

**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский
университет» Минздрава России**

На правах рукописи

Ачкасова Ксения Андреевна

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ БЕЛОГО ВЕЩЕСТВА
ПЕРИТУМОРАЛЬНОЙ ОБЛАСТИ ГОЛОВНОГО МОЗГА МЕТОДОМ
ОПТИЧЕСКОЙ КОГЕРЕНТНОЙ ТОМОГРАФИИ**

1.5.2. – биофизика

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
д.м.н., профессор Н.Д. Гладкова

Нижний Новгород – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
Введение	5
Глава 1. Обзор литературы	16
1.1. Структурные изменения белого вещества, возникающие при опухолях головного мозга	18
1.2. Методы оценки состояния белого вещества в клинике и в эксперименте	25
Глава 2 Объекты и методы исследования	48
2.1 Объекты исследования	48
2.2 Методы исследования	56
2.3. Методики исследования	59
2.4. Анализ данных, полученных методом оптической когерентной томографии	60
2.5. Оценка гистологических и иммуногистохимических срезов	63
2.6. Статистическая обработка полученных данных	67
Глава 3. Результаты	70
3.1. Подбор оптимальных параметров для расчета и представления коэффициента затухания, вычисляемого по ОКТ данным мозговой ткани ...	70
3.2. Результаты вычисления коэффициента затухания нормального белого вещества головного мозга и его взаимосвязь со морфологическим строением ткани, определенным путем цифровой обработки ИГХ изображений (материал аутопсий)	74
3.2.1. Анализ коэффициента затухания различных зон нормального белого вещества	75
3.2.2. Морфологические характеристики различных зон нормального белого вещества	76
3.2.3. Взаимосвязь между коэффициентом затухания и структурой нормального белого вещества	80

3.3. Результаты оценки изменения коэффициента затухания белого вещества головного мозга при развитии глиальных опухолей у экспериментальных животных.....	81
3.3.1 Исследование изменения коэффициента затухания белого вещества головного мозга крыс под влиянием роста опухоли 101/8	83
3.3.2. Исследование изменения коэффициента затухания белого вещества головного мозга крыс под влиянием роста опухоли 10-17-2.....	85
3.3.3 Исследование изменения коэффициента затухания белого вещества головного мозга крыс под влиянием роста опухоли С6	88
3.4 Результаты <i>ex vivo</i> оценки коэффициента затухания белого вещества перитуморальной зоны глиальных опухолей пациентов	92
3.4.1 Исследование морфологических характеристик образцов	92
3.4.2 Анализ коэффициента затухания неповрежденного белого вещества, поврежденного белого вещества и опухоли	94
3.4.3 Визуальный анализ цветокодированных оптических карт неповрежденного белого вещества, поврежденного белого вещества и опухоли	96
3.4.4 Диагностическая точность применения коэффициента затухания ОКТ сигнала для разграничения поврежденного белого вещества от нормального белого вещества и опухолевой ткани.....	99
3.4.5 Клинический пример применения ОКТ в ходе резекции опухоли....	101
Глава 4. Обсуждение результатов	103
Заключение	111
Выводы	114
Список использованных источников	116

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВКМ – внеклеточный матрикс

ГТГ – генерация третьей гармоники

ГЭ – гематоксилин-эозин

ДАБ – диаминобензидин

ДТ-МРТ – диффузионно-тензорная магнитно-резонансная томография

ИГХ – иммуногистохимическое исследование

КФА – коэффициент фракционной анизотропии

МРТ – магнитно-резонансная томография

МФМ – мультифотонная микроскопия

МФТ – мультифотонная томография

ОКТ – оптическая когерентная томография

ПКЯ – параметр количества клеточных ядер

СПВ – структурный параметр волокон

УЗИ – ультразвуковое исследование

ЦНС – центральная нервная система

МВР – *Myelin Basic Protein*, основной белок миелина

Введение

Актуальность и степень разработки темы исследования

Злокачественные опухоли являются второй по распространенности причиной смерти пациентов по всему миру, ежегодно унося жизни 10 миллионов человек. При этом, более 250 тысяч человек ежегодно умирают в связи с опухолями головного мозга [1].

Основная парадигма лечения пациентов с данной патологией основывается на достижении максимально возможной продолжительности жизни при одновременном сохранении ее высокого качества. Для достижения данной цели используется ряд методов лечения: хирургическая резекция опухоли, лучевая и химиотерапия. Активное комбинированное лечение позволяет замедлить рост опухоли, а также увеличить продолжительность жизни пациентов после постановки диагноза. Однако, несмотря на все достижения в области диагностики и лечения новообразований головного мозга, развитие опухоли приводит к ухудшению функционального статуса пациента в связи с формированием моторного, речевого или когнитивного дефицита.

Развитие неврологического дефицита зависит от месторасположения опухоли и, в основном, связано с ее инфильтративным ростом в окружающее белое вещество головного мозга, которое обеспечивает взаимосвязь между разными отделами ЦНС и, тем самым, обуславливает адекватное функционирование организма [2]. Инвазия опухолевых клеток в белое вещество приводит к формированию морфологических и функциональных изменений, что, в дальнейшем, влечет за собой нарушение проведения нервного импульса [3].

Однако, инфильтративный рост опухоли является не единственным фактором, оказывающим негативное влияние на ткань белого вещества. Области проводящих путей могут подвергаться разрушению в результате применения различных методов лечения. В частности, хирургическое

удаление опухоли является важнейшим этапом лечения новообразований головного мозга, позволяющим снизить уровень внутричерепного давления и выраженность неврологического дефицита. Однако, необходимо понимать, что в ходе проведения хирургического вмешательства возможно случайное механическое повреждение здоровых проводящих путей, что связано с отсутствием метода диагностики, позволяющего провести интраоперационную оценку морфологического состояния белого вещества в перитуморальной области [4].

Принимая во внимание значительную роль белого вещества в организации адекватной функциональной активности головного мозга и его низкую степень пластичности по сравнению с корой больших полушарий, исследование его повреждений, возникающих при злокачественных опухолях головного мозга, является важной научно-практической задачей. Возможность малоинвазивного (не нарушающего целостность ткани) прижизненного определения морфологического статуса белого вещества позволит увеличить качество проводимых опухолевых резекций, а также снизить риск формирования послеоперационных осложнений, связанных с повреждением проводящих путей.

В настоящее время единственным методом, активно применяющимся в клинической практике для прижизненного исследования состояния проводящих путей головного мозга, является диффузионно-тензорная магнитно-резонансная томография (ДТ-МРТ). Она позволяет провести качественную оценку взаиморасположения опухоли и трактов белого вещества, а также количественно оценить ориентацию и степень сохранности нервных волокон путем вычисления коэффициентов фракционной анизотропии и измеряемого коэффициента диффузии [5, 6]. Данная технология активно применяется на предоперационном этапе, позволяя выбрать хирургический доступ к опухолевому очагу, минуя здоровые проводящие пути [7]. Несмотря на огромные преимущества метода ДТ-МРТ, заключающиеся в его прижизненности и неинвазивности, его применение

имеет ряд ограничений. В частности, следует отметить недостаточную разрешающую способность, а также невозможность проведения интраоперационной диагностики структурных особенностей белого вещества в конкретной интересующей области интереса, связанную с возможным несоответствием между МРТ изображениями и реальным расположением тканей вследствие феномена смещения мозговых структур (англ. “brain shift”), вызванного изменением уровня внутричерепного давления после вскрытия твердой мозговой оболочки [8].

Интраоперационные методы, применяемые для обнаружения опухоли, включают в себя методы флуоресцентной диагностики, а также интраоперационное УЗИ. Использование данных технологий направлено исключительно на обнаружение опухолевой ткани при определении границ резекции и не позволяет с высоким разрешением провести исследование перитуморальной области, чтобы в ходе операции обнаружить и удалить области слабой инфильтрации/повреждения белого вещества и избежать раннего рецидива [9, 10].

Таким образом, существует необходимость поиска и применения метода, который в отличие от интраоперационного УЗИ обладает более высокой разрешающей способностью, и в отличие от флуоресцентной диагностики не требует использования дополнительных контрастных агентов, а также обеспечивает возможность получения объективных данных о структуре ткани в режиме реального времени с высоким контрастом.

Как уже было сказано, инфильтративный рост злокачественных опухолей, а также применение различных методов лечения данной патологии, оказывает ряд влияний на белое вещество, что приводит к формированию структурных изменений в тканях головного мозга. Известно, что структурные компоненты нервной ткани обуславливают ее рассеивающие свойства [11, 12]. Вследствие этого, возможно выдвинуть предположение о том, что развитие морфологических изменений белого вещества может быть обнаружено путем детектирования изменений его рассеивающих свойств.

В связи с этим, перспективным методом для визуализации структуры белого вещества головного мозга является оптическая когерентная томография (ОКТ) [13]. Принцип работы данной технологии основывается на использовании оптического излучения ближнего инфракрасного диапазона длин волн с последующей регистрацией обратно рассеянного излучения. Метод ОКТ характеризуется возможностью проведения прижизненных неинвазивных исследований без использования дополнительных контрастных агентов, высокой разрешающей способностью, возможностью быстрого получения информации о внутренней структуре тканей в режиме реального времени [14].

Существует ряд исследований, направленных на изучение нервных тканей при новообразованиях головного мозга с помощью ОКТ [15-19]. При этом для анализа ОКТ сигнала используют как визуальный [20], так и количественный анализ ОКТ изображений, основанный на вычислении коэффициента затухания [21]. Расчет коэффициента затухания (μ) является объективным и общепринятым подходом, описывающим исчезновение ОКТ сигнала с глубиной вследствие рассеяния и поглощения зондирующего излучения, и используется при оценке самых разнообразных тканей [22-26]. В ряде работ, показано, что вычисление коэффициента затухания ОКТ сигнала позволяет отличать нормальные ткани мозга от опухолевых [17, 21, 27, 28].

Однако до сих пор не проводилось прицельное изучение изменения коэффициента затухания белого вещества в перитуморальной зоне, где белое вещество повреждено вследствие инфильтративного роста опухоли, в частности:

- Отсутствуют работы, убедительно доказывающие взаимосвязь между структурой белого вещества и его коэффициентом затухания.
- Нет данных о влиянии структурных повреждений белого вещества, возникающих при опухолевом росте, на его коэффициент затухания и возможности получения информации о морфологическом статусе белого вещества методом ОКТ.

- Существует необходимость определения диагностической точности применения коэффициента затухания ОКТ сигнала для разграничения областей поврежденного белого вещества от зон неповрежденного белого вещества и опухолевой ткани с целью определения возможности применения ОКТ для определения границ резекции опухолей головного мозга.

Цель и задачи исследования

Цель работы состояла в определении признаков поврежденного белого вещества в перитуморальной области глиом головного мозга на основе коэффициента затухания ОКТ сигнала, измеряемого по данным оптической когерентной томографии.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Получить ОКТ изображения различных областей тканей головного мозга человека. На их основе подобрать оптимальные параметры для расчета и демонстрации коэффициента затухания ОКТ сигнала мозговой ткани.
2. Определить значения коэффициента затухания белого вещества в норме, используя модель неизменных миелиновых волокон различных областей аутопсийного головного мозга, и установить корреляцию полученных значений с морфологическим строением ткани.
3. Изучить изменения коэффициента затухания белого вещества, возникающие в результате развития глиальных опухолей, на животных экспериментальных моделях.
4. Изучить изменения коэффициента затухания белого вещества у пациентов с глиомами головного мозга и сформулировать ОКТ признаки неповрежденного и поврежденного белого вещества.
5. Определить диагностическую точность коэффициента затухания ОКТ сигнала для разграничения неповрежденного и поврежденного белого

вещества, а также поврежденного белого вещества и опухоли головного мозга

Научная новизна результатов

Впервые подобраны параметры расчета и демонстрации коэффициента затухания ОКТ сигнала для мозговой ткани.

Впервые установлена корреляция между коэффициентом затухания ОКТ сигнала нормального белого вещества головного мозга и характером расположения миелиновых волокон (тип укладки, толщина), определенных на основании численной обработки иммуногистохимических (ИГХ) изображений.

Впервые установлено, что инфильтративный рост глиальных опухолей снижает коэффициент затухания ОКТ сигнала белого вещества перитуморальной области головного мозга, в сравнении с нормой.

Впервые сформулированы признаки цветокодированных карт коэффициента затухания, соответствующие перитуморальному белому веществу с поврежденными миелиновыми волокнами при глиомах мозга.

Впервые определена диагностическая точность коэффициента затухания ОКТ сигнала для разграничения неповрежденного и поврежденного белого вещества; поврежденного белого вещества и опухоли, чем обоснована возможность интраоперационного использования данного метода для определения морфологического статуса ткани в перитуморальной области.

Научно-практическая значимость работы

Проведенное исследование демонстрирует высокую диагностическую ценность коэффициента затухания для обнаружения областей поврежденного белого вещества с целью нейронавигации в хирургии опухолей головного мозга. Дальнейшее развитие метода позволит осуществить внедрение ОКТ в клиническую практику врачей-нейрохирургов с последующим его

применением в ходе резекций опухолей головного мозга, а также стереотаксических биопсий.

Основные результаты работы могут быть включены в соответствующие разделы лекций и спецкурсов по биофизике, биомедицине и биофотонике.

Методология и методы исследования

Работа представляет собой клиничко-экспериментальное исследование, включающее в себя следующие этапы: 1) исследование материала аутопсий, полученных от 3-х пациентов, умерших от экстракраниальных патологий; 2) экспериментальное исследование на моделях глиальных опухолей у лабораторных животных; 3) исследование послеоперационных образцов ткани головного мозга, полученных от пациентов с опухолями головного мозга в ходе резекций.

В исследовании использованы оптические, гистологические и иммуногистохимические методы исследования структуры биотканей, а также статистические методы обработки данных.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Установленные корреляционные зависимости между коэффициентом затухания ОКТ сигнала и количественными параметрами, вычисляемыми по ИГХ изображениям, свидетельствуют о возможности прижизненного применения ОКТ для определения структурных особенностей ткани белого вещества, в частности, характера расположения и повреждения миелиновых волокон.
2. Снижение значений коэффициента затухания ОКТ сигнала белого вещества при росте и развитии глиальных опухолей свидетельствует о формировании таких патоморфологических изменений в белом веществе, как разрушение миелиновых волокон, отек ткани, инфильтрация опухолевыми клетками.

3. Диагностическая точность оценки коэффициента затухания ОКТ сигнала для дифференцировки областей поврежденного белого вещества головного мозга от неповрежденного при использовании порогового значения коэффициента равного $9,2 \text{ мм}^{-1}$ составляет 77,4%; для дифференцировки поврежденного белого вещества от глиальной опухоли при использовании порогового значения коэффициента равного $6,6 \text{ мм}^{-1}$ составляет 71,3%.
4. Расчет коэффициента затухания ОКТ сигнала и построение на его основе цветокодированных карт позволяет надежно обнаружить области белого вещества, характеризующиеся разрушением миелиновых волокон, инфильтрацией опухолевыми клетками и отеком, и разграничивать данные участки от неповрежденного белого вещества и опухолевой массы. Метод ОКТ может быть предложен для интраоперационного использования в реальном времени с целью выявления поврежденного перитуморального белого вещества, необходимого для определения предельно допустимой зоны резекции глиом головного мозга.

Личный вклад автора

Личное участие автора заключалось в постановке и проведении экспериментальных исследований, в получении всех видов изображений, систематизации, анализе всех полученных данных и формулировании выводов по работе. Планирование исследований, обсуждение и обобщение полученных результатов осуществлялось совместно с д.м.н. профессором Н.Д. Гладковой. Физико-математическая разработка методов расчета коэффициентов затухания и количественной обработки иммуногистохимических изображений осуществлялась старшим научным сотрудником ИПФ РАН, к. ф.-м. н. Моисеевым А.А. Морфологическая оценка полученных гистологических изображений осуществлялась совместно с врачом-патоморфологом Бедериной Е.Л.

Степень достоверности результатов

Результаты исследования были получены путем использования современных методов исследования и обработки информации и основаны на данных, объем которых обуславливает статистическую достоверность. Статистическая обработка данных проводилась с помощью программных пакетов GraphPad Prism 8.0, SPSS Statistics 26.

Апробация работы, внедрение результатов работы в практику

Основные результаты диссертационного исследования были представлены и обсуждены на 7 международных, 9 всероссийских, 3 региональных конференциях, 3 научных конкурсах, 7 докладов отмечены дипломами за лучшее выступление.

Материалы работы доложены на V, VI, VII, VIII Всероссийских конференциях молодых ученых и студентов с международным участием “VolgaMedScience” (Нижний Новгород, 2019, 2020, 2021, 2022), где отмечены дипломами I и II степени; на 19 Международной конференции «Оптика лазеров» (онлайн, Санкт-Петербург) (2020); на VIII Международном симпозиуме по оптике и биофотонике “Saratov Fall Meeting” (Саратов, 2020); IX Областном конкурсе молодежных инновационных команд «РОСТ 2020» (Нижний Новгород, 2020), где отмечены дипломом II степени; на VII Троицкой конференции с международным участием «Медицинская физика» (онлайн, Москва, 2020); на 25, 26, 27 Нижегородских сессиях молодых ученых (Нижний Новгород, 2020, 2021, 2022), где дважды отмечены дипломами II степени; на международных форумах “SPIE Photonics West” (онлайн-форум, Сан-Франциско, США, 2021, 2022); на международном форуме “European Conferences on Biomedical Optics” (онлайн-форум, Мюнхен, Германия, 2021); на 74 и 75 Всероссийских с международным участием школах-конференциях молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление» (Нижний Новгород, 2021, 2022), где отмечены дипломом III степени; в финале VII Всероссийского конкурса научно-исследовательских работ студентов и

аспирантов в рамках форума "Наука будущего - наука молодых" (Новосибирск, 2022); на III объединенном научном форуме физиологов, биохимиков и Молекулярных биологов, VII съезде биохимиков России, X Российском симпозиуме «Белки и пептиды», VII съезде физиологов СНГ (Сочи, 2022); в финале Всероссийского молодежного научного конкурса #ВЦЕНТРЕНАУКИ (г. Сочи, федеральная территория Сириус, 2022), где отмечены дипломом победителя; на VII Съезде биофизиков России (г. Краснодар, 2023); на Международной конференции “Volga Neuroscience Meeting 2023” (г. Дзержинск, 2023); на 30й Международной конференции Advanced Laser Technologies (ALT’23) (г. Самара, 2023).

Результаты диссертационного исследования внедрены в научно-исследовательскую работу научной лаборатории оптической когерентной томографии НИИ Экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России.

Апробация диссертации была проведена 04.09.2023 на Ученом совете НИИ Экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России.

Публикации

По материалам диссертации опубликованы 27 печатных работ, из них 5 научных статей в научных рецензируемых изданиях, входящих в перечень ВАК, индексируемых в Web of Science и Scopus, 3 главы в книгах и 19 публикаций в сборниках материалов научных конференций.

Конкурсная поддержка работы.

Проведенные исследования поддержаны Российским фондом фундаментальных исследований (проект №18-29-01049_мк, 2018-2020 гг.). Получен грант Российского научного фонда под руководством автора работы

на проведение фундаментальных научных исследований (проект № 23-25-00118, 2023-2024 гг.).

Структура и объем работы

Диссертация включает в себя введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследований, результаты и их обсуждение, заключение, выводы и список литературы. Работа изложена на 136 страницах, содержит 8 таблиц и 41 рисунок. Список литературы состоит из 158 источников, из них 144 зарубежных.

Глава 1. Обзор литературы

Белое вещество составляет около 40% ткани центральной нервной системы (ЦНС) у людей [29]. Оно формирует проводящие пути (тракты), которые соединяют разные области ЦНС между собой, и представляет собой многокомпонентную структуру, содержащую нервные волокна, а также клеточные элементы (рисунок 1).

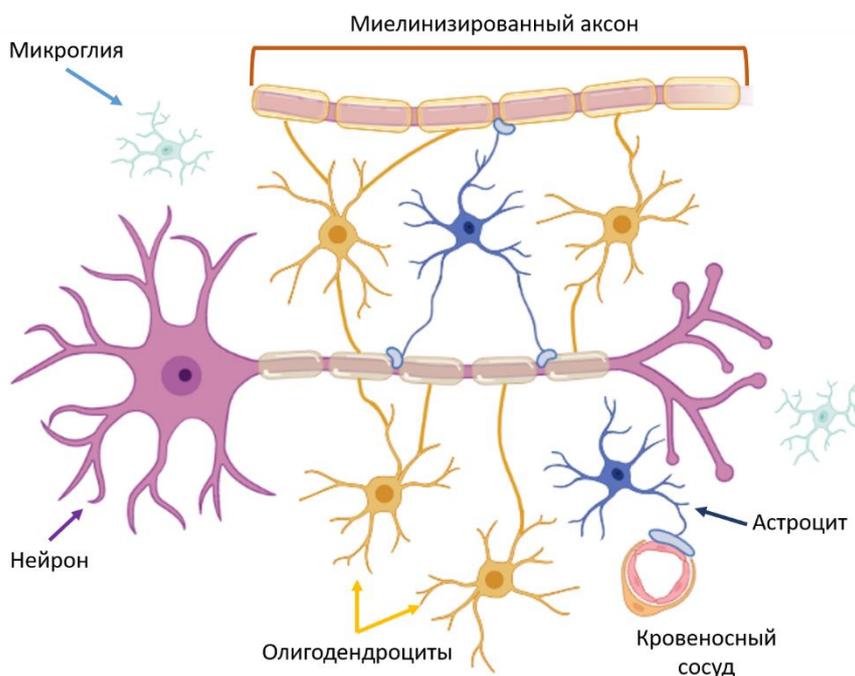


Рисунок 1. Компоненты белого вещества головного мозга (biorender.com).

Основной структурно-функциональной единицей белого вещества является миелиновое нервное волокно, сформированное аксональным отростком нейрона, покрытым миелиновой оболочкой. Помимо аксонов белое вещество содержит глиальные клетки, подразделяющиеся на две больших группы: макро- и микроглия. К клеткам макроглии относятся три разновидности клеток: астроциты, олигодендроциты и NG2-позитивные клетки, которые являются предшественниками астроцитов и олигодендроцитов. Астроциты – клетки звездчатой формы, выполняющие различные функции, основной из которых является трофическая, поддерживающая жизнедеятельность олигодендроцитов и нейронов [30].

NG2-позитивные клетки или прогениторные клетки ответственны за формирование зрелых астроцитов и олигодендроцитов, как на этапе развития, так и во взрослом организме. Клетки микроглии развиваются из миелоидно-моноцитарных клеток и являются резидентными макрофагами (иммунные клетки ЦНС) [31-33]. Особый интерес вызывают олигодендроциты, что связано с их ролью в формировании уникальной миелиновой оболочки, покрывающей аксоны нейронов. Основная функция миелиновой оболочки заключается в электрической изоляции аксона нейрона, что обеспечивает увеличение скорости передачи нервного импульса в 10-100 раз по сравнению с немиелинизированным волокном [34]. Миелиновая оболочка имеется у большинства аксонов диаметром более 0,2 мкм [35]. Именно миелин ответственен за придание трактам белого цвета, что и отражается в названии белого вещества.

Таким образом, белое вещество головного мозга содержит в своем составе большое количество различных компонентов, совместная деятельность которых приводит к осуществлению основной функции белого вещества, заключающейся во взаимодействии различных участков ЦНС между собой. Данное взаимодействие обеспечивается деятельностью проводящих путей (трактов) белого вещества, в состав которых входят функционально однородные нервные волокна, формирующие пучки, соединяющие различные области нервной системы. Структурное повреждение трактов будет приводить к нарушению взаимосвязи между отделами ЦНС, что может вызвать формирование неврологического дефицита вплоть до инвалидизации и снижение качества жизни пациента.

1.1. Структурные изменения белого вещества, возникающие при опухолях головного мозга

Все многообразие опухолей, возникающих в тканях головного мозга, можно разделить на две основные группы: 1) первичные опухоли, которые изначально развиваются в нервной ткани; 2) вторичные (метастатические) опухоли, первично развивающиеся в других органах и тканях, и в ходе прогрессирования формирующие метастазы в ткань мозга.

Среди первичных опухолей ЦНС особое место занимают злокачественные глиомы, формирующиеся из клеток нейроглии. Данные опухоли составляют абсолютное большинство первичных опухолей ЦНС у взрослых [36], являясь одними из самых злокачественных новообразований [37]. Согласно классификации, разработанной Всемирной организацией здравоохранения, глиомы подразделяются на низкоклеточные (Grade I-II), такие как пилоцитарная астроцитома и диффузная астроцитома, и высокозлокачественные (Grade III-IV), наиболее агрессивной из которых является глиобластома (Grade IV), смертность при которой является на 50% выше, чем при всех остальных интракраниальных опухолях [38].

Основной характерной особенностью данного вида опухолей является их быстрый инвазивный рост в окружающую ткань головного мозга по ряду путей: миграция вдоль трактов белого вещества, рост рядом с нейронами, проникновение вдоль кровеносных сосудов и мозговых оболочек (рисунок 2) [39]. Данная черта отличает глиальные опухоли от метастатических интракраниальных новообразований, использующих только гематогенный и лимфогенный пути распространения [40, 41], а также от доброкачественных опухолей, лишь отталкивающих нервную ткань в сторону и не внедряющихся в нее [42].

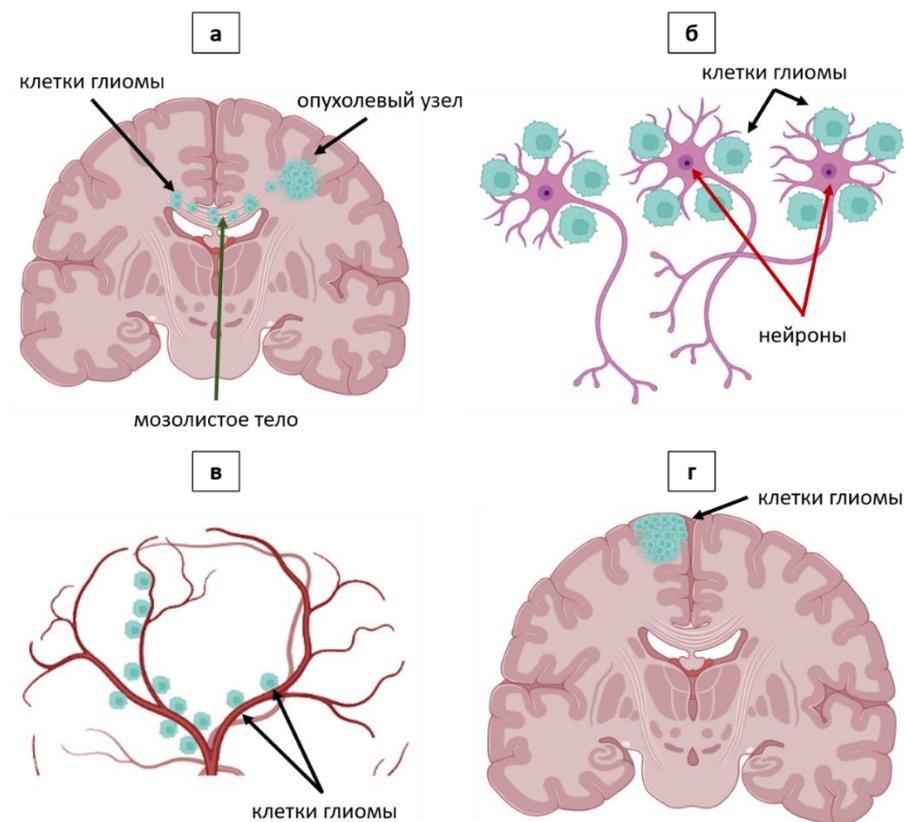


Рисунок 2. Пути инвазии глиальных опухолей головного мозга: (а) – по ходу трактов белого вещества, (б) – рост рядом с нейронами, (в) – миграция вдоль кровеносных сосудов, (г) – распространение вдоль мозговых оболочек. (biorender.com)

Известно, что глиальные опухоли часто развиваются в белом веществе и предпочитают распространяться по всему головному мозгу, используя миелинизированные волокна в качестве каркаса для миграции клеток [43, 44]. Кроме того, при использовании данного пути инвазии возможно распространение опухоли в контралатеральное полушарие, которое происходит исключительно по ходу волокон мозолистого тела [43]. Примечательно, что клеточные и молекулярные механизмы, лежащие в основе инвазии белого вещества, остаются почти полностью неизвестными, несмотря на наличие большого пласта исследований, направленных на изучение взаимодействий опухолевых клеток с окружающими тканями [40-44].

Изменения, возникающие в ткани белого вещества рядом с растущей опухолью, могут быть классифицированы как отек, инфильтрация, смещение или разрушение миелиновых волокон (деструкция) [3, 45]. Отдельно

необходимо выделить демиелинизацию нервных волокон, заключающуюся в исчезновении миелиновой оболочки по тем или иным причинам.

Отек имеет вазогенное происхождение и возникает вследствие нарушения целостности стенок кровеносных сосудов. Опухолевые клетки, мигрируя вдоль сосудов, отталкивают отростки астроцитов от сосудистой стенки, тем самым разрушая периваскулярную базальную мембрану и нарушая гематоэнцефалический барьер [40], что приводит к увеличению проницаемости сосудистой стенки, проникновению плазмы крови в паренхиму головного мозга и возникновению отека (рисунок 3) [46]. Развитие отека в дальнейшем ведет к увеличению внутричерепного давления, снижению циркуляции крови в сосудах и гипоксии, что находит свое отражение в формировании очаговой или генерализованной неврологической симптоматики [47].

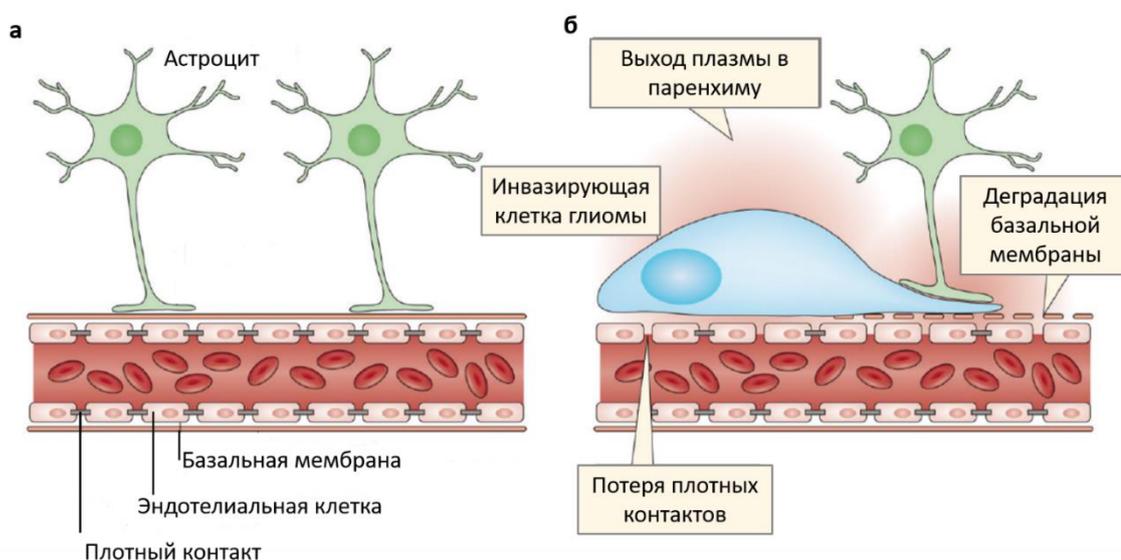


Рисунок 3. Разрушение гематоэнцефалического барьера клетками глиомы. (а) – в здоровом головном мозге отростки астроцитов окружают кровеносные сосуды, участвуя в формировании гематоэнцефалического барьера. (б) – клетка глиомы, мигрируя вдоль кровеносного сосуда, отталкивает отросток астроцита, что вызывает нарушение гематоэнцефалического барьера, деградации базальной мембраны, потери плотных контактов, приводящих к выходу плазмы в межклеточное пространство и формированию вазогенного отека (адаптировано из Cuddapah et al., 2014) [40]

Смещение волокон может наблюдаться как в форме их уплотнения, так и в форме разволокнения проводящих путей, что продиктовано двумя основными причинами. В первом случае смещение наблюдается в результате непосредственного роста опухолевого узла (рисунок 4, а). Известно, что клетки глиом низкой степени злокачественности преимущественно вызывают смещение паренхимы головного мозга, не вызывая сильного разрушения волокон [48]. Кроме того, как было упомянуто выше, метастазы периферических опухолей также отталкивают нервную ткань, не внедряясь в нее. Второй причиной смещения волокон является нарастающий отек ткани мозга (рисунок 4, б).

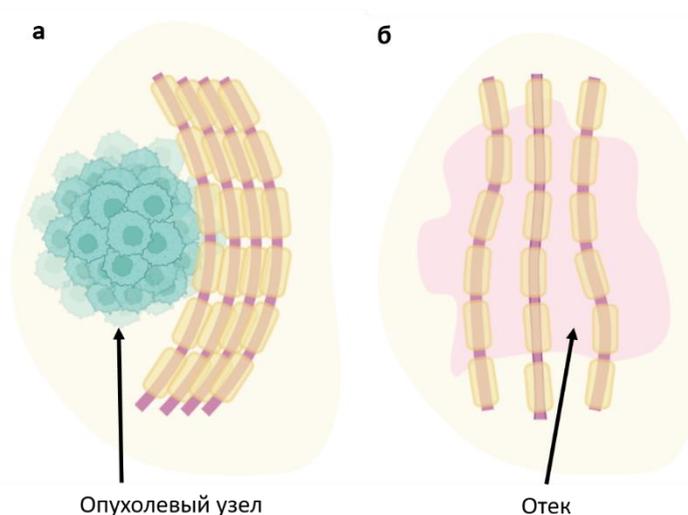


Рисунок 4. Смещение миелиновых волокон возникает в результате двух причин: непосредственного роста опухолевого узла (а) и вазогенного отека ткани (б). (biorender.com)

Что касается процесса инфильтрации, и тесно с ним связанного разрушения миелиновых волокон, на данный момент остается практически полностью неизвестна взаимосвязь между клетками глиальных опухолей и проводящими путями белого вещества. По всей видимости, в основе данных изменений лежит большая совокупность биохимических процессов, абсолютное большинство из которых являются неизученными на данный момент времени.

Инвазия глиальных опухолей в окружающую нервную ткань происходит за счет определенного вида клеток, названными опухолевыми стволовыми клетками, несущих на себе маркер CD133 [49]. Этот тип клеток обладает способностью самообновляться и давать начало дифференцированному потомству, при этом, они ответственны не только за инвазию, но и за возникновение рецидивов и терапевтическую резистентность [50].

Ключевым фактором, играющим важнейшую роль в инфильтративном росте глиальных опухолей, является внеклеточный матрикс (ВКМ) [51]. ВКМ в тканях головного мозга отличается по своему составу от ВКМ большинства органов и составляет всего около 20% объема мозговой ткани [52]. Мозговой ВКМ включает в себя паренхиматозный ВКМ, а также базальные мембраны, расположенные вокруг кровеносных сосудов [42, 52]. Паренхиматозный ВКМ состоит из гликозаминогликанов (гиалуроновой кислоты, в частности), протеогликанов без коллагенов и связующих белков. Базальные мембраны, как и в других органах, состоят из коллагенов, гликопротеинов и молекул адгезии.

Особый интерес вызывает гиалуроновая кислота, выполняющая ряд функций в нормальных и патологически измененных тканях головного мозга. Так, в состоянии нормы гиалуроновая кислота, входящая в состав ВКМ, поддерживает тканевой гомеостаз, биомеханическую целостность, а также структуру тканей [53]. В случае развития злокачественных опухолей содержание гиалуроновой кислоты значительно увеличивается, с чем связано усиление пролиферации, распространение и инвазия опухолевых клеток [54, 55]. Данное соединение активно способствует росту опухоли, благодаря открытию пространств для миграции опухолевых клеток [56-58]. Для того, чтобы проникать в эти небольшие пространства, опухолевые клетки обладают способностью ремоделировать свой цитоскелет и объем, что достигается за счет совместной работы ионных каналов и белка миозина [59, 60]. Кроме того, в процессе инвазии опухоли происходит активное изменение ВКМ с помощью

различных ферментов, которые разрушают определенные компоненты ВКМ, облегчая миграцию опухолевых клеток [51, 61]. Среди многообразия ферментов, разрушающих ВКМ (протеазы, гликозидазы, гиалуронидазы), отдельное внимание следует уделить металлопротеазам, которые непосредственно связаны с инвазией опухоли вдоль миелиновых волокон.

Следует отметить, что компоненты белого вещества головного мозга во многом обеспечивают стимуляцию и поддержку инфильтрации проводящих путей опухолевыми клетками. Как уже было сказано выше, для разрушения ВКМ опухолевые клетки секретируют большое количество протеаз, кроме того, они побуждают астроциты и клетки микроглии также участвовать в секреции данных соединений [40]. В процессе неоваскуляризации опухолевые клетки выделяют факторы ангиогенеза, что способствует образованию новых кровеносных сосудов, а эндотелиоциты, в свою очередь, секретируют различные факторы роста и протеазы [42].

Однако, в составе белого вещества находятся и компоненты, препятствующие распространению опухолевых клеток и, таким образом, обладающие защитным противоопухолевым эффектом. Известно, что миелин центральной нервной системы содержит белки-ингибиторы, блокирующие регенерацию аксонов и распространение астроцитов и фибробластов. Кроме того, данные соединения блокируют распространение клеток глиальных опухолей низкой степени злокачественности (Grade I-II), в то время как высокозлокачественные глиомы, включающие в себя глиобластому (Grade IV), анапластическую астроцитому (Grade III) и олигодендроглиому (Grade III), способны преодолевать ингибирующие эффекты миелина [62]. Это достигается путем секретирования опухолевыми клетками ферментов металлопротеаз [63], которые, по всей видимости, разрушают белки-ингибиторы, блокирующие распространение клеток, что способствует миграции опухолевых клеток вдоль миелинизированных волокон. Вероятно, именно с данным процессом связана более высокая скорость инфильтрации нервной ткани у высокозлокачественных глиом по сравнению с глиомами

низкой степени злокачественности, а также избегание опухолевыми клетками воздействия ионизирующего излучения при лучевой терапии [64, 65].

Структурные изменения миелиновых волокон могут возникать вследствие двух основных причин: 1) первичное поражение миелиновой оболочки с ее исчезновением (демиелинизация волокон); 2) повреждение нейронов или глиальных клеток, приводящее к деструкции волокон. Обнаружено, что в области инфильтрации опухолью белого вещества мозга присутствует частичная демиелинизация нервных волокон [2], вызванная, по всей видимости, секрецией тех или иных соединений и гибелью олигодендроцитов. Однако, точный механизм демиелинизации остается неизвестным. При этом, выявлено, что опухолевые стволовые клетки преимущественно располагаются рядом с теми участками нервных волокон, где наблюдается исчезновение миелина. Данный факт объясняется тем, что непрерывная передача нервных импульсов по аксону поддерживает жизнедеятельность опухолевых клеток и стимулирует их дальнейшую миграцию [65].

Разрушение волокон, как было упомянуто выше, является следствием двух основных причин: повреждения нейронов и нарушения функции глиальных клеток. Опухолевые клетки оказывают сильное влияние на нейроны, что достигается не только механической компрессией тканей мозга, но и нарушением питания нервных клеток, а также секрецией экзотоксинов, вызывающих нейрональную смерть и прекращение проведения нервных импульсов [66]. Гибель нейронов влечет за собой последующую гибель нервных волокон. Нарушение функции глиальных клеток является следствием их активной вовлеченности в продукцию огромного количества цитокинов, метаболитов, и сигнальных молекул под влиянием опухолевых клеток. В результате этого они оказываются неспособны поддерживать мозговой гомеостаз и обеспечивать достаточное питание нейронов и олигодендроцитов [67].

Таким образом, клетки опухоли оказывают влияние на все компоненты белого вещества, в частности миелиновые волокна, вызывая в ткани белого вещества ряд структурных изменений. Однако, взаимоотношения между клетками глиальных опухолей и проводящими путями белого вещества являются недостаточно изученными на данный момент, что требует продолжения исследований в данной области.

1.2. Методы оценки состояния белого вещества в клинике и в эксперименте

Исследование структурных особенностей белого вещества при различных патологических состояниях играет важную роль как на этапе проведения фундаментальных исследований, так и в клинической практике. В настоящее время с целью изучения морфологических особенностей белого вещества применяется ряд методов, которые будут рассмотрены ниже.

1.2.1. Гистологическое исследование образцов

Гистологическое исследование срезов, полученных с фиксированных образцов ткани, является «золотым стандартом» диагностики морфологических изменений, возникающих в белом веществе при ряде патологий. Данный метод основывается на приготовлении срезов с фиксированных тканей и последующем их окрашивании. Использование данного метода позволяет получить как общее представление об исследуемом образце ткани, что достигается применением обзорных окрасок, так и провести более детальный анализ структуры белого вещества с применением специфических окрасок на миелин (таблица 1, рисунок 5).

Таблица 1. Методы гистологического окрашивания белого вещества

Метод окраски	Используемые соединения	Визуализируемые структуры	Особенности метода
Гематоксилин-эозин (ГЭ)	Гематоксилин (краситель основной природы), эозин (краситель кислой природы)	Клеточные ядра (синий/фиолетовый цвет), цитоплазма (ярко-розовый цвет)	Предоставляет общую информацию об исследуемом образце. Невозможность проведения детального анализа структурных особенностей (обзорная окраска)
Люксолевый прочный синий с крезил фиолетом	Люксолевый прочный синий (производное тетрабензотетразо-порфирина), крезил фиолетовый. Дополнительная окраска ядер с помощью гематоксилина	Миелин (окрашивается в бирюзово-синий цвет), нейроны (фиолетовый цвет), нейропилы (скопления отростков нервных клеток) имеют розовый цвет	Предоставляет комплексную информацию о структурных особенностях белого вещества: как о миелиновых волокнах, так и о клеточных элементах
Окраска по Гальясу	Импрегнация серебром	Накопления таубелка (нейрофибрилярные клубки и глиальные включения, а также глиальные цитоплазматические включения) окрашены в черный цвет	Предоставляет информацию только о накоплениях таубелка, не позволяет идентифицировать нормальные ткани
Окраска по Хольцеру с кристаллическим фиолетовым	Фосфорно-молибденовая кислота, кристаллический фиолетовый краситель	Волокна нейроглии (фиолетово-синий цвет), ядра и частично цитоплазма глиальных клеток	Позволяет выявить только глиозные изменения. Отсутствие возможности прицельного изучения миелиновых волокон
Окраска Марки-Буша	Бихромат калия, четырехокись осмия, окись хрома	Дегенерированные миелиновые оболочки приобретают черный цвет	Позволяет выявить исключительно поврежденные миелиновые оболочки

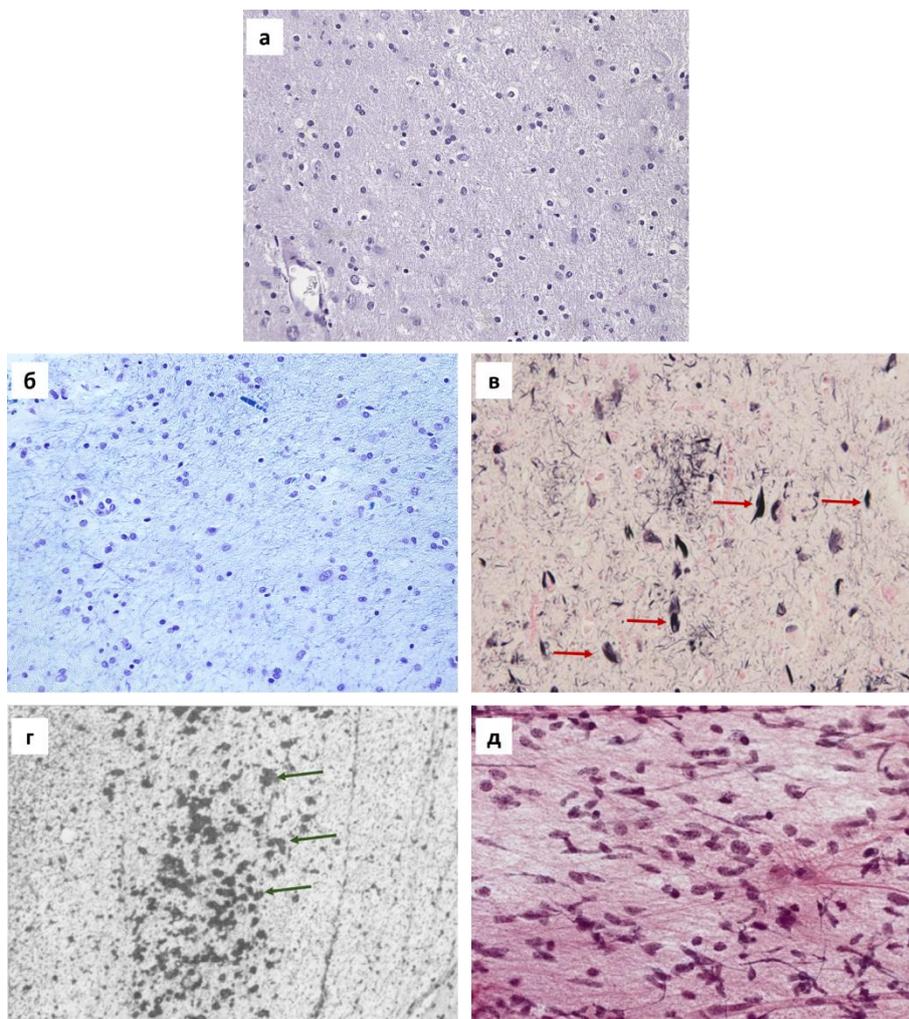


Рисунок 5. Окрашенные гистологические препараты белого вещества. (а) – окраска гематоксилин-эозином: визуализируются ядра и цитоплазма клеток; (б) – окраска люксолевым прочным синим с крезил-виолетом: отчетливо визуализируются миелиновые волокна (синий цвет), а также ядра клеток; (в) – окраска по Гальясу: визуализируются накопления тау-белка (красные стрелки); (г) – окрашивание методом Марки-Буша позволяет идентифицировать дегенерированный миелин (зеленые стрелки); (д) – окраска по Хольцеру позволяет идентифицировать глиозные изменения (разрастание клеток нейроглии).

Можно заметить, что из всех описанных специфических окрасок на миелин, наибольший объем информации об изучаемом образце белого вещества можно получить путем использования окраски люксолевым прочным синим, так как она позволяет выявлять не только миелиновые волокна, но и оценить наличие нервных клеток. Данная окраска совместно с окрашиванием ГЭ рутинно применяется как в клинической практике с целью

диагностики заболеваний, связанных с повреждением компонентов белого вещества, так и в различных фундаментальных исследованиях.

1.2.2. Иммуногистохимическое исследование

Иммуногистохимическое исследование (ИГХ) представляет собой метод изучения структурных особенностей тканей, основанный на мечении специфических антигенов путем высокоспецифичных реакций антиген-антитело. Данный метод используется для повышения контрастности получаемых гистологических срезов ткани за счет своей большей специфичности по сравнению с обычными гистологическими окрасками.

Для прицельного изучения морфологии миелиновых нервных волокон используются антитела к основным белковым компонентам миелиновой оболочки [68]. Результаты ИГХ исследования могут быть оценены при помощи световой микроскопии в случаях, когда антитела связаны с хромогенами, окрашивающими миелиновые волокна в определенный цвет, или при помощи флуоресцентной микроскопии в случаях связывания антител с флуоресцентными агентами [69].

Так, для последующей оценки морфологических свойств с помощью световой микроскопии, окрашивание производится антителами, меченными хромогеном диаминобензидином (ДАБ), который является субстратом пероксидазы хрена [70]. Как только антитело связывается с соответствующим антигеном (белком), ДАБ полимеризуется с образованием светло-коричневого продукта, что позволяет идентифицировать миелиновые волокна. Кроме того, производится дополнительное окрашивание клеточных ядер при помощи гематоксилина. Таким образом, в результате ИГХ анализа возможно не только получить детальную информацию о сохранности и характере расположения миелиновых волокон, но и оценить количество клеточных элементов (рисунок 6) [71, 72].

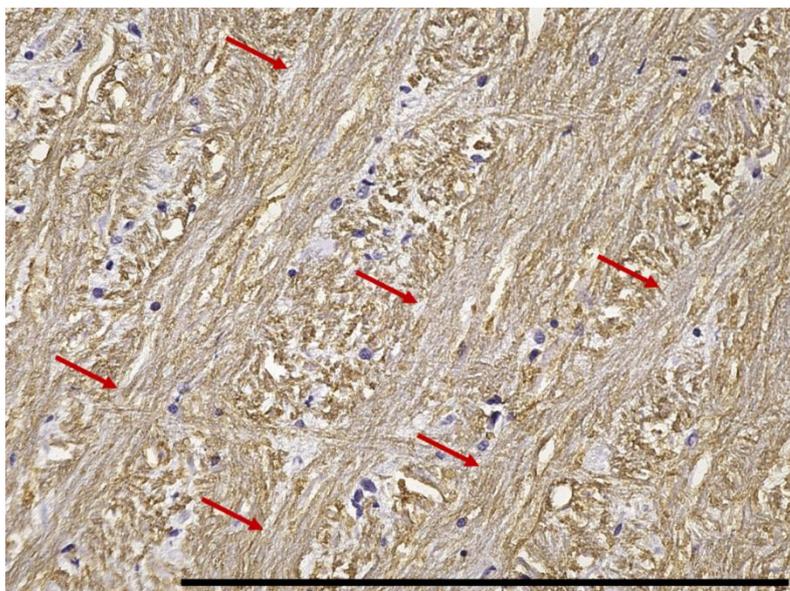


Рисунок 6. ИГХ изображение среза ствола мозга (использованы антитела к основному белку миелина). Миелиновые волокна окрашены коричневым цветом, ядра клеток – фиолетовым. Красными стрелками отмечены однонаправленные пучки миелиновых волокон. Бар – 500 мкм.

Таким образом, ИГХ анализ позволяет получать контрастные изображения белого вещества, предоставляя качественную информацию о структуре и расположении миелиновых нервных волокон. Однако, так же, как и при гистологическом исследовании, его использование ограничено рядом факторов: 1) инвазивность метода, а именно, необходимость иссечения изучаемого участка ткани; 2) невозможность проведения *in vivo* исследований и прижизненного получения информации о структуре ткани; 3) необходимость использования дополнительных контрастирующих агентов.

1.2.3. Магнитно-резонансная томография (МРТ): диффузионно-тензорная МРТ

Среди неоптических методов диагностики заболеваний головного мозга, связанных с повреждением проводящих путей, особое место занимает магнитно-резонансная томография (МРТ) а именно ее разновидность – диффузионно-тензорная (ДТ) МРТ. Метод МРТ основан на обнаружении явления ядерного магнитного резонанса – регистрации излучения электромагнитной энергии ядрами атомов (в данном случае атомов водорода),

находящихся в сильном магнитном поле [73]. Физически данный метод позволяет визуализировать внутреннюю структуру организма человека при помощи определения насыщенности тканей водородом и особенностей его магнитных свойств.

Ядро атома водорода содержит в своем составе один протон, имеющий спин и меняющий пространственную ориентацию при нахождении в мощном магнитном поле, а также при воздействии дополнительных полей и внешних радиочастотных импульсов. В ходе МРТ исследования на пациента действует энергия магнитного поля на соответствующей резонансной частоте, а атомы водорода возбуждаются радиочастотным импульсом. Результирующий сигнал обрабатывается путем определения спинов протона, их векторных направлений и взаимосвязи с магнитным моментом протона, что позволяет установить месторасположение конкретного атома водорода. Таким образом, при МРТ сканировании ядра водорода создают сигнал, который обрабатывается для формирования изображения организма человека с точки зрения плотности этих ядер в определенной области и особенностей их магнитных свойств, связанных с нахождением в окружении разных атомов и молекул.

ДТ-МРТ представляет собой метод количественной и качественной оценки направленности диффузии воды в тканях человека, позволяющий осуществлять прижизненную оценку структуры проводящих путей головного мозга [74, 75]. Данная разновидность МРТ основывается на регистрации микроскопических изменений МР-сигнала, возникающих вследствие хаотичного движения ядер атомов водорода вместе с молекулами воды [76]. При этом, интенсивность МР-сигнала зависит от скорости диффузии воды.

Измерение коэффициента диффузии воды в сложных средах (к примеру, в биологических тканях) возможно путем расчета *действительного (измеряемого) коэффициента диффузии*. Необходимость использования данного параметра объясняется тем, что биологические ткани не являются изотропными средами и содержат в своем составе препятствия (клеточные

мембраны, органеллы и т.д.), которые ограничивают диффузию воды. Однако, при этом между ними остаются свободные пространства для последующего перемещения молекул воды. Зависимость диффузионной способности молекул воды в биологической среде от направления называется *анизотропией диффузии*. Таким образом, геометрически диффузию молекул воды в биологических средах можно представить следующим образом: при неограниченном движении область диффузии имеет форму шара (рисунок 7, а), при равномерном наличии препятствий она принимает форму диска (рисунок 7, б), при движении в узком канале область имеет узкую эллипсоидную форму (рисунок 7, в). Форму, размеры и ориентацию получившегося эллипсоида диффузии характеризуют при помощи *коэффициентов тензора диффузии*. Три коэффициента тензора диффузии характеризуют длины отрезков, образованных точками пересечения эллипсоида диффузии с осями координат (x, y, z) (рисунок 7, г).

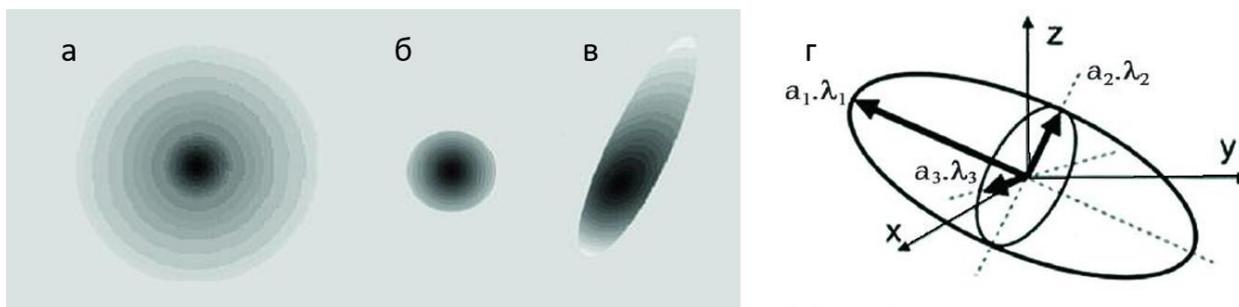


Рисунок 7. Типы диффузионного движения: свободная диффузия (а), равномерно ограниченная (изотропия диффузии) (б), неравномерно ограниченная (анизотропия диффузии) (в) [77]. Ориентация, размер и форма эллипсоида диффузии в вокселе (пространственном элементе), построенном по измерениям действительного коэффициента диффузии (γ). $\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3$ – собственные значения диффузионного тензора; a_1, a_2, a_3 – собственный вектор диффузионного тензора [77].

Наиболее важными количественными параметрами оценки диффузии молекул воды являются *коэффициент фракционной анизотропии (КФА)* и *средний коэффициент диффузии*. Средний коэффициент диффузии является показателем, характеризующим усредненное тепловое хаотическое движение молекул в биоткани, и взаимосвязанным с размером и целостностью

клеточных элементов [78]. КФА позволяет оценить ориентацию эллипсоида диффузии (степень анизотропии) и отражает неоднородность свойств среды по разным направлениям диффузии внутри этой среды, что позволяет характеризовать степень направленности структурных элементов среды и их целостность [79, 80].

На основании вышеперечисленных количественных характеристик ДТ-МРТ изображений (три коэффициента тензора диффузии, средний коэффициент диффузии и КФА) при помощи специального программного обеспечения возможно построение карт фракционной анизотропии, карт измеряемого коэффициента диффузии и карт диффузионного тензора, а также реконструкция проводящих путей в трехмерном режиме (трактография) (рисунок 8) [77, 81].

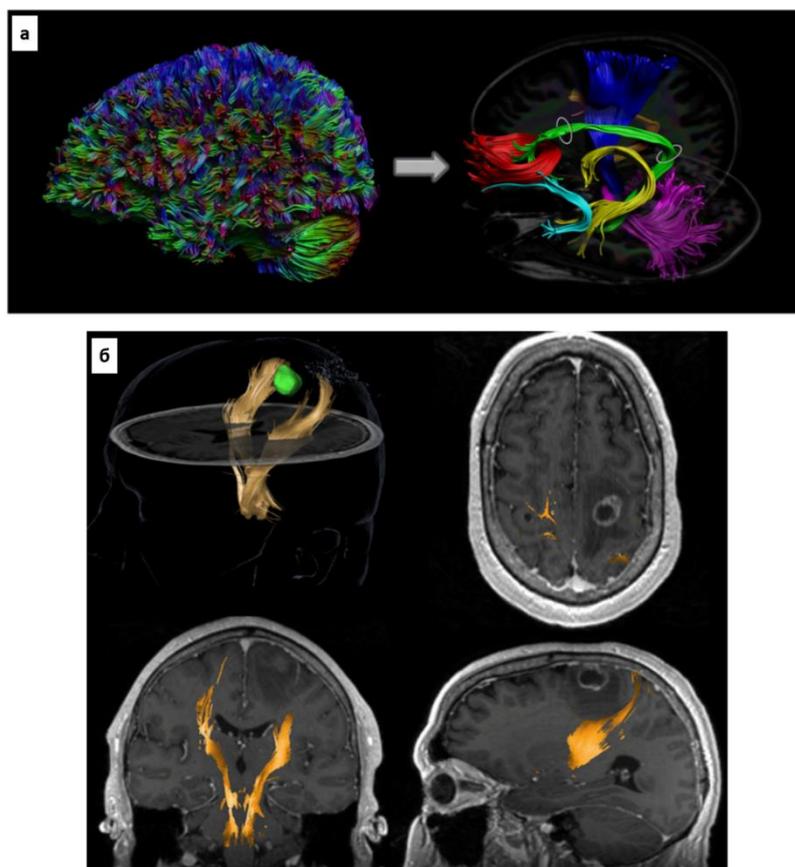


Рисунок 8. МР-трактографические изображения нервных волокон. (а) - Векторное поле локальных преобладающих ориентаций волокон и две линии хода волокон, где синяя линия соответствует части волокон корково-спинномозгового пути, а красная – части мозолистого тела. (б) – Применение программного обеспечения для отслеживания хода трактов позволяет вычленить проводящие пути белого вещества (справа) из трактограммы всего

мозга (слева) [81]. (в) – Пример использования МР-трактографии у пациента с опухолью головного мозга, расположенной в левом полушарии. Левый корково-спинномозговой путь (выделен желтым) смещен кзади по сравнению с правой (контралатеральной) ветвью [82].

Таким образом, метод ДТ-МРТ позволяет провести качественную и количественную оценку структурных особенностей проводящих путей, оценить сохранность миелиновых нервных волокон и детектировать патологические изменения, возникающие в белом веществе. Огромными преимуществами данного метода являются его неинвазивность и возможность его прижизненного применения. В связи с этим в настоящее время метод ДТ-МРТ активно применяется на этапе планирования операционных вмешательств, направленных на удаление опухолей головного мозга. Он позволяет не только локализовать опухоль, но и оценить ее взаиморасположение с проводящими путями, а также определить целостность миелиновых волокон (рисунок 8, б). Однако, у данной технологии есть и ряд ограничений. Если говорить о применении данного метода с целью нейронавигации с использованием нейронавигационных станций, то необходимо подчеркнуть частое несоответствие положения мозговых структур на ДТ-МРТ изображениях с реальным их положением в пространстве. Это связано с возникновением феномена смещения мозга (“brain shift”) из-за изменения внутричерепного давления после вскрытия твердой мозговой оболочки, эвакуации ликвора, а также вследствие введения гиперосмолярных растворов [83, 84]. Кроме того, в случае наличия сильного отека нервной ткани визуализация хода нервных волокон в данной области становится невозможной из-за избыточного содержания воды [82]. Также необходимо отметить высокую стоимость проведения ДТ-МРТ обследования и необходимость задействования высококвалифицированных специалистов в области лучевой диагностики.

1.2.4. Мультифотонная микроскопия/томография. Генерация третьей оптической гармоники

Мультифотонная микроскопия (МФМ) и мультифотонная томография (МФТ) представляют собой современные методы биоимиджинга, основанные на обнаружении явления флуоресценции и обладающие высоким разрешением (1 мкм). Данные методы в последнее время активно применяются для изучения живых клеток и тканей в ходе различных экспериментальных исследований. В их основе лежит использование фемтосекундных лазеров ближнего инфракрасного диапазона, которые позволяют генерировать сигнал в видимом диапазоне длин волн [85].

Как уже было сказано выше, в основе данных методов лежит регистрация явления флуоресценции. Обычное возбуждение в флуоресцентной микроскопии включает один фотон. Флуоресцентные молекулы (флуорофоры) обычно существуют в основном состоянии (более низкая энергия, S_0) и возбуждаются при воздействии фотонов определенной длины волны, переходя в более высокое энергетическое состояние (S_n). После перехода в более высокое энергетическое состояние происходит некоторое внутреннее преобразование и расслабление, когда энергия молекул может немного снизиться (до S_1), но в конечном итоге эти флуорофоры возвращаются в основное состояние, высвобождая энергию в виде испускаемых фотонов (рисунок 9, а) [86]. Фотоны, генерируемые в ближнем инфракрасном диапазоне, имеют преимущество за счет большей глубины проникновения в ткани и меньшего фотоповреждения. Однако, они имеют гораздо большую длину волны, чем фотоны видимого света, и, следовательно, имеют гораздо меньшую энергию. Это означает, что у одного фотона недостаточно энергии, чтобы перевести флуорофор с S_0 на S_n . Многофотонное возбуждение происходит, когда два (или более) фотона, суммарная энергия которых удовлетворяет энергии перехода, необходимой для перевода флуорофора из основного состояния в возбужденное, одновременно достигают образца (рисунок 9, б) [87]. При этом в качестве

флуорофора могут выступать как экзогенные молекулы, так и эндогенные молекулы [88].

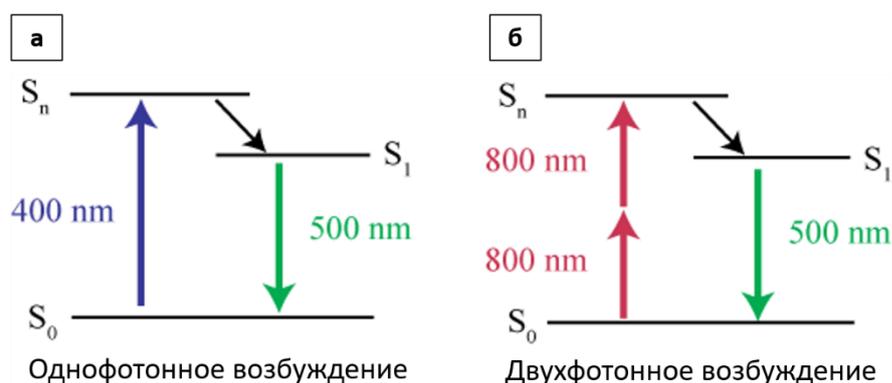


Рисунок 9. Диаграмма Яблонского, демонстрирующая разницу между однофотонным (а) и двухфотонным (б) возбуждением. При однофотонном возбуждении флуорофора требуется один фотон длиной волны 400 нм, при двухфотонном — два фотона ближнего инфракрасного диапазона с длиной волны 800 нм. [86]

Применительно к визуализации тканей мозга, было показано, что с помощью метода МФТ возможна визуализация опухолевой ткани, перифокальной зоны опухоли и нормальных тканей мозга с клеточным разрешением [89-91]. Продемонстрирована возможность использования данной технологии для прицельного изучения клеток олигодендроглии, непосредственно участвующих в процессе миелинизации нервных волокон [92]. Кроме того, при помощи метода МФМ возможна дифференцировка различных видов нейронов в коре головного мозга и визуализация кровеносных сосудов [93, 94]. Таким образом, данные методы активно используются для изучения нервных клеток, их отростков, клеток нейроглии и опухолевых клеток, а также их взаимодействий друг с другом как в условиях *in vitro*, так и *in vivo* [95-98].

Прямая оценка состояния миелина с помощью МФТ/МФМ остается сложной задачей вследствие недостаточного контраста [99], хотя в целом является возможной как при исследовании автофлуоресценции компонентов миелиновой оболочки без применения дополнительного окрашивания, так и с

использованием экзогенных флуорофоров, связывающихся с миелином (рисунок 10) [100-105].

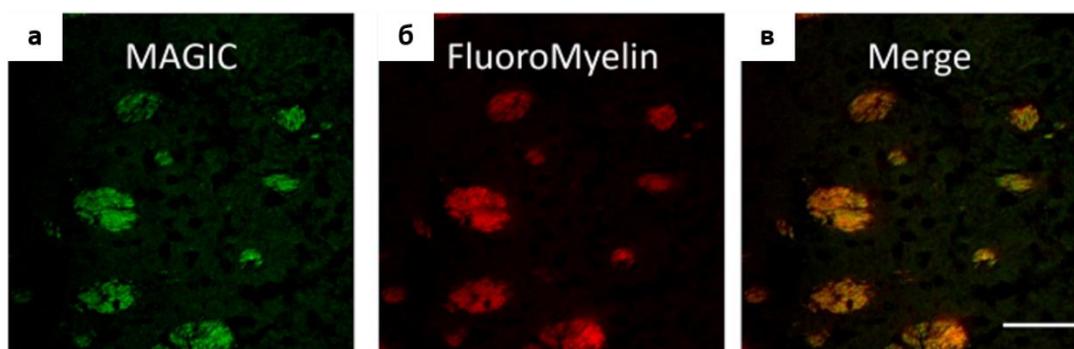


Рисунок 10. Изображения среза мозга мыши (поперечный срез миелиновых волокон), полученные при помощи двухфотонной флуоресцентной микроскопии: (а) – регистрируемая автофлуоресценция миелиновых волокон с помощью протокола MAGIC (Визуализация миелиновой аутофлуоресценции с усилением контраста, индуцированного глицерином, англ. Myelin Autofluorescence imaging by Glycerol Induced Contrast enhancement), (б) – регистрируемый сигнал флуоресценции после введения экзогенного красителя FluoroMyelin Red, (в) – совмещенное изображение (а) и (б). Шкала бар – 50 мкм. [100]

Отдельным преимуществом методов МФТ/МФМ является их чувствительность к генерации третьей оптической гармоники (ГТГ). ГТГ представляет собой мгновенный процесс когерентного нелинейного рассеяния света, при котором три фотона, обладающие низкой энергией и одинаковой частотой, преобразуют свою энергию с образованием нового фотона с утроенной энергией (рисунок 11) [106, 107].

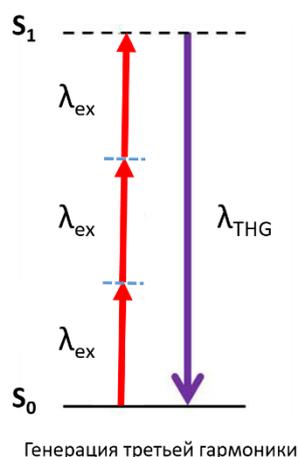


Рисунок 11. Диаграмма, иллюстрирующая одновременное преобразование трех фотонов ближнего инфракрасного диапазона в один фотон видимого диапазона при ГТГ [106].

Farrar и соавторы впервые показали, что процесс генерации сигнала ГТГ максимально эффективно происходит на границе между группами молекул с разной световой возбудимостью, в частности между цитоплазматической водой и липидами клеточной мембраны, что позволяет получать качественные изображения миелина как в фиксированных тканях, так и *in vivo* [108]. Известны работы, направленные на изучение миелиновых волокон как в периферической [109], так и в центральной нервной системе [110]. Так, группой ученых из Нью-Йорка, США, было показано, что метод ГТГ может быть применен для прицельной визуализации характера расположения миелиновых волокон в области коры больших полушарий [110]. При изучении опухолевых и нормальных тканей головного мозга при помощи ГТГ можно визуально детектировать различия между нормальным белым веществом и опухолью (рисунок 12) [111]. Применение количественной обработки ГТГ сигнала с подсчетом клеточных ядер позволяет разграничивать нормальные ткани и опухоль-инфильтрированные области с высокой чувствительностью и специфичностью (96.6% и 95.5% соответственно) [112].

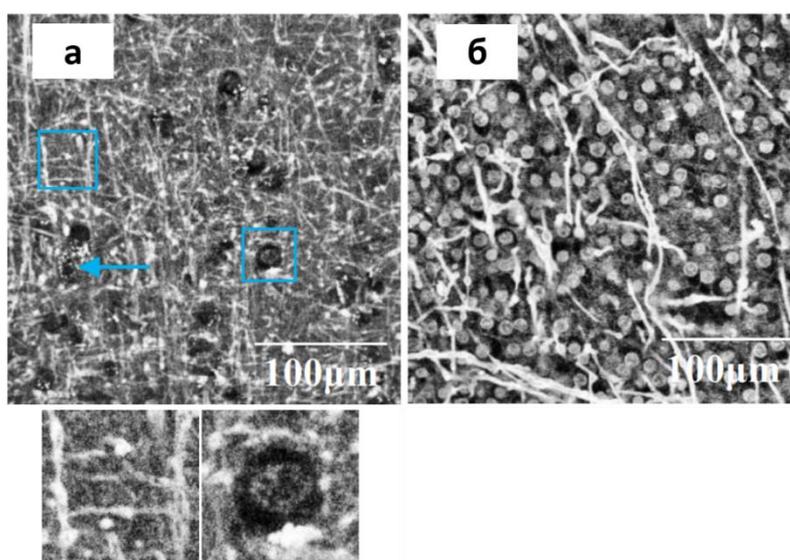


Рисунок 12. ГТГ изображения *ex vivo* биопсийных образцов нормального белого вещества головного мозга, где визуализируется большое количество

миелиновых нервных волокон (а) и низкоккачественной глиомы, где обнаруживается большое количество клеток и отдельные волокна (б) Области, выделенные голубыми прямоугольниками, представлены в большем увеличении. Голубая стрелка указывает на нервную клетку [111].

Суммируя вышесказанное, можно сказать, что методы МФТ/МФМ, а также получение изображений в режиме ГТГ, являются перспективными технологиями для визуализации компонентов белого вещества и их прицельного изучения в рамках фундаментальных и прикладных исследований. В настоящее время существуют ГТГ установки, позволяющие проводить как *ex vivo* исследования, так и исследования *in vivo* на животных моделях [110]. Однако, развитие дальнейшего применения данных методов в клинике ограничивается малой областью исследования ткани (<1 мм), а также длительностью получения изображений (до нескольких минут в зависимости от используемого устройства).

1.2.5. Оптическая когерентная томография

Оптическая когерентная томография (ОКТ) представляет собой неинвазивный способ визуализации внутренней структуры биоткани с разрешением 2-20 мкм на глубину до 2 мм, основанный на регистрации обратно рассеянного излучения в ближнем инфракрасном диапазоне длин волн (700-1400 нм). Метод ОКТ был разработан в 1991 году группой ученых из Массачусетского технологического института [113].

Принцип работы ОКТ-устройств. Формирование ОКТ изображений.

Функциональные расширения ОКТ

В основе ОКТ-установки лежит интерферометр Майкельсона, в одном плече которого находится опорный отражатель (опорное плечо), в другом – исследуемый объект (предметное плечо). В качестве зондирующего излучения используется широкополосное низкоккагерентное либо перестраиваемое оптическое излучение ближнего инфракрасного диапазона, попадающее в «терапевтическое окно прозрачности биотканей».

В настоящее время существует несколько вариантов ОКТ-установок, различающихся по методам приема и обработки сигнала: 1) корреляционная ОКТ (от англ. Time-domain OCT); 2) спектральная ОКТ (от англ. Spectral domain OCT); 3) ОКТ с перестраиваемым источником (от англ. Swept source OCT) и 4) полнопольная ОКТ (от англ. Full-field OCT).

В корреляционном варианте ОКТ-установки (рисунок 13, а) сканирование объекта производится в глубину путем изменения разности длин плеч интерферометра за счет подвижного зеркала [14]. При измерении корреляции между излучением, которое отразилось от опорного зеркала, и излучением, которое было обратно рассеяно от внутренних оптических неоднородностей исследуемого объекта, можно получить изображение внутренней структуры ткани.

Спектральные ОКТ установки (рисунок 13, б) отличаются отсутствием механического сканирования в глубину, так как опорное плечо является неподвижным. При этом производится анализ оптического спектра интерференционного сигнала и регистрация последовательности спектральных компонентов с последующим применением преобразования Фурье, что позволяет получить информации о пространственном распределении рассеивающих элементов в глубине ткани [114].

В ОКТ приборах с перестраиваемым источником также отсутствует механическое сканирование в глубину, что достигается использованием лазера с перестраиваемой частотой излучения в качестве источника (рисунок 13, в) [115]. Информация о пространственном распределении рассеивателей также получается при помощи преобразования Фурье.

Полнопольные ОКТ системы отличаются от всех вышеперечисленных тем, что в них применяется освещение всей исследуемой области, а не сфокусированный зондирующий пучок, как в остальных установках (рисунок 13, г) [116]. Такие установки являются наиболее быстродействующими, однако требуют увеличения мощности излучения, что может привести к

недопустимому нагреву тканей, что ограничивает их использование в условиях *in vivo* [116].

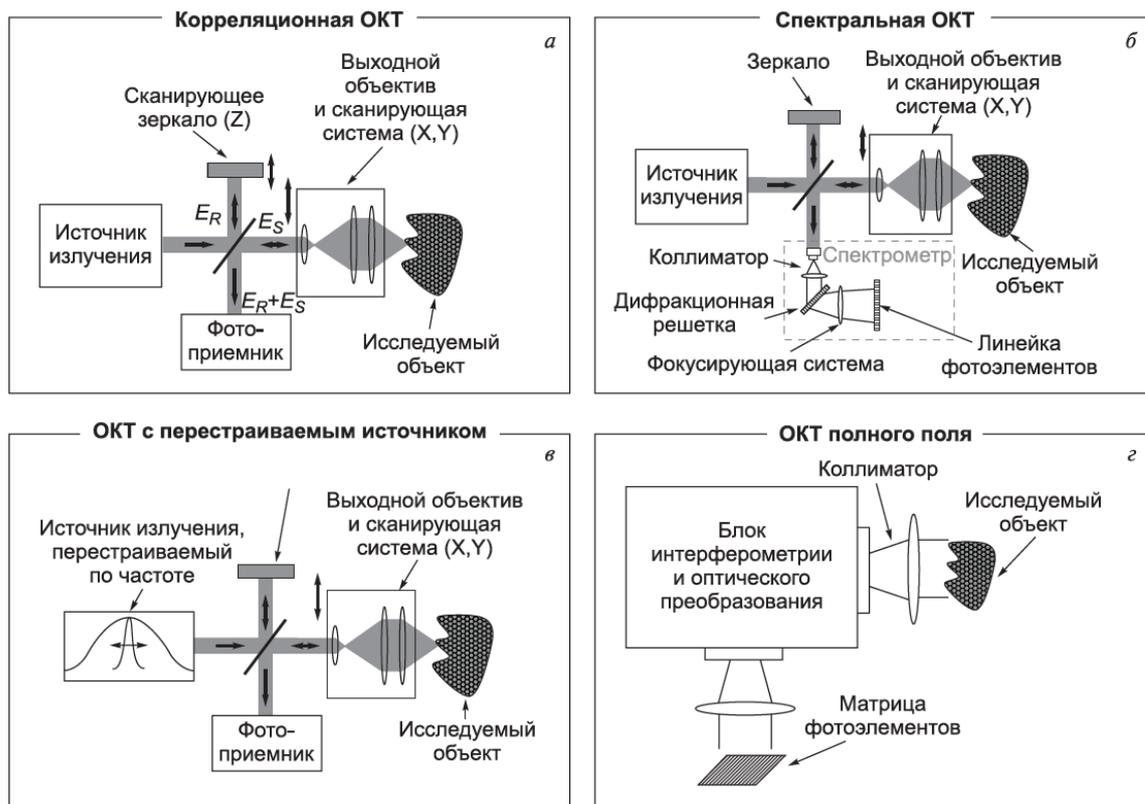


Рисунок 13. Разновидности ОКТ-установок по способу приема и анализа сигнала [117]

Построение исходного ОКТ изображения осуществляется следующим образом. После регистрации обратно рассеянного излучения в одной точке поверхности исследуемого объекта формируется профиль рассеяния по глубине, который получил название А-скана (рисунок 14, а). При последующем смещении зондирующего пучка в поперечном направлении формируется В-скан (рисунок 14, б), представляющий собой поперечное сечение объекта. Осуществление дополнительного перемещения зондирующего пучка в перпендикулярном направлении позволяет формировать трехмерные изображения (рисунок 14, в).

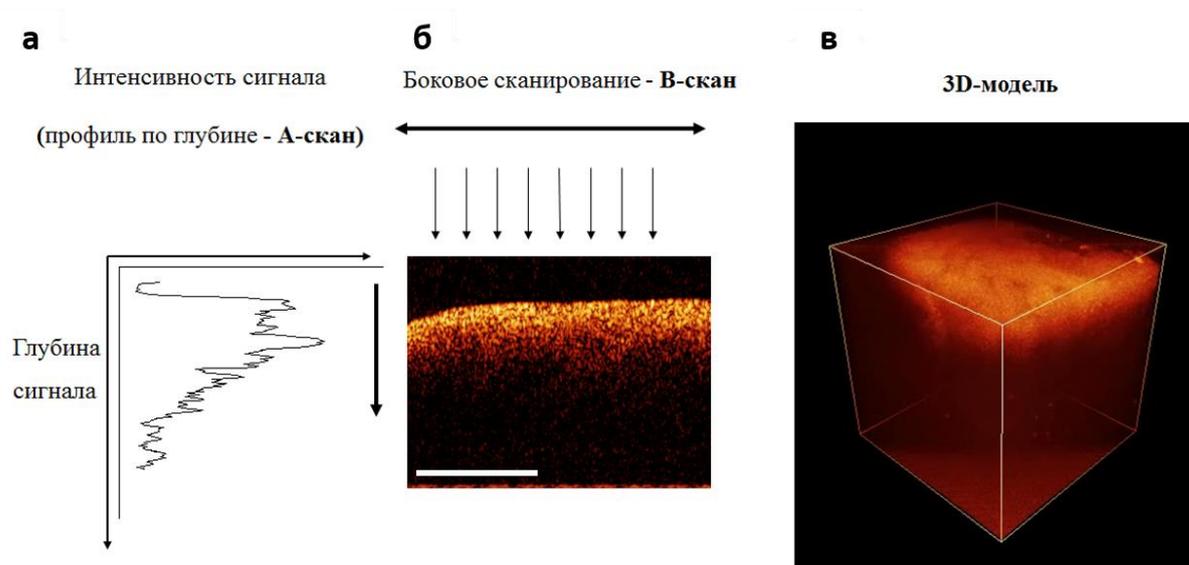


Рисунок 14. Формирование ОКТ изображений. (а) – профиль интенсивности сигнала по глубине (А-скан); (б) – двухмерное изображение объекта (В-скан); (в) – трехмерное изображение объекта. Шкала бар — 1 мм. [118]

Объем получаемой информации при помощи метода ОКТ может быть значительно увеличен за счет применения различных функциональных расширений. Среди них можно выделить оптическую когерентную ангиографию, позволяющую получать изображения сосудистого русла [119], а также оптическую когерентную эластографию, с помощью которой можно получить информацию об упругих свойствах объекта [120].

Отдельно необходимо выделить поляризационно-чувствительную ОКТ [121, 122] и ее разновидность – кросс-поляризационную ОКТ [123], которые позволяют усилить информативность метода за счет извлечения качественно новой информации об объекте. Поляризация представляет собой свойство, характеризующее изменение во времени вектора напряженности электрического поля световой волны. Известно, что большинство биологических тканей демонстрируют явление двулучепреломления, которое обуславливает регулярное с глубиной изменение поляризации света. В связи с этим, обратно рассеянное излучение будет содержать в себе компоненту с поляризацией, ортогональной к поляризации исходной зондирующей волны, что может быть детектировано при помощи вышеуказанных функциональных расширений. Кроме того, метод кросс-поляризационной ОКТ позволяет

обнаружить феномен микроскопической анизотропии рассеяния – кросс-рассеяние (деполяризация излучения) [123]. Поляризационные характеристики, детектируемые при помощи поляризационно-чувствительной и кросс-поляризационной ОКТ, предоставляют информацию о наличии в ткани определенных упорядоченных структур, их ориентации в пространстве (например, коллагеновых или миелиновых волокон).

Необходимо отметить, что явление двулучепреломления, возникающее в белом веществе, объясняется несколькими причинами. С одной стороны, белое вещество характеризуется упорядоченным расположением структур (миелиновых волокон). Возникновение двойного лучепреломления в объектах с такими структурными особенностями было впервые показано Вайнером в 1912 году на модели параллельных стержней в среде и затем подтверждено в ряде экспериментов [124]. С другой стороны, было продемонстрировано, что основное влияние на поляризационные свойства данной ткани оказывает миелиновая оболочка волокон, в частности, регулярное расположение липидов в структуре миелина [125]. Влияние геометрии отдельных компонентов белого вещества на двулучепреломление ткани является существенно менее выраженным.

Способы обработки ОКТ изображений и их применение для визуализации тканей головного мозга

В настоящее время известно несколько основных подходов к анализу получаемых ОКТ данных. Визуальный (качественный) анализ двухмерных структурных ОКТ изображений является традиционным методом обработки ОКТ данных (рисунок 15, а) [15, 126, 127]. Визуальный анализ позволяет идентифицировать характерные признаки ОКТ сигнала для опухолевых и нормальных тканей и, таким образом, разграничить нормальное белое вещество от опухоли с высокой чувствительностью (82-85%) и специфичностью (92-94%) [20]. Однако данный подход обладает рядом недостатков, включающих в себя недостаточную контрастность исходных изображений, а также субъективность оценки.

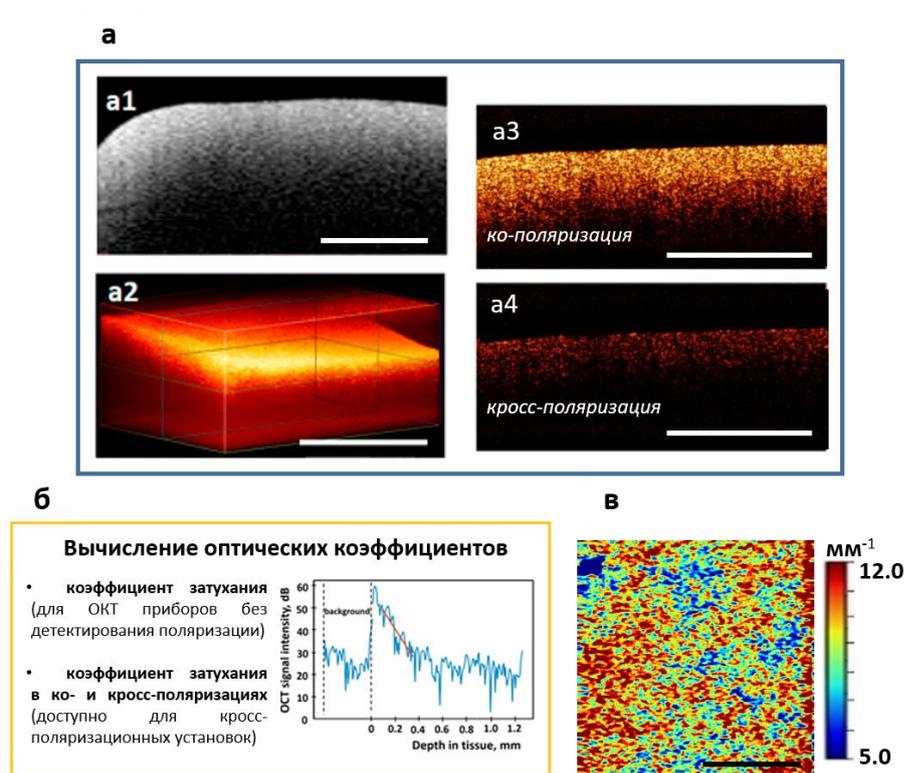


Рисунок 15. Методы обработки ОКТ данных. (а) – визуальный анализ структурных ОКТ изображений, (б) – вычисление оптических коэффициентов, (в) – построение оптических карт в псевдоцветной палитре Бар – 1 мм.

Количественная обработка ОКТ данных является вторым, более объективным, методом анализа результатов и проводится с помощью расчета оптических коэффициентов, среди которых наиболее часто используется коэффициент затухания (рисунок 15, б) [17, 21]. При наличии функции обнаружения состояния поляризации существует возможность вычисления дополнительных коэффициентов [128, 129].

Применительно к вычислению коэффициента затухания ОКТ сигнала, получаемого с тканей головного мозга, наиболее часто используется метод линейной аппроксимации логарифмированного сигнала [17, 21]. Кроме того, в работе Moiseev et al. [130] показана возможность применения алгоритма расчета оптических коэффициентов с разрешением по глубине, основанном на первоначально предложенном нидерландскими исследователями алгоритме [131].

В ряде работ продемонстрировано, что использование пороговых значений оптических коэффициентов позволяет увеличить диагностическую точность ОКТ для разграничения нормального белого вещества и опухоли до 100% [17, 128]. Основным ограничением данного подхода является получение одного числового значения со всего массива ОКТ данных, что не позволяет оценить гетерогенность получаемого сигнала.

Методом, объединяющим преимущества двух вышеуказанных подходов, является анализ изображений с использованием построения оптических карт в псевдоцветной палитре на основании полученных числовых распределений оптических коэффициентов (рисунок 15, в) [17, 128]. Он позволяет получать качественные контрастные изображения исследуемого объекта, тем самым характеризуясь наглядностью визуального подхода к анализу данных, и при этом отображаемая информация носит объективный характер.

Необходимо отметить, что псевдоцветная палитра является полностью настраиваемой, что позволяет выбрать как количество отображаемых цветов [17, 21, 28, 128], так и необходимый численный диапазон. Таким образом, данный подход позволяет получить максимально контрастные и информативные изображения.

Исследование рассеивающих свойств белого вещества головного мозга методом ОКТ

Характер взаимодействия оптического излучения с тканью зависит от двух основных факторов: проникающей способности излучения и рассеивающей способности исследуемой ткани [132]. Инфракрасное излучение ближнего инфракрасного диапазона, используемое в ОКТ, лежит в пределах «окна прозрачности» биологических тканей, что обуславливает максимально возможную глубину проникновения. Однако, следует отметить, что нервная ткань является сильно рассеивающей биотканью, что приведет к снижению глубины проникновения зондирующего излучения по сравнению, например, с роговицей глаза.

Визуализация белого вещества головного мозга методом ОКТ, в основном, осуществляется в рамках исследований, направленных на изучение возможности данного метода разграничивать опухолевые и здоровые нервные ткани [20, 21, 27]. Было показано, что нормальное белое вещество на структурных ОКТ изображениях характеризуется узкой полосой высокоинтенсивного сигнала, быстро затухающего по мере увеличения глубины объекта (рисунок 16, *a1*, *a2*) [20].

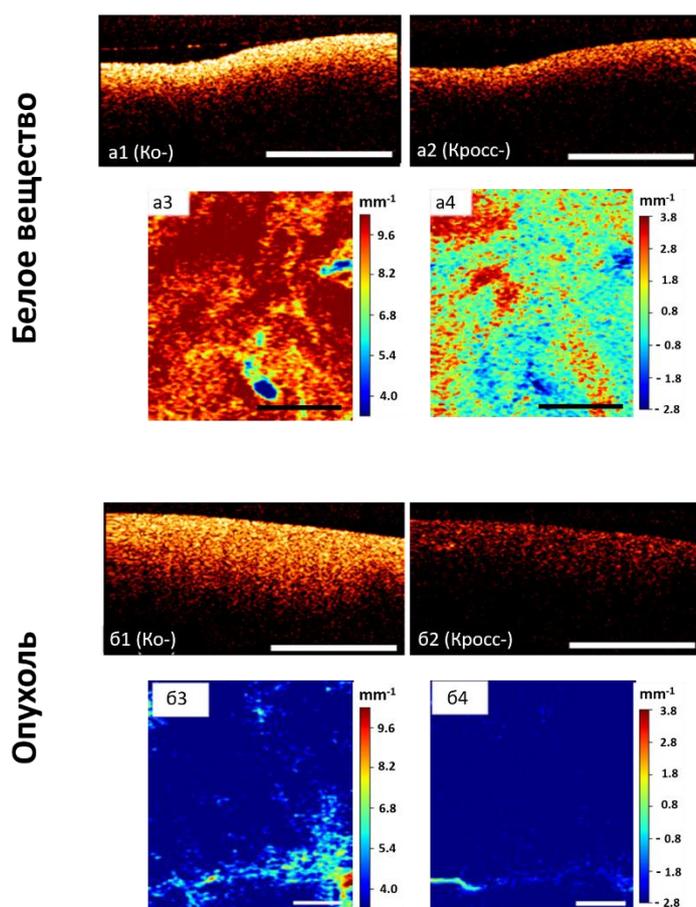


Рисунок 16. Характерные изображения нормального белого вещества (адаптировано из Yashin et al., 2019, *Frontiers Media*; Yashin et al., 2019, *Nature Research*). (a1), (a2) – ОКТ изображения белого вещества в ко- и кросс-поляризации соответственно; (б1), (б2) – оптические карты, демонстрирующие распределение значений коэффициента затухания в ко- и кросс-поляризации соответственно. Бар – 1 мм.

Кроме того, структурные компоненты белого вещества способны менять состояние поляризации зондирующего излучения, поэтому ткань проводящих путей отчетливо визуализируется в кросс-поляризации (рисунок 16, *a2*).

Результаты применения количественной обработки ОКТ сигнала от нормального белого вещества, опубликованные различными группами, обладают некоторыми различиями, что связано с особенностями используемых ОКТ установок и используемых алгоритмов расчета оптических коэффициентов [17, 128]. Так в работе Kut et al., значения коэффициента затухания белого вещества составили $6.2 \pm 0.8 \text{ мм}^{-1}$, в то время как Yashin et al. получили следующие значения коэффициента затухания: 8.5 [8.2; 9.3] мм^{-1} . Однако во всех случаях наблюдается сходная тенденция: области белого вещества демонстрируют высокие значения коэффициента затухания, статистически значимо превышающие значения, полученные от серого вещества и опухолевой ткани, что можно видеть на цветокодированных оптических картах (рисунок 16).

Таким образом, оптические свойства нормального белого вещества головного мозга статистически значимо отличаются от характеристик, демонстрируемых опухолями и нормальным серым веществом мозга. Показано, что при взаимодействии белого вещества с зондирующим излучением ближнего инфракрасного диапазона большая часть излучения рассеивается назад, а поглощается лишь незначительная часть [133], что, по всей видимости, и приводит к быстрому затуханию ОКТ сигнала. В областях серого вещества, наоборот, усиливается поглощение излучения, но снижается уровень обратного рассеяния, что отражается в большей глубине проникновения излучения. Данные различия обуславливаются структурными особенностями указанных типов ткани, а именно преимущественным содержанием миелиновых волокон в белом веществе. Известно, что клеточные мембраны, состоящие из фосфолипидного бислоя с включениями белков, обладают высоким индексом преломления [134]. В связи с этим миелиновая оболочка, представляющая собой большое количество слоев плазматической мембраны, также демонстрирует высокие значения индекса преломления (1.47), что обуславливает сильные рассеивающие свойства белого вещества [135]. Опухоли головного мозга так же, как и области серого вещества, состоят

преимущественно из клеток, имеющих низкий индекс преломления (1.32), а также не содержат такого количества мембран, следовательно, их рассеивающие свойства снижены [136].

Таким образом, структурные повреждения белого вещества, сопровождающихся разрушением миелиновых оболочек, вероятно будут находить отражение в изменении рассеивающих и поляризационных свойств, что может быть визуализировано при помощи ОКТ. Кроме того, при помощи данного метода можно зарегистрировать изменения, связанные с развитием отека, так как накопление межклеточной жидкости так же приводит к снижению рассеивающих свойств биоткани [137].

Суммируя все вышесказанное, можно сделать вывод о том, что ОКТ является перспективным методом исследования структурных особенностей белого вещества и их изменений под влиянием инвазивного роста злокачественных опухолей головного мозга. Особыми, решающими преимуществами метода являются его прижизненность, неинвазивность, отсутствие необходимости использования дополнительных контрастирующих агентов, высокая разрешающая способность, а также получение изображения в режиме реального времени с объективизацией результатов путем количественной обработки. Исследование при помощи метода ОКТ оптических свойств белого вещества, имеющего различную структуру, предоставит новую информацию об изменениях, возникающих в структуре проводящих путей при ряде патологий. Полученные результаты будут способствовать развитию фундаментальных исследований, а также дальнейшему внедрению метода в клиническую практику.

Глава 2 Объекты и методы исследования

2.1 Объекты исследования

Объектами исследований являлись *ex vivo* образцы мозговой ткани пациентов, полученные в ходе аутопсии; *ex vivo* мозговая ткань и прорастающие в ней глиальные опухоли (модели глиом крыс 101/8, 10-17-2, С6) в эксперименте; *ex vivo* образцы ткани головного мозга (белое вещество и опухоль) пациентов, полученные в ходе нейрохирургических вмешательств, направленных на резекцию глиальных опухолей (рисунок 17). Проведенные исследования одобрены Этическим комитетом ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России (выписка из протокола №3 от 21.02.2020, №6 от 17.04.2019).

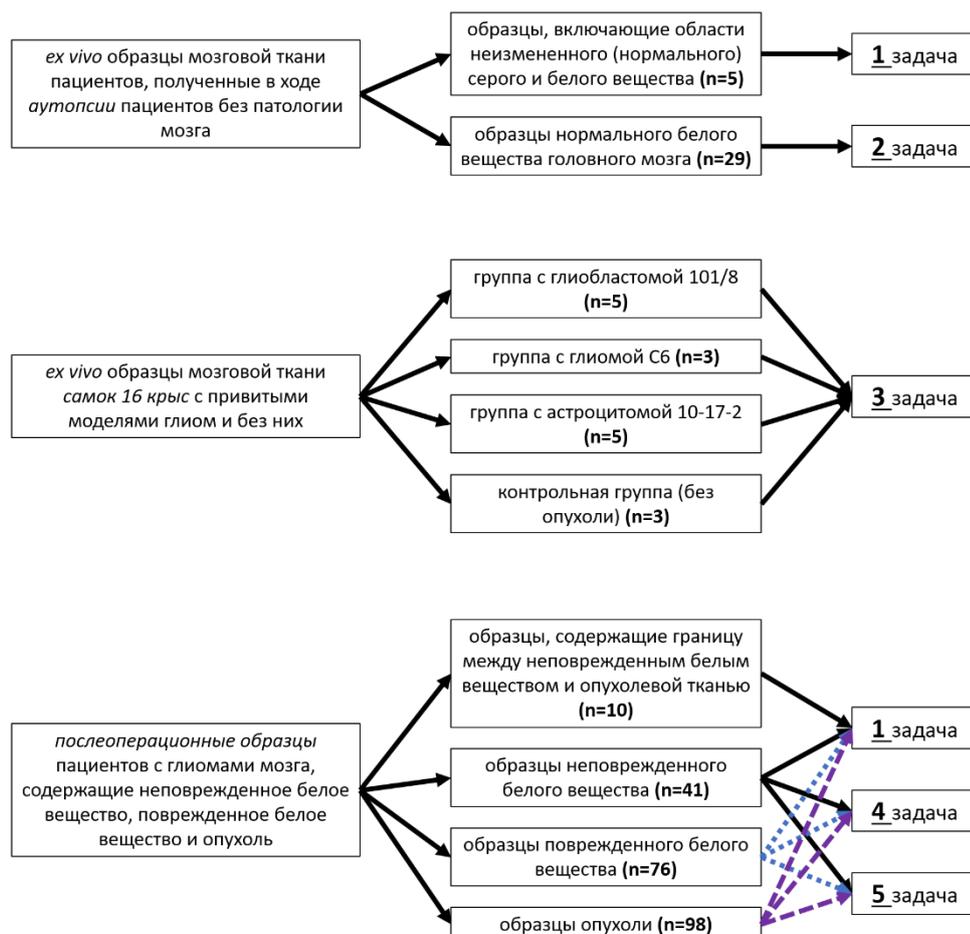


Рисунок 17. Соответствие объектов исследования поставленным задачам.

2.1.1. Материал, полученный в ходе аутопсий

Для решения 1-й и 2-й поставленных задач объектом исследования служил материал, полученный в ходе аутопсий (*ex vivo* образцы), включающий в себя 3 правых и 3 левых полушария головного мозга, полученный от 3-х пациентов в возрасте от 58 до 69 лет без патологических изменений ткани головного мозга. Информированные согласия были получены от законных представителей каждого из пациентов.

Для решения 1-й задачи в качестве объекта исследования служили *ex vivo* образцы нормальной ткани головного мозга, содержащие области серого и белого вещества (n=5) (рисунок 18).



Рисунок 18. Пример *ex vivo* образца нормальной ткани головного мозга, содержащего серое и белое вещество, использованного для решения 1-й задачи исследования.

Для решения 2-й задачи в качестве объекта исследования служили *ex vivo* образцы нормального белого вещества головного мозга. Образцы размером 2-3 см³ взяты из следующих областей головного мозга: 1) корковая зона – зона U-образных волокон (n=6), 2) подкорковая зона – зона длинных ассоциативных волокон (n=9), 3) мозолистое тело (n=4), 4) внутренняя капсула (n=5), 5) ствол мозга (n=5) (рисунок 19). Данные области использованы в качестве модели неповрежденных хорошо организованных волокон белого

вещества, которые практически невозможно получить у пациентов в ходе оперативного лечения опухолей (3, 4 и 5 области являются частью жизненно-важных зон, повреждение которых приведет к неврологическому дефициту). Также, эти области характеризуются морфологической гетерогенностью (отличаются между собой по толщине, плотности и взаимному расположению миелиновых волокон); 1-4 зоны служат структурами, рядом с которыми у пациентов чаще всего развиваются глиальные опухоли; мозолистое тело выбрано еще по причине его расположения в зоне прививаемых моделей глиальных опухолей у крыс – на его примере в 3 части работы будет изучено влияние опухоли на миелиновые волокна.

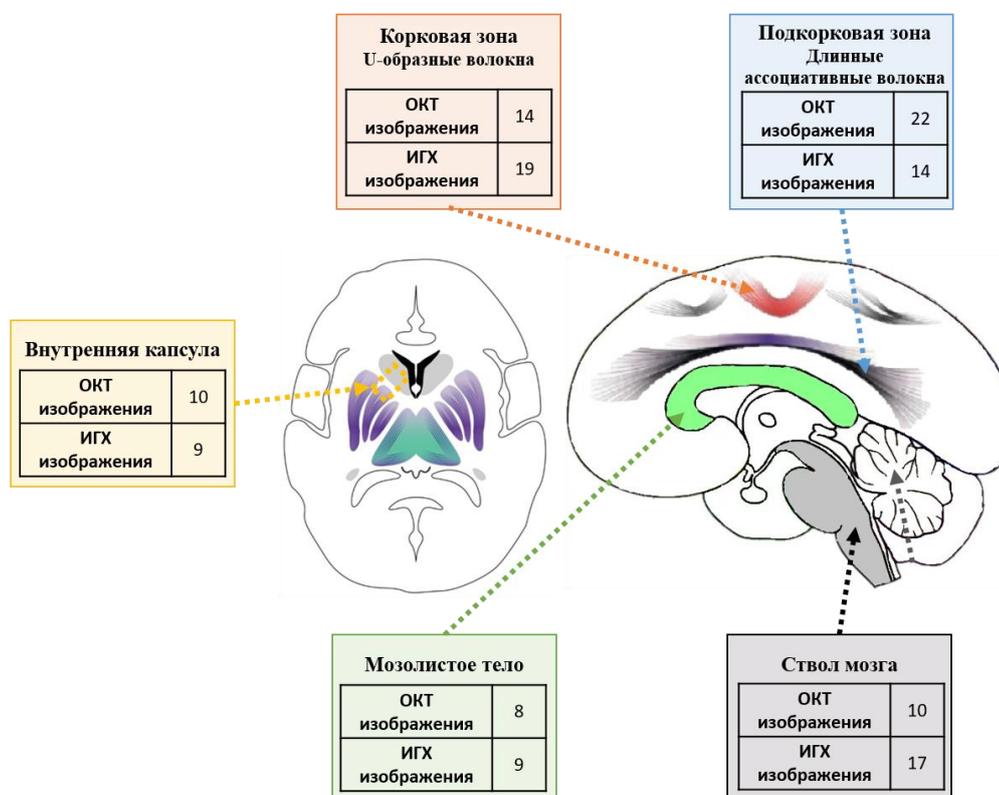


Рисунок 19. Области интереса, откуда были получены образцы белого вещества с указанием объема полученных данных.

После проведения аутопсии полученные образцы доставлялись к месту проведения ОКТ исследования на льду в закрытых чашках Петри, завернутыми в марлевую ткань, смоченную физиологическим раствором для предотвращения нарастания структурных изменений при транспортировке. Исследуемая поверхность образцов составила от 0,5 * 1 см, до 0,7 * 1,5 см, при

этом в результате исследования было получено 64 ОКТ изображения (рисунок 19). Для осуществления навигации в исследуемых образцах и последующего сопоставления ОКТ и гистологических изображений, в каждый образец был введен непрозрачный объект (хирургическая нить).

После проведения ОКТ исследования образцы фиксировались в 10% растворе формалина в течение 48 часов, после чего было сделано несколько срезов с каждого образца из области, совпадающей с плоскостью получения ОКТ изображения. Далее проводилось иммуногистохимическое исследование с использованием антител к основному белку миелина (MBP – англ. myelin basic protein) (Abcam, США). В последующем с гистологических срезов с областей, где было проведено ОКТ сканирование, были получены ИГХ изображения размером $490 * 653 \text{ мкм}^2$, в дальнейшем подвергнутые количественной обработке при помощи разработанного алгоритма.

Общая схема эксперимента представлена на рисунке 20.

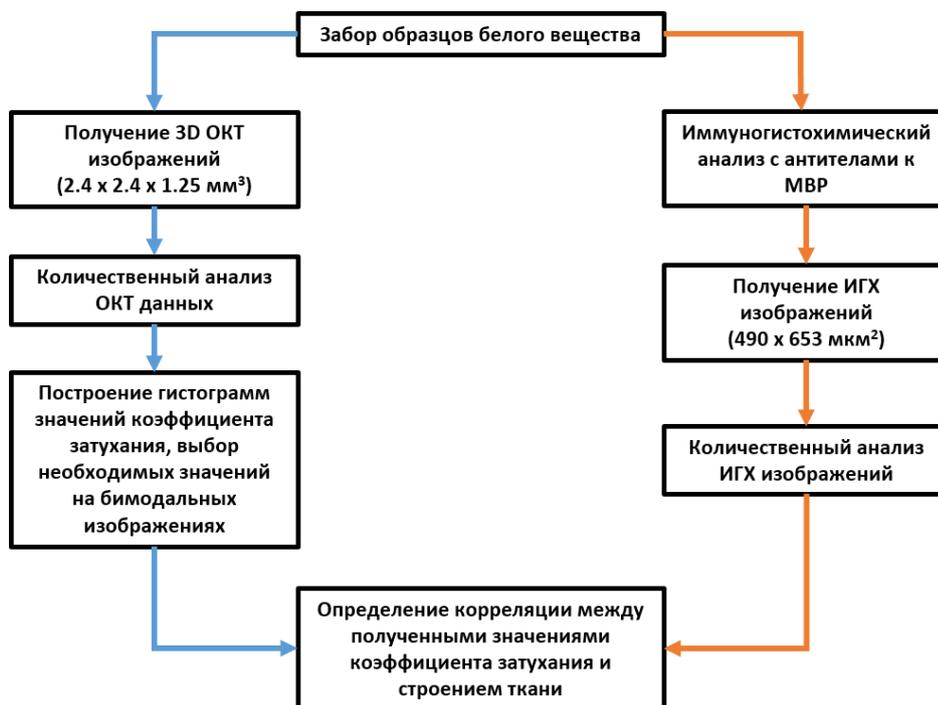


Рисунок 20. Общая схема эксперимента, проведенного на материале, полученном в ходе аутопсий.

2.1.2 Экспериментальные модели глиальных опухолей

Для решения 3-й задачи в качестве объекта исследования служили *ex vivo* образцы ткани головного мозга крыс. Для изучения изменений коэффициента затухания белого вещества, возникающих при инвазии глиальных опухолей, характеризующихся различной степенью злокачественности, разными темпами роста, а также разной степенью инвазивности роста в окружающие ткани были выбраны следующие экспериментальные модели глиальных опухолей: глиобластома 101/8, С6-глиома и астроцитомы 10-17-2.

Глиобластома крысы 101/8, полученная и поддерживаемая в институте морфологии РАН, первоначально была получена в 1967 году путем имплантации 7,12-диметил-(а)-бензантрацена в правое полушарие мозжечка крысы-самки линии Wistar. В результате серийного интрацеребрального пассирования после 14го пассажа произошло озлокачествление опухоли, которая приобрела характер глиобластомы, который устойчиво сохранялся на протяжении последующей работы с данной моделью до настоящего времени [138]. Данная опухоль является высокозлокачественной, выражено инфильтрирующей окружающие мозговые ткани.

Глиома С6 так же была получена в начале 1970х гг. в результате серийного внутривенного введения N-метилнитрозомочевины крысам линии Wistar. Внутримозговая инъекция клеточной культуры данной опухоли довольно быстро приводит к образованию опухолевого узла, который склонен к формированию некротических очагов и кровоизлияний. С6 глиома характеризуется высокой злокачественностью, однако незначительно инвазирует в нормальную ткань мозга, что отличает ее от экспериментальной модели глиобластомы [139].

Опухоль 10-17-2 по своим морфологическим свойствам представляет собой анапластическую астроцитому. Данный тип опухоли обладает менее выраженной митотической активностью по сравнению с моделью глиобластомы, а также не склонен к формированию некрозов и кровоизлияний

внутри опухолевой массы. Астроцитомы 10-17-2 характеризуется меньшей злокачественностью в сравнении с моделями 101/8 и С6, что находит свое отражение в меньших темпах роста опухолевого узла и незначительной инфильтрации опухолевыми клетками окружающих тканей.

Работа выполнена на 16 самках крыс линии Wistar возрастом 12-16 недель: группа с глиобластомой 101/8 (n=5), группа с глиомой С6 (n=3), группа с астроцитомой 10-17-2 (n=5), контрольная группа (без опухоли) (n=3). Крысы с опухолями были предоставлены НИИ Морфологии человека РАМН. Эксперимент проводили на 11-14 день после вкола культуры опухолевых клеток у группы с моделью 101/8, на 21-28 день у группы с моделью 10-17-2 и на 12-15 день у группы с С6 глиомой. Разные сроки эксперимента при использовании разных опухолевых моделей были продиктованы необходимостью достижения опухолью достаточных для исследования размеров. Визуальными критериями созревания опухоли были: 1) заметное снижение веса животного (свыше 10% массы тела); 2) снижение двигательной активности; 3) поведенческие нарушения (вялость, апатия).

При работе с животными руководствовались «Правилами для проведения работ с использованием экспериментальных животных» [140] и «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» [141].

Общая схема эксперимента включала в себя следующие этапы: 1) наркотизация животного; 2) декапитация животного, извлечение головного мозга из полости черепа; 3) проведение *ex vivo* ОКТ исследования свежеприготовленного фронтального среза головного мозга крысы, сделанного через видимый на поверхности мозга центр опухоли или место ее вкола; 3) гистологическое и ИГХ исследование образцов.

2.1.3. Материал, полученный в ходе резекции глиальных опухолей

Для решения 1-й, 4-й и 5-й поставленных задач объектами исследования служили *ex vivo* образцы ткани головного мозга, полученных от 57 пациентов

с глиомами головного мозга разной степени злокачественности: астроцитомы Grade I–II — 23, астроцитомы Grade III — 15, глиобластома Grade IV — 19.

Общая характеристика пациентов представлена в таблице 2.

Таблица 2. Общая характеристика пациентов, включенных в исследование

Сравниваемые параметры	Значение
Возраст, лет Av [Min – Max]*	47 [36 – 60]
Пол (М/Ж)	35/22
Диагноз: Grade I–II/Grade III/Grade IV	23/15/19
Месторасположение опухоли: лобная доля, теменная доля, височная доля, затылочная доля	31 / 14 / 27 / 6
Проводившееся до операции лечение: нет/лучевая терапия/химиотерапия/комбинированное лечение	42 / 2 / 1 / 12

*Av [Min – Max], где Av – среднее значение, Min и Max – минимальное и максимальное значение соответственно

Забор образцов белого вещества производился в два этапа: на первом этапе производился забор участков заведомо неповрежденного белого вещества на максимально возможном удалении от опухоли; на втором этапе забор образцов перитуморального белого вещества производился в непосредственной близости от опухолевого узла. Кроме того, был осуществлен забор образцов опухолевой ткани. В ряде случаев были получены образцы большего размера, содержащие и опухолевые, и здоровые ткани (n=10).

Забор образцов проводился с учетом данных предоперационного МРТ-исследования, а также нейрофизиологического мониторинга, осуществляясь строго в рамках планируемого оперативного вмешательства. Полученный материал помещался в марлевые салфетки, смоченные физиологическим раствором, и доставлялся на ОКТ исследование в течение 1,5 часов в закрытых чашках Петри на льду, что позволило полностью сохранить его морфологические и рассеивающие характеристики.

В ходе исследования было получено 158 образцов белого вещества и 98 образцов опухоли. С каждого образца был получен набор ОКТ изображений в 1-3 ряда (традиционно по наибольшей длине образца). В общей сложности было получено 930 ОКТ изображений белого вещества и 400 ОКТ изображений опухоли. Необходимо отметить, что для последующего анализа морфологических и рассеивающих свойств опухолей все типы опухолей были отнесены к одной группе и анализировались вместе.

Затем все образцы были направлены на гистологическое исследование, где с каждого образца был получен набор гистологических срезов. Для прицельного изучения морфологических особенностей белого вещества было отобрано 117 образцов, при этом образцы, содержащие дополнительно серое вещество или опухоль были исключены из исследования. Проведенное изучение структурных особенностей образцов, описанное в разделе 2.5.1, позволило классифицировать их на три типа ткани: 1) неповрежденное белое вещество (поле зрения заполнено сохранными плотно упакованными волокнами, расположенными упорядоченно, либо в виде сетки), $n=41$; 2) поврежденное белое вещество (наблюдается исчезновение миелиновых волокон, их фрагментация, $>20\%$ волокон повреждены, а также наблюдается инфильтрация опухолевыми клетками), $n=76$; 3) опухоль, $n=98$.

Перед анализом полученных ОКТ данных был осуществлен отбор изображений, не содержащих артефакты (поврежденные, обрезанные ОКТ изображения и изображения с бликами были исключены), в результате которого в исследование были включены 576 изображений белого вещества и 297 изображений опухоли.

Общая схема последующего анализа данных включала в себя несколько этапов:

- 1) Вычисление медианных значений коэффициента затухания (μ) для каждого ОКТ изображения с последующим сравнением значений между различными типами ткани, а также корреляционным анализом типов ткани и значений коэффициента;

- 2) Построение цветокодированных оптических карт распределений значений коэффициента затухания по ОКТ изображению с последующим визуальным анализом;
- 3) ROC-анализ применения коэффициента затухания для разграничения неповрежденного и поврежденного белого вещества, а также поврежденного белого вещества и опухоли.

2.2 Методы исследования

2.2.1. Метод кросс-поляризационной оптической когерентной томографии

Работа выполнена на скоростном спектральном мультимодальном оптическом когерентном томографе, разработанном и сконструированном в ИПФ РАН (Нижний Новгород, Россия) (рисунок 21, *а*) [142-146]. Установка оснащена рядом модальностей, включающих в себя кросс-поляризационную ОКТ [147, 148], ОКТ-эластографию [120], а также ОКТ-ангиографию [119]. Данная работа была проведена с использованием только кросс-поляризационной модальности.

Кросс-поляризационная оптическая когерентная томография представляет собой модификацию поляризационно-чувствительной ОКТ. В качестве зондирующего излучения в настоящей установке используется поляризованный свет с рабочей длиной волны 1310 нм. Данная модификация ОКТ прибора позволяет регистрировать изменения в состоянии поляризации зондирующего излучения в результате двулучепреломления и кросс-рассеяния. В результате на экране персонального компьютера одновременно строятся два изображения: а) стандартное интенсивное изображение в ко-поляризации (регистрируется излучение с состоянием поляризации, параллельным зондирующему, аналог структурных изображений, получаемых на не поляризационных приборах) (рисунок 21, *б*, *верхняя часть изображения*); б) изображение в кросс-поляризации (регистрируется

излучение с состоянием поляризации, перпендикулярным зондирующему) (рисунок 20, б, нижняя часть изображения). Благодаря тому, что ОКТ прибор осуществляет трехмерное сканирование ($2,4 \times 2,4 \times 1,25 \text{ мм}^3$), происходит построение двумерных изображений в трех разных плоскостях: вдоль плоскости сканирования, перпендикулярно плоскости сканирования, а также *en face* изображения (вид сверху – 256×256 А-сканов). При формировании ОКТ-изображения мощность ОКТ-сигнала $P(\text{Вт})$, соответствующая каждому пикселю изображения, пересчитана в яркость $I(\text{дБ})$ с использованием десятичного логарифма $I(\text{дБ})=10\lg(P)$. Для удобства восприятия значения яркости $I(\text{дБ})$ кодируются в псевдо-цветовой коричневой палитре при помощи линейного преобразователя, где светлые области отражают более интенсивный сигнал, более темные – менее интенсивный. В результате наличия активной системы управления, поддерживающей круговую поляризацию на выходе из зонда, обеспечивается надежность получаемой информации о поляризации на ОКТ-изображении, что не зависит от положения ткани и зонда [148].

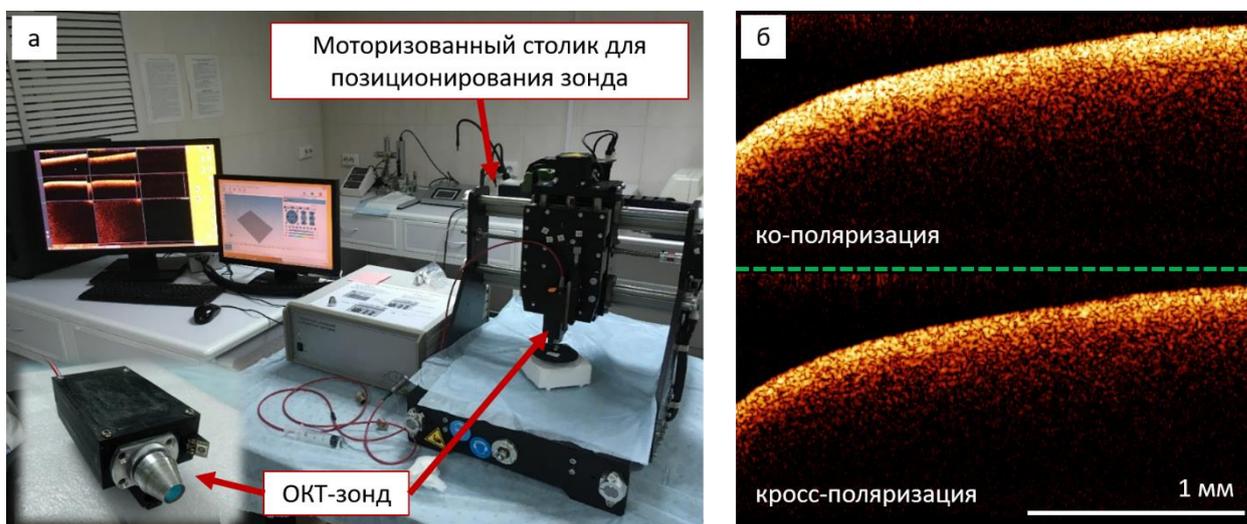


Рисунок 21. Кросс-поляризационный оптический когерентный томограф с торцевым зондом для бесконтактного способа съемки ОКТ изображений и моторизованным столом для позиционирования зонда (а). ОКТ-изображение, полученное с послеоперационного образца белого вещества (б).

Технические характеристики ОКТ прибора следующие: рабочая длина волны – 1310 нм при ширине спектра 100 нм, скорость сканирования – 20000 А-сканов/с, аксиальное разрешение (в воздухе) – 10 мкм, поперечное разрешение – 15 мкм, мощность излучения на объекте – 5 мВт. Глубина сканирования в воздухе – 1,7 мм.

Сканирование ткани возможно осуществить контактным и бесконтактным способом. Процесс получения одного трехмерного ОКТ-изображения занимает 26 с. Оптическая схема ОКТ прибора построена по принципу common path и представлена на рисунке 22.

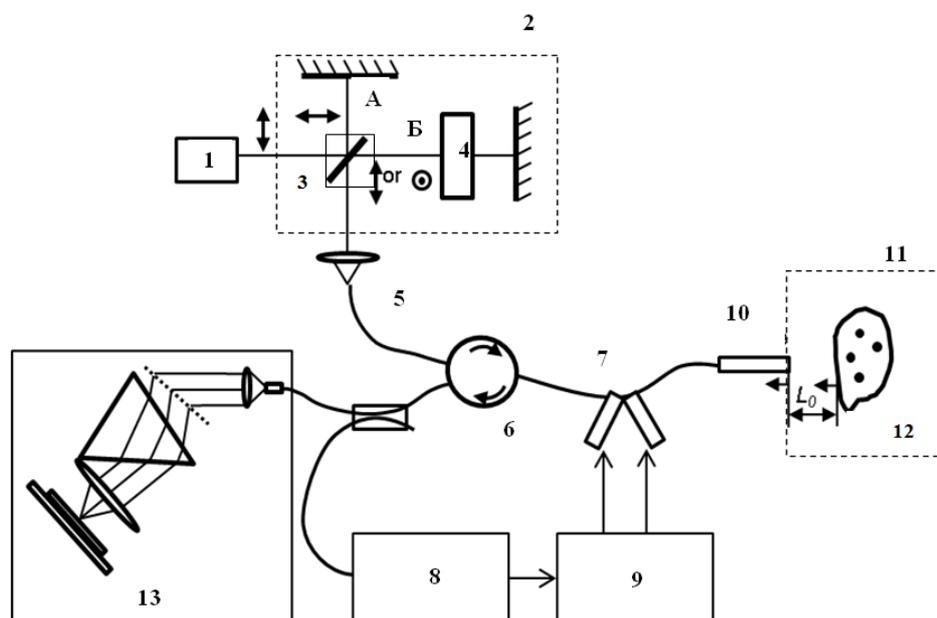


Рисунок 22. Оптическая схема кросс-поляризационного оптического когерентного томографа: 1 — суперлюминесцентный диод; 2 — компенсирующий интерферометр Майкельсона; 3 — изотропный делитель; 4 — управляемый фарадеевский 45° вращатель поляризации; 5 — одномодовое волокно SMF-28; 6 — оптический циркулятор; 7 — электрический управитель поляризации; 8 — поляризационный анализатор; 9 — PZT-драйвер управителя поляризации; 10 — зонд; 11 — измерительный интерферометр Физо; 12 — объект исследования; 13 — оптический спектрометр

2.2.2. Гистологическое и иммуногистохимическое исследование

С целью изучения структурных особенностей все исследуемые образцы были направлены на гистологическое исследование. С поверхности каждого

образца, соответствующей поверхности ОКТ-исследования, был получен набор гистологических срезов толщиной 4 мкм, после чего срезы были окрашены по стандартной методике с использованием гематоксилин-эозина [149] и люксолевого прочного синего [150]. Гистологические срезы тканей были качественно оценены врачом-патоморфологом. Кроме того, было проведено иммуногистохимическое исследование с использованием антител к основному белку миелина [72, 151].

Гистологические срезы оценивались на микроскопе Leica DM2500 DFC (Leica Microsystems, Германия), оснащенный цифровой камерой Leica DFC290 (Leica Microsystems). Гистологические изображения были получены при увеличении объектива x10 (размер изображения 1305x979 мкм), x20 (размер изображения 653x490 мкм). Полученные срезы оценивались как качественно, так и количественно.

2.3. Методики исследования

Методика ОКТ исследования ex vivo образцов ткани головного мозга экспериментальных животных и пациентов.

1. Фотографирование образцов головного мозга до проведения ОКТ-исследования. При исследовании послеоперационных образцов – определение поверхности, наиболее подходящей для ОКТ исследования (отсутствие кровоизлияний и участков коагуляции).
2. Размещение образца на плоской поверхности, определение зон интереса.
3. Помещение образца под чистый торцевой зонд, расположенный перпендикулярно к поверхности ткани.
4. Установка зонда в место получения первого ОКТ изображения с помощью моторизованной установки для позиционирования зонда.
5. Запись необходимого количества ОКТ-изображений в бесконтактном режиме из следующих областей интереса: 1) экспериментальные животные с моделями глиальных опухолей: опухоль, граница опухоли и белого вещества,

нормальное белое вещество, удаленное от опухоли на 2-4 мм; 2) материал аутопсий и послеоперационные образцы: 1-3 ряда изображений по максимальной длине образца. Последовательное получение изображений с перекрытием областей сканирования производилось с помощью позиционирования ОКТ-зонда с шагом 2 мм.

6. Сохранение каждого информативного изображения под кодовым именем, содержащим информацию о месторасположении зоны сканирования.

7. После снятия ОКТ-изображений области исследования маркировали гистологической тушью, фиксировали в 10% растворе формалина в течение 48 часов и отправляли на последующее приготовление гистологических срезов с плоскости, совпадающей с плоскостью получения ОКТ-изображений.

2.4. Анализ данных, полученных методом оптической когерентной томографии

Трехмерные ОКТ данные, полученные с образцов мозговой ткани лабораторных животных и пациентов, подвергались цифровой обработке с вычислением коэффициента затухания μ в каждом А-скане в заданном диапазоне глубин. В результате объемные изображения переводились в цветокодированные карты коэффициента затухания вида сверху на ткань (*en face*), и оценивались визуально с использованием критериев преобладания определенного(-ых) цвета(-ов) и гетерогенности карт: оранжевый и красный цвета соответствовали высоким значениям μ ($\geq 9,5 \text{ мм}^{-1}$), синий цвет – низким значениям μ ($\leq 7 \text{ мм}^{-1}$), голубой и зеленый цвета отображали промежуточные значения (от 7 до $9,5 \text{ мм}^{-1}$). Исходные изображения в псевдокоричневой палитре в данных видах экспериментов не давали нужного контраста между изучаемыми структурами (в случае образцов от экспериментальных животных, препятствием к визуализации был еще и мелкий масштаб изучаемых структур мозга), в то время как расчет коэффициента затухания сигнала и его перевод в цветовую шкалу позволил увеличить контраст и, таким

образом, облегчить классификацию видов тканей и ее состояний. Кроме построения двумерных карт, для каждого ОКТ изображения были рассчитаны средние значения коэффициента затухания для исследуемых образцов.

В настоящем исследовании для вычисления коэффициента затухания использовались два подхода: 1) метод линейной аппроксимации логарифмированного сигнала; 2) метод с разрешением по глубине.

Первый подход является наиболее распространенным применительно к анализу ОКТ данных, полученных с ткани головного мозга [17, 21], и работает на основе предположения об оптической однородности исследуемой биоткани. При этом ОКТ сигнал экспоненциально затухает с глубиной:

$$I = I_0 \cdot \exp(-2\mu z), \quad (1)$$

где I — сигнал ОКТ, I_0 — начальная интенсивность пучка, μ — коэффициент затухания образца, z — координата глубины.

Логарифмирование зависимости глубины сигнала ОКТ делает ее линейной по глубине:

$$\ln(I) = -2\mu z + \ln(I_0), \quad (2)$$

Данная зависимость позволяет вычислить искомый коэффициент затухания.

Подход вычисления коэффициента затухания с разрешением по глубине работает на основе двух предположений. Во-первых, доля обратного рассеяния одинакова на разных глубинах ОКТ изображения. Во-вторых, зондирующее излучение полностью затухает в пределах глубин ОКТ изображения. Данный подход был предложен впервые Vermeer et al в 2014 году [131]:

$$I_i \sim \alpha \cdot \mu_{att}(z_i) \cdot \exp[-2 \cdot \sum_{j=0}^i \mu_{att}(z_j) \cdot \Delta], \quad (3)$$

где I_i — сумма интенсивностей ОКТ сигнала в обоих каналах поляризации, μ_{att} — коэффициент затухания образца, z_i — координата глубины, Δ — размер пикселя по аксиальной координате.

Нашей исследовательской группой (*Институт прикладной физики РАН, Приволжский исследовательский медицинский университет*) был модифицирован подход вычисления коэффициента затухания с разрешением по глубине [130], который по сравнению с оригинальной работой [131] строго учитывает наличие шума, что препятствует возникновению ошибок в расчетных значениях коэффициента затухания. В этом случае коэффициент затухания с разрешением по глубине может быть записан как:

$$\mu_i = \frac{H_i \cdot SNR_i^\mu}{|H_i|^2 \cdot SNR_{i+1}^\mu} \cdot \mu^{est}$$

$$H_i = 1 - \frac{\sum_{i+1}^\infty N_j}{\sum_{i+1}^\infty I_j + \sum_{i+1}^{imax} N_j} = 1 - \frac{\langle N \rangle \cdot (i_{max} - i)}{\sum_{i+1}^\infty I_j + \sum_{i+1}^{imax} N_j}$$

$$SNR_i^\mu = \sum_{x_i, z_i \in W} \frac{|\mu_i^{est}|^2 - |N_i^\mu|^2}{|N_i^\mu|^2} \quad (4)$$

$$N_i^\mu = \frac{N_i}{2\Delta \sum_{i+1}^{imax} (I_j + N_j)} = \frac{\langle N \rangle}{2\Delta \sum_{i+1}^{imax} (I_j + N_j)}$$

где $\langle N \rangle$ - амплитуда минимального уровня шума, которая может быть оценена до измерений, SNR_i^μ - локальное отношение сигнал/шум для распределения коэффициента затухания, которое оценивается путем усреднения в прямоугольном окне со стороной W пикселей. Значение $(I_j + N_j)$ - это измеренный сигнал на глубине j .

Количественная обработка ОКТ данных проводилась в математической среде Anaconda (Python v. 3.7). Расчет средних значений коэффициента затухания для образцов аутопсий и послеоперационных образцов был проведен по всему объемному изображению, для образцов лабораторных животных на изображениях выделялась конкретная область интереса.

2.5. Оценка гистологических и иммуногистохимических срезов

2.5.1. Визуальная оценка гистологических срезов, окрашенных гематоксилин-эозином, люксолевым прочным синим с крезил виолетом, а также ИГХ срезов

Визуальная оценка окрашенных гистологических срезов, полученных с образцов ткани головного мозга лабораторных животных и человека, была проведена высококвалифицированным патоморфологом при помощи световой микроскопии для достижения следующих целей: 1) определение типа ткани; 2) определение процентного содержания белого вещества в образце; 3) определение сохранности миелиновых волокон и наличия инфильтрации опухолевыми клетками; 4) определение структур белого вещества, визуализируемых на срезе (в случае среза мозга лабораторного животного), и их вовлеченности в патологический процесс (разрушение миелиновых волокон, инфильтрация опухолевыми клетками, наличие отека).

Предварительное определение типа ткани оценивалось на гистологических срезах, окрашенных при помощи ГЭ, что позволяет легко отличить опухолевую ткань. При наличии белого вещества в оцениваемом препарате дальнейший визуальный анализ производился на срезах, окрашенных люксолевым прочным синим, специфичным к миелину, а также на ИГХ срезах. Определение процентного содержания белого вещества в образце производилось с целью последующего отбора образцов для включения в исследование, при этом доля белого вещества в исследуемом образце должна была составлять не менее 70%. Образцы, содержащие меньшее количество белого вещества, были исключены из исследования. Определение степени сохранности миелиновых волокон также производилось на срезах, окрашенных люксолевым прочным синим, и ИГХ срезах. При этом, в случае повреждения миелиновых волокон может наблюдаться их фрагментация или полное исчезновение в отличие от областей неповрежденного белого вещества, где сохранены нормальная структура и

расположение миелиновых волокон. Кроме того, при изучении областей поврежденного белого вещества оценивалось наличие и выраженность отека (незначительный/умеренный/выраженный), а также инфильтрация ткани опухолевыми клетками (незначительная/выраженная). Выраженность отека определялась на основании увеличения промежутков между миелиновыми волокнами, заполненных межклеточной жидкостью. При обнаружении диффузного распространения опухолевых клеток и их скоплений в образце белого вещества инфильтрация считалась выраженной, при визуализации единичных опухолевых клеток – незначительной.

2.5.2. Количественная обработка ИГХ изображений

Для проведения количественной оценки структуры изучаемых образцов нормального белого вещества, полученных в ходе аутопсий, был осуществлен численный анализ полученных ИГХ изображений. На первом этапе опытным патоморфологом была проведена оценка качества окрашивания срезов, так как, вследствие использования ручной техники окрашивания, интенсивность окрашивания была неоднородной в различных образцах. Образцы, где интенсивность окраски миелиновых волокон была непригодной для последующего анализа, были исключены. С каждого из отобранных образцов были получены 3-4 ИГХ изображений размером 490 x 653 мкм², которые затем были обработаны при помощи авторского алгоритма, принцип работы которого подробно изложен в опубликованной статье [152].

На первом этапе количественной обработки ИГХ изображения были разделены на изображения волокон и изображения ядер [153], как представлено на рисунке 23. На каждом изображении были определены точки, окрашенные одним красителем (ДАБ и гематоксилин соответственно). При этом концентрация красителя ДАБ обрабатывалась как изображение волокон, а концентрация гематоксилина обрабатывалась как изображение ядер.

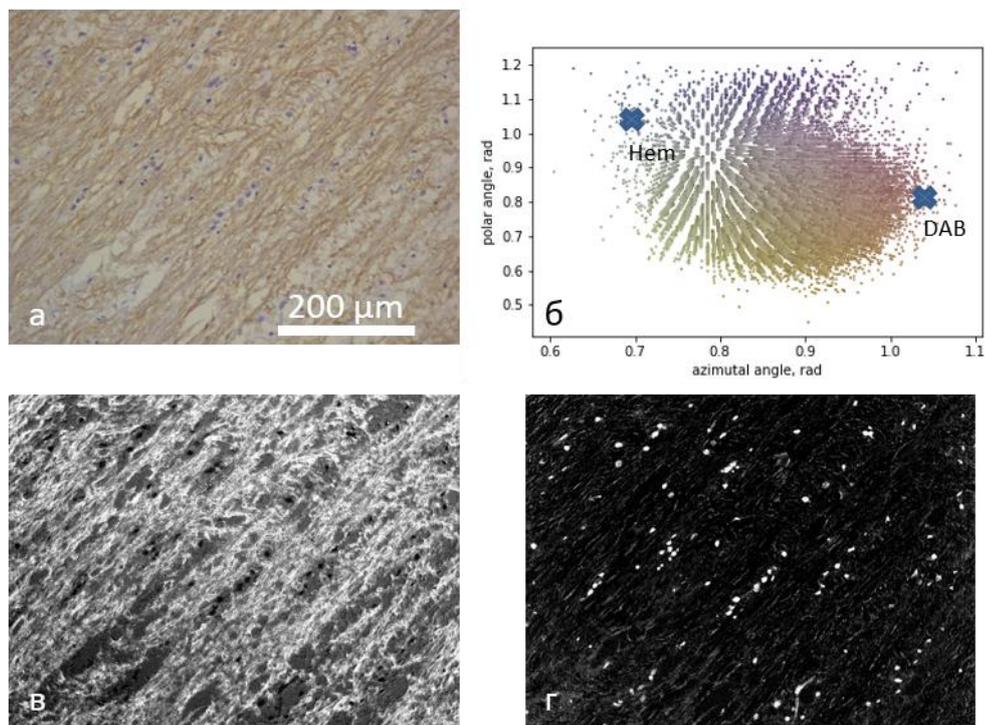


Рисунок 23. Декомпозиция ИГХ изображения на изображения волокон и ядер. А – ИГХ изображение; б – распределение пикселей ИГХ изображения, которое позволяет выделить пиксели, соответствующие волокнам (ДАБ – DAB) и ядрам (гематоксилин – Hem); в – изображение волокон; г – изображение ядер.

Полученные изображения волокон и ядер (распределения соответствующих концентраций красителей) были бинаризованы и проанализированы. Для анализа ядер использовался параметр количества клеточных ядер (ПКЯ), который позволяет подсчитывать общее количество клеточных ядер в поле зрения. Вследствие того, что подавляющее большинство клеток составляют клетки нейроглии, с помощью ПКЯ можно оценить количество глиальных клеток в поле зрения. Для количественного выявления различий в характере расположения миелиновых волокон были использованы два параметра. На первом этапе был определен параметр плотности волокон, рассчитываемый как площадь, занимаемая бинаризованными волокнами, деленная на общую площадь ИГХ изображения в пикселях:

$$Dens = \frac{\sum_{i,j} B_{i,j}}{N_{image}} \quad (5),$$

где $B_{i,j}$ – количество пикселей на бинаризованном изображении волокон, N_{image} – суммарное количество пикселей на ИГХ изображении. Второй параметр был предложен для отражения характера расположения волокон (ориентации волокон и площади, занимаемой волокнами в поле зрения) (рисунок 24):

$$FSP = 0.5 \cdot (\sqrt{E[S_{row}^2] - (E[S_{row}])^2} + \sqrt{E[S_{column}^2] - (E[S_{column}])^2})$$

$$S_{row} = \sum_{j=1 \dots N_{column}} B_{i,j} \quad (6)$$

$$S_{column} = \sum_{i=1 \dots N_{row}} B_{i,j}$$

где FSP - это предлагаемый структурный параметр волокон (СПВ), E - функция ожидаемого значения, $B_{i,j}$ - значение пикселя бинаризованного изображения волокна, N_{row} , N_{column} - количество пикселей в строках и столбцах ИГХ изображения соответственно. Как видно из рисунка 24, δ , структура пространств и пучков волокон приводит к более высокому стандартному отклонению общего числа бинаризованных пикселей в строках и столбцах изображения, что легко количественно оценить с помощью предлагаемого параметра СПВ.

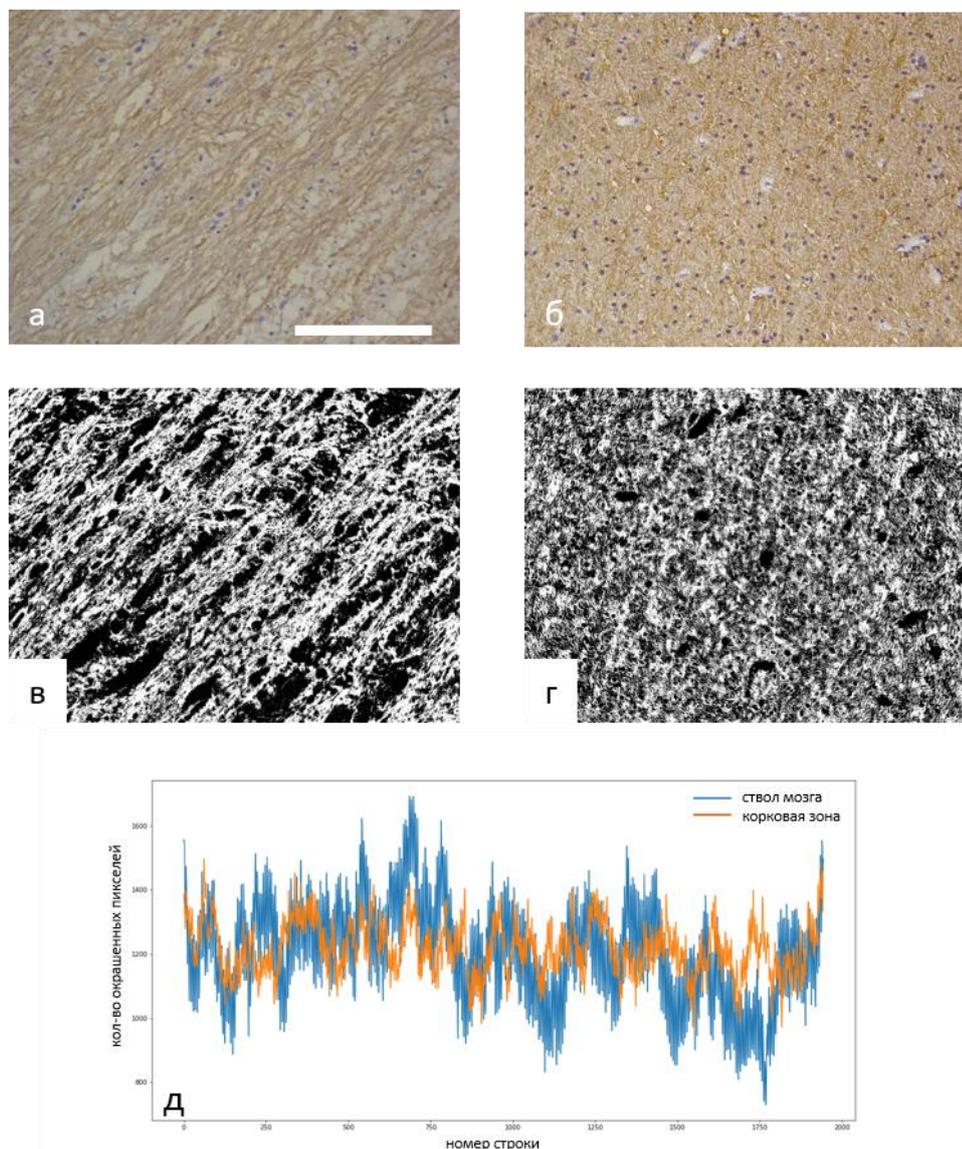


Рисунок 24. Формирование параметра СПВ. а, б - ИГХ изображения ствола мозга (а) и области коры (б); в, г - бинаризованные волокна в панелях а и б; д - общее количество пикселей, равное 1, в строках в зависимости от номера строки. Шкала бар = 200 мкм.

Количественная обработка ИГХ изображений была проведена в математической среде Anaconda 4.3.1 (Python v. 3.7).

2.6. Статистическая обработка полученных данных

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программных пакетов GraphPad Prism 8, SPSS Statistics 26.0. Нормальность распределения оценивалась при помощи тестов Колмогорова-

Смирнова и Шапиро-Уилка. Результаты количественной обработки ОКТ изображений представлены как $Me [Q1;Q3]$, где Me – медианное значение оптического коэффициента по ОКТ изображению; $Q1, Q3$ – значения 25го и 75го перцентиля соответственно. Достоверность различий между исследуемыми группами оценивали при помощи использования U-критерия Манна Уитни при нулевой гипотезе об отсутствии различий между группами. В случае множественных сравнений в значения уровня значимости была внесена поправка Бонферрони для нескольких испытаний. Во всех случаях различия считались статистически значимыми при $p < 0.05$.

Для оценки взаимосвязи между морфологическими характеристиками образцов и коэффициентом затухания ОКТ сигнала использовался ранговый коэффициент корреляции Спирмена ρ . Уровень взаимосвязи между исследуемыми переменными был интерпретирован исходя из полученных значений коэффициента корреляции Спирмена: $0,3 \geq \rho < 0,5$ – слабая, $0,5 \geq \rho < 0,7$ – средняя, $0,7 \geq \rho < 0,9$ – высокая, $0,9 \geq \rho \leq 1$ – очень высокая.

Для прицельного изучения корреляции между количественными параметрами ИГХ изображений и коэффициентом затухания проводилось вычисление парциальных коэффициентов корреляции, что позволяет установить уровень взаимосвязи между двумя переменными, контролируя другие переменные.

Для определения диагностической способности коэффициента затухания разграничивать поврежденное и неповрежденное белое вещество, поврежденное белое вещество и опухоль, а также неповрежденное белое вещество и патологические ткани (поврежденное белое вещество, опухоль) был проведен ROC-анализ. Для каждого случая дифференцировки тканей было предложено пороговое значение коэффициента затухания, для которого были рассчитаны статистические параметры диагностического теста: чувствительность, специфичность, диагностическая точность.

Чувствительность диагностического теста определяется как доля истинно положительных результатов среди всех проведенных тестов и определяется по формуле:

$$Se = \frac{TP}{D} \cdot 100\%$$

Где Se – чувствительность, TP – истинно положительные результаты исследования, D – количество случаев заболевания (в исследуемых случаях – ОКТ изображений поврежденного белого вещества / опухоли / патологических тканей головного мозга).

Специфичность диагностического теста определяется как доля истинно отрицательных результатов среди всех проведенных тестов и определяется по формуле:

$$Sp = \frac{TN}{D} \cdot 100\%$$

Где Sp – специфичность, TN – истинно отрицательные результаты исследования, D – количество здоровых пациентов (в исследуемых случаях – ОКТ изображений неповрежденного белого вещества / поврежденного белого вещества).

Диагностическая точность определяется как доля правильных результатов теста и вычисляется по формуле:

$$Ac = \frac{TP+TN}{D} \cdot 100\%$$

где Ac – диагностическая точность, D – все исследуемые случаи (все ОКТ изображения дифференцируемых тканей, включенные в исследование).

Пороговые значения коэффициента затухания для каждого случая дифференцировки тканей определялись исходя из максимально возможных равновесных значений чувствительности и специфичности.

Глава 3. Результаты

Работа по изучению коэффициента затухания ОКТ сигнала белого вещества, его изменений, возникающих при инвазии глиальных опухолей, а также определения возможности его использования для выявления зоны поврежденного белого вещества в перитуморальной области глиом головного мозга включала в себя четыре основных этапа.

Первый этап был направлен на подбор оптимальных параметров для расчета и демонстрации коэффициента затухания, вычисляемого по ОКТ данным мозговой ткани. На втором этапе были определены значения коэффициента затухания белого вещества в норме, на модели неповрежденных, хорошо организованных миелиновых волокон различных областей аутопсийного головного мозга, а также исследовалась корреляция между коэффициентом затухания и морфологическим строением ткани. Третий этап работы заключался в исследовании *ex vivo* образцов мозговой ткани лабораторных животных с моделированием влияния глиальных опухолей на ткань белого вещества. Четвертый, финальный этап работы, был посвящен изучению изменений коэффициента затухания белого вещества у пациентов с глиомами головного мозга, а также определению диагностической точности применения коэффициента затухания ОКТ сигнала для разграничения неповрежденного и поврежденного белого вещества, а также поврежденного белого вещества и опухоли.

3.1. Подбор оптимальных параметров для расчета и представления коэффициента затухания, вычисляемого по ОКТ данным мозговой ткани

Коэффициент затухания является общепринятым параметром, рассчитываемым по ОКТ данным. Алгоритмы расчета, как правило, адаптируются под параметры конкретного используемого прибора и задачи

исследования. В связи с этим, на первом этапе работы был выбран оптимальный метод расчета коэффициента затухания (по ко-поляризованному каналу, $\mu(\text{ко})$), что включало подбор диапазона глубин для его вычисления, а также подбор цветовой шкалы для более контрастного представления структур на *en face* цветокодированных картах. Выбранный метод расчета коэффициента затухания, и цветовая шкала на *en face* цветокодированных картах были применены к сигналу в кросс-поляризованном канале. Затем проведено сравнение результатов вычисления $\mu(\text{ко})$ и $\mu(\text{кросс})$.

Как было сказано в разделах 1.2.5 и 2.4 в настоящее время используются два основных подхода к вычислению коэффициента затухания: 1) метод линейной аппроксимации логарифмированного сигнала; 2) метод с разрешением по глубине. В данном исследовании использовалась оригинальная модификация алгоритма с разрешением по глубине, принцип работы которой подробно изложен в разделе 2.4 и в опубликованной статье [130].

Преимущества примененного нами подхода в сравнении с методом аппроксимации логарифмированного сигнала продемонстрированы на примере визуализации сложных структур мозга, содержащих серое и белое вещество (рисунок 25). Использование метода расчета коэффициента затухания с разрешением по глубине помогает выявить мелкие детали (рисунок 25, *в* и соответствующие крупные планы *в1-в4*), которые не видны в случае использования подхода линейной аппроксимации логарифмированного сигнала (рисунок 25, *б* и соответствующие крупные планы *б1-б4*). Контрастная визуализация является принципиально важным фактором для поиска границ между различными типами тканей мозга.

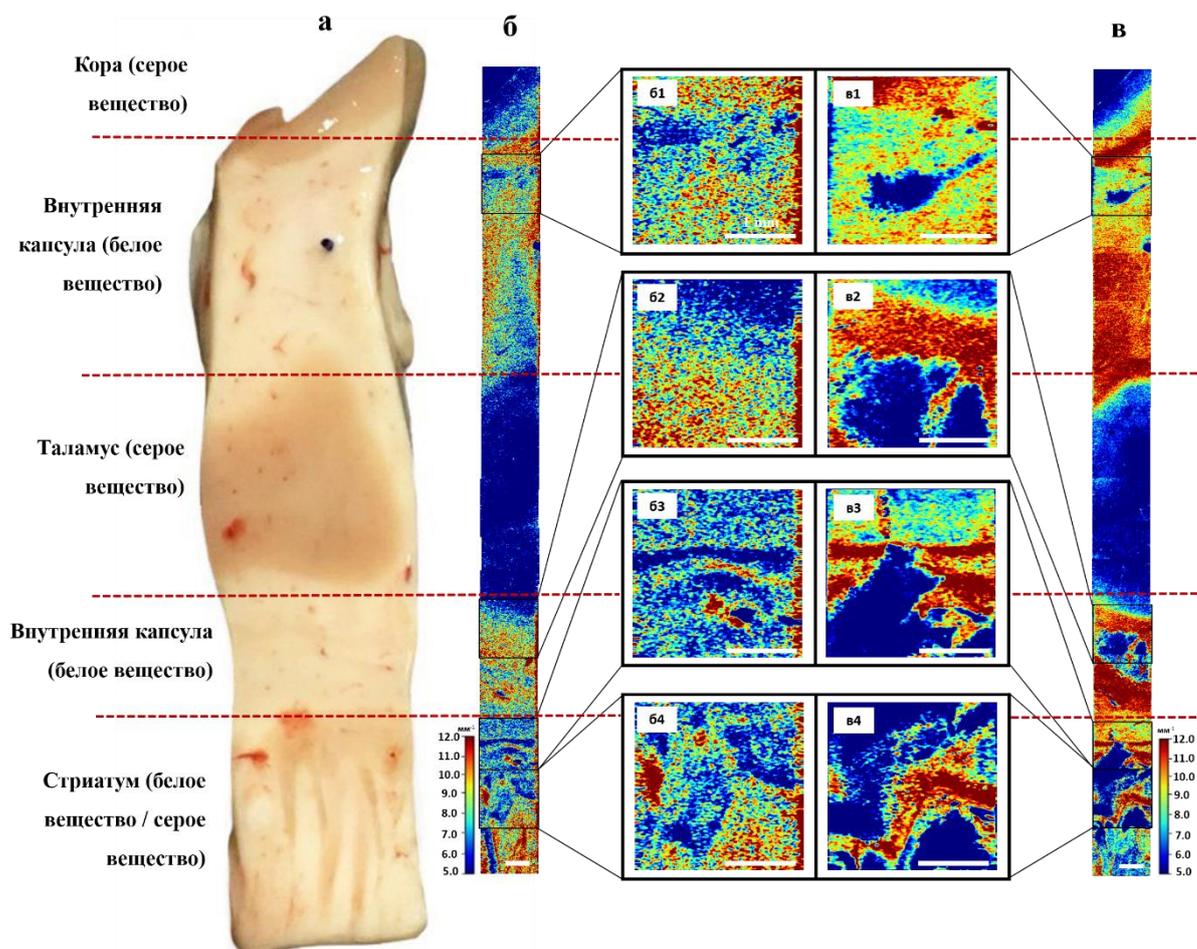


Рисунок 25. Цветокодированные карты коэффициента затухания, построенные для *post-mortem* образца человеческого мозга (а) с использованием методов линейной аппроксимации логарифмированного сигнала (б) и с разрешением по глубине (в). б1-б4, в1-в4 – части изображений на панелях б и в соответственно увеличены для удобства сравнения. Шкала бар – 1 мм.

Одновременно с апробацией предложенного подхода, был выбран оптимальный диапазон глубин для вычисления коэффициента затухания, а также подбор цветовой шкалы для наиболее контрастной визуализации распределений значений μ . Было установлено, что вычисление $\mu(\text{ко})$ в диапазоне глубин 120-300 мкм позволяет получать качественные цветокодированные карты, на которых четко визуализируется большее количество мелких деталей объекта (рисунок 26, а). Цветовая шкала, кодируемая численным диапазоном от 5 до 12 мм^{-1} , позволяет получать наиболее контрастные карты (рисунок 26, б).

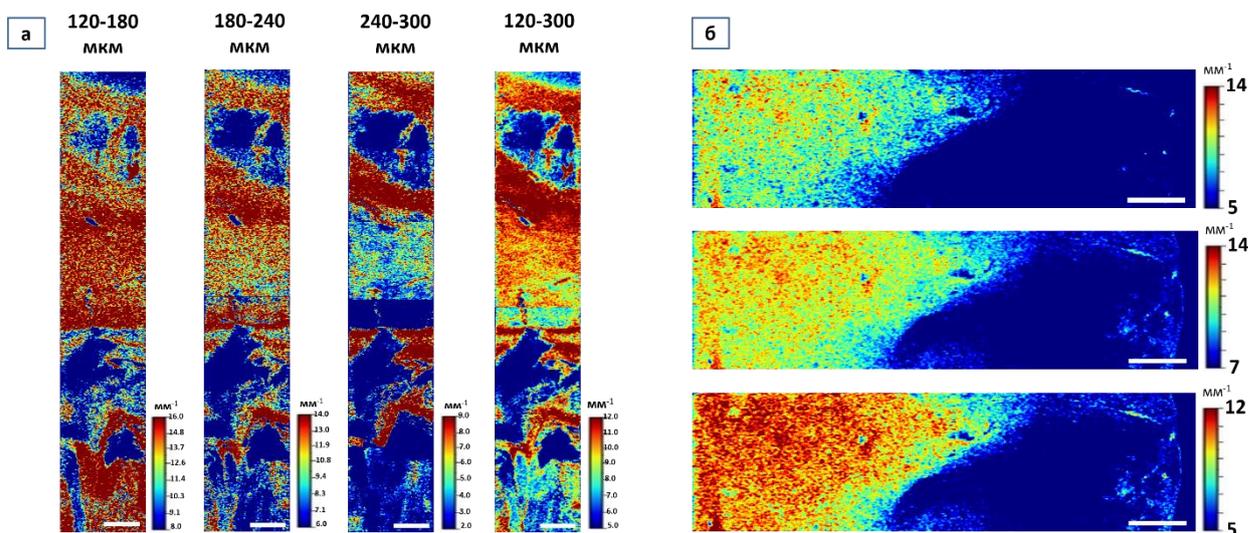


Рисунок 26. Подбор оптимального диапазона глубин вычисления μ и цветовой шкалы оптических карт. Цветокодированные карты коэффициента затухания μ , вычисляемого в различных диапазонах глубин объекта, построенные для *post-mortem* образца, содержащего белое и серое вещество (а). Цветокодированные карты, построенные для *послеоперационного* образца пациента, содержащего границу между неповрежденным белым веществом и опухолевой тканью, с различной цветовой шкалой (б). Шкала бар – 1 мм.

Поскольку в работе использована кросс-поляризационная модификация ОКТ прибора, позволяющая получать данные в ко- и кросс-каналах, на примере послеоперационных образцов белого вещества и опухоли проведена проверка целесообразности использования двух коэффициентов для количественной оценки всего полученного материала. Пример построенных карт в ко- и кросс- каналах представлены на рисунке 27. Было обнаружено, что использование μ (кросс) не позволяет получить дополнительную информацию об исследуемом объекте по сравнению с μ (ко), а также не увеличивает контраст между различными тканями на цветокодированных картах. Вследствие этого, было принято решение о расчете коэффициента затухания только для ко-поляризационного канала μ (ко), который в дальнейшем для удобства будет именоваться как μ .

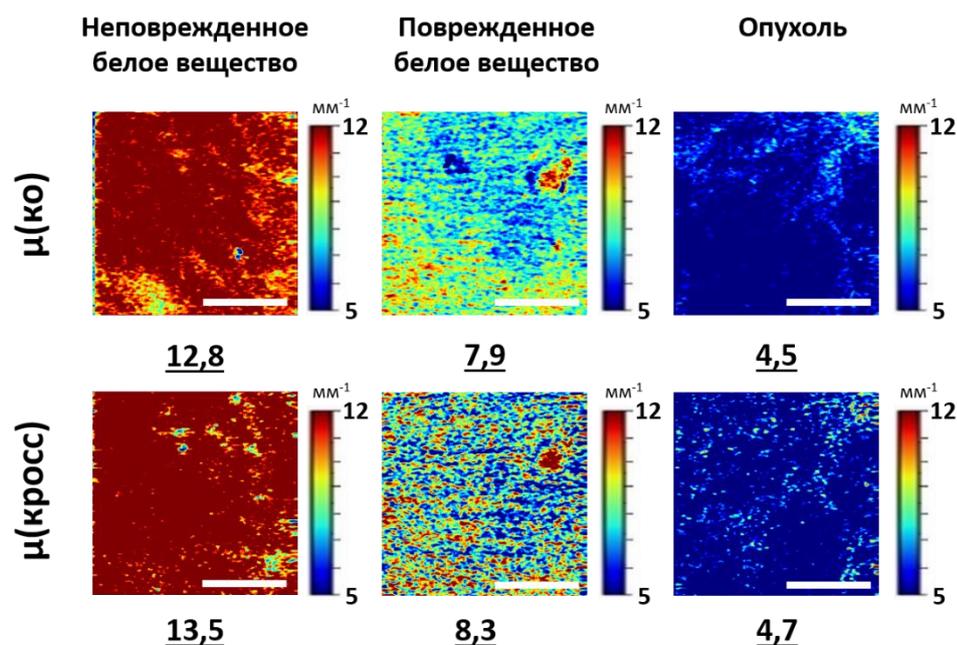


Рисунок 27. Цветокодированные карты коэффициентов затухания в ко- ($\mu(\text{ко})$) и кросс-поляризации ($\mu(\text{кросс})$), построенные для послеоперационных образцов неповрежденного белого вещества, поврежденного белого вещества и опухоли. Под каждой картой указано медианное значение коэффициента затухания по ОКТ изображению. Можно видеть, что карты $\mu(\text{кросс})$ не дают дополнительного контраста между различными тканями. Шкала бар – 1 мм.

Таким образом, на данном этапе работы были определены оптимальные параметры для расчета и демонстрации цветокодированных карт коэффициента затухания, которые были представлены для всех исследуемых объектов.

3.2. Результаты вычисления коэффициента затухания нормального белого вещества головного мозга и его взаимосвязь со морфологическим строением ткани, определенным путем цифровой обработки ИГХ изображений (материал аутопсий)

Работа, направленная на определение взаимосвязи между коэффициентом затухания нормального белого вещества и его структурными характеристиками (расположение миелиновых волокон, количество клеточных элементов), включала в себя несколько этапов. На первом этапе

производилось вычисление коэффициента затухания исследуемых образцов с помощью количественной обработки трехмерных ОКТ изображений. На втором этапе была проведена количественная обработка ИГХ изображений, полученных с образцов белого вещества различных участков головного мозга, в результате чего были определены их морфологические характеристики. В последующем анализировалась корреляция между количественными параметрами ОКТ и ИГХ изображений.

3.2.1. Анализ коэффициента затухания различных зон нормального белого вещества

Для количественной оценки рассеивающих свойств белого вещества для каждого трехмерного ОКТ изображения были рассчитаны медианные значения коэффициента затухания μ , при этом были получены распределения значений указанного коэффициента для всех исследуемых областей нормального белого вещества. Обнаружено, что области поверхностного белого вещества (корковая и подкорковая зоны) демонстрируют более высокие значения коэффициента затухания по сравнению с глубоко лежащими областями (внутренняя капсула, мозолистое тело и ствол мозга). При этом, наивысшими значениями коэффициента затухания характеризуется корковая область (10,6 [9,9; 11,9] мм^{-1}), которая статистически значимо отличается от всех остальных: подкорковой зоны (9,5 [8,8; 10,4] мм^{-1} , $p=0,009$), внутренней капсулы (8,9 [7,5; 9,4] мм^{-1} , $p=0,0005$), мозолистого тела (9,1 [8,3; 9,2] мм^{-1} , $p=0,005$) и ствола мозга (8,7 [8,5; 9,2] мм^{-1} , $p=0,001$). Результаты попарного сравнения исследуемых областей на основе значений коэффициента затухания представлены в таблице 3.

Таблица 3. Сравнение значений коэффициента затухания различных областей белого вещества головного мозга.

	Корковая зона (n=14) 10,6 [9,9; 11,9] мм ^{-1 а}	Подкорковая зона (n=22) 9,5 [8,8; 10,4] мм ⁻¹	Внутренняя капсула (n=10) 8,9 [7,5; 9,4] мм ^{-1 а}	Мозолистое тело (n=8) 9,1 [8,3; 9,2] мм ^{-1 а}	Ствол мозга (n=10) 8,7 [8,5; 9,2] мм ^{-1 а}
Корковая зона (n=14)	-	<u>0,009</u>	<u>0,0005</u>	<u>0,005</u>	<u>0,001</u>
Подкорковая зона (n=22)	0,99	-	<u>0,029</u>	0,1	<u>0,035</u>
Внутренняя капсула (n=10)	0,99	0,97	-	0,77	0,66
Мозолистое тело (n=8)	0,99	0,91	0,25	-	0,44
Ствол мозга (n=10)	0,99	0,97	0,37	0,59	-

Примечание: Представлены р-значения для альтернативной гипотезы U-критерия Манна-Уитни о том, что значения коэффициента затухания для областей мозга в строке таблицы стохастически выше, чем значения для областей мозга в столбце таблицы. Значения $p < 0,05$ выделены и подчеркнуты; ^аMe [Q1; Q3]: Me - медиана; [Q1; Q3] - значения 25-го и 75-го перцентилей соответственно.

3.2.2. Морфологические характеристики различных зон нормального белого вещества

Проведенный анализ ИГХ изображений, полученных из разных областей нормального белого вещества головного мозга, выявил, что исследуемые области белого вещества характеризуются морфологическими различиями, что обнаруживается как качественно (рисунок 28), так и количественно (таблицы 4-6). При помощи визуальной оценки изображений были идентифицированы области, характеризующиеся параллельным расположением крупных волокон, разделенных промежутками – ствол головного мозга (рисунок 28, а), зоны с плотно упакованными тонкими волокнами, образующими сетчатую структуру, равномерно покрывающую все поле зрения – корковая и подкорковая зона (рисунок 28, г, д), а также участки, характеризующиеся как параллельными, так и хаотично расположенными волокнами – мозолистое тело и внутренняя капсула (рисунок 28, б, в). При этом было обнаружено, что сетчатая структура из плотно упакованных

волокон характерна для корковой и подкорковой областей, в то время как образцы ствола мозга демонстрировали параллельное расположение волокон с промежутками между ними.

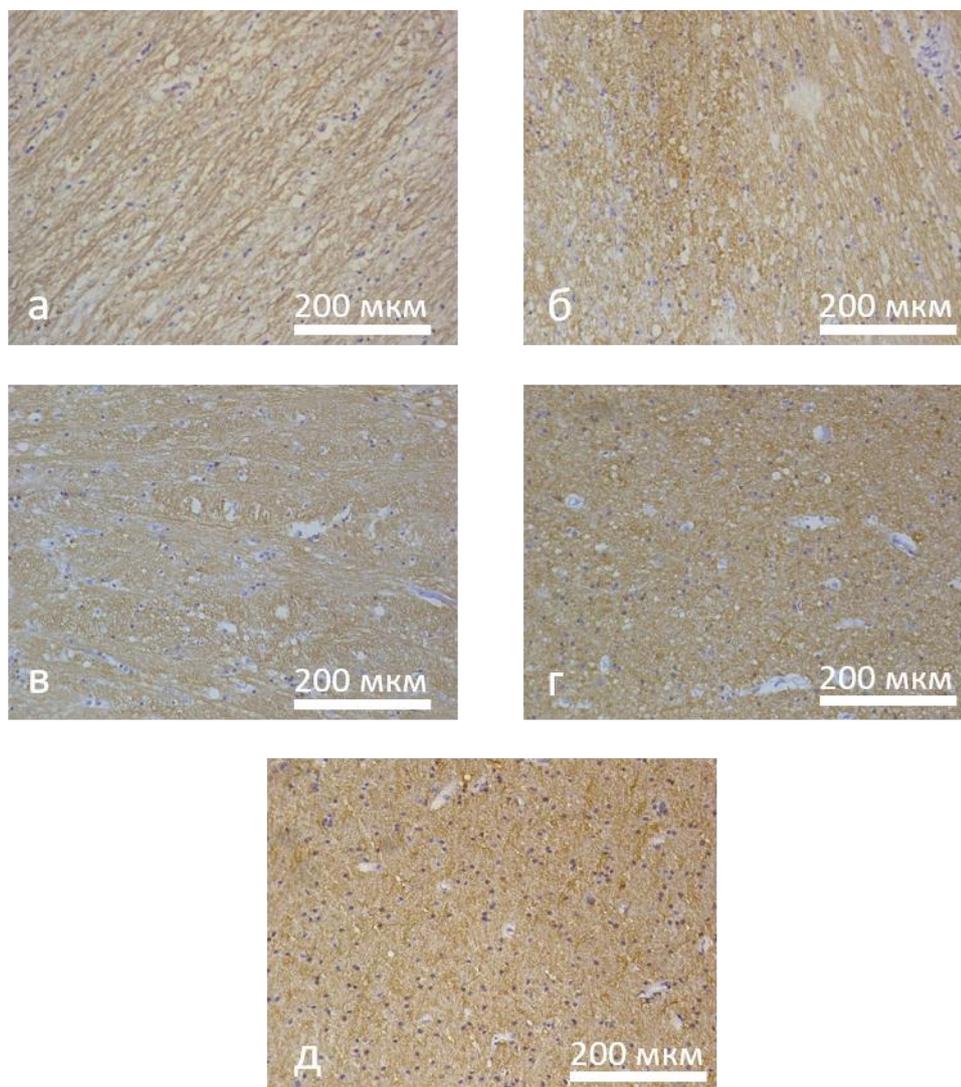


Рисунок 28. Характерные примеры ИГХ изображений (МВР) областей головного мозга: а – ствол мозга; б – мозолистое тело; в – внутренняя капсула; г – подкорковая зона; д – корковая зона;

Использование количественных параметров ИГХ изображений предоставляет объективную информацию о морфологических различиях между областями белого вещества. Как было сказано в разделе 2.5.2, количественная оценка ИГХ изображений проводилась путем анализа характера расположения миелиновых волокон и их плотности, а также подсчета количества клеточных элементов. Применение параметра СПВ,

комплексно характеризующего расположение волокон (ориентацию волокон и площадь, занимаемую волокнами в поле зрения), позволило разграничить между собой практически все исследуемые области за исключением пар «корковая зона – подкорковая зона», «мозолистое тело – ствол мозга», «мозолистое тело – внутренняя капсула» (таблица 4). Было обнаружено, что наименьшими значениями данного параметра характеризуются корковая (90,8 [85,2; 94,7]) и подкорковая зоны (88,7 [85,7; 92,3]), что отражает плотную упаковку миелиновых волокон в виде сетчатой структуры в этих областях. Наибольшие значения СПВ демонстрирует ствол мозга (123,5 [118,4; 132,1]), характеризующийся параллельным расположением волокон и чередованием волокон и промежутков.

Таблица 4. Сравнение параметра СПВ для разных зон белого вещества.

	Корковая зона (n=19) 90,8 [85,2; 94,7] ^a	Подкорковая зона (n=14) 88,7 [85,7; 92,3]	Внутренняя капсула (n=9) 110,0 [102,8;111,5] ^a	Мозолистое тело (n=9) 120,7 [115,0;125,3] ^a	Ствол мозга (n=17) 123,5 [118,4; 132,1] ^a
Корковая зона (n=19)	-	0,39	0,99	0,99	0,99
Подкорковая зона (n=14)	0,62	-	0,99	0,99	0,99
Внутренняя капсула (n=9)	<u>7*10⁻⁵</u>	<u>1*10⁻⁴</u>	-	0,94	0,99
Мозолистое тело (n=9)	<u>1*10⁻⁴</u>	<u>3*10⁻⁴</u>	0,07	-	0,88
Ствол мозга (n=17)	<u>2*10⁻⁷</u>	<u>1*10⁻⁶</u>	<u>2*10⁻³</u>	0,13	-

Примечание: Представлены р-значения для альтернативной гипотезы U-критерия Манна-Уитни о том, что значения СПВ для областей мозга в строке таблицы стохастически выше, чем значения для областей мозга в столбце таблицы. Значения $p < 0,05$ выделены и подчеркнуты; ^aMe [Q1; Q3]: Me - медиана; [Q1; Q3] - значения 25-го и 75-го перцентилей соответственно.

Проведенный анализ плотности волокон в исследуемых образцах белого вещества практически не выявил статистически значимых отличий между областями (таблица 4). Было обнаружено, что только зона ствола мозга характеризуется более низкими значениями плотности волокон по сравнению

с остальными областями. Кроме того, необходимо подчеркнуть, что для всех исследуемых областей значения параметра плотности волокон лежали в относительно узком диапазоне (0,45 – 0,5 для наименьшего значения 25го и наивысшего значения 75го процентиля соответственно). Таким образом, с целью количественной оценки расположения миелиновых волокон в исследуемой области более перспективно использование параметра СПВ.

Таблица 5. Сравнение плотности волокон в разных зонах белого вещества.

	Корковая зона (n=19) 0,47 [0,46; 0,48] ^a	Подкорковая зона (n=14) 0,48 [0,47; 0,5]	Внутренняя капсула (n=9) 0,48 [0,47;0,49] ^a	Мозолистое тело (n=9) 0,47 [0,46;0,48] ^a	Ствол мозга (n=17) 0,46 [0,45; 0,46] ^a
Корковая зона (n=19)	-	0,99	0,95	0,54	<u>6*10⁻⁴</u>
Подкорковая зона (n=14)	<u>5*10⁻³</u>	-	0,51	0,25	<u>4*10⁻³</u>
Внутренняя капсула (n=9)	0,055	0,77	-	0,14	<u>4*10⁻⁵</u>
Мозолистое тело (n=9)	0,48	0,96	0,87	-	<u>2*10⁻³</u>
Ствол мозга (n=17)	0,99	0,99	0,99	0,98	-

Примечание: Представлены р-значения для альтернативной гипотезы U-критерия Манна-Уитни о том, что значения плотности волокон для областей мозга в строке таблицы стохастически выше, чем значения для областей мозга в столбце таблицы. Значения $p < 0,05$ выделены и подчеркнуты; ^aMe [Q1; Q3]: Me - медиана; [Q1; Q3] - значения 25-го и 75-го перцентилей соответственно.

Области, которые не могут быть разграничены при помощи параметра СПВ, демонстрируют различия в количестве клеточных элементов (глиальных клеток), что обнаруживается путем подсчета клеточных ядер (параметр ПКЯ) (таблица 6). При этом, наибольшее количество клеточных ядер было зарегистрировано в корковой зоне (183 [150; 225]), в то время как внутренняя капсула и ствол мозга демонстрировали наименьшее количество ядер (81 [74; 95] и 86 [78; 100] соответственно).

Таблица 6. Сравнение параметра ПКЯ для разных зон белого вещества.

	Корковая зона (n=19) 183 [150; 225] a	Подкорковая зона (n=14) 91 [79; 106]a	Внутренняя капсула (n=9) 81 [74; 95] a	Мозолистое тело (n=9) 139 [119; 149] a	Ствол мозга (n=17) 86 [78; 100] a
Корковая зона (n=19)	-	<u>4*10⁻⁶</u>	<u>1.8*10⁻⁵</u>	<u>0.007</u>	<u>2*10⁻⁷</u>
Подкорковая зона (n=14)	0.99	-	0.27	0.99	0.32
Внутренняя капсула (n=9)	0.99	0.75	-	0.99	0.70
Мозолистое тело (n=9)	0.99	<u>6*10⁻⁴</u>	<u>5*10⁻⁴</u>	-	<u>4*10⁻⁵</u>
Ствол мозга (n=17)	0.99	0.69	0.31	0.99	-

Примечание: Представлены р-значения для альтернативной гипотезы U-критерия Манна-Уитни о том, что значения ПКЯ для областей мозга в строке таблицы стохастически выше, чем значения для областей мозга в столбце таблицы. Значения $p < 0,05$ выделены и подчеркнуты; ^aMe [Q1; Q3]: Me - медиана; [Q1; Q3] - значения 25-го и 75-го перцентилей соответственно.

3.2.3. Взаимосвязь между коэффициентом затухания и структурой нормального белого вещества

Для определения взаимосвязи между коэффициентом затухания, вычисляемого по ОКТ изображениям и количественными характеристиками ИГХ изображений были рассчитаны парциальные коэффициенты корреляции для коэффициента затухания и каждой из трех количественных характеристик ИГХ (таблица 7). Была обнаружена наибольшая корреляция между коэффициентом затухания и параметром СПВ.

Таблица 7. Корреляционный анализ количественных характеристик ИГХ изображений и коэффициента затухания (использован ранговый коэффициент корреляции Спирмена).

	СПВ	ПКЯ	Плотность волокон
Коэффициент затухания μ	-0,49; [-0,61; -0,37]; 7*10 ⁻¹¹	0,29; [0,14; 0,43]; 3*10 ⁻⁴	-0,09; [-0,25; 0,07]; 0,25

Примечание: Частные корреляции для коэффициента затухания с количественными параметрами ИГХ, контролирующими два других параметра. 95% доверительный интервал

и p -значение для частных корреляций представлены как p_{corr} ; $[ci_{low}, ci_{high}]$; p -значение.

Таким образом, в данном разделе работы впервые рассчитаны значения коэффициента затухания ОКТ сигнала для различных областей нормального белого вещества с разным расположением миелиновых волокон (их укладкой и толщиной). Кроме того, впервые продемонстрирована корреляция между коэффициентом затухания белого вещества и его структурой, определенной на основании цифровой обработки ИГХ изображений. Установлена наибольшая корреляция между характером расположения миелиновых волокон (структурным параметром волокон) и коэффициентом затухания. Количество клеточных элементов (глиальных клеток) в поле зрения также коррелирует со значениями коэффициента затухания, однако, данная взаимосвязь является менее существенной. Полученные результаты свидетельствуют о том, что миелиновые волокна оказывают большее влияние на коэффициент затухания в сравнении с глиальными клетками.

3.3. Результаты оценки изменения коэффициента затухания белого вещества головного мозга при развитии глиальных опухолей у экспериментальных животных

Данный этап работы включал в себя две части: 1) визуальная оценка *en face* цветокодированных карт коэффициента затухания μ , полученных с фронтальных срезов головного мозга крыс, с последующим вычислением медианных значений μ в конкретных областях интереса; 2) изучение структурных характеристик белого вещества головного мозга крыс на гистологических срезах.

Сначала был проведен анализ данных, полученных с образцов головного мозга лабораторных животных из контрольной группы (без опухолей). Согласно гистологическому исследованию, все ткани на данных образцах находились в состоянии нормы, при этом области белого вещества

характеризовались наличием большого количества миелиновых волокон, плотно упакованных и расположенных либо упорядоченно, либо в виде сетки (в зависимости от месторасположения), с наличием небольших промежутков между волокнами. Визуальный анализ цветокодированных карт показал, что неизменные области белого вещества характеризуются высокими значениями коэффициента затухания ($\mu = 11.7 [10,8; 13,5] \text{ мм}^{-1}$), демонстрируя высокие рассеивающие свойства. На цветокодированных картах нормальное белое вещество (в частности, мозолистое тело) представлено красным, оранжевым и желтым цветами и хорошо дифференцируется от областей серого вещества (рисунок 29).

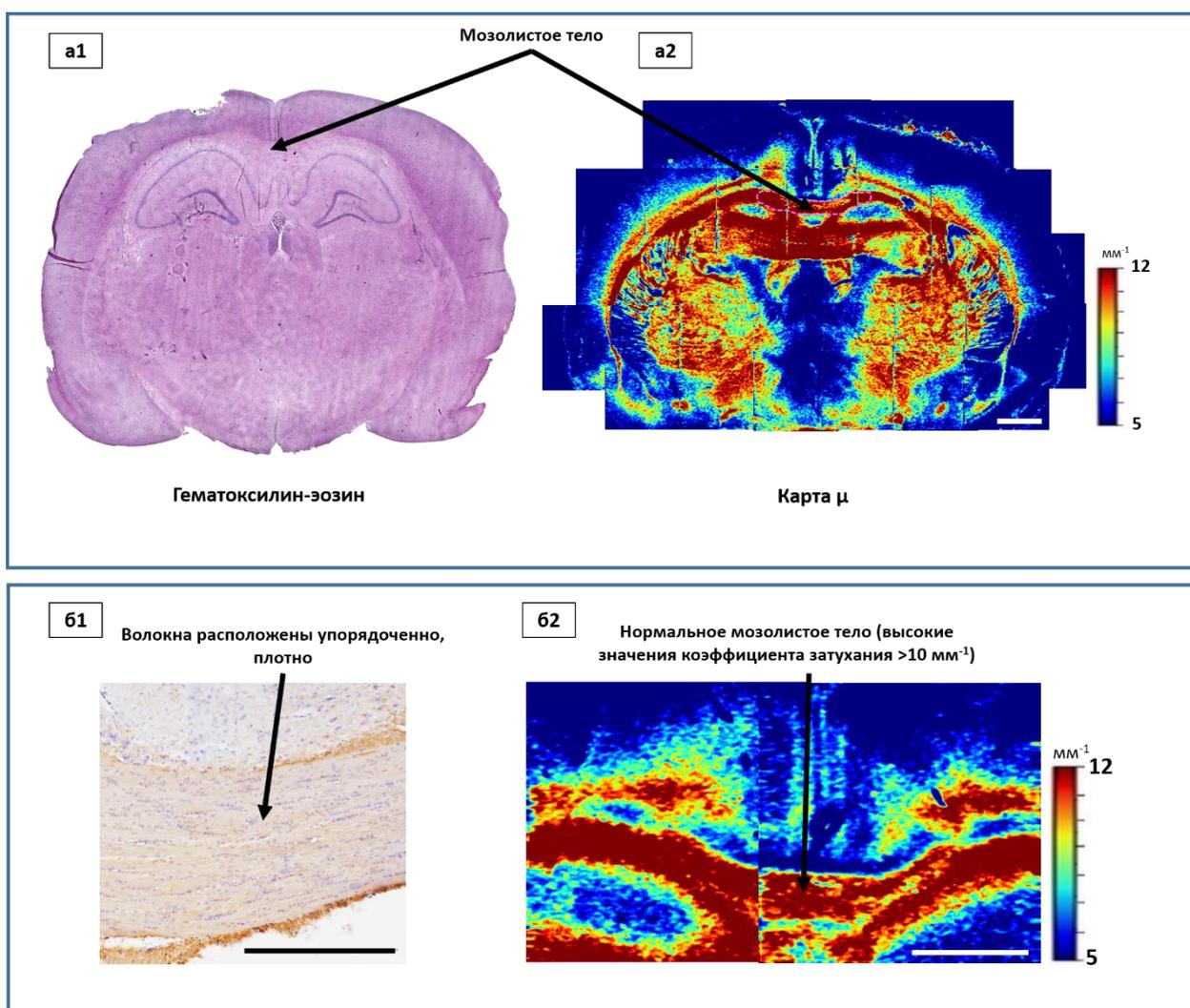


Рисунок 29. Фронтальный срез мозга крысы из контрольной группы. Представлен обзорный гистологический срез, окрашенный ГЭ (a1), обзорная цветокодированная карта коэффициента затухания μ (a2), увеличенное ИГХ

изображение области мозолистого тела, где визуализируются упорядоченные, плотно расположенные миелиновые волокна (б1), а также цветокодированная карта μ где указана область нормального мозолистого тела, характеризующаяся высокими значениями коэффициента затухания (б2). Шкала бар – 1 мм на цветокодированной карте и 500 мкм на ИГХ изображении.

В последующем было проведено исследование цветокодированных оптических карт и гистологических срезов в трех группах экспериментальных животных с различными моделями глиальных опухолей. В качестве области интереса было выбрано мозолистое тело, так как данная структура отчетливо визуализировалась на всех срезах и всегда была вовлечена в патологические процессы, связанные с опухолевым ростом.

3.3.1 Исследование изменения коэффициента затухания белого вещества головного мозга крыс под влиянием роста опухоли 101/8

Исследование гистологических срезов показало, что глиобластома 101/8 во всех исследуемых случаях располагалась в области серого и белого вещества одного полушария. При этом наблюдалось массивное вторжение опухоли по трактам белого вещества мозолистого тела с образованием вторичных узлов в области латеральных желудочков (рисунок 30, а).

Визуальный анализ цветокодированных карт μ выявил, что рост и развитие данной опухоли приводит к снижению рассеивающих свойств белого вещества, что отражается в значительном снижении значений коэффициента затухания в данной области ($\mu = 6,1 [5,2; 6,8] \text{ мм}^{-1}$) по сравнению с контрольной группой ($\mu = 11,7 [10,8; 13,5] \text{ мм}^{-1}$, $p < 0,001$). При этом, на цветокодированных картах данные области характеризуются преобладанием синего цвета, что не позволяет разграничить их от опухолевой ткани ($\mu = 3,7 [3,5; 4,2] \text{ мм}^{-1}$) (рисунок 30, б, *бежевая стрелка*). Данный факт объясняется выбранной цветовой шкалой.

Морфологически глиобластома 101/8 явилась наиболее агрессивной опухолью, характеризующейся выраженной инфильтрацией в ткань белого

вещества. При прицельном исследовании мозолистого тела был обнаружен умеренно выраженный отек, разрушение миелиновых волокон, а также значительная инфильтрация опухолевыми клетками по ходу волокон с расширением пространств между волокнами (рисунок 30, *a*).

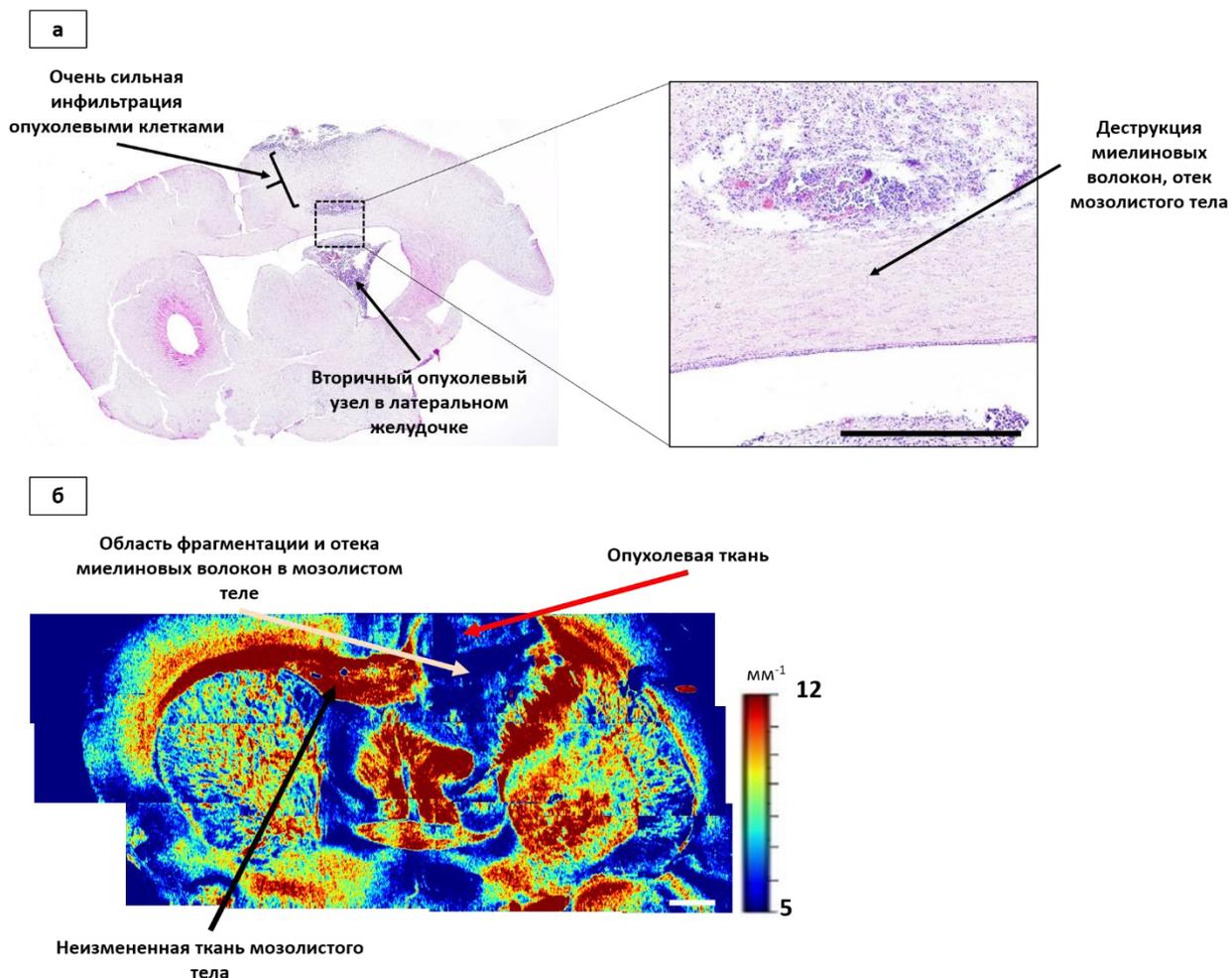


Рисунок 30. Влияние опухоли 101/8 на мозолистое тело. *a* – гистологический срез, окрашенный ГЭ, на котором видно области выраженной инфильтрации опухолевыми клетками, образование вторичного опухолевого узла в латеральном желудочке. В области мозолистого тела отмечается отек и фрагментация волокон. *б* – соответствующая цветокодированная карта μ , где указана область фрагментации миелиновых волокон и выраженного отека мозолистого тела, характеризующаяся значительно сниженными значениями коэффициента затухания по сравнению с нормальным мозолистым телом. Шкала бар – 1 мм на цветокодированной карте, 500 мкм на гистологическом изображении.

Таким образом, повреждения белого вещества (разрушение волокон, отек, инфильтрация опухолевыми клетками) вследствие развития данного

типа опухоли характеризуются значительным снижением его коэффициента затухания.

3.3.2 Исследование изменения коэффициента затухания белого вещества головного мозга крыс под влиянием роста опухоли 10-17-2

Анапластическая астроцитома 10-17-2 во всех исследуемых случаях занимала обширную область серого и белого вещества одного полушария. В двух из пяти случаев наблюдалось возникновение очагов некроза в опухолевых узлах. В одном случае были отмечены многочисленные кровоизлияния в опухолевую ткань.

Анализ *en face* цветокодированных карт μ выявил статистически значимое снижение значений коэффициента затухания мозолистого тела в 4 из 5 случаях ($\mu = 7,1 [6,0; 7,7] \text{ мм}^{-1}$) по сравнению с нормой ($\mu = 11,7 [10,8; 13,5] \text{ мм}^{-1}$, $p < 0,001$). При этом, данные области отображаются голубым и синим цветами (рисунок 31, *в*, рисунок 32, *а2*), в результате чего становится невозможно разграничить данные области от опухолевой ткани ($\mu = 5,8 [5,1; 6,9] \text{ мм}^{-1}$), что также объясняется выбранной цветовой шкалой. В одном случае было обнаружено смещение и компрессия мозолистого тела вследствие роста опухоли, при этом не было зарегистрировано снижения значений коэффициента затухания данной области, вследствие чего данный участок отображается темно-красным цветом (рисунок 32, *б2*, черная стрелка).

По результатам гистологического исследования во всех исследуемых гистологических препаратах обнаружены значительные структурные изменения мозолистого тела, возникшие вследствие роста опухолевого узла. Так, на каждом гистологическом срезе отмечался отек мозолистого тела, интенсивность которого варьировала от умеренного до значительно выраженного. Кроме того, отмечалась инфильтрация ткани мозолистого тела опухолевыми клетками (рисунок 31, *б*, красная стрелка, рисунок 32, *а1*). Наблюдаемые изменения миелиновых волокон подразделялись на два основных вида. В четырех из пяти случаев наблюдалась выраженная

деструкция и разрыв миелиновых волокон, особенно в областях, прилегающих к опухолевому узлу (рисунок 31, *а*, *черные стрелки*, рисунок 32, *а1*). В одном случае был обнаружен тотальный разрыв мозолистого тела с выраженной компрессией миелиновых волокон в одном из участков, соответствующему области с отсутствием снижения значений μ (рисунок 32, *б1*).

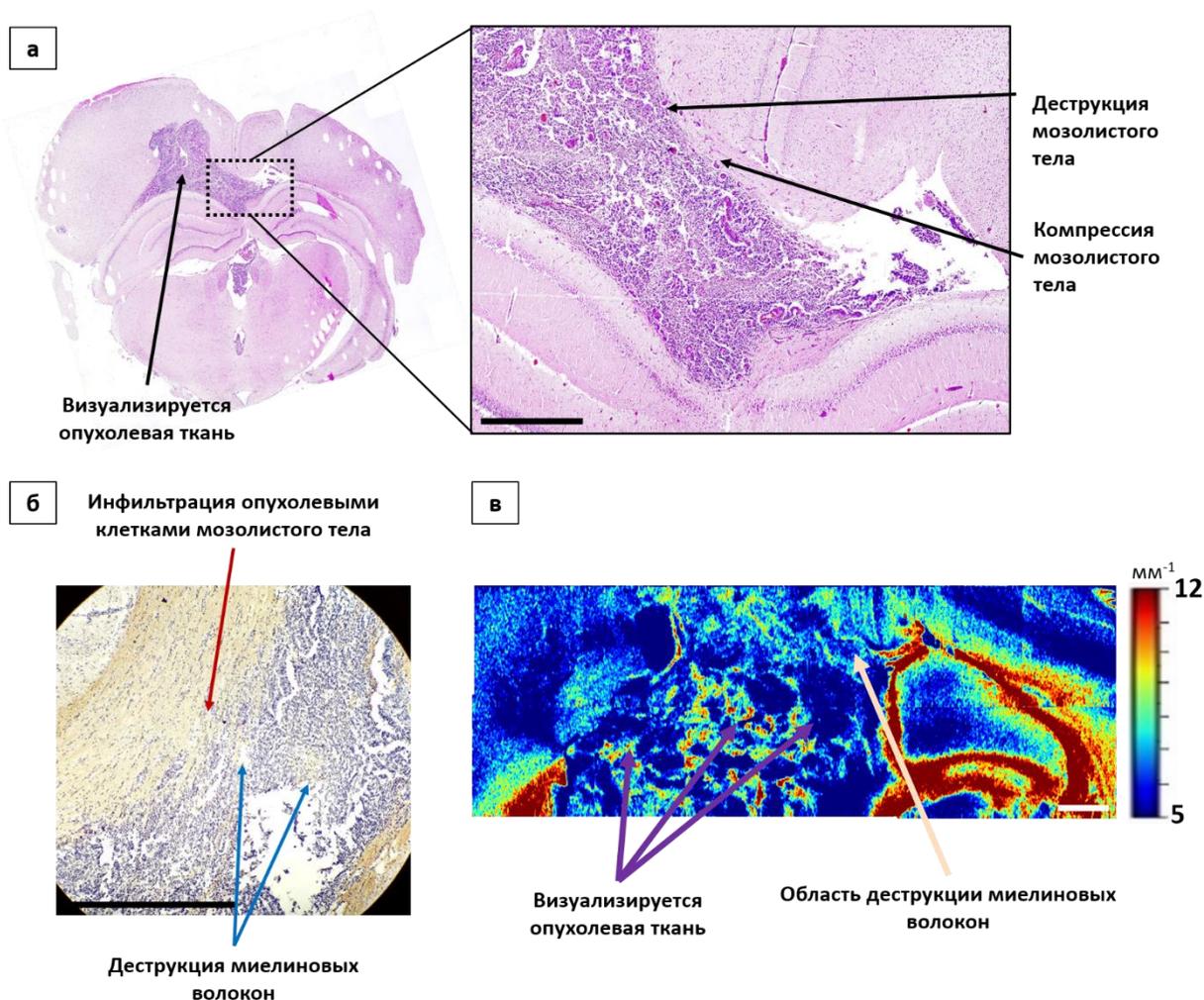


Рисунок 31. Влияние анапластической астроцитомы 10-17-2 на мозолистое тело (пример 1). *а* – гистологический срез, окрашенный ГЭ, на котором визуализируется опухолевый узел, вызвавший деструкцию и компрессию миелиновых волокон мозолистого тела. *б* – При большем увеличении на ИГХ изображении (МВР), полученном с того же среза мозга крысы, можно видеть инфильтрацию мозолистого тела опухолевыми клетками и разрушение миелиновых волокон. *в* – цветокодированная карта μ , на которой визуализируется опухолевая ткань. Разрушение миелиновых волокон мозолистого тела приводит к снижению значений коэффициента затухания, в результате чего невозможно дифференцировать измененные области

мозолистого тела от опухолевой ткани. Шкала бар – 1 мм на цветокодированной карте и 500 мкм на гистологическом изображении.

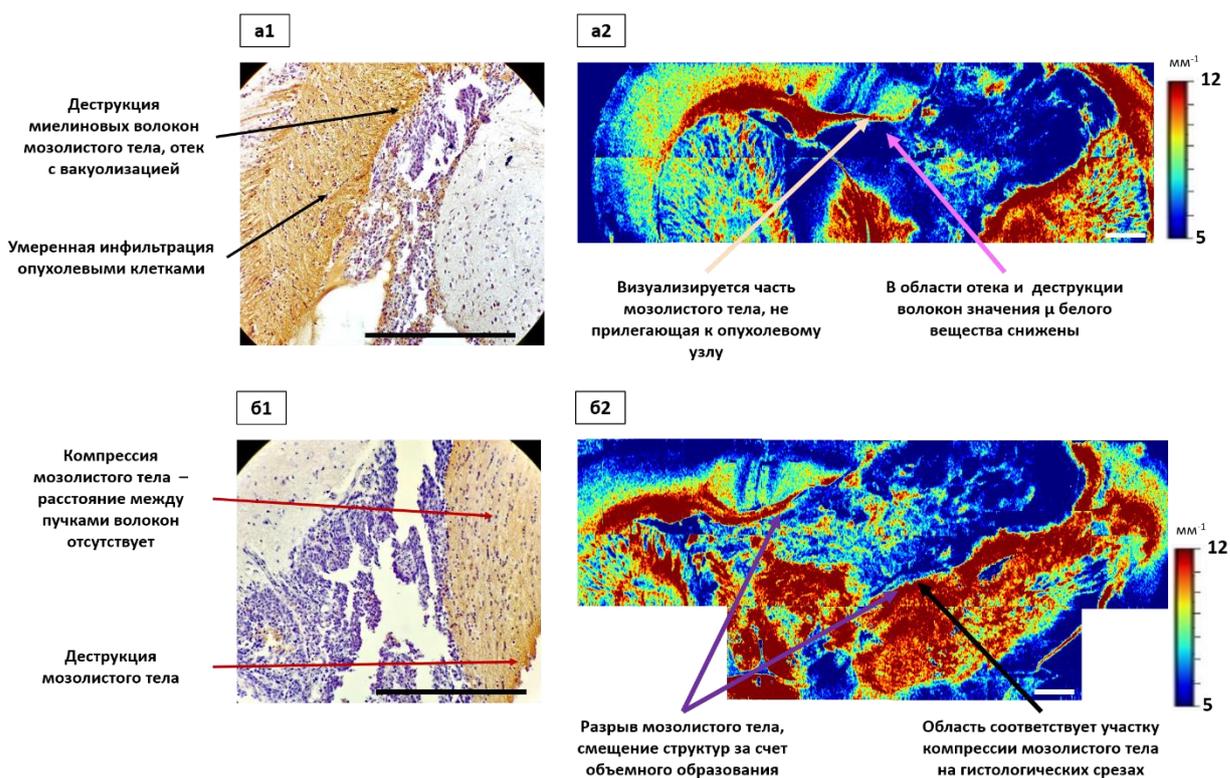


Рисунок 32. Влияние опухоли 10-17-2 на мозолистое тело (примеры 2 и 3). a1 – ИГХ изображение (МВР) участка мозолистого тела, прилегающего к опухолевому узлу, на котором визуализируется разрушение миелиновых волокон, а также умеренная инфильтрация опухолевыми клетками. a2 – цветокодированная карта μ соответствующего фронтального среза мозга крысы, где визуализируется часть мозолистого тела, не прилегающая к опухолевому узлу, где значения μ являются высокими (бежевая стрелка); в области отека и разрушенных миелиновых волокон значения μ снижены (розовая стрелка). b1 – ИГХ изображение участка мозолистого тела, смещенного в результате роста опухоли, где наблюдается компрессия миелиновых волокон. b2 – цветокодированная карта μ соответствующего среза головного мозга, на которой представлен опухолевый узел, вызвавший тотальный разрыв мозолистого тела; при этом в области, соответствующей участку компрессии мозолистого тела, не наблюдается снижения значений μ . Шкала бар – 1 мм на цветокодированной карте и 500 мкм на гистологическом изображении.

Таким образом, можно сделать вывод, что повреждения белого вещества, возникающие вследствие развития астроцитомы 10-17-2, включающие в себя разрушение миелиновых волокон, отек ткани и

инфильтрация опухолевыми клетками, приводит к статистически значимому снижению его коэффициента затухания в сравнении с нормой.

3.3.3 Исследование изменения коэффициента затухания белого вещества головного мозга крыс под влиянием роста опухоли С6

Во всех исследуемых случаях опухолевый узел располагался под оболочками головного мозга в пределах одного полушария. При этом, он занимал область серого вещества коры и граничил с трактами белого вещества мозолистого тела. Не было отмечено формирования очагов некроза или кровоизлияний внутри опухоли. Кроме того, было обнаружено, что данный тип опухоли характеризуется незначительной инвазией в ткань белого вещества или полным ее отсутствием, что отличало ее от моделей 10-17-2 и 101/8. Таким образом, рост опухоли С6 преимущественно вызывает смещение структур головного мозга.

При анализе цветокодированных карт μ было обнаружено, что развитие глиомы С6 не оказывает значительного влияния на коэффициент затухания белого вещества. Во всех случаях на оптических картах визуализируется смещенное мозолистое тело, значения коэффициента затухания для которого являются высокими ($\mu = 11,8 [11,0; 13,7] \text{ мм}^{-1}$) (рисунок 33, б, фиолетовая стрелка). В одном случае были обнаружены единичные области мозолистого тела со сниженными значениями μ до $8,2 \text{ мм}^{-1}$ (рисунок 34, в, розовая стрелка).

Гистологический анализ позволил выявить значительное смещение мозолистого тела вследствие роста опухолевого узла во всех случаях, в результате чего возникала компрессия миелиновых волокон с уменьшением пространства между ними (рисунок 33, а, рисунок 34, б). Инфильтрация опухолевыми клетками была либо незначительной, либо отсутствовала совсем (рисунок 33, а). В одном случае в области мозолистого тела были обнаружены зоны с разрушенными миелиновыми волокнами (рисунок 34, б), соответствующие областям со сниженными значениями коэффициента затухания. Таким образом, можно сделать вывод о том, что снижение

коэффициента затухания ткани белого вещества связано преимущественно именно с нарушением целостности миелиновых волокон, возникающим в результате опухолевой инвазии.

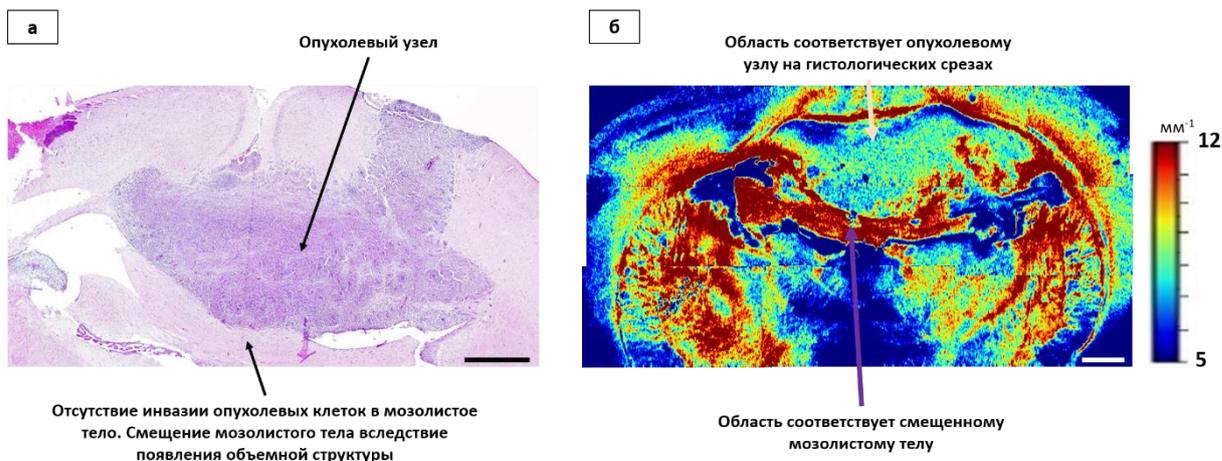


Рисунок 33. Влияние опухоли С6 на мозолистое тело (пример 1). а – гистологический срез, окрашенный ГЭ, где визуализируется опухолевый узел, располагающийся в области серого вещества и прилегающий к трактам белого вещества мозолистого тела. Не было отмечено инфильтрации опухолевыми клетками мозолистого тела, однако данная структура является сильно смещенной вследствие роста опухоли. б – соответствующая цветокодированная карта μ , где наблюдается смещение области мозолистого тела, однако значения коэффициента затухания находятся на высоком уровне. Шкала бар – 1 мм.

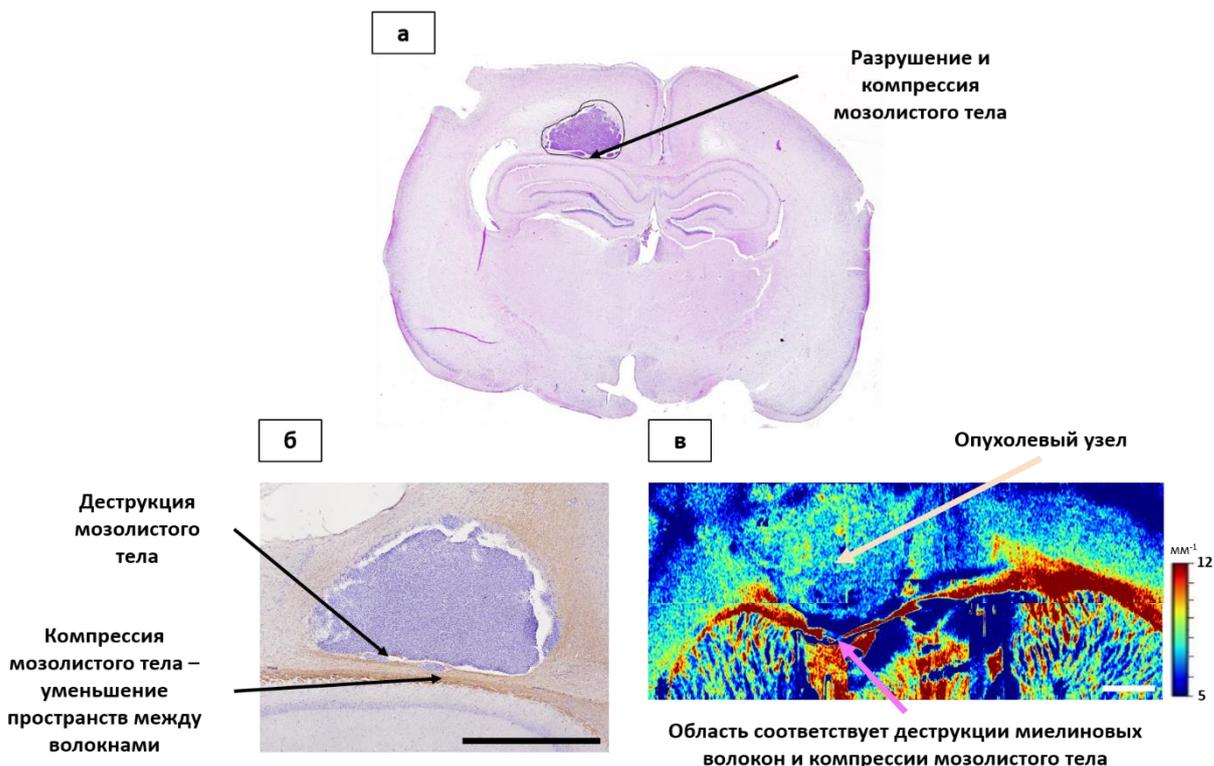


Рисунок 34. Влияние опухоли С6 на мозолистое тело (пример 2). а – гистологический срез, окрашенный ГЭ, на котором визуализируется опухолевый узел. б – ИГХ изображение (МВР), на котором демонстрируется область мозолистого тела, прилегающая к опухоли. при этом, регистрируются участки с разрушением миелиновых волокон, а также компрессия мозолистого тела. в – соответствующая цветокодированная карта μ , на которой визуализируется область мозолистого тела с участками, со сниженными значениями коэффициента затухания, соответствующими зоне деструкции миелиновых волокон. Шкала бар – 1 мм на цветокодированной карте, 500 мкм на гистологическом изображении.

По результатам данного этапа работы можно сделать следующие выводы. Исследуемые модели глиальных опухолей крыс (10-17-2, 101/8 и С6) оказывают различное влияние на коэффициент затухания белого вещества головного мозга, что связано с характерными особенностями каждой модели.

Наиболее агрессивной опухолью, вызывающей значительное коэффициента затухания мозолистого тела ($\mu = 6,1 [5,2; 6,8] \text{ мм}^{-1}$), явилась глиобластома 101/8. Развитие данного типа опухоли характеризовалось массивной инвазией ткани белого вещества, вызывающей деструкцию и разрыв миелиновых волокон, а также отек, вследствие чего невозможно визуально разграничить поврежденные области белого вещества от опухолевой ткани на оптических картах.

Анапластическая астроцитома 10-17-2 также вызывает снижения значений коэффициента затухания, регистрируемых от области мозолистого тела ($\mu = 7,1 [6,0; 7,7] \text{ мм}^{-1}$). Снижение μ в данном случае морфологически объясняется обнаружением следующих патоморфологических изменений: отек ткани, деструкция и разрыв миелиновых волокон. Инфильтрация опухолевыми клетками в данном случае была меньше, чем в случае с глиобластомой 101/8.

Развитие глиомы С6, в отличие от остальных моделей глиальных опухолей, не вызвало снижения коэффициента затухания мозолистого тела, за исключением участков, где наблюдалось разрушение миелиновых волокон.

Данный факт объясняется смещением и компрессией мозолистого тела вследствие роста опухолевого узла, обнаруженных гистологически.

Таким образом, установлено, что изученные опухолевые модели в разной степени меняют коэффициент затухания белого вещества мозолистого тела (рисунок 35). Опухолевые модели 101/8 и 10-17-2 при росте опухоли повреждают структуру белого вещества за счет инвазии опухолевых клеток, разрушения миелиновых волокон и отека ткани, что отражается в резком снижении коэффициента затухания, по сравнению с контрольной группой. Быстрорастущий опухолевый узел глиомы С6 смещает структуры и приводит к компрессии миелиновых волокон мозолистого тела без их разрушения и инфильтрации опухолевыми клетками, что сохраняет значение коэффициента затухания белого вещества мозолистого тела неизменным.

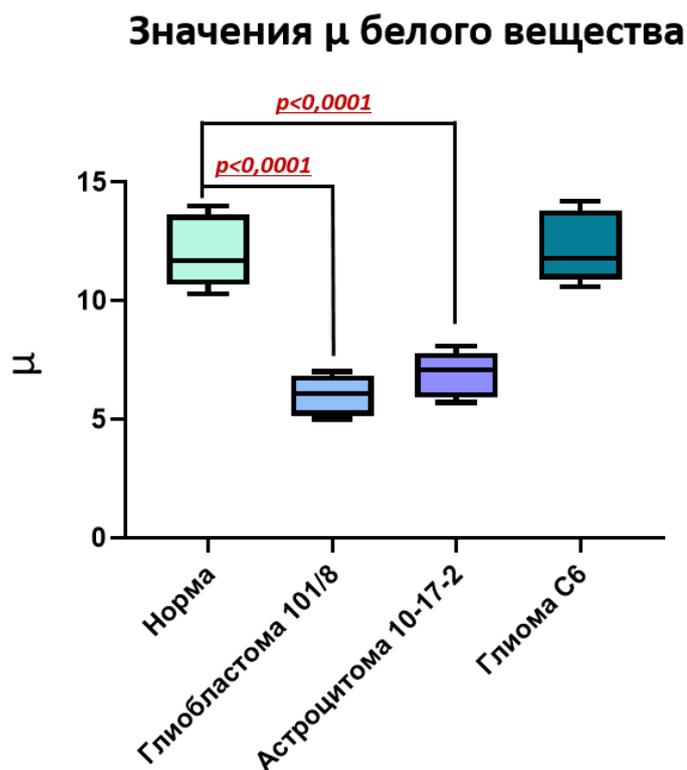


Рисунок 35. Распределение значений коэффициента затухания белого вещества в исследуемых группах экспериментальных животных.

3.4 Результаты *ex vivo* оценки коэффициента затухания белого вещества перитуморальной зоны глиальных опухолей пациентов

Финальный этап работы был направлен на определение ОКТ признаков поврежденного белого вещества с последующим определением диагностической точности применения коэффициента затухания ОКТ сигнала для разграничения поврежденного белого вещества от неповрежденного и от опухолевой ткани.

3.4.1 Исследование морфологических характеристик образцов

Гистологический анализ исследуемых образцов ткани головного мозга, проведенный с использованием окрашивания ГЭ и люксолевым прочным синим, позволил выявить следующие морфологические особенности, характерные для различных типов ткани:

- Неповрежденное белое вещество: поле зрения заполнено множеством сохраненных плотно упакованных миелиновых волокон, расположенных упорядоченно или переплетенных в виде «сетки» (рисунок 36, *a1, a2*)
- Поврежденное белое вещество на гистологических препаратах характеризуется разрушением миелиновых волокон, что более отчетливо визуализируется на срезах, окрашенных люксолевым прочным синим: нарушена типичная архитектура, разрушено более 20% волокон (рисунок 36, *b2*). Кроме того, наблюдается увеличение количество клеточных элементов за счет инфильтрации ткани опухолевыми клетками, а также развитие отека (рисунок 36, *b1, b2*).
- В гистологических препаратах опухоли наблюдается наличие атипичных клеток, кровеносных сосудов, а также возможно появление очагов кровоизлияний и некрозов (рисунок 36, *v1*)

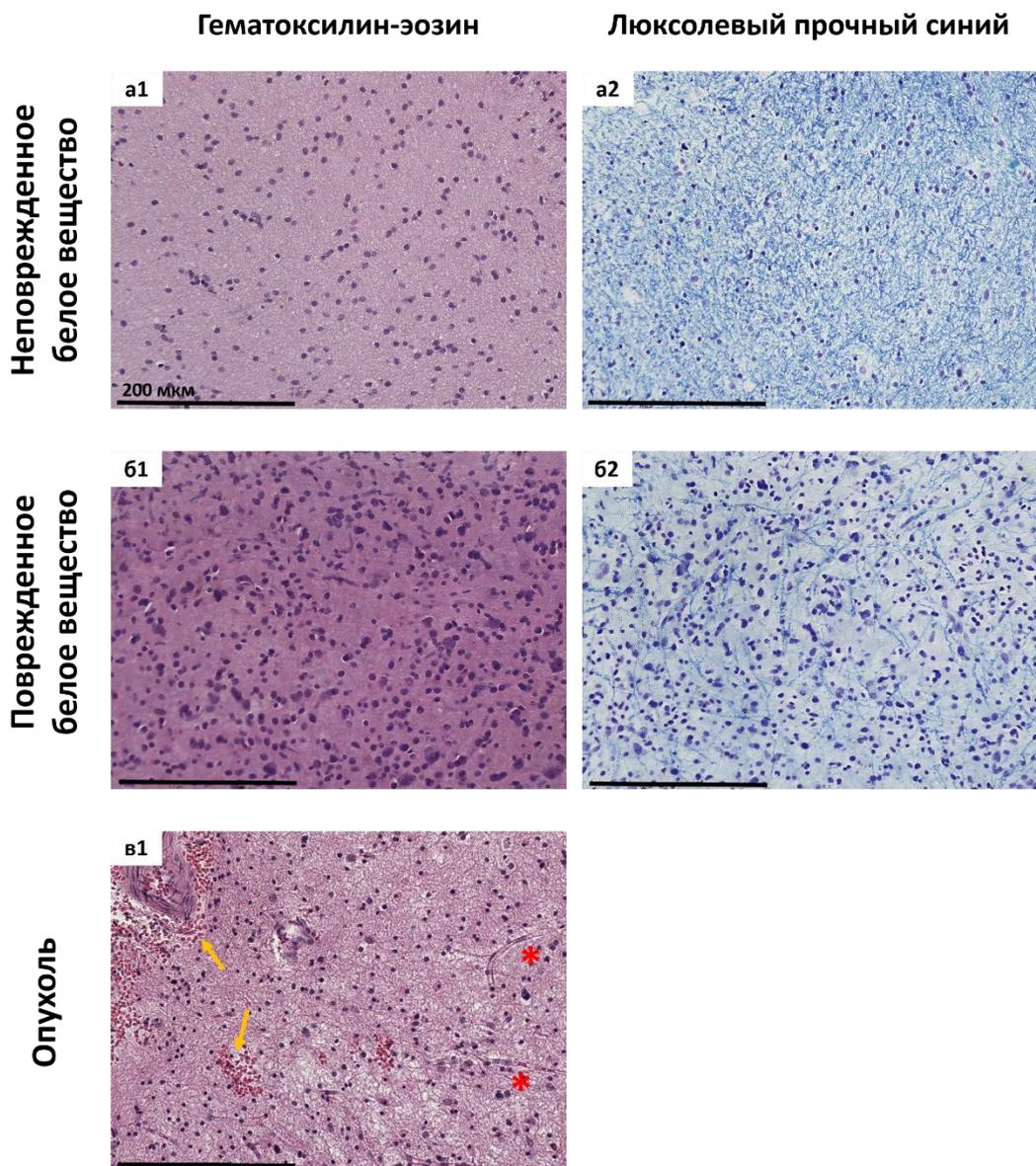


Рисунок 36. Гистологические препараты исследуемых типов ткани, окрашенные ГЭ и люксолевым прочным синим. a1, a2 – область неповрежденного белого вещества – визуализируется сеть плотно упакованных миелиновых волокон. б1, б2 – область поврежденного белого вещества – визуализируются единичные сохраненные миелиновые волокна. в1 – препарат олигоастроцитомы Grade II, в котором визуализируются кровеносные сосуды (красные звездочки) и очаги кровоизлияний (желтые стрелки). Бар = 200 мкм.

Следует отметить, что образцы поврежденного белого вещества характеризуются морфологической неоднородностью, в частности, различным количеством разрушенных миелиновых волокон, степенью инфильтрации опухолевыми клетками и степенью выраженности отека. Как можно видеть из рисунка 37, панель б, количество сохраненных миелиновых

волокон может варьироваться в широких пределах от единичных волокон, до сформированной сетки, являющейся более разреженной по сравнению с областями неповрежденного белого вещества (рисунок 37, панель а). Степень инфильтрации опухолевыми клетками была выраженной в 70% исследуемых образцов, в 30% - незначительной. Выраженность отека ткани также варьировалась: умеренный отек обнаружен в 25 % образцов; выраженный – в 4% образцов, в остальных случаях (71%) отек был незначительным.

Интересным выглядит факт, что в ходе исследования не было обнаружено достоверной взаимосвязи между злокачественностью опухоли и степенью повреждения перитуморального белого вещества. Вероятно, данный факт объясняется необходимостью набора большего объема статистической выборки.

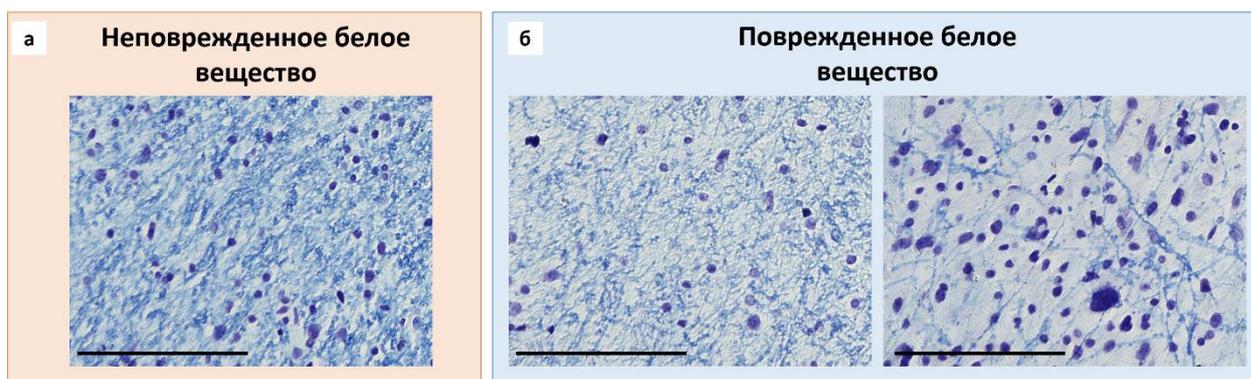


Рисунок 37. Гистологические препараты неповрежденного (а) и поврежденного белого вещества (б), окрашенные люксолевым прочным синим. Области поврежденного белого вещества могут характеризоваться как частичной утратой миелиновых волокон, так и практически тотальным их разрушением с сохранением отдельных волокон. Бар = 100 мкм.

3.4.2 Анализ коэффициента затухания неповрежденного белого вещества, поврежденного белого вещества и опухоли

Применение количественной обработки с использованием коэффициента затухания позволяет обнаруживать различия в рассеивающих свойствах всех трех исследуемых типов ткани с высокой точностью (таблица 8). Обнаружено, что неповрежденное белое вещество характеризуется наивысшими значениями коэффициента затухания (10,3 [9,6; 10,9] мм⁻¹). Разрушение миелиновых волокон в области интереса приводит к снижению

рассеивающих свойств, что отражается в статистически значимом уменьшении значений μ по сравнению с неповрежденным белым веществом (9,2 [6,4; 10,7] мм⁻¹). Таким образом, белое вещество, характеризующееся деструкцией миелиновых волокон, инфильтрацией опухолевыми клетками и отеком, занимает промежуточную позицию между неповрежденным белым веществом и опухолевой тканью (рисунок 38). Отдельно необходимо отметить более значительную вариабельность значений коэффициентов затухания в данной ткани по сравнению с двумя другими типами (межквартильный интервал 4,3 мм⁻¹), что связано с различным количеством поврежденных миелиновых волокон в исследуемой области, различной степенью инфильтрации опухолевыми клетками и выраженностью отека ткани.

Таблица 8. Сравнение исследуемых типов ткани при помощи коэффициента затухания.

	Неповрежденное белое вещество (n=169) 10,3 [9,6; 10,9]	Поврежденное белое вещество (n=407) 9,2 [6,4; 10,7]	Опухоль (n=297) 5,8 [4,6; 6,8]
Неповрежденное белое вещество	-	<0.0001	<0.0001
Поврежденное белое вещество	<0.0001	-	<0.0001
Опухоль	<0.0001	<0.0001	-

Примечание: указаны р-значения для альтернативной гипотезы U-теста Манна-Уитни о наличие различий между сравниваемыми группами. Результаты представлены как Me [Q1; Q3], где Me – медианное значение, Q1 и Q3 – значения 25го и 75го процентиля соответственно.

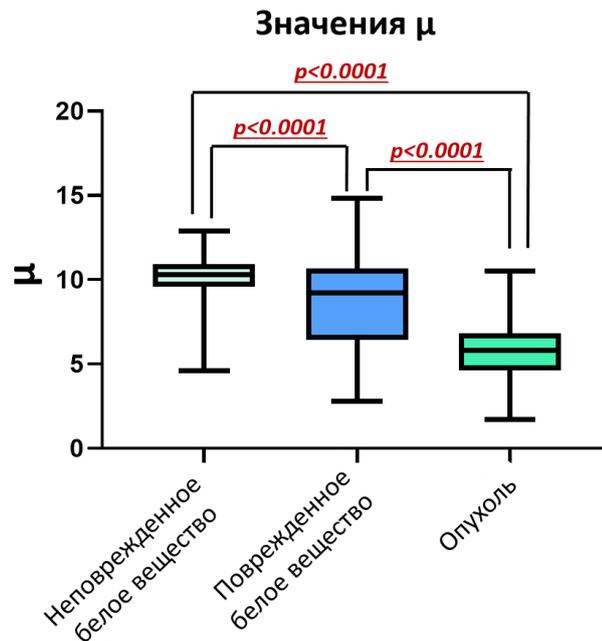


Рисунок 38. Распределение значений коэффициента затухания для исследуемых типов ткани.

Корреляционный анализ, проведенный с использованием рангового коэффициента корреляции Спирмена, выявил статистически значимую отрицательную корреляцию между значениями коэффициента затухания и морфологическими типами ткани мозга: $\rho = (-0,72)$, $p < 0,0001$. При корреляционном анализе неповрежденное белое вещество было принято за «1», поврежденное белое вещество за «2», опухолевая ткань кодировалась «3». В результате, более низкие значения коэффициента затухания соответствуют более существенному патологическому состоянию ткани.

3.4.3 Визуальный анализ цветокодированных оптических карт неповрежденного белого вещества, поврежденного белого вещества и опухоли

Было обнаружено, что области поврежденного белого вещества демонстрируют преобладание промежуточных оттенков на оптических картах (рисунок 39, б2, б3). Кроме того, данные карты являются более гетерогенными, характеризуясь наличием как областей с высокими

значениями коэффициента затухания (области с сохраненными миелиновыми волокнами), так и областей с низкими значениями оптического коэффициента (тотальная деструкция волокон).

В результате исследования были установлены следующие характеристики оптических карт μ для исследуемых типов ткани:

А. нормальное белое вещество

- тотальное преобладание темно-красного и оранжевого цветов. В редких случаях появление желтого.

Б. поврежденное белое вещество

- наиболее гетерогенная группа; характерно преобладание голубого, зеленого и желтого цветов. В редких случаях возможно присутствие синих и желтых областей.

В. опухоль

- тотальное преобладание синего. В редких случаях возможно наличие областей с более высокими значениями μ : голубых, зеленых, желтых.

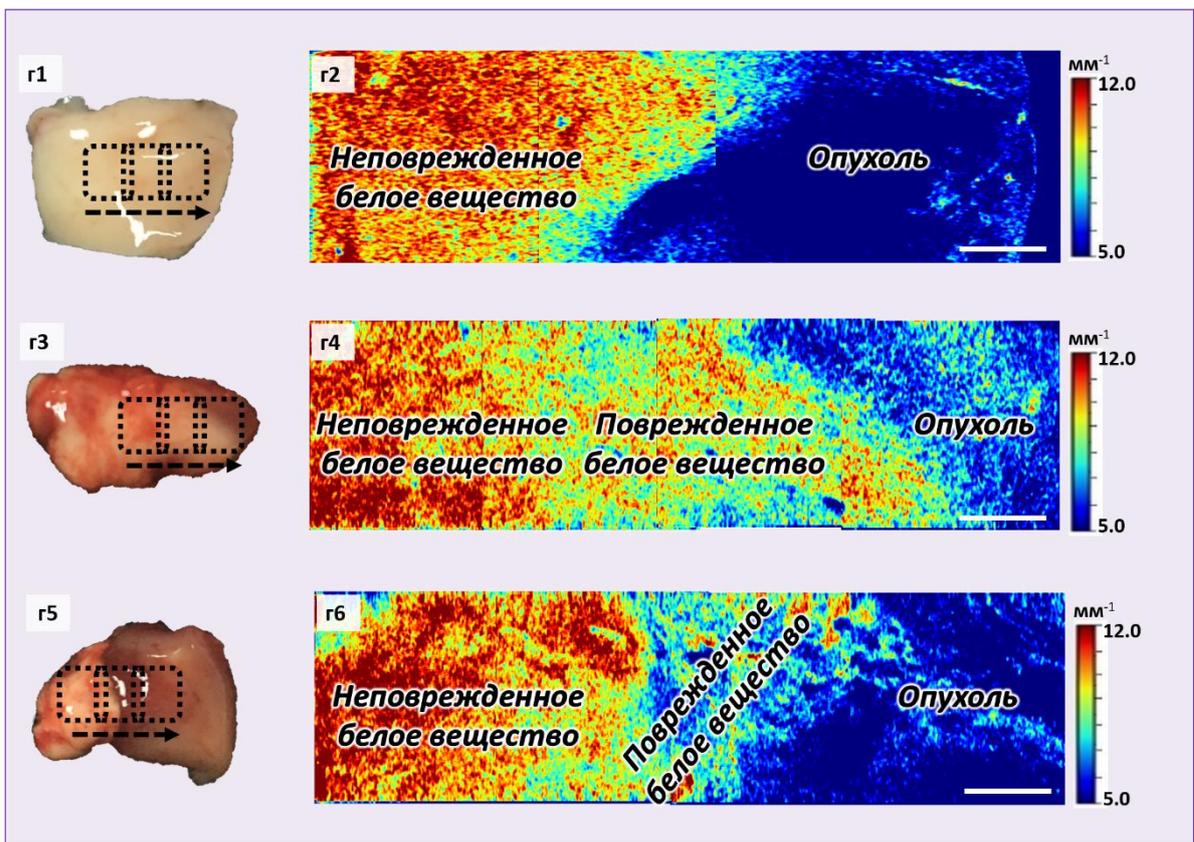
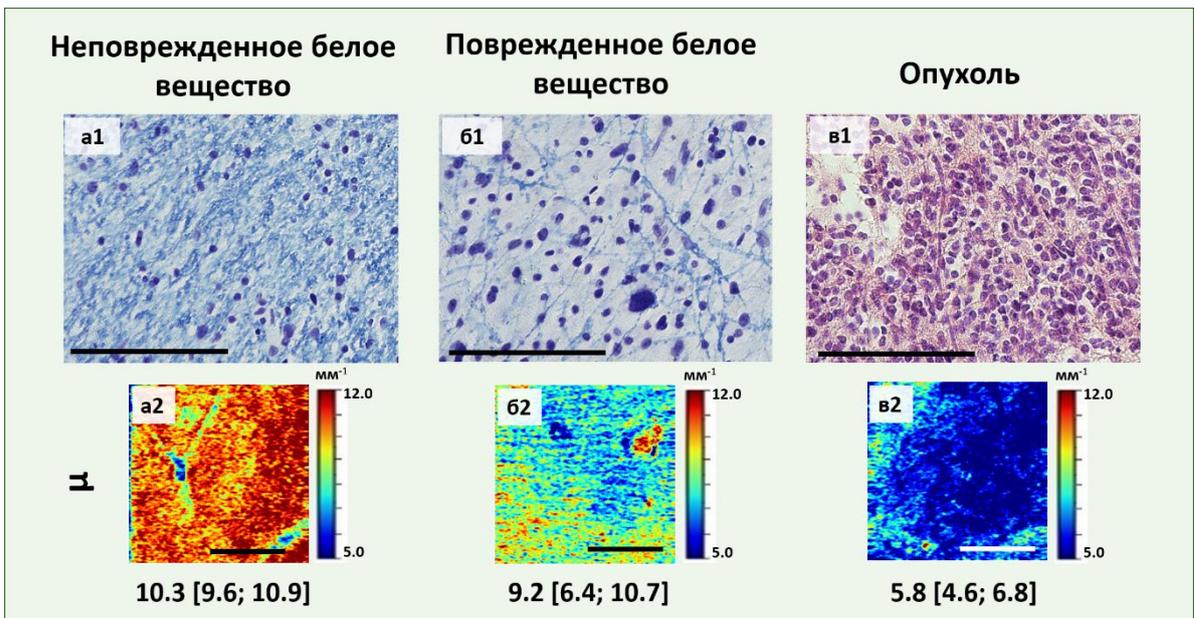


Рисунок 39. Примеры *en face* цветочисленных карт, построенных на основании численных распределений коэффициента μ (а1, б1, в1) для трех исследуемых типов ткани и соответствующие гистологические изображения. г2, г4, г6 – цветочисленные карты коэффициента μ , демонстрирующие различные варианты границ опухоли, где области неповрежденного и поврежденного белого вещества могут быть визуализированы. Можно отметить, что граница между неповрежденным белым веществом и опухолью может варьироваться от тонкой полосы поврежденного белого вещества (г2), до широкой зоны с меньшим (г4) или большим (г6) количеством

разрушенных миелиновых волокон. Области исследования отмечены на образцах (г1, г3, г5) черными прямоугольниками. Шкала бар = 200 мкм на гистологическом изображении и 1 мм на цветокодированной карте.

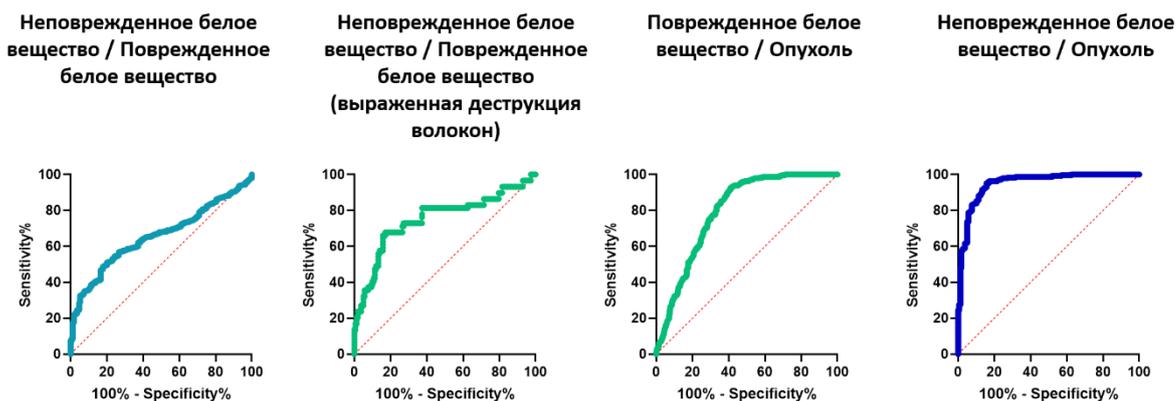
Необходимо отметить, что в ряде случаев отмечаются трудности с разграничением областей поврежденного белого вещества как от опухоли, так и неповрежденного белого вещества. Это возникает в тех случаях, когда наблюдаются пересечения значений коэффициентов затухания для разграничиваемых типов ткани. В частности, при повреждении небольшого числа миелиновых волокон в зоне исследования значения коэффициентов снижаются незначительно, отображаясь желтым цветом. Однако, области нормального белого вещества в редких случаях также характеризуются наличием желтого цвета. Зоны тотальной деструкции отображаются голубо-синими цветами, что может быть спутано с опухолевой тканью.

3.4.4 Диагностическая точность применения коэффициента затухания ОКТ сигнала для разграничения поврежденного белого вещества от нормального белого вещества и опухолевой ткани

Финальным этапом исследования явился ROC-анализ применения коэффициента затухания для разграничения поврежденного белого вещества / неповрежденного белого вещества, поврежденного белого вещества / опухоли (рисунок 40).

Для каждого случая дифференцировки тканей были предложены пороговые значения коэффициента затухания. В частности, для дифференцировки поврежденного белого вещества от областей неповрежденного белого вещества оптимальным стал порог отсечки равный $10,0 \text{ мм}^{-1}$. При этом, значения чувствительности, специфичности и диагностической точности составили 60,2%, 62,7% и 60,7% соответственно. Необходимо отметить, что низкие значения чувствительности и специфичности в данном случае связаны с гетерогенностью областей белого вещества. Поиск областей с незначительным количеством поврежденных

миелиновых волокон в поле зрения снижает диагностическую точность метода в сравнении с разграничением неповрежденного белого вещества от зон с выраженной деструкцией волокон. В случае разграничения неповрежденного белого вещества от областей, где наблюдается выраженная деструкция миелиновых волокон, значения чувствительности, специфичности и диагностической точности составляют 67,8%, 80,8% и 77,4% соответственно, при использовании порогового значения μ равного $9,2 \text{ мм}^{-1}$.



	Неповрежденное белое вещество / Поврежденное белое вещество	Неповрежденное белое вещество / Поврежденное белое вещество (выраженная деструкция волокон)	Поврежденное белое вещество / Опухоль	Неповрежденное белое вещество / Опухоль
Площадь под кривой	0,656	0,752	0,796	0,952
Предлагаемое пороговое значение μ , мм^{-1}	10,0	9,2	6,6	7,7
Чувствительность, %	60,2	67,8	70,0	83,8
Специфичность, %	62,7	80,8	72,5	91,7
Диагностическая точность, %	60,7	77,4	71,3	86,7

Рисунок 40. ROC-анализ применения коэффициента затухания для разграничения типов ткани мозга.

Таким образом, несмотря на низкие значения чувствительности и специфичности, использование коэффициента затухания ОКТ сигнала с целью обнаружения областей поврежденного белого вещества в перитуморальной зоне глиом головного мозга, является возможным.

Обнаружено, что развитие патоморфологических изменений (разрушение миелиновых волокон, инфильтрация опухолевыми клетками, отек ткани) приводит к статистически значимому снижению коэффициента затухания белого вещества по сравнению с неповрежденными областями.

Снижение значений коэффициентов затухания приводит, в свою очередь, к преобладанию промежуточных цветов (зеленый и желтый) на оптических картах, что позволяет проводить визуальную дифференцировку трех исследуемых типов ткани.

Сформулированные ОКТ признаки для неповрежденного и поврежденного белого вещества могут быть применимы для интраоперационного обнаружения поврежденных областей в ходе резекций новообразований головного мозга или стереотаксических биопсий.

3.4.5 Клинический пример применения ОКТ в ходе резекции опухоли

Пациент К, 31 год. В анамнезе повторяющиеся эпизоды головной боли, а также зрительные галлюцинации. МРТ выявило анапластическую астроцитому (Grade III, IDH-mutant) в левой височной доле (рисунок 41, *a1-a3*), расположенную рядом с областью Вернике. Хирургическое вмешательство с пробуждением было проведено для определения зон речи, затем проведено выделение височной доли в пределах анатомических ориентиров. После осуществления доступа к опухолевому очагу был произведен забор образца ткани в непосредственной близости к опухоли для последующего ОКТ сканирования. Полученные ОКТ данные продемонстрировали типичные особенности, характерные для поврежденного белого вещества (рисунок 41, *б3*), в частности: цветочкообразные карты характеризуются промежуточными значениями коэффициентов затухания (ниже, чем у нормального белого вещества, но выше, чем у опухоли). После удаления опухоли был произведен забор еще одного образца ткани в области задней границы резекции (рисунок 41, *б2*). Полученные ОКТ изображения соответствовали неповрежденному белому веществу (рисунок 41, *б4*). По данным послеоперационного МРТ (рисунок 41, *в1, в2*) – тотальное удаление опухоли.

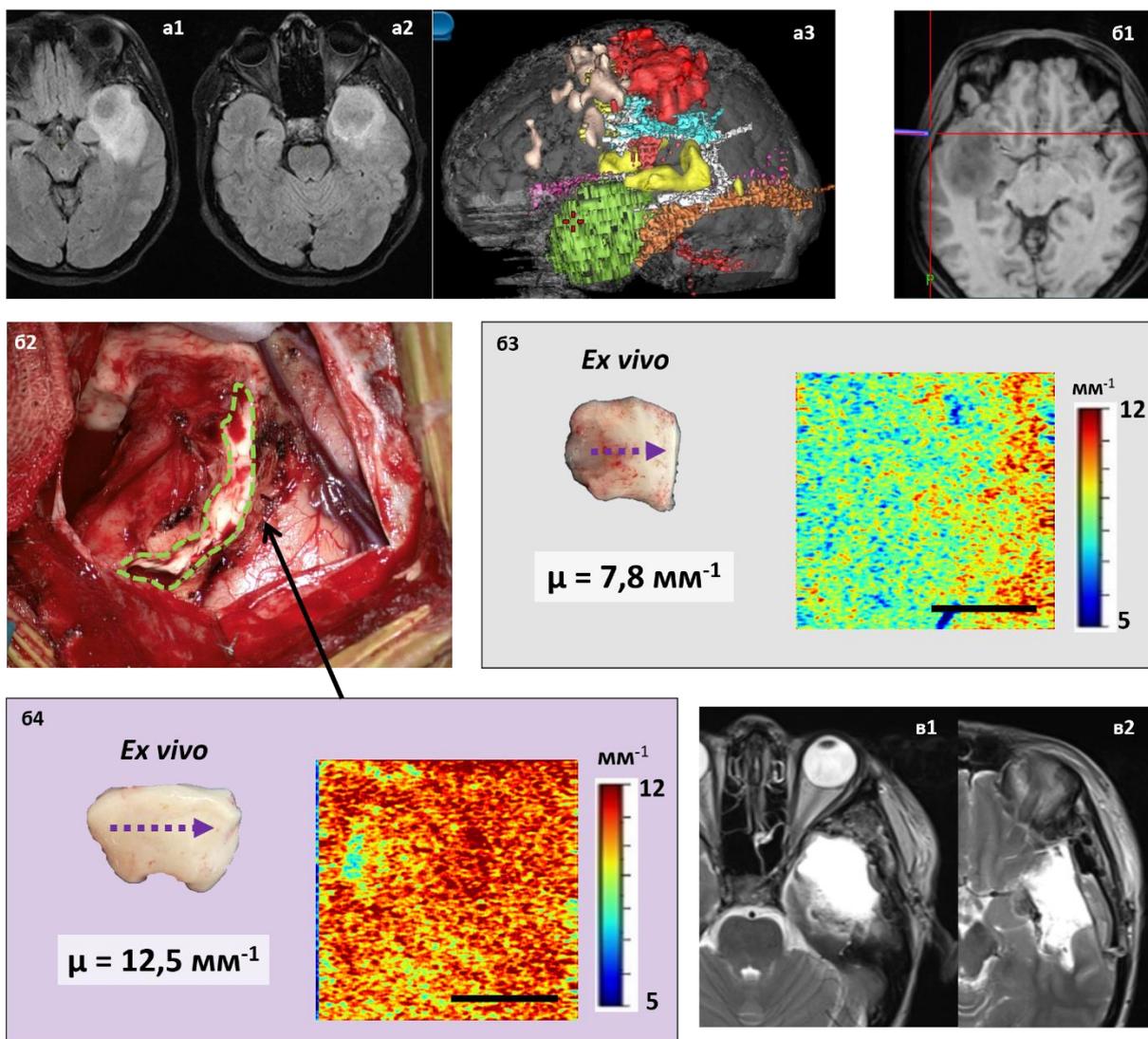


Рисунок 41. Пример применения ОКТ в ходе резекции анапластической астроцитомы (Grade III, IDH-mutant) левой височной доли. a1-a3 – предоперационные МРТ-изображения. В ходе операции, осуществляемой под контролем нейронавигации (б1, б2), был произведен забор образца ткани в непосредственной близости к опухолевому очагу, с которого были получены ОКТ изображения, соответствующие поврежденному белому веществу (б3). В последующем был произведен забор образца ткани из области заднего края резекции с последующим получением ОКТ изображения (б4). Характер изображений соответствовал неповрежденному белому веществу. v1, v2 – постоперационные МРТ-изображения.

Глава 4. Обсуждение результатов

В данной работе представлено изучение коэффициента затухания ОКТ сигнала (μ) *post-mortem* образцов головного мозга человека, ткани головного мозга *экспериментальных животных*, а также *послеоперационных образцов* пациентов с опухолями головного мозга. Задачи исследования заключались в оценке изменений коэффициента затухания белого вещества, возникающих при развитии глиальных опухолей головного мозга, а также в определении возможности применения μ для обнаружения областей поврежденного белого вещества и их дифференцировки от неповрежденного белого вещества и опухоли с целью определения предельно допустимой зоны резекции.

Первый этап работы был направлен на подбор оптимальных параметров для расчета и демонстрации коэффициента затухания, вычисляемого по ОКТ данным мозговой ткани. Было проведено сравнение двух подходов для вычисления μ : оригинальной модификации метода с разрешением по глубине, а также метода линейной аппроксимации логарифмированного сигнала. В результате было показано, что с целью анализа ОКТ данных мозговой ткани предпочтительным является использование предложенного нами подхода, что связано с возможностью обнаружения мелких деталей и большей контрастностью оптических карт, что является принципиально важным моментом. Кроме того, продемонстрировано, что цветокодированные оптические карты являются наиболее контрастными при вычислении коэффициента затухания в диапазоне глубин 120-300 мкм и при использовании цветовой шкалы, кодированной диапазоном от 5 до 12 мм^{-1} . Несмотря на то, что в данной работе использована кросс-поляризационная модальность ОКТ, было принято решение об использовании только ОКТ сигнала в ко-поляризации, так как применение коэффициента затухания в кросс-поляризации не дает дополнительной информации об исследуемом объекте, а также не увеличивает контрастность оптических карт. Подобранные

параметры были в дальнейшем продемонстрированы для всех исследуемых объектов.

Второй этап работы заключался в исследовании коэффициента затухания нормального белого вещества, а также определении взаимосвязи между μ белого вещества и его структурой. Результаты данного этапа детально представлены в нашей опубликованной работе [152]. Для того, чтобы количественно охарактеризовать структурные характеристики белого вещества, был разработан авторский алгоритм, направленный на численную обработку ИГХ изображений. Данный алгоритм позволяет оценить характер расположения миелиновых волокон при помощи предлагаемого параметра СПВ (структурный параметр волокон), а также оценить количество глиальных клеток путем подсчета клеточных ядер (ПКЯ – параметр количества клеточных ядер). Работа была проведена на образцах нормального белого вещества, полученных из различных областей головного мозга, которые практически невозможно получить у пациентов в ходе оперативного лечения опухолей. Данные области были выбраны исходя из их частой вовлеченности в опухолевый рост, а также из предположения об их морфологической неоднородности [35].

По результатам данного этапа работы впервые рассчитаны значения коэффициента затухания ОКТ сигнала для различных областей нормального белого вещества. Обнаружено, что наивысшими значениями коэффициента затухания обладает корковая зона ($\mu = 10,6 [9,9; 11,9] \text{ мм}^{-1}$), в то время как ствол мозга демонстрирует самые низкие значения μ ($8,7 [8,5; 9,2] \text{ мм}^{-1}$). При этом, были зафиксированы структурные различия исследуемых областей, связанные как с различным количеством клеток, так и с различным характером расположения миелиновых волокон, что подтвердило предположение о морфологической неоднородности выбранных областей. Было обнаружено, что области, характеризующиеся равномерным заполнением поля зрения миелиновыми волокнами, расположенными в виде сетки (корковая и подкорковая зоны), демонстрируют бóльшие значения параметра СПВ, в

сравнении с параллельной укладкой волокон, разделенных промежутками. Таким образом, бóльшая площадь, занимаемая волокнами на изображении, соответствует меньшим значениям параметра СПВ.

Впервые продемонстрирована корреляция между коэффициентом затухания белого вещества и его структурой, определенной на основании цифровой обработки ИГХ изображений. Установлена наибольшая корреляция между характером расположения миелиновых волокон (структурным параметром волокон) и коэффициентом затухания. Количество клеточных элементов (глиальных клеток) в поле зрения также коррелирует со значениями коэффициента затухания, однако, данная взаимосвязь является менее существенной. Обнаруженные зависимости свидетельствуют о возможности прижизненного применения ОКТ для определения структурных особенностей ткани белого вещества, в частности, характера расположения и повреждения миелиновых волокон.

На третьем этапе работы впервые исследовалось влияние глиальных опухолей головного мозга на коэффициент затухания белого вещества головного мозга экспериментальных животных (крыс). На примере мозолистого тела было продемонстрировано, что исследуемые модели глиальных опухолей крыс (101/8, 10-17-2 и С6) оказывают различное воздействие на белое вещество, что связано с характерными особенностями каждой модели. Зарегистрированные морфологические изменения, возникающие в мозолистом теле при росте опухолей, включали в себя отек различной степени выраженности, инфильтрацию опухолевыми клетками, компрессию миелиновых волокон, а также нарушение их целостности. Во всех исследуемых случаях (исключая изолированную компрессию миелиновых волокон) было обнаружено статистически значимое снижение коэффициента затухания белого вещества по сравнению с контрольной группой.

Наиболее агрессивной опухолью, характеризующейся массивным вторжением в ткань белого вещества, явилась глиобластома 101/8. Развитие данного типа опухоли характеризовалось значительной деструкцией и

разрывом миелиновых волокон мозолистого тела, а также отеком, что находило свое отражение в снижении коэффициента затухания, регистрируемых от данной области ($\mu = 6,1 [5,2; 6,8] \text{ мм}^{-1}$), по сравнению с контрольной группой ($\mu = 11,7 [10,8; 13,5] \text{ мм}^{-1}$, $p < 0,001$). Несмотря на то, что при развитии анапластической астроцитомы 10-17-2 инфильтрация опухолевыми клетками ткани белого вещества выражена незначительно, нами был зарегистрирован целый комплекс структурных изменений, включающий как изменения миелиновых волокон (деструкция, компрессия), так и отек ткани. Обнаруженная совокупность морфологических изменений привела к снижению значений коэффициента затухания ($\mu = 7,1 [6,0; 7,7] \text{ мм}^{-1}$) до уровня, близкого к опухолевым значениям ($\mu = 5,8 [5,1; 6,9] \text{ мм}^{-1}$). Модель глиомы С6, в отличие от остальных исследуемых опухолей, не продемонстрировала столь значительного влияния на ткань мозолистого тела. Рост данного типа опухоли сопровождается либо незначительной инвазией белого вещества, либо полным ее отсутствием, что приводит к смещению структур с последующей компрессией миелиновых волокон. При данном типе морфологических изменений нами не было обнаружено снижения значений коэффициента затухания мозолистого тела ($\mu = 11,8 [11,0; 13,7] \text{ мм}^{-1}$).

Таким образом, на данном этапе работы установлено, что изменения в структуре белого вещества вследствие опухолевого роста, включающие разрушение миелиновых волокон, инфильтрацию опухолевыми клетками и отек ткани, приводят к значительному снижению его коэффициента затухания. При этом, данные области характеризовались преобладанием голубого и синего цветов на цветокодированных картах, что сделало их визуально не различимыми с опухолевой тканью. Отсутствие цветовых различий в данных случаях связано с выбранной цветовой шкалой.

Финальный этап работы был направлен на исследование изменений коэффициента затухания белого вещества у пациентов с глиомами головного мозга с последующим определением диагностической точности применения коэффициента затухания ОКТ сигнала для дифференцировки различных

морфологических типов ткани головного мозга. Результаты детально представлены в опубликованной работе [154].

Следует отметить, что мировые исследования ткани головного мозга при помощи ОКТ направлены, преимущественно, на разграничение нормальных и опухолевых тканей между собой. Известен ряд работ, демонстрирующих возможность разграничения нормального белого вещества от опухоли на основании визуального анализа В-сканов и количественной оценки ОКТ сигнала с помощью коэффициента затухания и оптических карт [15, 17, 21, 155]. Кроме того, опубликованы исследования, показывающие перспективность применения методов машинного обучения и искусственного интеллекта для разграничения тканей [27, 156]. Однако, ни в одной работе ранее перитуморальная зона не служила фокусом исследования, в частности, структурные особенности белого вещества, которые определяют эффективность резекции опухолей.

В ходе исследования были определены значения коэффициента затухания, а также визуальные признаки цветочкодированных карт, характерные для трех типов ткани: неповрежденное белое вещество, поврежденное белое вещество, опухоль. Впервые продемонстрировано, что области поврежденного белого вещества характеризуются статистически значимым снижением μ в сравнении с тканью неповрежденного белого вещества. При этом значения μ остаются статистически выше, чем у опухоли. Снижение коэффициента затухания приводит к преобладанию промежуточных цветов (зелено-желтый, голубой цвета) на оптических картах, что делает данные области визуально хорошо отличимыми как от неповрежденного белого вещества (оранжевый, красный цвета), так и от опухолевой ткани (синий цвет).

Важно подчеркнуть, что области поврежденного белого вещества включают в себя несколько видов структурных изменений, возникающих вследствие влияния опухоли на ткань проводящих путей [3]. С одной стороны, наблюдается деструкция миелиновых волокон, точный механизм

возникновения которой до сих пор не установлен [2]. Нами было обнаружено, что изменение миелиновых волокон в данных областях может варьироваться от незначительного повреждения до тотальной деструкции. При этом, впервые было отмечено, что различия в количестве поврежденных миелиновых волокон находят свое отражение в большем разбросе значений коэффициентов затухания по сравнению с нормой. Так, межквартильный диапазон для μ составил 9,6-10,9 мм^{-1} для неповрежденного белого вещества и 6,4-10,7 мм^{-1} для поврежденного белого вещества. Данный факт также подтверждает взаимосвязь между морфологией миелиновых волокон и коэффициентом затухания белого вещества. Цветокодированные оптические карты поврежденного белого вещества также являются гетерогенными и могут включать как области с более высокими значениями коэффициента затухания, соответствующие зонам с большим количеством сохраненных миелиновых волокон, и области с низкими значениями коэффициента затухания в случае зон с тотальной деструкцией волокон. С другой стороны, помимо повреждения миелиновых волокон поврежденные области характеризуются инфильтрацией опухолевыми клетками, а также возникновением вазогенного отека [40], которые также влияют на рассеивающие свойства ткани. Таким образом, у каждого конкретного пациента наблюдается индивидуальная комбинация повреждений, включающая в себя различную степень выраженности отека, различное количество поврежденных волокон, а также различную степень инфильтрации опухолевыми клетками.

В работе впервые показана диагностическая точность применения коэффициента затухания ОКТ сигнала для дифференцировки областей поврежденного белого вещества от неповрежденного и от опухолевой ткани с использованием пороговых значений μ . В частности, для дифференцировки поврежденного белого вещества от областей неповрежденного белого вещества оптимальным стал порог отсечки равный 10,0 мм^{-1} . При этом, значение диагностической точности составило 60,7%. Попытка выделить поврежденное белое вещество приводит к снижению диагностической

точности метода в сравнении с разграничением исключительно нормального белого вещества и опухолевых тканей. Так, в работе Yashin et al. [128] диагностическая точность использования коэффициента затухания для разграничения нормального белого вещества и глиальных опухолей составила 93,5%. Необходимость обнаружения областей с разрушенными миелиновыми волокнами затрудняет исследование, что связано с большей гетерогенностью ОКТ изображений, получаемых с данного типа ткани. Кроме того, следует отметить, что в ходе хирургического вмешательства оценка одного численного значения, получаемого со всего ОКТ изображения, может быть недостаточной. В частности, в случаях присутствия различных типов ткани в пределах одного трехмерного массива ОКТ данных. В таких случаях более перспективным выглядит использование цветокодированных оптических карт.

Говоря о возможности применения полученных результатов в клинической практике, необходимо отметить, что данное исследование проводилось на *ex vivo* образцах ткани мозга. Мы утверждаем, что транспортировка образцов в закрытых чашках Петри на льду сохраняет структурные характеристики и, следовательно, оптические свойства объекта [157]. Однако, для подтверждения результатов и внедрения технологии ОКТ в клинику, необходимы дополнительные *in vivo* исследования.

Кроме того, следует упомянуть ряд ограничений данной работы, связанных с различными аспектами. С одной стороны, существуют ограничения, связанные непосредственно с методом ОКТ, в частности, малая глубина проникновения зондирующего излучения в ткани. Таким образом, возможно получить изображения внутренней структуры ткани на глубину лишь до 1,5 мм. Кроме того, размер ОКТ изображения и, соответственно, объем сканирования ткани является небольшим (2,4x2,4 мм²). С другой стороны, в ходе определения сохранности миелиновых волокон в зоне интереса невозможно исключить влияние отека на характер регистрируемого ОКТ сигнала. Как уже было сказано выше, известно, что отек мозговой ткани

оказывает влияние на ее рассеивающие свойства. Вследствие этого, значительно выраженный отек может существенно снизить коэффициент затухания белого вещества, что может ввести в заблуждение в ситуациях с небольшим количеством поврежденных миелиновых волокон. Кроме того, области коагуляции, некроза или кровоизлияний также приводят к изменениям в характеристиках получаемого ОКТ сигнала, что важно иметь в виду в ходе исследований *in vivo*.

Однако, несмотря на наличие вышеупомянутых ограничений, можно утверждать, что ОКТ является перспективным методом для применения в ходе резекций новообразований головного мозга или стереотаксических биопсий. В настоящее время существует ряд интраоперационных ОКТ систем, описанных в обзорной статье [158], что свидетельствует о возможности интраоперационного применения данного метода с целью получения детальной информации о ткани головного мозга в конкретной области интереса.

Заключение

В работе применен расчет коэффициента затухания белого вещества головного мозга в норме, а также под влиянием опухолевого роста. Впервые установлены ОКТ признаки поврежденного белого вещества и определена диагностическая точность коэффициента затухания ОКТ сигнала для дифференцировки поврежденного белого вещества от неповрежденного и глиальной опухоли.

Впервые установлена корреляция между коэффициентом затухания нормального белого вещества и его структурными компонентами на основании численной обработки ИГХ и ОКТ изображений. Применение разработанного авторами параметра, описывающего степень присутствия миелиновых волокон в зоне интереса, позволило установить достоверную взаимосвязь между характером расположения миелиновых волокон и коэффициентом затухания ОКТ сигнала: коэффициент корреляции для структурного параметра волокон и μ составил (-0,49); [-0,61; -0,37]. Таким образом, области, где миелиновые волокна занимают большую площадь поля зрения, характеризуются большим значением коэффициента затухания. Количество клеточных элементов (глиальных клеток) также оказывает влияние на рассеивающие свойства белого вещества, однако, оно является более низким (коэффициент корреляции для количества клеточных ядер и μ составил 0,29; [0,14, 0,43]). Выявленные корреляционные зависимости демонстрируют возможность использования ОКТ для определения структурных особенностей ткани белого вещества, в частности, характера расположения миелиновых волокон.

Впервые описаны изменения коэффициента затухания белого вещества, возникающие вследствие роста и развития глиом головного мозга на примере животных моделей. Рост глиальных опухолей оказывает комплексное воздействие на ткань белого вещества, вызывая отек, инфильтрацию ткани опухолевыми клетками, компрессию и деструкцию миелиновых волокон. Возникающие структурные повреждения влекут за собой снижение

рассеивающих свойств белого вещества, что регистрируется при анализе медианных значений μ и визуальном анализе цветокодированных карт.

В данной работе впервые идентифицированы параметры цветокодированных карт перитуморального белого вещества с поврежденными миелиновыми волокнами, а также определена диагностическая точность коэффициента затухания ОКТ сигнала для обнаружения областей поврежденного белого вещества и его разграничения от неповрежденного белого вещества и опухоли у пациентов с глиомами мозга. Снижение рассеивающих свойств в областях поврежденного белого вещества находит свое отражение в статистически значимом снижении значений коэффициента затухания по сравнению с нормой ($p < 0.0001$), при этом они остаются статистически выше, чем у опухолевой ткани ($p < 0.0001$). Таким образом, использование медианных значений коэффициента затухания позволяет разграничивать три типа ткани: неповрежденное белое вещество, поврежденное белое вещество и опухоль между собой с высокой точностью. Построение цветокодированных карт, демонстрирующих распределение значений коэффициента μ по всему ОКТ изображению, позволяет представить полученные ОКТ данные в наглядном и распознаваемом виде. При этом, сниженные рассеивающие свойства в области поврежденного белого вещества приводят к преобладанию на цветокодированных картах промежуточных цветов (желто-зеленых, голубых), что позволяет разграничивать их от неповрежденного белого вещества (красно-оранжевый цвет) и опухоли (синий).

Нами впервые была определена диагностическая точность применения коэффициента затухания для разграничения областей поврежденного белого вещества от неповрежденного белого вещества и опухоли. Для каждого случая были предложены пороговые значения μ и определены стандартные статистические параметры диагностического теста (чувствительность, специфичность, диагностическая точность). В частности, для дифференцировки поврежденного белого вещества от областей

неповрежденного белого вещества мы предлагаем порог отсечки равный $10,0 \text{ мм}^{-1}$. При этом, значения чувствительности, специфичности и диагностической точности составили 60,2%, 62,7% и 60,7% соответственно.

В заключение стоит отметить, что результаты данной работы свидетельствуют о высокой ценности коэффициента затухания ОКТ сигнала белого вещества головного мозга для оценки его морфологических характеристик, а также демонстрируют возможность применения ОКТ с целью обнаружения поврежденного белого вещества в перитуморальной зоне опухоли. Проведение дальнейших клинических исследований и усовершенствование технологии позволит внедрить данный метод в клиническую практику врачей-нейрохирургов с целью нейронавигации при резекциях глиальных опухолей головного мозга в реальном времени.

Выводы

1. Определены оптимальные параметры для расчета коэффициента затухания структур мозга и его демонстрации в виде цветокодированных карт: применен модифицированный алгоритм вычисления коэффициента затухания μ с разрешением по глубине; оптимальная глубина оценки μ находится в диапазоне 120-300 мкм глубин ОКТ изображения; цветовая шкала цветокодированных карт, дающая оптимальный контраст мозговых структур кодируется численным диапазоном μ от 5 до 12 мм^{-1} .
2. Установлена корреляция между коэффициентом затухания неизменного белого вещества и его структурными компонентами на основании численной обработки ИГХ и ОКТ изображений. Показано, что миелиновые волокна оказывают большее влияние на коэффициент затухания ОКТ сигнала в сравнении с клетками.
3. Развитие экспериментальных моделей глиальных опухолей демонстрирует статистически значимое снижение μ белого вещества в сравнении с контрольной группой здорового мозга животных, обусловленное возникновением отека, инфильтрацией опухолевыми клетками и разрушением миелиновых волокон. Развитие изолированной компрессии миелиновых волокон не приводит к снижению коэффициента затухания белого вещества.
4. Области поврежденного белого вещества у пациентов с глиомами головного мозга характеризуются сниженными значениями коэффициента затухания и преобладанием промежуточных цветов на цветокодированных картах в сравнении с неповрежденным белым веществом.
5. Диагностическая точность дифференцировки областей поврежденного белого вещества от неповрежденного при использовании порогового значения коэффициента затухания $\mu = 9,2 \text{ мм}^{-1}$ составляет 77,4%. Дифференцировка поврежденного белого вещества от опухоли возможна при использовании порогового значения $\mu = 6,6 \text{ мм}^{-1}$, при этом

диагностическая точность μ составляет 71,3%. Метод ОКТ может быть использован интраоперационно в реальном времени для выявления морфологического статуса ткани, необходимого для определения предельно допустимой зоны резекции глиом головного мозга.

- б. Суммарная диагностическая ценность метода ОКТ для обнаружения повреждений белого вещества перитуморальной области головного мозга определяется использованием медианных значений коэффициента затухания и визуальным анализом цветокодированных карт μ .

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Sung, H. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries / H. Sung, J. Ferlay, R.L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, F. Bray // *A Cancer Journal for Clinicians*. — 2021. — Vol. 71, N. 3. — P. 209-249
2. Brooks, L.J. The white matter is a pro-differentiative niche for glioblastoma / L.J. Brooks, M.P. Clements, J.J. Burden, D. Kocher, L. Richards, S.C. Devesa, L. Zakka, M. Woodberry, M. Ellis, Z. Jaunmuktane, S. Brandner, G. Morrison, S.M. Pollard, P.B. Dirks, S. Marguerat, S. Parrinello // *Nature communications*. — 2021. — Vol. 12, N. 1. — P. 2184
3. Yen, P.S. White Matter tract involvement in brain tumors: a diffusion tensor imaging analysis / P.S. Yen, B.T. Teo, C.H. Chiu, S.C. Chen, T.L. Chiu, C.F. Su // *Surgical neurology*. — 2009. — Vol. 72, N. 5. — P. 464–469
4. Jackson, C. Complications of glioma surgery / C. Jackson, M. Westphal, A. Quiñones-Hinojosa // *Handbook of clinical neurology*. — 2016. — Vol. 134, N. 1. — P. 201–218
5. Romano, A. Fiber density index, fractional anisotropy, adc and clinical motor findings in the white matter of patients with glioblastoma / A. Romano, F. Fasoli, M. Ferrante, L. Ferrante, L.M. Fantozzi, A. Bozzao // *European radiology*. — 2008. — Vol. 18, N. 2. — P. 331–336
6. Szmuda, T. Tractography-guided surgery of brain tumours: what is the best method to outline the corticospinal tract? / T. Szmuda, S. Kierońska, S. Ali, P. Słoniewski, M. Pacholski, J. Dzierżanowski, A. Sabisz, E. Szurowska // *Folia morphologica*. — 2021. — Vol. 80, N. 1. — P. 40–46
7. Henderson, F. Tractography and the connectome in neurosurgical treatment of gliomas: the premise, the progress, and the potential / F. Henderson, K.G. Abdullah, R. Verma, S. Brem // *Neurosurgical focus*. — 2020. — Vol. 48, N. 2. — P. E6

8. Gerard, I.J. Brain Shift in Neuronavigation of Brain Tumors: An Updated Review of Intra-Operative Ultrasound Applications / I.J. Gerard, M. Kersten-Oertel, J.A. Hall, D. Sirhan, D.L. Collins // *Frontiers in oncology*. — 2021. — Vol. 10. — P. 618837
9. Roberts, D. W. Coregistered fluorescence-enhanced tumor resection of malignant glioma: relationships between δ -aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX fluorescence, magnetic resonance imaging enhancement, and neuropathological parameters. Clinical article. / D.W. Roberts, P.A. Valdés, B.T. Harris, K.M. Fontaine, A. Hartov, X. Fan, S. Ji, S.S. Lollis, B.W. Pogue, F. Leblond, T.D. Tosteson, B.C. Wilson, K.D. Paulsen // *Journal of neurosurgery*. — 2011. — Vol. 114, N. 3. — P. 595–603.
10. Colditz, M.J. Aminolevulinic acid (ALA)-protoporphyrin IX fluorescence guided tumour resection. Part 1: Clinical, radiological and pathological studies. / M.J. Colditz, R.L. Jeffree // *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australia*. — 2012. — Vol. 19. — P. 1471-1474.
11. Dunn, A.K. Optical Properties of Neural Tissue / A.K. Dunn // In: *Optical Imaging of Neocortical Dynamics* / Edited by B. Weber and F. Helmchen. — United States, Totowa, NJ: Humana Press, 2014. — P. 33-51
12. Svaasand, L.O. Optical properties of human brain / L.O. Svaasand, R. Ellingsen // *Photochemistry and photobiology*. — 1983. — Vol. 38, N. 3. — P. 293–299
13. Leitgeb, R. Enhanced medical diagnosis for dOCTors: a perspective of optical coherence tomography / R. Leitgeb, F. Placzek, E. Rank, L. Krainz, R. Haindl, Q. Li, M. Liu, M. Andreana, A. Unterhuber, T. Schmoll, W. Drexler // *Journal of biomedical optics*. — 2021. — Vol. 26, N. 10. — P. 100601.
14. Drexler, W. Optical coherence tomography today: speed, contrast, and multimodality / W. Drexler, M. Liu, A. Kumar, T. Kamali, A. Unterhuber, R.A. Leitgeb // *Journal of biomedical optics*. — 2014. — Vol. 19, N. 7. — P. 071412.
15. Bizheva, K. Imaging ex vivo healthy and pathological human brain tissue with ultra-high-resolution optical coherence tomography / K. Bizheva, A. Unterhuber, B. Hermann, B. Povazay, H. Sattmann, A.F. Fercher, W. Drexler, M. Preusser,

- H. Budka, A. Stingl, T. Le // *Journal of biomedical optics*. — 2005. — Vol. 10, N. 1. — P. 11006
16. Böhringer, H. J. Time-domain and spectral-domain optical coherence tomography in the analysis of brain tumor tissue / H.J. Böhringer, D. Boller, J. Leppert, U. Knopp, E. Lankenau, E. Reusche, G. Hüttmann, A. Giese // *Lasers in surgery and medicine*. — 2006. — Vol. 38, N. 6. — P. 588-597
17. Kut, C. Detection of human brain cancer infiltration ex vivo and in vivo using quantitative optical coherence tomography. *Science translational medicine* / C. Kut, K.L. Chaichana, J. Xi, S.M. Raza, X. Ye, E.R. McVeigh, F.J. Rodriguez, A. Quiñones-Hinojosa, X. Li // *Science translational medicine*. — 2015. — Vol. 7, N. 292. — P. 292ra100
18. Valdés, P. A. Optical technologies for intraoperative neurosurgical guidance. *Neurosurgical focus* / P.A. Valdés, D.W. Roberts, F.K. Lu, A. Golby // *Neurosurgical focus*. — 2016. — Vol. 40, N. 3. — P. E8
19. Böhringer, H. J. Imaging of human brain tumor tissue by near-infrared laser coherence tomography / H.J. Böhringer, E. Lankenau, F. Stellmacher, E. Reusche, G. Hüttmann, A. Giese // *Acta neurochirurgica*. — 2009. — Vol. 151, N. 5. — P. 507–517
20. Yashin, K.S. Cross-Polarization Optical Coherence Tomography for Brain Tumor Imaging / K.S. Yashin, E.B. Kiseleva, E.V. Gubarkova, A.A. Moiseev, S.S. Kuznetsov, P.A. Shilyagin, G.V. Gelikonov, I.A. Medyanik, L.Y. Kravets, A.A. Potapov, E.V. Zagaynova, N.D. Gladkova // *Frontiers in Oncology*. — 2019. — Vol. 9. — P. 209
21. Yuan, W. Robust and fast characterization of OCT-based optical attenuation using a novel frequency-domain algorithm for brain cancer detection / W. Yuan, C. Kut, W. Liang, X. Li // *Scientific Reports*. — 2017. — Vol. 7. — P. 44909
22. Lee, J. Optical coherence tomography confirms non-malignant pigmented lesions in phacomatosis pigmentokeratolica using a support vector machine learning algorithm. / J. Lee, M.J. Beirami, R. Ebrahimpour, C. Puyana, M. Tsoukas, K. Avanaki // *Skin research and technology*. — 2023. — Vol. 29, N. 6. — P. e13377

23. Liu, H. C. Intraoperative application of optical coherence tomography for lung tumor / H.C. Liu, M.H. Lin, C.H. Ting, Y.M. Wang, C.W. Sun // *Journal of biophotonics*. — 2023. — Vol. 16, N. 6. — P. e202200344
24. Gubarkova, E. Intraoperative Assessment of Breast Cancer Tissues after Breast-Conserving Surgery Based on Mapping the Attenuation Coefficients in 3D Cross-Polarization Optical Coherence Tomography / E. Gubarkova, E. Kiseleva, A. Moiseev, D. Vorontsov, S. Kuznetsov, A. Plekhanov, M. Karabut, M. Sirotkina, G. Gelikonov, S. Gamayunov, A. Vorontsov, P. Krivorotko, N. Gladkova // *Cancers*. — 2023. — Vol. 15, N. 9. — P. 2663
25. Parsa, S. Use of Optical Coherence Tomography (OCT) in Assessment of Diabetic Skin Wound Characteristics and Blood Flow / S. Parsa, C. Wamsley, P. Kim, J. Kenkel, Y. Akgul // *The Journal of foot and ankle surgery*. — 2023. — Vol. 62, N. 3. — P. 407-412
26. de Souza Bachour, R.P. Optical attenuation coefficient of skin under low compression / R.P. de Souza Bachour, C.T. Dominguez, G.C. Cardoso // *Journal of the Optical Society of America*. — 2023. — Vol. 40, N. 5. — P. 955-960
27. Juarez-Chambi, R. M. AI-Assisted In Situ Detection of Human Glioma Infiltration Using a Novel Computational Method for Optical Coherence Tomography / R.M. Juarez-Chambi, C. Kut, J.J. Rico-Jimenez, K. Chaichana, J. Xi, D.U. Campos-Delgado, F.J. Rodriguez, A. Quinones-Hinojosa, X. Li, J.A. Jo // *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. — 2019. — Vol. 25, N. 21. — P. 6329-6338
28. Kiseleva, E. B. Optical coefficients as tools for increasing the optical coherence tomography contrast for normal brain visualization and glioblastoma detection / E.B. Kiseleva, K.S. Yashin, A.A. Moiseev, L.B. Timofeeva, V.V. Kudelkina, A.I. Alekseeva, S.V. Meshkova, A.V. Polozova, G.V. Gelikonov, E.V. Zagaynova, N.D. Gladkova // *Neurophotonics*. — 2019. — Vol. 6, N. 3. — P. 035003
29. Morrel, P. Myelin / P. Morrel. — Second edition. — New York and London: Plenum Press, 1984. — 545 P.

30. Abrams, C. K. Gap junctions in inherited human disorders of the central nervous system / C.K. Abrams, S.S. Scherer // *Biochimica et biophysica acta*. — 2012. — Vol. 1818, N. 8. — P. 2030–2047
31. Hanisch, U. K. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain / U.K. Hanisch, H. Kettenmann // *Nature neuroscience*. — 2007. — Vol. 10, N. 11. — P. 1387–1394
32. Tambuyzer, B. R. Microglia: gatekeepers of central nervous system immunology / B.R. Tambuyzer, P. Ponsaerts, E.J. Nouwen // *Journal of leukocyte biology*. — 2009. — Vol. 85, N. 3. — P. 352–370
33. Lawson, L.J. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain / L.J. Lawson, V.H. Perry, P. Dri, S. Gordon // *Neuroscience*. — 1990. — Vol. 39. — P. 151-170
34. Trapp, B.D. Structure of the myelinated axon / B.D. Trapp, G.J. Kidd // In: *Myelin Biology and Disorders* / Edited by R.A. Lazarini, J.W. Griffin, H. Lassmann, K.-A. Nave, R.H. Miller and B.D. Trapp. — Amsterdam: Elsevier, 2004. — P. 3-27
35. Edgar, J.M. White Matter Structure: A Microscopist's View / J.M. Edgar, I.R. Griffiths // In: *Diffusion MRI* / Edited by H. Johansen-Berg and T.E.J. Behrens. — United States: Academic Press, 2014. — P. 127-153
36. Davis, F. G. Prevalence estimates for primary brain tumors in the United States by behavior and major histology groups / F.G. Davis, V. Kupelian, S. Freels, B. McCarthy, T. Surawicz // *Neuro Oncology*. — 2001. — Vol. 3. — P. 152-158
37. Kleihues, P. World Health Organization classification of tumors / P. Kleihues, L.H. Sobin // *Cancer*. — 2000. — Vol. 88. — P. 2887
38. Louis, D. N. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system / D.N. Louis, H. Ohgaki, O.D. Wiestler, W.K Cavenee, P.C. Burger, A. Jouvett, B.W. Sheithauer, P. Kleihues // *Acta neuropathologica*. — 2007. — Vol. 114, N. 2. — P. 97–109
39. Winkler, F. Imaging glioma cell invasion in vivo reveals mechanisms of dissemination and peritumoral angiogenesis / F. Winkler, Y. Kienast, M.

- Fuhrmann, L. Von Baumgarten, S. Burgold, G. Mitteregger, H. Kretzschmar, J. Herms // *Glia*. — 2009. — Vol. 57. — P. 1306–1315
40. Cuddapah, V. A. A neurocentric perspective on glioma invasion / V.A. Cuddapah, S. Robel, S. Watkins, H. Sontheimer // *Nature reviews. Neuroscience*. — 2014. — Vol. 15, N. 7. — P. 455–465
41. Preusser, M. Malignant glioma: neuropathology and neurobiology / M. Preusser, C. Haberler, J.A. Hainfellner // *Wiener medizinische Wochenschrift*. — 2006. — Vol 156, N. 11-12. — P. 332–337
42. Mentlein, R. Lost in disruption: role of proteases in glioma invasion and progression / R. Mentlein, K. Hattermann, J. Held-Feindt // *Biochimica et biophysica acta*. — 2012. — Vol. 1825, N. 2. — P. 178-185
43. Scherer, H.J. Structural development in gliomas / H.J. Scherer // *The American Journal of Cancer*. — 1938. — Vol. 34, N. 3. — P. 333-351
44. Giese, A. Migration of human glioma cells on myelin / A. Giese, L. Kluwe, B. Laube, H. Meissner, M.E. Berens, M. Westphal // *Neurosurgery*. — 1996. — Vol. 38, N. 4. — P. 755–764
45. Witwer, B. P. Diffusion-tensor imaging of white matter tracts in patients with cerebral neoplasm / B.P. Witwer, R. Moftakhar, K.M. Hasan, P. Deshmukh, V. Haughton, A. Field, K. Arfanakis, J. Noyes, C.H. Moritz, M.E. Meyerand, H.A. Rowley, A.L. Alexander, B. Badie // *Journal of neurosurgery*. — 2002. — Vol 97, N. 3. — P. 568–575.
46. Weiss, N. The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases / N. Weiss, F. Miller, S. Cazaubon, P.O. Couraud // *Biochimica et biophysica acta*. — 2009. — Vol. 1788, N. 4. — P. 842–857
47. Roth, P. Tumor-associated edema in brain cancer patients: pathogenesis and management / P. Roth, L. Regli, M. Tonder, M. Weller // *Expert review of anticancer therapy*. — 2013. — Vol. 13, N. 11. — P. 1319–1325
48. Price, S.J. Diffusion tensor imaging of brain tumours at 3T: a potential tool for assessing white matter tract invasion? / S.J. Price, H.G. Burnet, T. Donovan, H.A.

- Green, A. Pena, N.M. Antoun, J.D. Pickard, T.A. Carpenter, J.H. Gillard // *Clinical Radiology*. — 2003. — Vol. 58, N. 6. — P. 455-462
49. Bao, S. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response / S. Bao, Q. Wu, R.E. McLendon, Y. Hao, Q. Shi, A.B. Hjelmeland, M.W. Dewhirst, D.D. Bigner, J.N. Rich // *Nature*. — 2006. — Vol. 444, N. 7120. — P. 756-760
50. da Hora, C. C. Patient-Derived Glioma Models: From Patients to Dish to Animals / C.C. da Hora, M.W. Schweiger, T. Wurdinger, B.A. Tannous // *Cells*. — 2019. — Vol. 8, N. 10. — P. 1177
51. Ferrer, V. P. Glioma infiltration and extracellular matrix: key players and modulators / V.P. Ferrer, V. Moura Neto, R. Mentlein // *Glia*. — 2018. — Vol. 66, N. 8. — P. 1542-1565
52. Rauch, U. (2007). Brain matrix: Structure, turnover and necessity / U. Rauch // *Biochemical Society Transactions*. — 2007. — Vol. 35. — P. 656–660
53. Wight T. N. Provisional matrix: A role for versican and hyaluronan / T.N. Wight // *Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology*. — 2017. — Vol. 60-61. — P. 38–56
54. Karousou, E. Roles and targeting of the HAS/hyaluronan/CD44 molecular system in cancer / E. Karousou, S. Misra, S. Ghatak, K. Dobra, M. Götte, D. Vigetti, A. Passi, N.K. Karamanos, S.S. Skandalis // *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. — 2017. — Vol. 59. — P. 3–22
55. Park, J. B. Role of hyaluronan in glioma invasion / J.B. Park, H.J. Kwak, S.H. Lee // *Cell adhesion & migration*. — 2008. — Vol. 2, N. 3. — P. 202–207
56. Sherman, L. S. Hyaluronate-based extracellular matrix: keeping glia in their place / L.S. Sherman, J.N. Struve, R. Rangwala, N.M. Wallingford, T.M. Tuohy, C. Kuntz // *Glia* . — 2002. — Vol. 38, N. 2, P. 93-102
57. Boregowda, R. K. Expression of hyaluronan in human tumor progression / R.K. Boregowda, H.N. Appaiah, M. Siddaiah, S.B. Kumarswamy, S. Sunila, K.N. Thimmaiah, K. Mortha, B. Toole, S.d. Banerjee // *Journal of carcinogenesis*. — 2006. — Vol. 5. — P. 2

58. Stuhlmeier K. M. / Aspects of the biology of hyaluronan, a largely neglected but extremely versatile molecule / K.M. Stuhlmeier // Wiener medizinische Wochenschrift. — 2006. — Vol. 156, N. 21-22. — P. 563-568
59. Ivkovic, S. Direct inhibition of myosin II effectively blocks glioma invasion in the presence of multiple motogens / S. Ivkovic, C. Beadle, S. Noticewala, S.C. Massey, K.R. Swanson, L.N. Toro, A.R. Bresnick, P. Canoll, S.S. Rosenfeld // Molecular biology of the cell. — 2012. — Vol. 23, N. 4. — P. 533-542
60. Manini, I. Role of Microenvironment in Glioma Invasion: What We Learned from In Vitro Models / I. Manini, F. Caponnetto, A. Bartolini, T. Ius, L. Mariuzzi, C. Di Loreto, A.P. Beltrami, D. Cesselli // International journal of molecular sciences. — 2018. — Vol. 19, N. 1. — P. 147
61. Lu, P. Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease / P. Lu, K. Takai, V.M. Weaver, Z. Werb // Cold Spring Harbor perspectives in biology. — 2011. — Vol. 3, N. 12. — P. a005058
62. Amberger, V. R. Spreading and migration of human glioma and rat C6 cells on central nervous system myelin in vitro is correlated with tumor malignancy and involves a metalloproteolytic activity / V.R. Amberger, T. Hensel, N. Ogata, M.E. Schwab // Cancer research. — 1998. — Vol. 58, N. 1. — P. 149-158
63. Amberger, V. R. Characterization of a membrane-bound metalloendoprotease of rat C6 glioblastoma cells / V.R. Amberger, P.A. Paganetti, H. Seulberger, J.A. Eldering, M.E. Schwab // Cancer research. — 1994. — Vol. 54, N. 15. — P. 4017-4025
64. Gritsenko, P. G. Interstitial guidance of cancer invasion / P.G. Gritsenko, O. Ilina, P. Friedl // The Journal of pathology. — 2012. — Vol. 226, N. 2. — P. 185-199
65. Wang, J. Invasion of white matter tracts by glioma stem cells is regulated by a NOTCH1-SOX2 positive-feedback loop / J. Wang, S.L. Xu, J.J. Duan, L. Yi, Y.F. Guo, Y. Shi, L. Li, Z.Y. Yang, X.M. Liao, J. Cai, Y.Q. Zhang, H.L. Xiao, L. Yin, H. Wu, J.N. Zhang, S.Q. Lv, Q.K. Yang, X.J. Yang, T. Jiang, X. Zhang,

- X.W. Bian, S.C. Yu // *Nature neuroscience*. — 2019. — Vol. 22, N. 1. — P. 91-105
66. van Kessel, E. Tumor-related neurocognitive dysfunction in patients with diffuse glioma: a systematic review of neurocognitive functioning prior to anti-tumor treatment / E. van Kessel, A.E. Baumfalk, M.J.E. van Zandvoort, P.A. Robe, T.J. Snijders // *Journal of neuro-oncology*. — 2017. — Vol. 134. — P. 9-18
67. Parmigiani, E. Old Stars and New Players in the Brain Tumor Microenvironment / E. Parmigiani, M. Scalera, E. Mori, E. Tantillo, E. Vannini // *Frontiers in cellular neuroscience*. — 2021. — Vol. 15. — P. 709917
68. Thetiot, M. Immunohistochemical Analysis of Myelin Structures / M. Thetiot, S.A. Freeman, A. Desmazières // *Methods in molecular biology*. — 2018. — Vol. 1791. — P. 15–23
69. Иммуногистохимическое исследование головного мозга / Д. Э. Коржевский, Е. Г. Гилерович, О. В. Кирик, [и др.]; под ред. Д. Э. Коржевского. — Санкт-Петербург : СпецЛит, 2016. — 143 с.
70. Roschzttardtz, H. The Plant Cell Nucleolus as a Hot Spot for Iron / H. Roschzttardtz, L. Grillet, M.-P. Isaure, G. Conejero, R. Ortega, C. Curie, S. Mari // *The Journal of Biological Chemistry*. — 2011. — Vol. 286, N. 32. — P. 27863–27866
71. Bajaj, A. Identification of the protein target of myelin-binding ligands by immunohistochemistry and biochemical analyses / A. Bajaj, N.E. LaPlante, V.E. Coterio, K.M. Fish, R. M. Bjerke, T. Siclovan, C.A. Tan Hehir // *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. — 2013. — Vol. 61, N. 1. — P. 19–30
72. Bodhireddy, S. R. Immunohistochemical detection of myelin basic protein is a sensitive marker of myelination in second trimester human fetal spinal cord / S.R. Bodhireddy, W.D. Lyman, W.K. Rashbaum, K.M. Weidenheim // *Journal of neuropathology and experimental neurology*. — 1994. — Vol. 53, N. 2. — P. 144–149

73. McRobbie, D. MRI from Picture to Proton / D. McRobbie, E. Moore, M. Graves, M. Prince. — Second edition. — Cambridge: Cambridge University Press, 2006
74. Qi, W. Diffusion tensor MR imaging characteristics of cerebral white matter development in fetal pigs / W. Qi, S. Gao, C. Liu, G. Lan, X. Yang, Q. Guo // BMC medical imaging. — 2017. — Vol. 17, N. 1. — P. 50
75. Raffelt, D. A. Investigating white matter fibre density and morphology using fixel-based analysis / D.A. Raffelt, J.D. Tournier, R.E. Smith, D.N. Vaughan, G. Jackson, G.R. Ridgway, A. Connelly // NeuroImage. — 2017. — Vol. 144. — P. 58–73
76. Stejskal E.O. Spin diffusion measurements: spin echoes in the presence of a time-dependent field gradient / E.O. Stejskal, J.E. Tanner // The Journal of Chemical Physics. — 1965. — Vol. 42. — P. 288–292
77. Пронин, И. Н. Диффузионная тензорная магнитно-резонансная томография и трактография / И.Н. Пронин, Л.М. Фадеева, Н.Е. Захарова, М.Б. Долгушин, А.Е. Подопригора, В.Н. Корниенко // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. — 2008. — Vol. 1. — P. 32-40
78. Wintermark, M. Imaging evidence and recommendations for traumatic brain injury: advanced neuro- and neurovascular imaging techniques / M. Wintermark, P.C. Sanelli, Y. Anzai, A.J. Tsiouris, C.T. Whitlow, American College of Radiology Head Injury Institute // American journal of neuroradiology. — 2015. — Vol. 36, N. 2. — P. E1–E11
79. Ceccarelli, A. Normal-appearing white and grey matter damage in MS. A volumetric and diffusion tensor MRI study at 3.0 Tesla / A. Ceccarelli, M.A. Rocca, A. Falini, P. Tortorella, E. Pagani, M. Rodegher, G. Comi, G. Scotti, M. Filippi // Journal of neurology. — 2007. — Vol. 254, N. 4. — P. 513–518
80. Jones, D.K. Studying connections in the living human brain with diffusion MRI / D.K. Jones // Cortex. — 2008. — Vol. 44, N. 8. — P. 936-52
81. Jeurissen, B. Diffusion MRI fiber tractography of the brain / B. Jeurissen, M. Descoteaux, S. Mori, A. Leemans // NMR in biomedicine. — 2019. — Vol. 32, N. 4. — P. e3785

82. Yeh, F. C. Tractography methods and findings in brain tumors and traumatic brain injury / F.C. Yeh, A. Irimia, D.C.A. Bastos, A.J. Golby // *NeuroImage*. — 2021. — Vol. 245. — P. 118651
83. Nabavi, A. Serial intraoperative magnetic resonance imaging of brain shift / A. Nabavi, P.M. Black, D.T. Gering, C.F. Westin, V. Mehta, R.S. Pergolizzi Jr., M. Ferrant, S.K. Warfield, N. Hata, R.B. Schwartz, W.M. Wells 3rd, R. Kikinis, F.A. Jolesz // *Neurosurgery*. — 2001. — Vol. 48, N 4. — P. 787–798
84. Vasefi, F. Review of the potential of optical technologies for cancer diagnosis in neurosurgery: a step toward intraoperative neurophotonics / F. Vasefi, N. MacKinnon, D.L. Farkas, B. Kateb // *Neurophotonics*. — 2017. — Vol. 4, N. 1. — P. 011010
85. König, K. Review: Clinical in vivo multiphoton FLIM tomography / K. König // *Methods and applications in fluorescence*. — 2020. — Vol. 8, N. 3. — P. 034002.
86. Nowak, D. B. Apertureless near-field/far-field CW two-photon microscope for biological and material imaging and spectroscopic applications / D.B. Nowak, A.J. Lawrence, E.J. Sánchez // *Applied optics*. — 2010. — Vol. 49, N. 35. — P. 6766–6771
87. Williams, R. M. Multiphoton microscopy in biological research / R.M. Williams, W.R. Zipfel, W.W. Webb // *Current opinion in chemical biology*. — 2001. — Vol. 5, N. 5. — P. 603–608
88. König, K. Multiphoton microscopy in life sciences / K. König // *Journal of microscopy*. — 2000. — Vol. 200. — P. 83–104
89. Kantelhardt, S. R. Imaging of brain and brain tumor specimens by time-resolved multiphoton excitation microscopy ex vivo / S.R. Kantelhardt, J. Leppert, J. Krajewski, N. Petkus, E. Reusche, V.M. Tronnier, G. Hüttmann, A. Giese // *Neuro-oncology*. — 2007. — Vol. 9, N. 2. — P. 103–112
90. Leppert, J. Multiphoton excitation fluorescence microscopy of glioma tissue / J. Leppert, J. Krajewski, S.R. Kantelhardt, S. Schlaffer, N. Petkus, E. Reusche, G. Hüttmann, A. Giese // *Neurosurgery*. — 2006. — Vol. 58. — P. 759–767

91. Kantelhardt, S.R. Multi-photon excitation fluorescence microscopy of brain-tumour tissue and analysis of cell density / S.R. Kantelhardt, J. Leppert, J.W. Kantelhardt, E. Reusche, G. Huttmann, A. Giese // *Acta Neurochirurgica*. — 2009. — Vol. 151, N 3. — P. 253–262
92. Ioannidou, K. Time-Lapse Imaging of the Dynamics of CNS Glial-Axonal Interactions In Vitro and Ex Vivo / K. Ioannidou, K.I. Anderson, D. Strachan, J.M. Edgar, S.C. Barnett // *PLoS ONE*. — 2012. — Vol. 7, N. 1. — P. e30775
93. Kobat, D. In vivo two-photon microscopy to 1.6-mm depth in mouse cortex / D. Kobat, N.G. Horton, C. Xu // *Journal of Biomedical Optics*. — 2011. — Vol. 16, N 10. — P. 106014
94. Wang, B.G. Two-photon microscopy of deep intravital tissues and its merits in clinical research / B.G. Wang, K. König, K.J. Halhuber // *Journal of microscopy*. — 2010. — V. 238, N 1. — P. 1–20
95. Jung, J. C. Multiphoton endoscopy: Optical design and application to in vivo imaging of mammalian hippocampal neurons / J. C. Jung, A. D. Mehta, M. J. Schnitzer // *Conference on Lasers and Electro-Optics/Quantum Electronics and Laser Science Conference, Technical Digest*. — 2003. — P. CThPDD5
96. Levene, M. J. In vivo multiphoton microscopy of deep brain tissue / M.J. Levene, D.A. Dombeck, K.A. Kasischke, R.P. Molloy, W.W. Webb // *Journal of neurophysiology*. — 2004. — Vol. 91, N. 4. — P. 1908–1912
97. Meng, G. Ultrafast two-photon fluorescence imaging of cerebral blood circulation in the mouse brain in vivo / G. Meng, J. Zhong, Q. Zhang, J.S.J. Wong, J. Wu, K.K. Tsia, N. Ji // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 2022. — Vol. 119, N. 23. — P. e2117346119
98. Yang, Y. Adaptive optics enables aberration-free single-objective remote focusing for two-photon fluorescence microscopy / Y. Yang, W. Chen, J.L. Fan, N. Ji // *Biomedical optics express*. — 2020. — Vol. 12, N. 1. — P. 354–366
99. Hu, C. R. Label-free real-time imaging of myelination in the *Xenopus laevis* tadpole by in vivo stimulated Raman scattering microscopy / C.R. Hu, D. Zhang,

- M.N. Slipchenko, J.X. Cheng, B. Hu // *Journal of biomedical optics*. — 2014. — Vol. 19, N. 8. — P. 086005
100. Costantini, I. Autofluorescence enhancement for label-free imaging of myelinated fibers in mammalian brains / I. Costantini, E. Baria, M. Sorelli, F. Matuschke, F. Giardini, M. Menzel, G. Mazzamuto, L. Silvestri, R. Cicchi, K. Amunts, M. Axer, F.S. Pavone // *Scientific reports*. — 2021. — Vol. 11, N. 1. — P. 8038.
101. Greenberg, M. L. Two-photon imaging of remyelination of spinal cord axons by engrafted neural precursor cells in a viral model of multiple sclerosis / M.L. Greenberg, J.G. Weinger, M.P. Matheu, K.S. Carbajal, I. Parker, W.B. Macklin, T.E. Lane, M.D. Cahalan // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 2014. — Vol. 111, N. 22. — P. E2349–E2355
102. Condie, A. G. Two-photon fluorescent imaging of myelination in the spinal cord / A.G. Condie, S.L. Gerson, R.H. Miller, Y. Wang // *ChemMedChem*. — 2012. — Vol. 7, N. 12. — P. 2194–2203
103. Xiang, Z. Detection of myelination using a novel histological probe / Z. Xiang, E.E. Nesterov, J. Skoch, T. Lin, B.T. Hyman, T.M. Swager, B.J. Bacskai, S.A. Reeves // *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society*. — 2005. — Vol. 53, N. 12. — P. 1511–1516
104. Monsma, P. C. FluoroMyelin™ Red is a bright, photostable and non-toxic fluorescent stain for live imaging of myelin / P.C. Monsma, A. Brown // *Journal of neuroscience methods*. — 2012. — Vol. 209, N. 2. — P. 344–350
105. Wang, C. In situ fluorescence imaging of myelination / C. Wang, D.C. Popescu, C. Wu, J. Zhu, W. Macklin, Y. Wang // *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. — 2010. — Vol. 58, N. 7. — P. 611–621
106. Larson, A. Multiphoton microscopy / A. Larson // *Nature Photon*. — 2011. — Vol. 5. — P. 1

107. Turcotte, R. Intravital assessment of myelin molecular order with polarimetric multiphoton microscopy / R. Turcotte, D.J. Rutledge, E. Bélanger, D. Dill, W.B. Macklin, D.C. Côté // *Scientific reports*. — 2016. — Vol. 6. — P. 31685.
108. Farrar, M. J. In vivo imaging of myelin in the vertebrate central nervous system using third harmonic generation microscopy / M.J. Farrar, F.W. Wise, J.R. Fetcho, C.B. Schaffer // *Biophysical journal*. — 2011. — Vol. 100, N. 5. — P. 1362–1371
109. Lim, H. Label-free imaging of Schwann cell myelination by third harmonic generation microscopy / H. Lim, D. Sharoukhov, I. Kassim, Y. Zhang, J.L. Salzer, C.V. Melendez-Vasquez // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 2014. — Vol. 111, N. 50. — P. 18025–18030
110. Redlich, M. J. A Method to Measure Myeloarchitecture of the Murine Cerebral Cortex in vivo and ex vivo by Intrinsic Third-Harmonic Generation / M.J. Redlich, H. Lim // *Frontiers in neuroanatomy*. — 2019. — Vol. 13. — P. 65
111. Zhang, Z. Tensor regularized total variation for denoising of third harmonic generation images of brain tumors / Z. Zhang, M.L. Groot, J.C. de Munck // *Journal of biophotonics*. — 2019. — Vol. 12, N. 1. — P. e201800129
112. Zhang, Z. Quantitative Third Harmonic Generation Microscopy for Assessment of Glioma in Human Brain Tissue / Z. Zhang, J.C. de Munck, N. Verburg, A.J. Rozemuller, W. Vreuls, P. Cakmak, L.M.G. van Huizen, S. Idema, E. Aronica, P.C. de Witt Hamer, P. Wesseling, M.L. Groot // *Advanced Science*. — 2019. — Vol 6. — P. 1900163
113. Huang, D. Optical coherence tomography / D. Huang, E.A. Swanson, C.P. Lin, J.S. Schuman, W.G. Stinson, W. Chang, M.R. Hee, T. Flotte, K. Gregory, C.A. Puliafito // *Science* — 1991. — Vol. 254, N. 5035. — P. 1178–1181
114. Leitgeb, R. Performance of fourier domain vs. time domain optical coherence tomography / R. Leitgeb, C. K. Hitzenberger, A. F. Fercher // *Optics Express*. — 2003. — Vol. 11. — P. 889-894

115. Choma, M. A. Swept source optical coherence tomography using an all-fiber 1300-nm ring laser source / M.A. Choma, K. Hsu, J.A. Izatt // *Journal of biomedical optics*. — 2005. — Vol. 10, N. 4. — P. 44009
116. Drexler, W. *Optical Coherence Tomography: Technology and Applications* / W. Drexler, J.G. Fujimoto. — Second edition. — Berlin, Heidelberg: Springer, 2015. — 2601 P.
117. Ксенофонтов, С.Ю. Физические принципы оптической когерентной томографии / С.Ю. Ксенофонтов, П.А. Шилягин, А.А. Моисеев, В.А. Маткиевский, В.Н. Ромашов, Д.А. Терпелов, Д.В. Шабанов, С.В. Лесниченко, И.В. Касаткина, Т.В. Василенкова, В.М. Геликонов, Г.В. Геликонов // В книге: *Мультимодальная оптическая когерентная томография в клинической медицине* / Под ред. д.м.н., проф. Н.Д. Гладковой, д.ф.-м.н. Г.В. Геликонова, к.б.н. Е.Б. Киселевой. — М.: ФИЗМАТЛИТ, 2022. — P. 15-22
118. Гладкова, Н.Д. *Руководство по оптической когерентной томографии* / ред. Н.Д. Гладкова, Н.Д. Шахова, А.М. Сергеев. — М.: Физматлит, Медкнига, 2007. — 296 с.
119. Моисеев, А.А. *Оптическая когерентная ангиография* / А.А. Моисеев, Г.В. Геликонов, Л.А. Матвеев, С.Ю. Ксенофонтов, М.А. Сироткина, Е.Б. Киселева, Н.Д. Гладкова // в книге: *Мультимодальная оптическая когерентная томография в клинической медицине* / Под ред. д.м.н., проф. Н.Д. Гладковой, д.ф.-м.н. Г.В. Геликонова, к.б.н. Е.Б. Киселевой. — М.: ФИЗМАТЛИТ, 2022. — 47-54 с.
120. Зайцев, В.Ю. *Компрессионная оптическая когерентная эластография. Количественная оценка параметров жесткости: распределение значений жесткости и нелинейность* // В.Ю. Зайцев, А.Л. Матвеев, Л.А. Матвеев, А.А. Зыков, А.А. Советский // в книге: *Мультимодальная оптическая когерентная томография в клинической медицине* / Под ред. д.м.н., проф. Н.Д. Гладковой, д.ф.-м.н. Г.В. Геликонова, к.б.н. Е.Б. Киселевой. — М.: ФИЗМАТЛИТ, 2022. — 58-79 с.

121. Kim K.H. Polarization-sensitive optical frequency domain imaging based on unpolarized light / K.H. Kim, B.H. Park, Y. Tu, T. Hasan, B. Lee, J. Li, J.F. de Boer // *Optics express*. — 2011. — Vol. 19, N. 2. — P. 552–561
122. Liu, B. Characterizing of tissue microstructure with single-detector polarization-sensitive optical coherence tomography / B. Liu, M. Harman, S. Giattina, D.L. Stamper, C. Demakis, M. Chitek, S. Raby, M.E. Brezinski // *Applied optics*. — 2006, — Vol. 45, N. 18. — P. 4464–4479
123. Schmitt, J.M. Cross-polarized backscatter in optical coherence tomography of biological tissue / J.M. Schmitt, S.H. Xiang // *Optics Letters*. — 1998. — Vol. 23, N. 13. — P. 1060.
124. Fraher, J.P. Fiber bundles in the CNS revealed by polarized light / J.P. Fraher, M.A. MacConaill // *Journal of anatomy*. — 1970. — Vol. 106. — P. 170
125. Larsen, L. Polarized light imaging of white matter architecture / L. Larsen, L.D. Griffin, D. GRäbel, O.W. Witte, H. Axer // *Microscopy Research and Technique*. — 2007. — Vol. 70, N. 10. — P. 851–863
126. Boppart, S.A. Optical coherence tomography for neurosurgical imaging of human intracortical melanoma / S.A. Boppart, M.E. Brezinski, C. Pitris, J.G. Fujimoto // *Neurosurgery*. — 1998. — Vol. 43, N. 4. — P. 834-841
127. Giese, A. Non-invasive intraoperative optical coherence tomography of the resection cavity during surgery of intrinsic brain tumors / A. Giese, H.J. Böhringer, J. Leppert, S. R. Kantelhardt, E. Lankenau, P. Koch, R. Birngruber, and G. Hüttmann // *Proceedings of SPIE*. — 2006. — Vol. 6078. — P. 60782Z
128. Yashin, K.S. Quantitative nontumorous and tumorous human brain tissue assessment using microstructural co- and cross-polarized optical coherence tomography / K.S. Yashin, E.B. Kiseleva, A.A. Moiseev, S.S. Kuznetsov, L.B. Timofeeva, N.P. Pavlova, G.V. Gelikonov, I.A. Medyanik, L. Ya. Kravets, E.V. Zagaynova, N.D. Gladkova // *Scientific Reports*. — 2019. — Vol. 9. — P. 2024
129. Gong, P. Parametric imaging of attenuation by optical coherence tomography: review of models, methods, and clinical translation / P. Gong, M. Almasian, G.

- van Soest, D.M. de Bruin, T.G. van Leeuwen, D.D. Sampson, D.J. Faber // *Journal of Biomedical Optics*. — 2020. — Vol. 25, N. 4. — P. 040901
130. Moiseev, A.A. Depth-resolved method for attenuation coefficient calculation from Optical Coherence Tomography data for improved biological structure visualization / A. Moiseev, E. Sherstnev, E. Kiseleva, K. Achkasova, A. Potapov, K. Yashin, M. Sirotkina, G. Gelikonov, V. Matkivsky, P. Shilyagin, S. Ksenofontov, E. Bederina, I. Medyanik, E. Zagaynova, N. Gladkova // *Journal of Biophotonics*. — 2023. — e202100392
131. Vermeer, K.A. Depth-resolved model-based reconstruction of attenuation coefficients in optical coherence tomography / K.A. Vermeer, J. Mo, J. J. A. Weda, H. G. Lemij, J. F. de Boer // *Biomedical Optics Express*. — 2014. — Vol. 5, N. 1. — P. 322-337
132. Красников, И. В. Распространение оптического излучения в биологических тканях / И. В. Красников, В. Е. Привалов, А. Ю. Сетейкин, А. Э. Фотиади // *Вестник СПбГУ*. — 2013. — Vol. 4. — P. 202-217
133. Eggert, H. R. Optical properties of human brain tissue, meninges, and brain tumors in the spectral range of 200 to 900 nm / H.R. Eggert, V. Blazek // *Neurosurgery*. — 1987. — Vol. 21, N. 4. — P. 459-464
134. Meyer, R.A. Light scattering from biological cells: dependence of backscatter radiation on membrane thickness and refractive index / R.A. Meyer // *Applied Optics*. — 1979. — Vol. 18, N. 5. — P. 585-588
135. Menzel, M. Diattenuation Imaging reveals different brain tissue properties / M. Menzel, M. Axer, K. Amunts, H. De Raedt, K. Michielsen // *Scientific Reports*. — 2019. — Vol. 9. — P. 1939
136. Binding, J. Brain refractive index measured in vivo with high-NA defocus-corrected full-field OCT and consequences for two-photon microscopy / J. Binding, J. Ben Arous, J.F. Léger, S. Gigan, C. Voccara, L. Bourdieu // *Optics express*. — 2011. — Vol. 19, N 6. — P. 4833-4847
137. Rodriguez, C.L. Decreased light attenuation in cerebral cortex during cerebral edema detected using optical coherence tomography / C.L. Rodriguez, J.I. Szu,

- M.M. Eberle, Y. Wang, M.S. Hsu, D.K. Binder, B.H. Park // *Neurophotonics*. — 2014. — Vol. 1, N 2. — P. 025004
138. Халанский, А.С. Перевиваемый штамм глиомы крысы 101.8. Биологическая характеристика / А.С. Халанский, Л.И. Кондакова // *Клиническая и экспериментальная морфология*. — 2013. — Vol. 4. — P. 63–69
139. Шевцов, М.А. Модели интракраниальной опухоли у животных в доклинической нейроонкологии / М.А. Шевцов, В.А. Хачатрян, А.В. Поздняков, И.В. Гужова, И.В. Романова, Б.А. Маргулис // *Нейрохирургия и неврология детского возраста*. — 2011. — Vol. 30, N. 4. — P. 20-32
140. Правила для проведения работ с использованием экспериментальных животных // Приказ Минздрава СССР от 12.08.1977 N 755 «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных»
141. Международные рекомендации по проведению медико-биологических исследований с использованием животных // «Этический кодекс», разработан и опубликован в 1985 году Советом международных научных организаций
142. Геликонов, В.М. Подавление автокорреляционных артефактов изображения в спектральной оптической когерентной томографии и цифровой голографии / В.М. Геликонов, Г.В. Геликонов, Д.А. Терпелов, Д.В. Шабанов, П.А. Шилягин // *Квантовая электроника*. — 2012. — Vol. 42, N. 5. — P. 390–393
143. Шилягин, П.А. Ахроматическая регистрация квадратурных компонент оптического спектра в спектральной оптической когерентной томографии / П.А. Шилягин, Г.В. Геликонов, В.М. Геликонов, А.А. Моисеев, Д.А. Терпелов // *Квантовая электроника*. — 2014. — Vol. 44, N. 7. — P. 664–669
144. Gelikonov, V.M. Coherent noise compensation in Spectral-Domain optical coherence tomography / V.M. Gelikonov, G.V. Gelikonov, I.V. Kasatkina, D.A.

- Terpelov, P.A. Shilyagin // *Optics and Spectroscopy*. — 2009. — Vol. 106, N. 6. — P. 895–900
145. Gelikonov, V.M. Linear-wavenumber spectrometer for high-speed Spectral-Domain optical coherence tomography / V.M. Gelikonov, G.V. Gelikonov, P.A. Shilyagin // *Optics and Spectroscopy*. — 2009. — Vol. 106, N. 3. — P. 459–465
146. Moiseev, A.A. Improvement of lateral resolution of spectral domain optical coherence tomography images in out-of-focus regions with holographic data processing techniques / A.A. Moiseev, G.V. Gelikonov, D.A. Terpelov, P.A. Shilyagin, V.M. Gelikonov // *Quantum Electronics*. — 2014. — Vol. 44, N. 8. — P. 732–739
147. Геликонов, В. М. Кросс-поляризационная оптическая когерентная томография: особенности приборной реализации и преимущества метода / В.М. Геликонов, Г.В. Геликонов // в книге: Мультимодальная оптическая когерентная томография в клинической медицине / Под ред. д.м.н., проф. Н.Д. Гладковой, д.ф.-м.н. Г.В. Геликонова, к.б.н. Е.Б. Киселевой. — М.: ФИЗМАТЛИТ, 2022. — с. 23-32
148. Gelikonov, V.M. New approach to cross-polarized optical coherence tomography based on orthogonal arbitrarily polarized modes / V.M. Gelikonov, G.V. Gelikonov // *Laser Physics Letters*. — 2006. — Vol. 3, N. 9. — P. 445–451
149. Wittekind, D. Traditional staining for routine diagnostic pathology including the role of tannic acid. 1. Value and limitations of the hematoxylin-eosin stain / D. Wittekind // *Biotechnic & histochemistry: official publication of the Biological Stain Commission*. — 2003. — Vol. 78, N. 5. — P. 261–270
150. Kluver, H. A method for the combined staining of cells and fibers in the nervous system / H. Kluver, E. Barrera // *Journal of neuropathology and experimental neurology*. — 1953. — Vol. 12, N. 4. — P. 400–403
151. Hasegawa, M. Development of myelination in the human fetal and infant cerebrum: a myelin basic protein immunohistochemical study / M. Hasegawa, S. Houdou, T. Mito, S. Takashima, K. Asanuma, T. Ohno // *Brain & development*. — 1992. — Vol. 14, N. 1. — P. 1–6

152. Moiseev, A. A. Brain white matter morphological structure correlation with its optical properties estimated from optical coherence tomography (OCT) data / A.A. Moiseev, K.A. Achkasova, E.B. Kiseleva, K.S. Yashin, A.L. Potapov, E.L. Bederina, S.S. Kuznetsov, E.P. Sherstnev, D.V. Shabanov, G.V. Gelikonov, Y.V. Ostrovskaya, N.D. Gladkova // *Biomedical Optics Express*. — 2022. — Vol. 13, N. 4. — P. 457467
153. Ruifrok, A.C. Quantification of histochemical staining by color deconvolution / A. C. Ruifrok, D. A. Johnston // *Analytical and quantitative cytology and histology*. — 2011. — Vol. 23, N. 4. — P. 291-299
154. Achkasova, K.A. Nondestructive label-free detection of peritumoral white matter damage using cross-polarization optical coherence tomography / K.A. Achkasova, A.A. Moiseev, K.S. Yashin, E.B. Kiseleva, E.L. Bederina, M.M. Loginova, I.A. Medyanik, G.V. Gelikonov, E.V. Zagaynova, N.D. Gladkova // *Frontiers in Oncology*. — 2023. — Vol. 13. — P. 1133074
155. Almasian, M. Pilot feasibility study of in vivo intraoperative quantitative optical coherence tomography of human brain tissue during glioma resection / M. Almasian, L.S. Wilk, P.R. Bloemen, T.G. van Leeuwen, M. Ter Laan, M.C.G. Aalders // *Journal of Biophotonics*. — 2019. — Vol. 12, N. 10. — P. e201900037
156. Möller, J. Applying machine learning to optical coherence tomography images for automated tissue classification in brain metastases / J. Möller, A. Bartsch, M. Lenz, I. Tischoff, R. Krug, H. Welp, M.R. Hofmann, K. Schmieder, D. Miller // *International journal of computer assisted radiology and surgery*. — 2019. — Vol. 16, N. 9. — P. 1517–1526
157. Kiseleva, E.B. Cross-Polarization Optical Coherence Tomography in Comparative in vivo and ex vivo Studies of the Optical Properties of Normal and Tumorous Brain Tissues / E.B. Kiseleva, K.S. Yashin, A.A. Moiseev, M.A. Sirotkina, L.B. Timofeeva, V.V. Fedoseeva, A.I. Alekseeva, I.A. Medyanik, N.N. Karyakin, L.Ya. Kravets, N.D. Gladkova // *Sovremennye tehnologii v medicine*. — 2017. — Vol. 9, N. 4. — P. 177

158. Yashin, K. OCT-Guided Surgery for Gliomas: Current Concept and Future Perspectives / K. Yashin, M.M. Bonsanto, K. Achkasova, A. Zolotova, A.M. Wael, E. Kiseleva, A. Moiseev, I. Medyanik, L. Kravets, R. Huber, R. Brinkmann, N. Gladkova // *Diagnostics* (Basel, Switzerland). — 2022. — Vol. 12, N. 2. — P. 335