эмбриологией¹;
В.В. Федосеева, младший научный сотрудник лаборатории нейроморфологии⁴;
А.И. Алексеева, младший научный сотрудник лаборатории нейроморфологии⁴;
И.А. Медяник, д.м.н., старший научный сотрудник группы микронеурологии²;
Н.Н. Карякин, д.м.н., и.о. ректора¹;
Л.Я. Кравец, д.м.н., профессор, главный научный сотрудник группы микронеурологии²;
Н.Д. Гладкова, д.м.н., профессор, зав. лабораторией изучения оптических свойств биотканей НИИ биомедицинских технологий¹

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

²Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр Минздрава России, Н. Новгород, 603155, Верхне-Волжская набережная, 18;

³Федеральный исследовательский центр Институт прикладной физики РАН, Н. Новгород, 603155, ул. Ульянова, 46;

⁴Научно-исследовательский институт морфологии человека РАН, Москва, 117418, ул. Цюрупы, 3

Цель исследования — визуальная и количественная оценка изображений опухолевой и нормальной ткани головного мозга, полученных методом кросс-поляризационной оптической когерентной томографии (КП ОКТ), в сравнительном исследовании *in vivo* и *ex vivo*.

Материалы и методы. Исследование проведено с использованием не повреждающего оптического метода визуализации внутренней структуры тканей — КП ОКТ, позволяющего получать за короткое время (26 с) объемные изображения 2,4×2,4×1,25 мм в режиме реального времени. Объектом исследования являлись опухолевые и нормальные ткани головного мозга 12 экспериментальных крыс линии Wistar: 4 — интактные, 4 — с моделью злокачественной глиомы 101.8 и 4 — с моделью злокачественной глиомы С6. У интактных крыс проведено КП ОКТ-сканирование коры и белого вещества головного мозга, у крыс с опухолями — центральной части опухоли на поверхности коры сначала *in vivo*, а затем — в условиях *ex vivo*. Количественная обработка КП ОКТ-данных, полученных *in vivo* и *ex vivo*, заключалась в расчете коэффициентов затухания для каждого типа ткани.

Результаты. Качественный сравнительный анализ *in vivo* и *ex vivo* КП ОКТ-изображений нормальных тканей головного мозга и глиом показал, что КП ОКТ-изображения, полученные *ex vivo*, имеют более высокую интенсивность и скорость затухания как в исходной, так и в ортогональной поляризации по сравнению с изображениями, полученными *in vivo*. Количественный анализ КП ОКТ-изображений выявил статистически значимые отличия ($p < 0,02$) между значениями коэффициента затухания от обеих опухолей и белого вещества при исследовании *in vivo* (5,5 [4,8; 5,8] мм⁻¹ — для глиомы 101.8; 3,2 [2,4; 4,3] мм⁻¹ — для глиомы С6; 7,5 [7,0; 8,0] мм⁻¹ — для белого вещества в норме), по сравнению с *ex vivo* исследованием (7,0 [5,9; 8,1] мм⁻¹ — для глиомы 101.8; 6,8 [6,2; 7,9] мм⁻¹ — для глиомы С6; 9,0 [8,4; 9,5] мм⁻¹ — для белого вещества в норме). Для коры головного мозга статистически значимой разницы в этом случае не получено (5,8 [4,9; 6,6] мм⁻¹ против 6,3 [5,5; 7,1] мм⁻¹; $p = 0,34$). Сравнение коэффициентов затухания между корой и белым веществом головного мозга в норме, а также белого вещества в норме и злокачественных глиом показало статистически значимые различия как при исследовании *in vivo*, так и при *ex vivo* исследовании.

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

Заключение. Результаты качественного сравнительного анализа оптических свойств нормальной и опухолевой ткани головного мозга при исследовании методом КП ОКТ позволяют заключить, что визуально в процессе оценки структура КП ОКТ-изображений, полученных от тканей *ex vivo*, сохраняется при прижизненном изучении этих же типов тканей. Результаты количественной оценки КП ОКТ-сигнала подтвердили значительную разницу коэффициента затухания ($p < 0,005$) между опухолевой тканью и белым веществом головного мозга в норме, которая наблюдается как при исследовании *ex vivo*, так и в условиях *in vivo*. Однако при прижизненной оценке оптических коэффициентов тканей необходимо учитывать существующие различия в оптических свойствах тканей *ex vivo* и *in vivo*.

Ключевые слова: белое вещество головного мозга; кора головного мозга; экспериментальная опухолевая модель; злокачественная глиома; кросс-поляризационная оптическая когерентная томография; КП ОКТ; коэффициент затухания; исследование *in vivo* и *ex vivo*.

Как цитировать: Kiseleva E.B., Yashin K.S., Moiseev A.A., Sirotkina M.A., Timofeeva L.B., Fedoseeva V.V., Alekseeva A.I., Medyanik I.A., Karyakin N.N., Kravets L.Ya., Gladkova N.D. Cross-polarization optical coherence tomography in comparative *in vivo* and *ex vivo* studies of the optical properties of tumorous and normal brain tissues. Modern Tehnologies in Medicine 2017; 9(4): 177–187, <https://doi.org/10.17691/stm2017.9.4.22>

English

Cross-Polarization Optical Coherent Tomography in Comparative *in vivo* and *ex vivo* Studies of Optical Properties of Normal and Tumorous Brain Tissues

E.B. Kiseleva, PhD, Researcher, Laboratory for Studies of Optical Structure of Biotissues, Research Institute of Biomedical Technologies¹;

K.S. Yashin, MD, Neurosurgeon², Junior Researcher, Laboratory of High-Resolution Microscopy and Gene Technology, Research Institute of Biomedical Technologies¹;

A.A. Moiseev, PhD, Senior Researcher, Laboratory of High-Sensitivity Optical Measurements³;

M.A. Sirotkina, PhD, Senior Researcher, Laboratory for Individual Cancer Chemotherapy, Research Institute of Biomedical Technologies¹;

L.B. Timofeeva, PhD, Assistant Professor, Department of Histology with Cytology and Embryology¹;

V.V. Fedoseeva, Junior Researcher, Laboratory of Neuromorphology⁴;

A.I. Alekseeva, Junior Researcher, Laboratory of Neuromorphology⁴;

I.A. Medyanik, MD, DSc, Senior Researcher, Microneurosurgery Group²;

L.Ya. Kravets, MD, DSc, Professor, Chief Researcher, Microneurosurgery Group²;

N.D. Gladkova, MD, DSc, Professor, Head of the Laboratory for Studies of Optical Structure of Biotissues, Research Institute of Biomedical Technologies¹

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

²Privolzhsky Federal Research Medical Centre, Ministry of Health of the Russian Federation, 18 Verkhne-Volzhsкая naberezhnaya St., Nizhny Novgorod, 603155, Russian Federation;

³Institute of Applied Physics, Russian Academy of Sciences, 46 Ulyanova St., Nizhny Novgorod, 603155, Russian Federation;

⁴Research Institute of Human Morphology, 3 Tsurupy St., Moscow, 117418, Russian Federation

The aim of the study was to provide visual and quantitative evaluation of normal and tumorous brain tissue images obtained by cross-polarization optical coherence tomography (CP OCT) in comparative *in vivo* and *ex vivo* studies.

Materials and Methods. The study was conducted using CP OCT — a non-damaging optical method of tissue structure imaging, which is capable of obtaining real time 3D images 2.4×2.4×1.25 mm in size within a short time of 26 s. The object of the study were normal and tumorous brain tissues of 12 experimental rats of the Wistar line: 4 — intact, 4 — with an induced malignant 101.8-glioma model and 4 — with an induced malignant C6-glioma model. In the intact rats, the cortex and the white matter were studied, in the rats with tumors — the central part of the tumor on the cortical surface, first *in vivo* and then *ex vivo*. Quantitative data evaluation of the CP OCT images involved calculation of attenuation coefficients for each tissue type.

Results. A comparative qualitative image analysis of normal brain tissues and gliomas showed that the CP OCT images obtained *ex vivo* have the intensity and the attenuation rate (in both the initial and orthogonal polarizations) greater than those obtained *in vivo*. Quantitative analysis of the CP OCT images revealed significant statistical differences ($p < 0.02$) between the attenuation coefficients from both tumors and the white matter *in vivo* (5.5 [4.8; 5.8] mm⁻¹ for 101.8-glioma; 3.2 [2.4; 4.3] mm⁻¹ for C6-glioma; and 7.5 [7.0; 8.0] mm⁻¹

for the normal white matter) as compared with *ex vivo* (7.0 [5.9; 8.1] mm^{-1} for 101.8-glioma; 6.8 [6.2; 7.9] mm^{-1} for C6-glioma; and 9.0 [8.4; 9.5] mm^{-1} for the normal white matter). For the cerebral cortex, no significant statistical difference was found (5.8 [4.9, 6.6] mm^{-1} versus 6.3 [5.5; 7.1] mm^{-1} ; $p=0.34$). A comparison of the attenuation coefficients between the cortex and the white matter of the normal brain, as well as the white matter in the normal and malignant tissues, showed significant statistical differences both *in vivo* and *ex vivo*.

Conclusion. The results of a qualitative comparative analysis of optical properties of normal and tumorous brain tissues using CP OCT allow us to conclude that the images obtained *ex vivo* show a full qualitative similarity with the structures observed with the intravital CP OCT study. Quantitative evaluation of CP OCT signals demonstrated a significant difference in the attenuation coefficient ($p<0.005$) between tumorous tissue, on the one hand, and normal white matter, on the other, both *ex vivo* and *in vivo*. However, when optical coefficients of tissues are evaluated *in vivo*, it is necessary to introduce adjustments based on the known differences between *ex vivo* and *in vivo* attenuation coefficients.

Key words: brain white matter; cortex; experimental tumor model; malignant glioma; cross-polarization optical coherence tomography; CP OCT; attenuation coefficient; *in vivo* and *ex vivo* studies.

В настоящее время в хирургическом лечении глиом головного мозга используются различные интраоперационные технологии (ультразвуковое исследование, магнитно-резонансная томография, флюоресцентная диагностика), направленные на повышение безопасности и радикальности удаления опухоли [1–4]. Исследованиями последних лет показано, что объем опухолевой резекции достоверно коррелирует с продолжительностью жизни пациентов в данной группе [5–8], что обуславливает поиск новых технологий для точной дифференцировки опухолевой и нормальной мозговой ткани.

Одними из наиболее перспективных являются технологии оптического биоимиджинга [9], среди которых визуализировать цито- и миелоархитектонику тканей позволяют методы оптической когерентной томографии (ОКТ) [10] и мультифотонной микроскопии/томографии [11].

С момента создания ОКТ в 1991 г. и в течение последующих лет непрерывного технологического совершенствования метод получил широкое распространение в экспериментальной медицине и различных клинических областях, в том числе в нейрохирургии [12–15]. В настоящее время системы для интраоперационного применения ОКТ существуют в составе операционного микроскопа [15] и эндоскопических инструментов [16, 17]. Однако критерии дифференцировки опухолевой и нормальной мозговой ткани по краю опухолевой резекции не могут считаться до конца отработанными: нет единого мнения относительно критериев визуальной оценки изображений и их количественных характеристик.

Несколько научных групп внесли существенный вклад в выявление различий в характере ОКТ-сигнала от нормальной и опухолевой тканей головного мозга, проведя *in vivo* [18] и *ex vivo* [19] исследования на опухолевых моделях в эксперименте, *in vivo* — у пациентов с глиомами головного мозга [12, 20] и *ex vivo* — на послеоперационных образцах глиом [12, 20, 21]. Существуют два подхода к анализу ОКТ-данных: качественный анализ ОКТ-изображений [12, 21] и количественный анализ ОКТ-сигнала с опре-

делением различных оптических коэффициентов, среди которых наиболее информативными принято считать коэффициенты обратного рассеяния [21] и затухания [12, 18, 22].

ОКТ позволяет осуществлять анализ микроструктуры ткани в режиме реального времени, не требует введения контрастных веществ, используемое излучение ближнего инфракрасного диапазона (700–1300 нм) не оказывает повреждающего действия на ткань. Все это является безусловными аргументами в пользу применения ОКТ в клинике непосредственно во время оперативного вмешательства в качестве метода «оптической биопсии», т.е. способного в той или иной степени определять морфологические особенности ткани.

Наиболее убедительным способом интерпретации результатов, получаемых при использовании метода ОКТ, является прицельное гистологическое исследование образца. Такая методика валидации метода ОКТ применительно к глиальным опухолям головного мозга имеет ряд сложностей и ограничений при ее проведении в условиях *in vivo* — в ходе оперативных вмешательств у пациентов: 1) сложность в получении четкого ОКТ-изображения при колебательных движениях ткани за счет пульса и дыхания; 2) деформация при ее заборе; 3) трудность в достижении представляющих наибольший интерес областей инфильтрации опухолью белого вещества; 4) наличие активного кровотечения и использование гемостатических материалов, что может повлиять на качество получаемых ОКТ-изображений [12]; 5) ограничение по времени использования метода, так как существенное увеличение времени операции недопустимо.

Учитывая все вышесказанное, исследователи отдают предпочтение проведению оценки тканей *ex vivo* на материале операционных биопсий, содержащих только глиальные опухоли, белое или серое вещество головного мозга или одновременно опухоль и нормальную ткань головного мозга, поскольку при таком способе исследования легче «прицельно» на нужную для изучения область. Важным преимуществом исследования *ex vivo* является возможность проведе-

ния максимально прицельных гистологических исследований для более точной и убедительной валидации метода с определением его диагностической точности. Другое его преимущество — отсутствие жестких временных ограничений, что позволяет проводить многократное сканирование образца, контролировать качество изображений, при необходимости повторить эксперимент и накопить необходимое количество данных. Результаты визуальной оценки и количественной обработки *ex vivo* ОКТ-изображений будут лишены неточностей, возникающих из-за присутствия артефактов при исследовании *in vivo*.

В то же время при проведении исследований *ex vivo* для адекватной интерпретации ОКТ-изображений и количественной оценки ОКТ-сигнала следует учитывать потерю перфузии тканей и изменение объема образцов из-за искажения трехмерного тканевого контекста. Исследования на животных показывают, что профиль затухания света в ткани с глубиной по краю резекции в нормальном головном мозге изменяется во времени, что указывает на следующий факт: длительность проведения исследования и повреждение ткани меняют ОКТ-сигнал [12]. Таким образом, важно понимать, насколько результаты, получаемые в условиях *ex vivo*, будут соответствовать получаемым в ходе оперативного вмешательства *in vivo*, поскольку метод ОКТ предполагает интраоперационное применение. Вопрос о возможности применения критериев качественной и количественной оценки ОКТ-изображений, которые будут сформулированы при исследовании *ex vivo*, для оценки ОКТ-данных, получаемых *in vivo*, остается открытым.

Метод кросс-поляризационной ОКТ (КП ОКТ) является разновидностью поляризационно-чувствительной ОКТ с некоторыми преимуществами. Основное из них — относительная простота анализа структуры КП ОКТ-изображений, физический смысл которых заключается в визуализации на разных изображениях волн, сохранивших при рассеянии исходное состояние поляризации, и волн, сменивших исходное состояние поляризации на ортогональное. С точки зрения медицинской диагностики такой анализ позволяет судить о наличии (либо отсутствии) в исследуемых образцах биоткани анизотропно рассеивающих структур, таких как коллаген или миелиновые волокна. По изменению количества и качества анизотропных структур можно осуществлять идентификацию патологических изменений в тканях. Технология КП ОКТ не зависит от ориентации зонда относительно анизотропных структур биоткани и чувствительна как к кросс-рассеянию, так и к двулучепреломлению.

Поляризационные свойства коллагена, детектируемые методом КП ОКТ, были использованы при обнаружении уязвимых атеросклеротических бляшек [23] и карциномы мочевого пузыря [24]. Для визуализации ткани головного мозга и глиом этот метод применялся в нескольких работах: *in vivo* исследовании модели глиомы крысы [25] и *ex vivo* исследовании глиом че-

ловека разной степени злокачественности [26], в которых продемонстрированы возможности метода КП ОКТ соответственно для выявления границ опухолевого роста и для дифференциации степени злокачественности.

Цель исследования — визуальная и количественная оценка изображений, полученных от опухолевой и нормальной ткани головного мозга методом кросс-поляризационной оптической когерентной томографии, в сравнительном исследовании *in vivo* и *ex vivo*.

Материалы и методы

Опухолевые модели. Исследование проведено на 12 экспериментальных животных (крысах линии Wistar): 4 — интактные, 4 — с моделью злокачественной глиомы 101.8 и 4 — с моделью злокачественной глиомы С6. Обе глиомы являются химически индуцируемыми и были выбраны в качестве опухолевых моделей из-за схожести с глиобластомой человека по морфологическим характеристикам и высокой степени инфильтрации. Перевиваемая глиома 101.8 представляет собой злокачественную глиальную опухоль с высокой клеточностью, многочисленными митозами, очаговой микроваскулярной пролиферацией. Для нее характерны обширные очаги некрозов и кровоизлияний вследствие быстрого роста. Крысиная глиома С6, напротив, растет относительно медленно, поэтому обширные очаги кровоизлияний и некрозов для нее не типичны, опухоль характеризуется периваскулярным и перинейрональным инфильтративным ростом, клетки опухоли полиморфны по размеру и форме — округлые или овальные. В данной работе изучены оптические свойства обеих опухолей, поскольку они имеют разный темп роста и морфологически представляют собой более (глиома 101.8) и менее (глиома С6) гетерогенные структуры.

Опухоли прививали крысам в научно-исследовательском институте морфологии человека РАН (Москва) по стандартной методике [27]. Во время развития и роста опухоли животные содержались в стандартных условиях вивария. КП ОКТ-исследования проводили на 10–12-е сутки после трансплантации глиомы 101.8 и на 17–19-е сутки — глиомы С6, когда опухоли сформировались и в результате интенсивного роста распространялись на поверхность коры головного мозга.

При работе с животными руководствовались «Правилами для проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приказ Минздрава РФ от 23.08.2010 г. №708н «Об утверждении Правил лабораторной практики») и «Международными рекомендациями (этический кодекс) по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» 1985 г., при этом неукоснительно соблюдались этические принципы, установленные Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (принятой в Страсбурге 18.03.1986 г. и подтвержденной в

Страсбурге 15.06.2006 г.). На проведение экспериментальных исследований на животных получено разрешение Этического комитета НижГМА.

Кросс-поляризационный оптический когерентный томограф. Исследование выполнено на скоростном мультимодальном оптическом когерентном томографе, в основе работы которого лежит спектральный принцип приема сигнала. Прибор разработан в Федеральном исследовательском центре Института прикладной физики Российской академии наук (Н. Новгород) [28, 29]. После сканирования ткани происходит построение нескольких изображений ее поперечного среза (с поверхности вглубь) и изображений вида сверху в режиме реального времени. В качестве зондирующего излучения используется поляризованный свет, поэтому кроме стандартного структурного ОКТ-изображения (рис. 1, 1-й и 2-й столбцы, верхняя часть каждого из изображений) строится второе, сопряженное с первым, изображение в ортогональной поляризации (рис. 1, 1-й и 2-й столбцы, нижняя часть каждого из изображений). Усовершенствованные инженерно-физические решения позволяют получать также ангиографические изображения, что важно при исследованиях *in vivo* [22].

Источником излучения служит суперлюминесцентный диод. Параметры излучения: центральная длина волны — 1310 нм, ширина спектра — около 100 нм, мощность — менее 5 мВт. Разрешение по глубине составляет 15 мкм, поперечное пространственное разрешение — около 20 мкм. Скорость получения изображений — 20 кГц/с, запись 3D-изображения размером 2,4×2,4×1,25 мм (планарные размеры и высота) занимает 26 с. Из записанных трехмерных массивов ОКТ-данных (один трехмерный массив содержит 256 В-сканов в каждой поляризации и 65536 А-сканов) для удобства представления материала и его качественного анализа выбраны В-сканы, наиболее характерные для каждого вида исследуемой ткани. Они сохранены в виде двухмерных изображений в ко- и кросс-поляризациях. Размер КП ОКТ-изображений (В-сканов) в каждой поляризации составляет 2,4 мм (ширина) × 1,25 мм (высота).

КП ОКТ-устройство оснащено торцевым волоконно-оптическим зондом с внешним диаметром объектива 8 мм, который подводится к исследуемой поверхности ткани бесконтактно.

Дизайн КП ОКТ-исследования *in vivo* и *ex vivo*. КП ОКТ-исследование опухолевых и нормальных тканей головного мозга *in vivo* проводили после трепанации черепа. Все оперативные вмешательства выполняли с использованием стереотаксической установки под стереомикроскопом Leica M60 (Leica Microsystems, Германия) (объектив — ×1, окуляры — ×10). Во время проведения КП ОКТ-исследования животные находились под наркозом (Золетил 50 и 2% Рометар).

КП ОКТ-изображения нормальной коры (левого полушария), нормального белого вещества (правого полушария) получены с теменной области мозга

на расстоянии 2–5 мм от центральной извилины у 4 интактных крыс; КП ОКТ-изображения глиом 101.8 и С6 — из центральной области опухоли, видимой на поверхности коры, у 8 крыс (по 4 крысы с каждой моделью). Для исследования белого вещества интактного полушария головного мозга *in vivo* кора предварительно послойно счищалась. Время сканирования одной области интереса не превышало 5 мин. Далее границы области сканирования отмечали гистологической тушью, животных выводили из эксперимента, головной мозг извлекали, помещали под зонд ОКТ-устройства и из соответствующих зон коры головного мозга, белого вещества и опухоли проводили запись КП ОКТ-изображений.

Исследовано 16 областей интереса *in vivo* и столько же *ex vivo*, на гистологическое исследование взято 16 образцов. Всего получено и проанализировано 98 трехмерных массивов ОКТ-данных, с каждой области интереса записано по 2–3 объемных КП ОКТ-изображения. Для количественного анализа отобраны 92 изображения (см. таблицу).

Количественная обработка КП ОКТ-данных.

Обработку данных проводили в математической среде Anaconda 4.3.1 (Python v. 3.6). Расчеты выполнены по 3D-изображениям. Для каждого А-скана, который представляет собой профиль затухания ОКТ-сигнала по глубине, рассчитан коэффициент затухания зондирующего излучения в исследуемом образце [18], затем вычислено среднее значение по всему объему данных. Для учета поляризационных эффектов коэффициент затухания рассчитывали по пифагоровой сумме сигналов в исходной и ортогональной поляризациях [23]. Записанные сигналы в ко- и кросс-каналах возводили в квадрат, складывали и логарифмировали. Полученные кривые описывали линейной зависимостью, коэффициент затухания определяли как коэффициент при первой степени получаемой зависимости. Для лучшего соответствия получаемых данных выбранной модели расчет производили для сокращенного диапазона глубин: 100–300 мкм от поверхности изображения.

Коэффициенты затухания рассчитаны для 4 групп областей интереса: коры головного мозга, белого вещества, глиомы 101.8 и глиомы С6. Сравнивали коэффициенты затухания *in vivo* и *ex vivo* для каждой группы, а также вычисляли достоверность отличий нормальных тканей от опухолевых по коэффициентам в условиях *in vivo* и *ex vivo*.

Гистологическое исследование. Для верификации структуры опухолевой и нормальной нервной ткани головного мозга в области КП ОКТ-исследования был проведен гистологический анализ образцов. Их фиксировали в 10% растворе забуференного формалина в течение 48 ч. После серии промывок материал заливали в парафин при температуре 57°C. Затем из области КП ОКТ-сканирования получали несколько срезов, которые окрашивали гематоксилином и эозином. Гистологические срезы были описаны морфоло-

гом и сфотографированы в проходящем свете с использованием микроскопа Leica DM2500 DFC (Leica Microsystems, Германия), укомплектованного цифровой камерой.

Статистическую обработку результатов выполняли с использованием пакета статистического анализа Statistica 10.0. При вычислении коэффициента затухания по объемному КП ОКТ-изображению рассчитывали среднее значение по всем А-сканам, в каждой группе коэффициент затухания характеризовали в виде $Me [Q1; Q3]$. Для проверки статистических

гипотез применяли непараметрические методы. Для сравнения количественных данных двух независимых групп использован U-критерий Манна–Уитни.

Результаты и обсуждение

Сравнительный анализ *in vivo* и *ex vivo* КП ОКТ-изображений нормальных тканей головного мозга и глиом — качественная оценка. Визуальная оценка КП ОКТ-изображений позволяет выявить различие между характером сигнала от коры, белого вещества и опухоли. На рис. 1 представлены типичные КП ОКТ-изображения нормальной коры головного

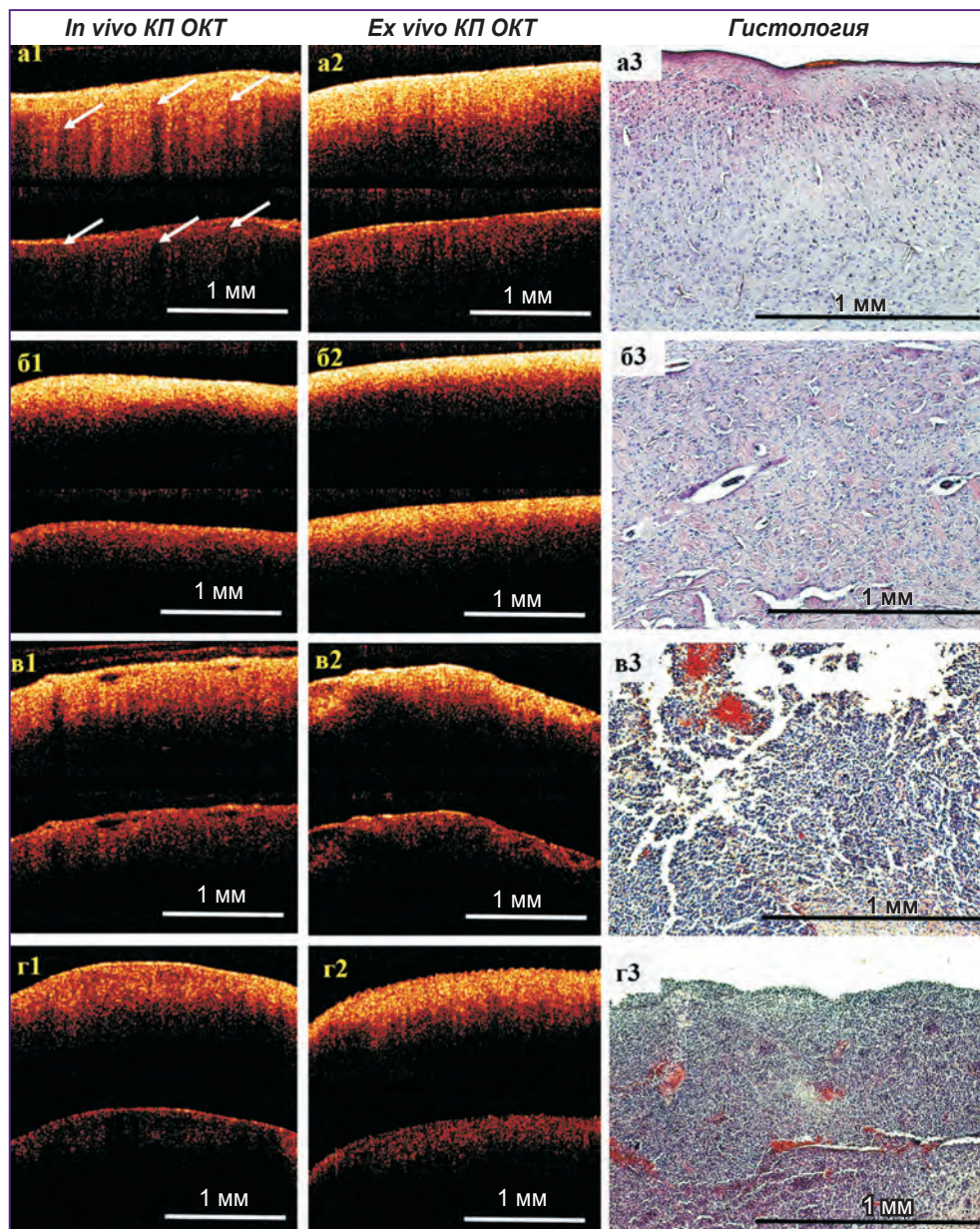


Рис. 1. КП ОКТ-изображения, полученные при исследовании *in vivo* (a1–г1) и *ex vivo* (a2–г2), и соответствующие гистологические препараты (a3–г3):

a1, a2 — нормальной коры головного мозга; б1, б2 — белого вещества в норме; в1, в2 — глиомы 101.8; г1, г2 — глиомы S6; КП ОКТ-изображения состоят из двух частей: верхняя часть изображения соответствует сигналу в исходной (ко-) поляризации, нижняя — в ортогональной (кросс-) поляризации; белыми стрелками обозначены «тени» от кровеносных сосудов (a1); ОКТ-сигнал на изображениях представлен в логарифмическом масштабе

мозга, белого вещества и глиом 101.8 и С6 *in vivo* (а1–а2) и *ex vivo* (а2–а2) и соответствующие гистологические изображения (а3–а3).

По характеру сигнала КП ОКТ-изображения, полученные *ex vivo*, визуально имеют более высокую интенсивность и скорость затухания (как в исходной, так и в ортогональной поляризациях) по сравнению с изображениями, полученными *in vivo*. Отдельно стоит отметить структурные различия между *ex vivo* и *in vivo* изображениями коры головного мозга. При исследовании *in vivo* КП ОКТ-изображения имеют характерную вертикальную исчерченность, возникающую за счет «теней» от поверхностно расположенных в ткани кровеносных сосудов (см. рис. 1, а1), которая практически исчезает при исследовании *ex vivo* вследствие вазоконстрикции (см. рис. 1, а2). При анализе КП ОКТ-изображений белого вещества и обеих экспериментальных опухолей принципиальных структурных различий в характере сигнала, получаемого при исследовании *ex vivo* и *in vivo*, не выявлено (см. рис. 1, б1–б2).

Белое вещество и опухоль могут быть дифференцированы по характеру КП ОКТ-сигнала, визуальные критерии были описаны ранее [25]. Белое вещество в норме на КП ОКТ-изображениях в обеих поляризациях имеет однородный сигнал в виде узкой полосы высокой интенсивности (см. рис. 1, б1, б2). Белое вещество образовано плотно упакованными миелиновыми нервными волокнами (рис. 1, б3), за счет чего способно эффективно рассеивать зондирующее излучение как в исходную, так и в ортогональную поляризации.

Опухолевая ткань образована неупорядоченно расположенными клетками различной формы и размеров, большим количеством сосудов (см. рис. 1, в3), встре-

чаются также очаги крупных и мелких кровоизлияний и некрозов, которые характерны для глиомы 101.8 (см. рис. 1, в3, в3). Эти морфологические особенности ткани обуславливают неоднородность ОКТ-сигнала в исходной и ортогональной поляризациях (рис. 1, в1, в2), причем в ортогональной поляризации неоднородность сигнала контрастнее. Степень обратного рассеяния света от мембран опухолевых клеток гораздо меньше по сравнению с миелиновой оболочкой нервного волокна (образованной большим количеством мембран), поэтому общая интенсивность ОКТ-сигнала от опухолей (см. рис. 1, в1, в2, г1, г2) существенно ниже по сравнению с белым веществом головного мозга (рис. 1, б1, б2). При этом КП ОКТ-изображение может быть достаточно однородным (см. рис. 1, г1, г2), если исследуемый участок опухоли не содержит некрозов или кровоизлияний, как показано на примере глиомы С6 (см. рис. 1, г3). Скорость затухания ОКТ-сигнала в этом случае низкая. Области кровоизлияний и некроза имеют сильные рассеивающие свойства и на КП ОКТ-изображениях представлены участками с высокой интенсивностью сигнала, тем самым они формируют выраженно неоднородный сигнал от опухолевой ткани, что продемонстрировано на примере глиомы 101.8 (см. рис. 1, в1, в2).

Сравнительный анализ *in vivo* и *ex vivo* КП ОКТ-изображений нормальных тканей головного мозга и глиом — количественная оценка. Сравнительный количественный анализ структурных КП ОКТ-данных выявил статистически значимые различия в значениях коэффициента затухания при исследовании *in vivo* и *ex vivo* белого вещества головного мозга и экспериментальных глиом (см. таблицу, рис. 2, б–в): значения коэффициента затухания от бе-

Коэффициенты затухания, получаемые при количественном анализе объемных КП ОКТ-данных нормальных тканей головного мозга и моделей злокачественных глиом *in vivo* и *ex vivo* (Me [Q1; Q3])

Объекты исследования	Коэффициент затухания, мм ⁻¹		Отношение коэффициентов <i>ex vivo/in vivo</i>	P (<i>ex vivo-in vivo</i>)
	<i>in vivo</i>	<i>ex vivo</i>		
Кора головного мозга	5,8 [4,9; 6,6] (n=11)	6,3 [5,5; 7,1] (n=17)	1,08	0,34
Белое вещество	7,5 [7,0; 8,0] (n=12)	9,0 [8,4; 9,5] (n=15)	1,20	0,0008
Глиома 101.8	5,5 [4,8; 5,8] (n=8)	7,0 [5,9; 8,1] (n=12)	1,27	0,007
Глиома С6	3,2 [2,4; 4,3] (n=8)	6,8 [6,2; 7,9] (n=9)	2,10	0,016
p (белое вещество–глиома 101.8)	0,0004	0,0001		
p (белое вещество–глиома С6)	0,004	0,0004		
p (белое вещество–кора)	0,0002	0,000007		
p (кора–глиома 101.8)	0,36	0,11		
p (кора–глиома С6)	0,01	0,51		

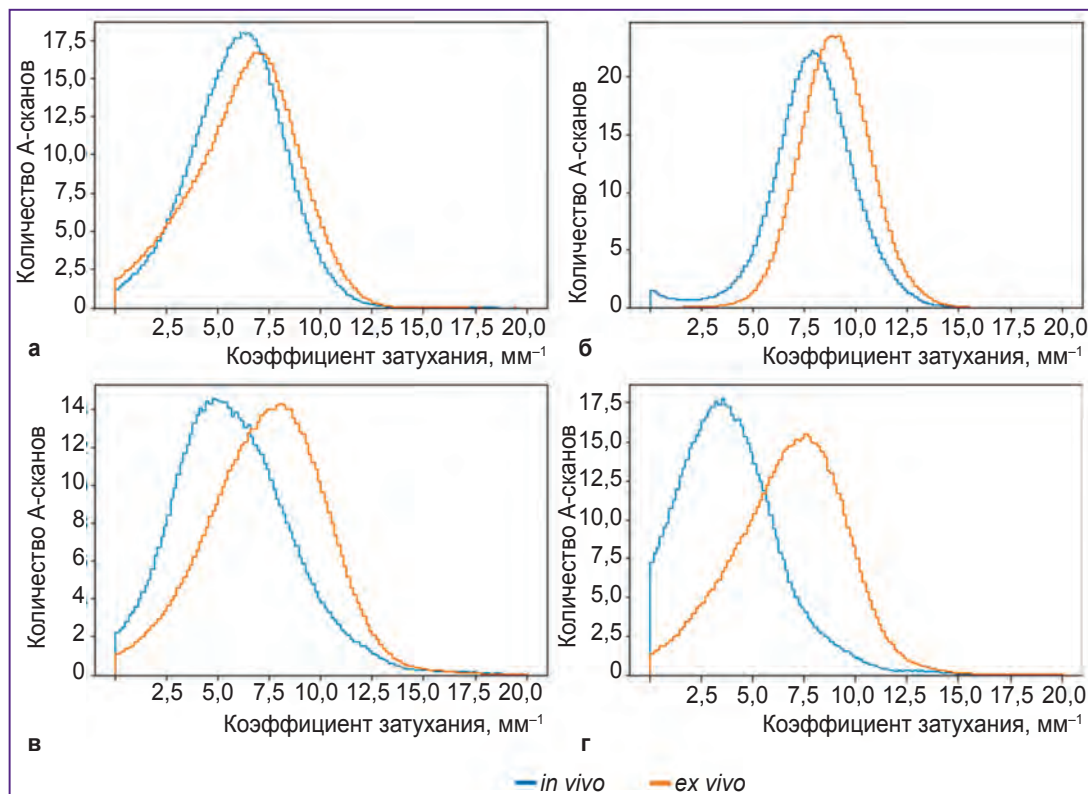


Рис. 2. Гистограммы распределения значений коэффициента затухания при исследовании *in vivo* и *ex vivo* разных типов ткани:

а — коры головного мозга в норме; **б** — белого вещества головного мозга в норме; **в** — экспериментальной глиомы 101.8; **г** — экспериментальной глиомы С6

лого вещества и глиом 101.8 и С6 при исследовании *ex vivo* выше по сравнению с таковыми при исследовании *in vivo*, что связано с уплотнением ткани вследствие уменьшения в ней количества жидкости [30]. Стоит отметить, что по данным визуальной оценки также заметно некоторое повышение интенсивности сигнала на *ex vivo* КП ОКТ-изображениях по сравнению с данными *in vivo* (см. рис. 1, *а1*, *а2*, *б1*, *б2*, *в1*, *в2*, *г1*, *г2*).

Для коры головного мозга по данным количественной оценки КП ОКТ-изображений также отмечена тенденция в повышении коэффициента затухания при исследовании *ex vivo* — 6,3 [5,5; 7,1] мм⁻¹ по сравнению с *in vivo* исследованием — 5,8 [4,9; 6,6] мм⁻¹, однако статистически значимого отличия не выявлено ($p=0,34$) (см. таблицу, рис. 2, *а*). Это можно объяснить завышением коэффициента затухания при его расчете по *in vivo* КП ОКТ-изображениям в связи с наличием в коре большого количества средних и крупных кровеносных сосудов, формирующих локальные области быстрого затухания ОКТ-сигнала по сравнению с тканью коры. Для получения более достоверных отличий необходима корректировка алгоритма расчета коэффициента затухания для КП ОКТ-изображений, получаемых *in vivo*, с учетом наличия кровеносных сосудов.

Сравнение коэффициентов затухания сигналов

от коры и белого вещества головного мозга в норме, а также от тканей головного мозга в норме и злокачественных глиом показало следующее. Выявлены статистически значимые различия между значениями коэффициента затухания сигналов от обеих опухолей и белого вещества как при анализе *in vivo* (см. таблицу, рис. 3, *в*), так и при анализе *ex vivo* (см. таблицу, рис. 3, *г*). Это согласуется с данными визуальной оценки типичных КП ОКТ-изображений экспериментальных опухолей и белого вещества, на которых белое вещество представлено узкой полосой сигнала высокой интенсивности и характеризуется быстрой скоростью спадания сигнала, а опухоль характеризуется менее интенсивным неоднородным сигналом с медленной скоростью его затухания.

Значения коэффициента затухания КП ОКТ-сигнала от коры головного мозга в норме также статистически значимо ниже по сравнению с данным параметром от белого вещества при исследовании *in vivo* (см. таблицу, рис. 3, *а*) и *ex vivo* (см. таблицу, рис. 3, *б*), однако сопоставимы со значениями коэффициентов от экспериментальных опухолей (см. таблицу, рис. 3, *д*, *е*).

Исключение в нашем исследовании составили полученные *in vivo* значения коэффициента затухания сигнала от глиомы С6, которые оказались статистически значимо ниже значений сигнала от коры (3,2 [2,4; 4,3]

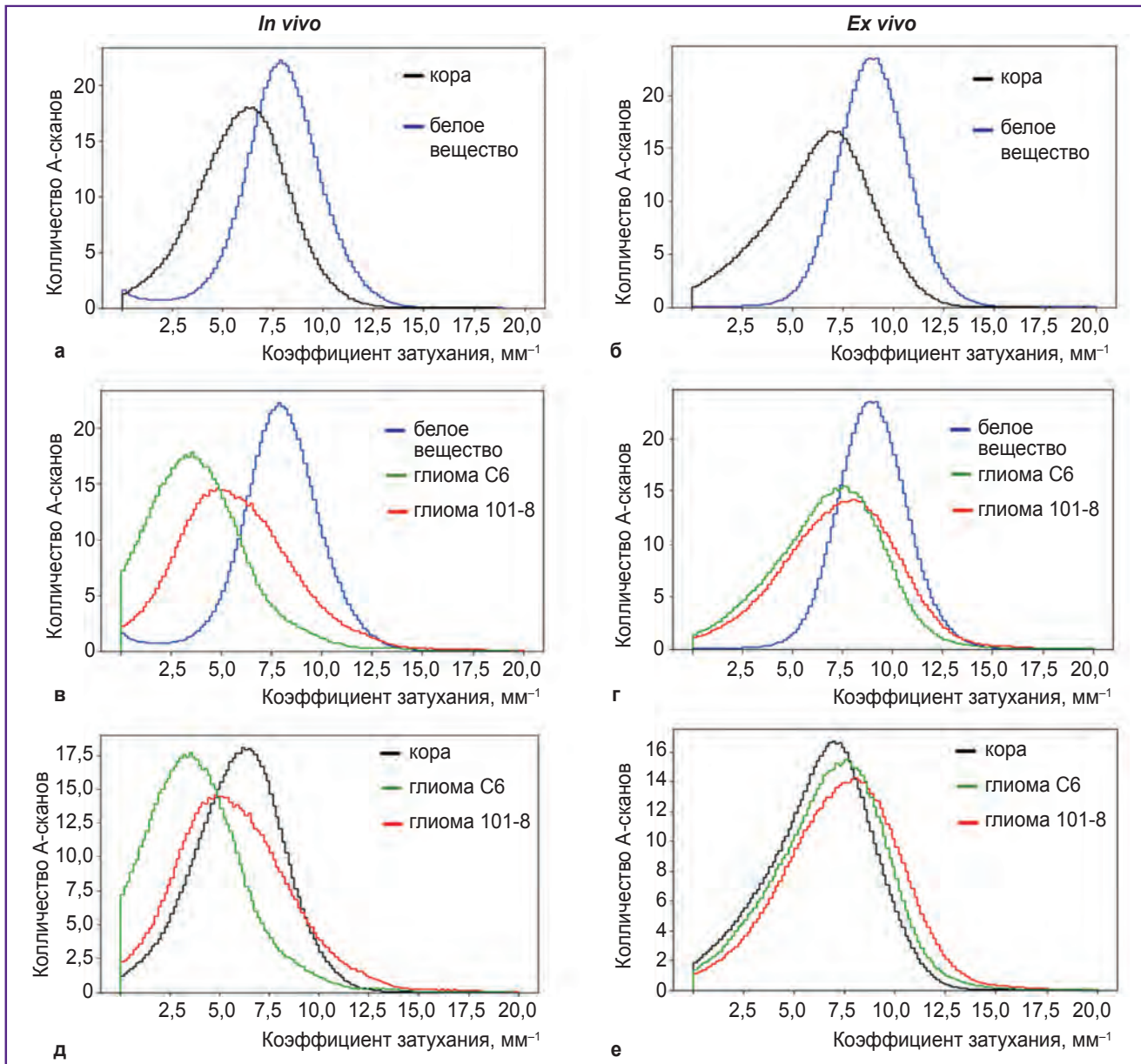


Рис. 3. Гистограммы распределения значений коэффициента затухания при сравнении разных типов тканей *in vivo* (а, в, д) и *ex vivo* (б, г, е):

а, б — белое вещество и кора головного мозга в норме; в, г — белое вещество в норме и экспериментальные глиомы 101.8 и С6; д, е — кора головного мозга в норме и экспериментальные глиомы 101.8 и С6

против 5,8 [4,9; 6,6] мм⁻¹; p=0,01). При этом коэффициент затухания КП ОКТ-сигнала от глиомы 101.8 при исследовании *in vivo* оказался сопоставим с коэффициентом затухания сигнала от коры головного мозга (5,5 [4,8; 5,8] против 5,8 [4,9; 6,6] мм⁻¹; p=0,36), что может быть обусловлено морфологическими особенностями данной модели в виде большого количества участков кровоизлияний и некротических изменений. При исследовании *ex vivo* различия становятся менее выраженными вследствие повышения значения коэффициента затухания КП ОКТ-сигнала в коре головного мозга.

Результаты данного исследования показали, что оп-

тические свойства нормальных тканей головного мозга, так же, как и злокачественных опухолей, меняются в зависимости от условий их изучения. Значения коэффициентов затухания при исследовании нормальных тканей и опухолей методом КП ОКТ *ex vivo* выше по сравнению с исследованием *in vivo*, при этом в случае белого вещества головного мозга и опухолей эти различия статистически значимы. Однако выявленная закономерность более высоких значений коэффициента затухания сигналов от белого вещества по сравнению со значениями от опухолей сохраняется как для *in vivo*, так и для *ex vivo* исследований, в то время

как для коры головного мозга эта закономерность не очевидна. Поэтому мы считаем, что использование результатов, полученных на образцах ткани *ex vivo*, при исследовании в *in vivo* условиях требует их корректировки.

Полученные в данном исследовании *ex vivo* результаты, показывающие статистически значимые отличия коэффициентов затухания сигналов от белого вещества и злокачественных моделей опухолей (9,0 [8,4; 9,5] мм⁻¹ белого вещества против 7,0 [5,9; 8,1] мм⁻¹ для глиомы 101.8; $p=0,001$ и против 6,8 [6,2; 7,9] мм⁻¹ для глиомы С6; $p=0,001$) хорошо согласуются с результатами работы [18], в которой на послеоперационных образцах показано, что значения коэффициента затухания сигнала от белого вещества головного мозга (6,2±0,8 мм⁻¹) статистически значимо выше ($p=0,002$) по сравнению с таковым от опухолевой ткани, взятой из центра опухоли высокой степени злокачественности (3,9±1,6 мм⁻¹). Более высокие коэффициенты затухания, полученные в нашем исследовании, могут быть обусловлены способом их вычисления. В отличие от работы [18], где коэффициенты считались по определенным областям интереса, составляющим часть ОКТ-изображения, с применением алгоритмов предварительного усреднения сигнала, в нашем исследовании способ вычисления коэффициентов затухания был упрощен: использовались все А-сканы объемного КП ОКТ-изображения без применения специальных алгоритмов подготовки изображений и устанавливался фиксированный для всех образцов диапазон расчета.

Заключение. Результаты сравнительного качественного и количественного анализа оптических свойств нормальной и опухолевой ткани головного мозга при исследовании методом КП ОКТ позволяют сделать следующие выводы:

при проведении дифференциации тканей *in vivo* на основании оптических коэффициентов, полученных на образцах ткани *ex vivo*, следует учитывать существующие различия в их значениях, например путем их пересчета с учетом соответствующего данному виду ткани отношения *ex vivo* и *in vivo* коэффициентов;

вследствие различий в характере ОКТ-сигнала и значениях коэффициента затухания сигналов у злокачественных глиом и белого вещества головного мозга, а также у белого вещества и коры при исследовании как *in vivo*, так и *ex vivo* критерии визуальной и количественной оценки КП ОКТ-данных, полученных *ex vivo*, могут быть с определенной степенью достоверности применены для интерпретации *in vivo* сигнала. Исключение составляет кора головного мозга, структурные особенности которой при прижизненном исследовании не характерны для других видов тканей, что позволяет легко дифференцировать ее даже при визуальной оценке.

Финансирование исследования. Проведение экспериментального исследования, количественная обработка и статистический анализ результатов выпол-

нены в рамках гранта, финансируемого Российским научным фондом, договор №16-15-10391 (ЕБК, КСЯ, МАС, ЛБТ, НДГ); метод определения оптических коэффициентов — при поддержке РФФИ, договор №16-32-60178 мол_а_дк (ААМ).

Конфликт интересов. У авторов нет конфликта интересов.

Литература/References

1. Potapov A.A., Goryaynov S.A., Okhlopkov V.A., Pitskhelauri D.I., Kobayakov G.L., Zhukov V.Y., Gol'bin D.A., Svistov D.V., Martynov B.V., Krivoshapkin A.L., Gaytan A.S., Anokhina Y.E., Varyukhina M.D., Gol'dberg M.F., Kondrashov A.V., Chumakova A.P. Clinical guidelines for the use of intraoperative fluorescence diagnosis in brain tumor surgery. *Zh Vopr Neurokhir Im N N Burdenko* 2015; 79(5): 91–101, <https://doi.org/10.17116/neiro201579591-101>.
2. Selbekk T., Jakola A.S., Solheim O., Johansen T.F., Lindseth F., Reinertsen I., Unsgard G. Ultrasound imaging in neurosurgery: approaches to minimize surgically induced image artefacts for improved resection control. *Acta Neurochir (Wien)* 2013; 155(6): 973–980, <https://doi.org/10.1007/s00701-013-1647-7>.
3. Семин П.А., Кривошапкин А.Л., Мелиди Е.Г., Каныгин В.В. Безрамочная нейронавигация в хирургии объемных образований головного мозга. *Нейрохирургия* 2004; 2: 20–24. Semin P.A., Krivoshapkin A.L., Melidi E.G., Kanygin V.V. Frameless neuronavigation and its application in the course of surgery of cerebral mass lesions. *Neyrokhirurgiya* 2004; 2: 20–24.
4. Fahlbusch R., Samii A. Editorial: Intraoperative MRI. *Neurosurg Focus* 2016; 40(3): E3, <https://doi.org/10.3171/2015.12.focus15631>.
5. Almeida J.P., Chaichana K.L., Rincon-Torroella J., Quinones-Hinojosa A. The value of extent of resection of glioblastomas: clinical evidence and current approach. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2014; 15(2): 517, <https://doi.org/10.1007/s11910-014-0517-x>.
6. Díez Valle R., Tejada Solis S., Idoate Gastearena M.A., García de Eulate R., Domínguez Echávarri P., Aristu Mendiroz J. Surgery guided by 5-aminolevulinic fluorescence in glioblastoma: volumetric analysis of extent of resection in single-center experience. *J Neurooncol* 2011; 102(1): 105–113, <https://doi.org/10.1007/s11060-010-0296-4>.
7. Sanai N., Berger M.S. Extent of resection influences outcomes for patients with gliomas. *Rev Neurol (Paris)* 2011; 167(10): 648–654, <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2011.07.004>.
8. Stummer W., Pichlmeier U., Meinel T., Wiestler O.D., Zanella F., Reulen H.J. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol* 2006; 7(5): 392–401, [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(06\)70665-9](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(06)70665-9).
9. Vasefi F., MacKinnon N., Farkas D.L., Kateb B. Review of the potential of optical technologies for cancer diagnosis in neurosurgery: a step toward intraoperative neurophotonics. *Neurophotonics* 2016; 4(1): 011010, <https://doi.org/10.1117/1.nph.4.1.011010>.
10. Yashin K.S., Kravets L.Y., Gladkova N.D., Gelikonov G.V., Medyanik I.A., Karabut M.M., Kiseleva E.B., Shilyagin P.A. Optical coherence tomography in neurosurgery.

Zh Vopr Neurokhir Im N N Burdenko 2017; 81(3): 107–115, <https://doi.org/10.17116/neiro2017813107-115>.

11. Kantelhardt S.R., Kalasauskas D., König K., Kim E., Weinigel M., Uchugonova A., Giese A. In vivo multiphoton tomography and fluorescence lifetime imaging of human brain tumor tissue. *J Neurooncol* 2016; 127(3): 473–482, <https://doi.org/10.1007/s11060-016-2062-8>.

12. Böhringer H.J., Lankenau E., Stellmacher F., Reusche E., Hüttmann G., Giese A. Imaging of human brain tumor tissue by near-infrared laser coherence tomography. *Acta Neurochir (Wien)* 2009; 151(5): 507–517, <https://doi.org/10.1007/s00701-009-0248-y>.

13. Herrero-Garibi J., Cruz-Gonzalez I., Parejo-Diaz P., Jang I.K. Optical coherence tomography: its value in intravascular diagnosis today. *Rev Esp Cardiol* 2010; 63(8): 951–962, [https://doi.org/10.1016/s1885-5857\(10\)70189-4](https://doi.org/10.1016/s1885-5857(10)70189-4).

14. Mathews M.S., Su J., Heidari E., Levy E.I., Linskey M.E., Chen Z. Neuroendovascular optical coherence tomography imaging and histological analysis. *Neurosurgery* 2011; 69(2): 430–439, <https://doi.org/10.1227/neu.0b013e318212bcb4>.

15. Lankenau E.M., Krug M., Oelckers S., Schrage N., Just T., Hüttmann G. iOCT with surgical microscopes: a new imaging during microsurgery. *Advanced Optical Technologies* 2013; 2(3), <https://doi.org/10.1515/aot-2013-0011>.

16. Zagaynova E., Gladkova N., Shakhova N., Gelikonov G., Gelikonov V. Endoscopic OCT with forward-looking probe: clinical studies in urology and gastroenterology. *J Biophotonics* 2008; 1(2): 114–128, <https://doi.org/10.1002/jbio.200710017>.

17. Sun C., Lee K.K., Vuong B., Cusimano M.D., Brukson A., Mauro A., Munce N., Courtney B.K., Standish B.A., Yang V.X. Intraoperative handheld optical coherence tomography forward-viewing probe: physical performance and preliminary animal imaging. *Biomed Opt Express* 2012; 3(6): 1404–1412, <https://doi.org/10.1364/boe.3.001404>.

18. Kut C., Chaichana K.L., Xi J., Raza S.M., Ye X., McVeigh E.R., Rodriguez F.J., Quinones-Hinojosa A., Li X. Detection of human brain cancer infiltration ex vivo and in vivo using quantitative optical coherence tomography. *Sci Transl Med* 2015; 7(292): 292ra100, <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3010611>.

19. Böhringer H.J., Boller D., Leppert J., Knopp U., Lankenau E., Reusche E., Hüttmann G., Giese A. Time-domain and spectral-domain optical coherence tomography in the analysis of brain tumor tissue. *Lasers Surg Med* 2006; 38(6): 588–597, <https://doi.org/10.1002/lsm.20353>.

20. Bizheva K., Unterhuber A., Hermann B., Povazay B., Sattmann H., Fercher A.F., Drexler W., Preusser M., Budka H., Stingl A., Le T. Imaging ex vivo healthy and pathological human brain tissue with ultra-high-resolution optical coherence tomography. *J Biomed Opt* 2005; 10(1): 11006, <https://doi.org/10.1117/1.1851513>.

21. Boppart S.A., Brezinski M.E., Pitris C., Fujimoto J.G. Optical coherence tomography for neurosurgical imaging of human intracortical melanoma. *Neurosurgery* 1998; 43(4): 834–841, <https://doi.org/10.1097/00006123-199810000-00068>.

22. Yuan W., Kut C., Liang W., Li X. Robust and fast characterization of OCT-based optical attenuation using a novel frequency-domain algorithm for brain cancer detection. *Sci Rep* 2017; 7: 44909, <https://doi.org/10.1038/srep44909>.

23. Gubarkova E.V., Kirillin M.Y., Dudenkova V.V., Timashev P.S., Kotova S.L., Kiseleva E.B., Timofeeva L.B., Belkova G.V., Solovieva A.B., Moiseev A.A., Gelikonov G.V., Fiks I.I., Feldchtein F.I., Gladkova N.D. Quantitative evaluation of atherosclerotic plaques using cross-polarization optical coherence tomography, nonlinear, and atomic force microscopy. *J Biomed Opt* 2016; 21(12): 126010, <https://doi.org/10.1117/1.jbo.21.12.126010>.

24. 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>.

25. Yashin K.S., Karabut M.M., Fedoseeva V.V., Khalansky A.S., Matveev L.A., Elagin V.V., Kuznetsov S.S., Kiseleva E.B., Kravets L.Y., Medyanik I.A., Gladkova N.D. Multimodal optical coherence tomography in visualization of brain tissue structure at glioblastoma (experimental study). *Sovremennye tehnologii v medicine* 2016; 8(1): 73–81, <https://doi.org/10.17691/stm2016.8.1.10>.

26. Yashin K.S., Gubarkova E., Kiseleva E., Kuznetsov S.S., Karabut M.M., Medyanik I.A., Kravets L.Y., Gladkova N.D. Ex vivo imaging of human gliomas by cross-polarization optical coherence tomography: pilot study. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2016; 8(3): 14–22, <https://doi.org/10.17691/stm2016.8.4.02>.

27. Халанский А.С., Кондакова Л.И., Гельперина С.Э. Перевиваемый штамм глиомы крысы 101.8. II. Использование в качестве модели для экспериментальной терапии опухолей мозга. *Клиническая и экспериментальная морфология* 2014; 1(9): 50–59. Khalansky A.S., Kondakova L.I., Gelperina S.E. Transplanted rat glioma 101.8. II. The application in experimental neurooncology and therapy. *Klinicheskaya i eksperimental'naya morfologiya* 2014; 1(9): 50–59.

28. Gelikonov V.M., Gelikonov G.V. New approach to cross-polarized optical coherence tomography based on orthogonal arbitrarily polarized modes. *Laser Physics Letters* 2006; 3(9): 445–451, <https://doi.org/10.1002/lapl.200610030>.

29. Matveev L.A., Zaitsev V.Y., Gelikonov G.V., Matveyev A.L., Moiseev A.A., Ksenofontov S.Y., Gelikonov V.M., Sirotkina M.A., Gladkova N.D., Demidov V., Vitkin A. Hybrid M-mode-like OCT imaging of three-dimensional microvasculature in vivo using reference-free processing of complex valued B-scans. *Opt Lett* 2015; 40(7): 1472–1475, <https://doi.org/10.1364/ol.40.001472>.

30. Rodriguez C.L., Szu J.I., Eberle M.M., Wang Y., Hsu M.S., Binder D.K., Park B.H. Decreased light attenuation in cerebral cortex during cerebral edema detected using optical coherence tomography. *Neurophotonics* 2014; 1(2): 025004, <https://doi.org/10.1117/1.nph.1.2.025004>.