

**Hubert Doleżyczek**

**Obrazowanie zmian w sieci naczyniowej i tkance mózgu myszy  
w modelach udaru niedokrwienego i glejaka przy pomocy  
Tomografii Optycznej OCT**

Praca doktorska  
wykonana w Pracowni Neuromorfologii  
Molekularnej i Systemowej  
Instytutu Biologii Doświadczalnej  
im. M. Nenckiego PAN

**PROMOTOR**

**Prof. dr hab. Grzegorz Wilczyński †**  
**Prof. dr hab. Jakub Włodarczyk**

**DRUGI PROMOTOR**

**Prof. dr hab. Maciej Wojtkowski**

**PROMOTOR POMOCNICZY**

**Dr Monika Malinowska**

Warszawa 2022

## Streszczenie

Udar niedokrwienny jak i glejak wielopostaciowy to choroby mózgu dotykające olbrzymią liczbę ludzi na całym świecie. Opracowanie innowacyjnych technik do przyżyciowego obrazowania zmian chorobowych mózgu może istotnie przyspieszyć proces poszukiwania nowych środków terapeutycznych. Jedną z takich technik jest Tomografia Optyczna z wykorzystaniem światła częściowo spójnego lub inaczej Tomografia Optyczna OCT (ang. Optical Coherence Tomography, OCT).

OCT jest nieinwazyjną, bezkontaktową, interferometryczną metodą obrazowania, polegającą na detekcji światła wstecznie rozproszonego na zewnętrznych i wewnętrznych elementach strukturalnych badanego obiektu. Technika OCT, nie wymaga stosowania kontrastu, pozwala na szybkie, trójwymiarowe obrazowanie z wysoką rozdzielczością rzędu kilku mikrometrów. Technika ta jest wykorzystywana klinicznie w diagnostyce oczu, doświadczalnie np. w dermatologii czy kardiologii oraz w badaniach podstawowych do obrazowania struktur biologicznych zarówno *in-vitro* jak i *in-vivo*.

Celem rozprawy była ocena przydatności OCT do obrazowania strukturalnych i angiograficznych zmian w mózgu myszy w modelach udaru niedokrwiennego i glejaka. Kolejnym celem pracy była próba korelacji sygnałów OCT ze zmianami w tkance nerwowej i naczyniach uwidocznionych histologicznie. Na potrzeby rozprawy opracowano prototyp systemu OCT, zoptymalizowano go w trakcie kolejnych etapów projektu i oceniono metodę pod względem przydatności do ilościowego określania biomarkerów, charakteryzujących rozwój zmian chorobowych.

W pierwszym etapie użyto systemu OCT, który łączył Tomografię Optyczną OCT, mikroskopię jasnego pola oraz układ z diodą laserową, emitującą wiązkę światła zielonego do indukcji udaru. System ten opracowano w celu przyżyciowego obrazowania kory mózgu przez okienko czaszkowe w ciągu 24 godzin od udaru. Za pomocą OCT uwidoczniono z wysoką rozdzielczością czasową i przestrzenną sieć naczyniową mózgu przed, w trakcie i po udarze. W badaniach zastosowano zmodyfikowany myszy model udaru fotouczuleniowego, gdzie światłem zielonym naświetlano pojedyncze odgałęzienie tętnicy środkowej mózgu. Model udaru został pozytywnie zweryfikowany histologicznie. Za pomocą OCT wykryto, że pomimo reperfuzji tętnic powierzchniowych mózgu 24 godziny po udarze, nie ma przepływu krwi w naczyniach w głębszych obszarach kory. Ponadto, po 24 godzinach na obrazach angiograficznych w obszarze udaru zaobserwowano wzmocnienie sygnału rozpraszania w okolicy dużych naczyń.

W drugim etapie układ OCT został zoptymalizowany poprzez zamianę interferometru i typu wiązki skanującej. W ten sposób dzięki zmniejszeniu liczby

elementów optycznych w układzie optycznym osiągnięto zwiększoną odporność urządzenia na warunki zewnętrzne i większą powtarzalność parametrów systemu obrazującego. Wpłynęło to pozytywnie na uzyskiwanie obrazów o powtarzalnej jakości, w trakcie wielodniowego obrazowania. Układ ten został zastosowany do unikalnego, przyżyciowego obrazowania rozwoju guza glejaka w mózgu myszy przez 14 dni. Na potrzeby tego doświadczenia opracowano metodę iniekcji mysich komórek glejaka GI261 do kory mózgu, którą przykryto okienkiem czaszkowym. Barwienie histologiczne w dniu 14 wykazało obecność guza, widocznego na skrawkach mózgu. Strukturalne obrazy OCT uwidoczniły obszar objęty przez guza jako hiporefleksyjny (ciemny) rejon, otoczony obszarem hiperrefleksyjnym (jasnym) zdrowej tkanki. Wykazano silną angiogenezę w obszarze wzrostu glejaka w kolejnych punktach czasowych, z charakterystycznymi nowopowstałymi naczyniami o nieregularnych kształtach. Podobne naczynia uwidoczniło histologicznie.

W trzecim etapie przeprowadzono ocenę angiogenezy w obszarze niedokrwienia po udarze oraz podjęto próbę korelacji obszarów hipo- i hiperrefleksyjnych ze zmianami w tkance nerwowej i naczyniach uwidoczniłymi histologicznie. W celu zapewnienia bardziej stabilnych parametrów skanowania zamieniono źródło światła, czyli mniej stabilny laser femtosekundowy na diodę laserową. Dodatkowo do interferometru wprowadzono wiązkę światła zielonego do indukcji ogniskowego (średnica ok. 400  $\mu\text{m}$ ) udaru fotouczuleniowego. Wielkość udaru zweryfikowano histologicznie. Region kory o ograniczonym przepływie krwi był dobrze widoczny na obrazach angiograficznych jako ciemny obszar, pozbawiony naczyń krwionośnych. W ciągu kolejnych 14 dni w obszarze tym pojawiały się naczynia krwionośne na skutek angiogenezy i reperfuzji. W trakcie pierwszych 7 dni po udarze angiograficzne obrazy uwidoczniły naczynia głównie w powierzchniowej warstwie, a w dniu 14 również w głębszych warstwach kory. Trzeciego dnia od udaru na obrazach strukturalnych OCT zaobserwowano hiporefleksyjny obszar w ognisku niedokrwienia, którego powierzchnia zmniejszyła się o 70% w dniu 14. Obszar ten korelował z rejonem z komórkami mikrogleju/makrofagami obecnymi na barwionych skrawkach mózgu. U niektórych myszy obszar hiporefleksyjny otoczony był pierścieniem hiperrefleksyjnym, który korelował z obecnością aktywowanych astrocytów.

Wykazano, że prototypowy wielofunkcyjny układ OCT jest dobrym narzędziem do indukcji udaru i obrazowania wczesnych i późnych zmian w mózgu po udarze. Analiza sygnałów rozpraszania zidentyfikowanych w obszarze niedokrwienia metodą OCT i ich histologiczna weryfikacja pozwoliła na ich korelację z zmianami na poziomie komórkowym. Wykazano, że technika OCT może być wykorzystana do przyżyciowej oceny wzrostu guza mózgu myszy, oraz obserwacji angiogenezy w jego otoczeniu.

## LISTA PUBLIKACJI

Rozprawa została przygotowana na podstawie badań przedstawionych w następujących publikacjach:

1. **Doleżyczek H**, Kasprzycki P, Włodarczyk J, Wojtkowski M, and Malinowska M. **2022**. Optical Coherence Tomography reveals heterogeneity of the brain tissue and vasculature in the ischemic region after photothrombotic stroke in mice. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 82(1):106-119.
2. **Doleżyczek H**, Rapolu M, Niedzwiedziuk P, Karnowski K, Borycki D, Dzwonek J, Wilczynski G, Malinowska M, Wojtkowski M. **2020**. Longitudinal in-vivo OCM imaging of glioblastoma development in the mouse brain. *Biomed Opt Express*. Aug 12;11(9):5003-5016.
3. **Doleżyczek H**, Tamborski S, Majka P, Sampson D, Wojtkowski M, Wilczyński G, Szkulmowski M, Malinowska M. **2020**. *In vivo* brain imaging with multimodal optical coherence microscopy in a mouse model of thromboembolic photochemical stroke. *Neurophotonics*. Jan 7(1):015002.

Pozostałe publikacje nie uwzględnione w rozprawie:

4. Rojek KO, Krzemień J, **Doleżyczek H**, Boguszewski PM, Kaczmarek L, Konopka W, Rylski M, Jaworski J, Holmgren L, Prószyński TJ. **2019**. Amot and Yap1 regulate neuronal dendritic tree complexity and locomotor coordination in mice. *PLoS Biol*. May 1;17(5):e3000253.
5. Maczynska E, Karnowski K, Szulzycki K, Malinowska M, **Doleżyczek H**, Cichanski A, Wojtkowski M, Kaluzny B, Grulkowski I. **2019**. Assessment of the influence of viscoelasticity of cornea in animal ex vivo model using air-puff optical coherence tomography and corneal hysteresis. *J Biophotonics*. Sep 21:e201800154.
6. Tamborski S, Lyu HC, **Doleżyczek H**, Malinowska M, Wilczynski G, Szlag D, Lasser T, Wojtkowski M, Szkulmowski M. **2016**. Extended-focus optical coherence microscopy for high-resolution imaging of the murine brain. *Biomed Opt Express*. Oct 5;7(11):4400-4414. .
7. Roszkowska M, Skupien A, Wójtowicz T, Konopka A, Gorlewicz A, Kisiel M, Bekisz M, Ruszczycki B, **Doleżyczek H**, Rejmak E, Knapska E, Mozrzymas JW, Włodarczyk J, Wilczynski GM, Dzwonek J. **2016**. CD44: a novel synaptic cell

adhesion molecule regulating structural and functional plasticity of dendritic spines. *Mol Biol Cell*. Dec 15;27(25):4055-4066.

8. Skupien A, Konopka A, Trzaskoma P, Labus J, Gorlewicz A, Swiech L, Babraj M, **Dolezyczek H**, Figiel I, Ponimaskin E, Wlodarczyk J, Jaworski J, Wilczynski GM, Dzwonek J. **2014**. CD44 regulates dendrite morphogenesis through Src tyrosine kinase-dependent positioning of the Golgi. *J Cell Sci*. Dec 1;127(Pt 23):5038-51.

## I. AUTOREFERAT

<b>SPIS TREŚCI</b> .....	6
<b>1. Wstęp</b> .....	7
<b>UDAR MÓZGU</b> .....	7
Zmiany w tkance mózgowej po udarze .....	8
Angiogeneza .....	8
<b>GLEJAK</b> .....	9
<b>TOMOGRAFIA OPTYCZNA OCT</b> .....	10
Zastosowanie OCT w medycynie i badaniach podstawowych .....	11
OCT jako metoda angiograficzna .....	14
OCT jako metoda obrazowania mózgu .....	14
Inne metody obrazowania mózgu a OCT .....	14
<b>2. Cel pracy</b> .....	18
Cel ogólny .....	18
Cele szczegółowe .....	18
<b>3. Projekt badawczy</b> .....	19
Posumowanie pierwszego etapu (Publikacja 1) .....	19
Podsumowanie drugiego etapu (Publikacja 2) .....	26
Podsumowanie trzeciego etapu (Publikacja 3) .....	29
<b>4. Wnioski</b> .....	33
<b>5. Bibliografia</b> .....	34
<b>II. SUMMARY OF PROFESSIONAL ACCOMPLISHMENTS</b> .....	38
<b>III. PUBLIKACJE</b>	
<u>Publikacja 1.</u> “ <i>In vivo</i> brain imaging with multimodal optical coherence microscopy in a mouse model of thromboembolic photochemical stroke.” .....	72
<u>Publikacja 2.</u> “Longitudinal <i>in-vivo</i> OCM imaging of glioblastoma development in the mouse brain” .....	92
<u>Publikacja 3.</u> Optical Coherence Tomography reveals heterogeneity of the brain tissue and vasculature in the ischemic region after photothrombotic stroke in mice .....	106
<b>IV. OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORÓW</b> .....	120

## 1.Wstęp

### UDAR MÓZGU

Udar mózgu jest stanem patologicznym wywołanym przez ograniczoną perfuzję krwi w danym obszarze mózgu. Do ograniczenia przepływu krwi tętniczej lub żylniej w mózgu może dojść z powodu zwężenia światła naczyń w wyniku stanów chorobowych ściany naczyń lub w wyniku pojawienia się w naczyniu materiału zakrzepowego lub zatorowego. Tego typu zaburzenie określane jest udarem niedokrwiennym mózgu. Oprócz udaru niedokrwiennego obserwuje się rzadziej występujące udary krwotoczne oraz podpajęczynówkowe. Udar mózgu jest jedną z najczęstszych przyczyn śmierci na świecie, a liczba chorych z roku na rok rośnie (WHO, 2018). W leczeniu udaru stosuje się leki rozpuszczające zakrzep jak, np. rekombinowany tkankowy aktywator plazminogenu (rtPA), jednak skuteczność tej terapii ściśle zależy od czasu podania leku od udaru (maksymalnie jest to 4,5 godz.) (Rabinstein A. i wsp. 2017). Cały czas trwają poszukiwania skutecznej terapii, ograniczającej wielkość obszaru uszkodzonego niedokrwieniem. Z tego powodu istnieje duża potrzeba prowadzenia dalszych badań nad patofizjologią udaru. Aby opracować nowy środek farmakologiczny potrzebne są odpowiednie badania przedkliniczne, których istotnym elementem są doświadczenia prowadzone na zwierzętach laboratoryjnych. Można wyróżnić dwa główne typy udarów indukowanych doświadczalnie - globalne niedokrwienie lub udar ogniskowy. Często stosowane modele udaru ogniskowego mózgu to między innymi: udar fotouczuleniowy (fototromboza), udar indukowany podaniem trombiny do tętnicy środkowej mózgu (ang. Middle Cerebral Artery, MCA), bezpośrednia koagulacja odgałęzienia MCA, czy udar wywołany wprowadzeniem do światła tętnicy monofilamentowej nici chirurgicznej (Kowiański i wsp. 2009). Jednak wydaje się, że z pośród wymienionych modeli, udar fotouczuleniowy daje unikalną możliwość indukowania niedokrwienia o powtarzalnym obszarze, zależnym od średnicy wiązki światła skierowanego na korę mózgu (Schroeter i wsp. 2002). Pozwala to na indukcję niewielkiego udaru, co daje możliwość obserwacji zarówno ogniska udaru, jak i jego otoczenia. Aby analizować zmiany zachodzące w mózgu po udarze w czasie rzeczywistym pożądane są metody przyżyciowego obrazowania, pozwalające na wielokrotne obserwacje z wysoką rozdzielczością tego samego obszaru u danego zwierzęcia.

## **Zmiany w tkance mózgowej po udarze**

W wyniku niedokrwienia komórki nerwowe pozbawione tlenu i glukozy są narażone na deficyt energetyczny. Przy braku substratów zahamowana zostaje synteza ATP. Deficyt ATP zaburza podstawowe funkcje komórek, dochodzi do depolaryzacji błony (w wyniku zahamowania aktywności pompy sodowo-potasowej), napływu jonów chloru i wapnia, wody i obrzęku komórek. Dodatkowo uwolniony w czasie depolaryzacji glutaminian nie jest z powrotem wchłaniany z przestrzeni zewnątrzkomórkowej, co prowadzi do ekscytotoksyczności. Niedokrwienie wywołuje stan zapalny, dochodzi do aktywacji i migracji astrocytów oraz mikrogleju (Lee i wsp. 2018). Po udarze obserwuje się również obrzęk mózgu, który wynika z uszkodzenia bariery krew-mózg. Uszkodzona tkanka nerwowa jest usuwana w wyniku aktywności komórek fagocytarnych, w pierwszej kolejności jest aktywowany rezydujący mikroglej, a następnie również makrofagi migrujące z krwiobiegu do niedokrwionej tkanki (Margaritescu i wsp. 2009). W modelu czasowej okluzji tętnicy środkowej mózgu, 2-go dnia od indukcji udaru zaobserwowano maksymalną liczbę aktywowanego mikrogleju, a 4-go dnia makrofagów krwiopochodnych (Schilling i wsp. 2005).

W obszarze niedokrwienia można wyróżnić dwie strefy, ognisko uszkodzenia (rdzeń, zawał) i otaczający ognisko obszar półcienia (penumbra). W ognisku, przy silnym ograniczeniu perfuzji dochodzi do martwicy, gdzie prawie wszystkie komórki umierają w stosunkowo szybkim czasie. Natomiast w obszarze półcienia obserwuje się powolny proces degeneracji komórek, głównie na drodze programowanej śmierci czyli apoptozy, która może trwać wiele dni lub nawet tygodni. Półcień jest obszarem mózgu o częściowej perfuzji, która w pewnym stopniu zapobiega całkowitej degeneracji neuronów. W obszarze tym komórki nerwowe mogą zregenerować się, jeśli krążenie krwi zostanie przywrócone (Paciaroni i wsp. 2009). W półcieniu aktywowane astrocyty wraz z mikroglejem tworzą bliznę glejową, która oddziela obszar martwicy od nieuszkodzonej tkanki nerwowej (Zbesko i wsp. 2018).

## **Angiogeneza**

Po udarze mózgu w obszarze niedokrwienia ma miejsce angiogeneza. Generalnie, nowe naczynia krwionośne mogą powstawać na drodze waskulogenezy lub angiogenezy. Waskulogeneza jest procesem tworzenia się naczyń głównie na etapie zarodkowym, gdzie z komórek macierzystych hemangioblastów powstają



komórki śródbłonka. Następnie komórki śródbłonka proliferują i formują nowe naczynia. Natomiast angiogeneza rozpoczyna się od aktywacji komórek śródbłonka wewnątrz istniejących już naczyń. Po degradacji błony podstawnej i macierzy zewnątrzkomórkowej komórki śródbłonka migrują do miejsca docelowego, a czynnikami przyciągającymi są chemoatraktanty, takie jak czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego (VEGF) czy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF), (Lamallice i wsp. 2007). W stanach fizjologicznych angiogeneza zachodzi np. podczas gojenia się ran oraz przy regeneracji naczyń śluzówki macicy w trakcie cyklu menstruacyjnego. Powstawanie nowych naczyń często zachodzi w przebiegu procesów chorobowych, związanych z niedotlenieniem, jak astmą, czy ze stanem zapalnym, np. przy przewlekłym zapaleniu błony śluzowej przewodu pokarmowego. Angiogeneza odgrywa istotną rolę w trakcie nowotworzenia, gdzie nowopowstałe naczynia krwionośne zaopatrują intensywnie dzielące się komórki nowotworowe w tlen i substancje odżywcze. Dodatkowo silne unaczynienie guzów ułatwia migrację komórek nowotworowych i tworzenie się przerzutów (Swidzińska i wsp. 2006).

W pierwszych dniach po udarze część naczyń krwionośnych (zwłaszcza naczynia włosowate) ulega degeneracji. Tylko szybkie przywrócenie krążenia krwi może ograniczyć obszar uszkodzenia i przynajmniej częściowo przywrócić fizjologiczne funkcje tkanki nerwowej. Często poprawa przepływu krwi zachodzi na drodze wczesnej, spontanicznej reperfuzji, jednak ważnym procesem po udarze jest tworzenie się nowej sieci naczyń w obszarze niedokrwienia (Hatakeyama i wsp., 2020). Proces angiogenezy wpływa na wielkość obszaru uszkodzenia i czas regeneracji tkanki.

## **GLEJAK**

Glejak wielopostaciowy (łac. Glioblastoma Multiforme, GBM) jest najczęściej występującym guzem mózgu pochodzenia glejowego, należącym do pierwotnych nowotworów wewnątrzczaszkowych. Cechuje się wyjątkowo wysoką inwazyjnością i gwałtownym rozrostem, prowadzącym do niszczenia otaczanej tkanki. Światowa Organizacja Zdrowia zaklasyfikowała go do IV kategorii (najwyższej) złośliwości.

Obraz makroskopowy guza jest niejednorodny. GBM cechuje się dużym zróżnicowaniem komórkowym z wyraźną atypią i wyjątkowo licznymi komórkami proliferującymi. Charakteryzuje się tworzeniem wielu nacieków, intensywną angiogenezą, obecnością ognisk martwicy otoczonych strefami komórek ułożonych

palisadowo oraz ognisk krwotocznych. Niestety, mimo ciągłych poszukiwań odpowiedniej terapii, do tej pory nie znaleziono skutecznej metody leczenia glejaka, a większość chorych umiera w ciągu kilku miesięcy od ustalenia rozpoznania (Rojek i wsp. 2015). Od lat prowadzone są badania dotyczące glejaka zarówno na liniach komórkowych, jak i na zwierzętach laboratoryjnych. Jedną z częściej stosowanych linii komórkowych jest GI261, która została uzyskana poprzez iniekcje 3-metylochlorantenu do kory mózgu myszy C57Bl/J6. Komórki GI261 po iniekcji do mózgu myszy tworzą lity guz, podobny do guza glejaka u ludzi.

Aby móc ocenić unaczynienie i angiogenezę mózgu istotne jest rozwijanie nowych przyżyciowych, małoinwazyjnych technik obrazowych. Jedną z takich technik wydaje się być Tomografia Optyczna OCT (ang. Optical Coherence Tomography, OCT), (Wojtkowski i wsp. 2002, Targowski i wsp. 2009, Srinivasan i wsp. 2013; Tamborski i wsp. 2016)

### **TOMOGRAFIA OPTYCZNA OCT**

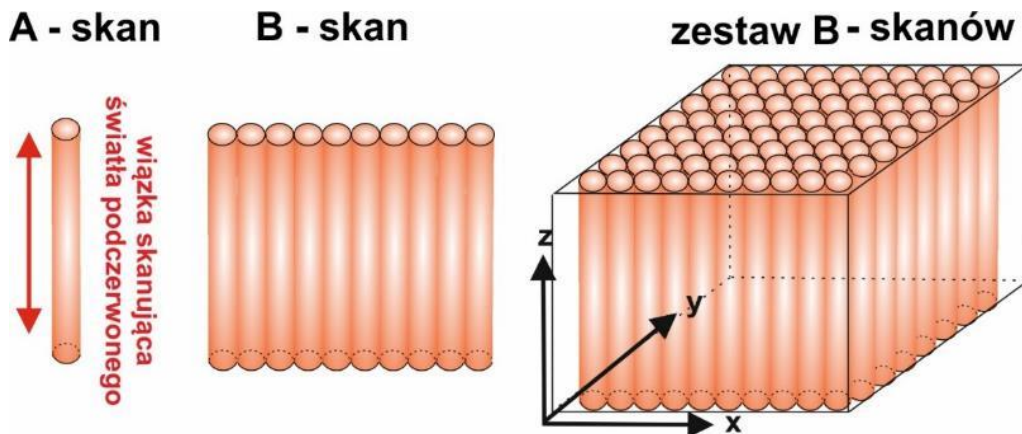
OCT jest nieinwazyjną, bezkontaktową, interferometryczną metodą obrazowania polegającą na detekcji światła wstecznie rozproszonego na zewnętrznych i wewnętrznych elementach strukturalnych badanego obiektu. Metoda ta bazuje na różnicach w naturalnych właściwościach optycznych badanych struktur i nie wymaga używania dodatkowych środków kontrastujących. OCT pozwala na szybkie trójwymiarowe obrazowanie badanych obiektów z wysoką rozdzielczością rzędu kilku mikrometrów. Pierwsze prace dotyczące OCT rozpoczęły się pod koniec XX wieku. W 1991 r. zaprezentowano układ OCT, za pomocą którego obrazowano *in-vitro* skrawki siatkówki człowieka oraz tętnicy wieńcowej (Huang i wsp. 1991). W 1993 r. pokazano przydatność OCT jako metody do obrazowania ludzkiego oka *in-vivo* (Fercher i wsp. 1993). W kolejnych badaniach wykazano, że obrazowanie oka metodą OCT może być pomocne w diagnozowaniu chorób takich, jak degeneracja plamki żółtej, obrzęk plamki żółtej czy retinopatia (Cocker i wsp. 1996). Zaobserwowano również przydatność OCT do obrazowania neowaskularyzacji naczyń oka (Hee i wsp. 1996). W następnych latach nastąpił szybki rozwój techniki OCT, istotnym momentem było opracowanie nowej metody detekcji światła wstecznie rozproszonego z użyciem transformacji Fouriera i zbudowanie pierwszego układu FD-OCT (ang. Fourier domain OCT) do obrazowania ludzkiego oka *in-vivo* (Wojtkowski i wsp. 2002). OCT z detekcją fourierowską różni się od starszych tomografów obecnością

spektrometru oraz unieruchomieniem lustra referencyjnego, dzięki czemu czas skanowania obiektu został skrócony ponad stukrotnie oraz znacząco wyższą czułością układu. Duża czułość tomografu OCT jest szczególnie istotna w przypadku obrazowania przyżyciowego, gdzie ograniczony jest silnie czas ekspozycji próbki. Obecne tomografy optyczne wymagają niewielkiej części światła powracającego z obiektu ( $1/10^{10}$ ) dzięki czemu do obrazowania można stosować źródła światła o mniejszej mocy (Targowski i wsp. 2009). Najczęściej stosowanymi źródłami światła w tomografach OCT są lasery femtosekundowe o stosunkowo dużej mocy oraz diody superluminescencyjne, emitujące światło z zakresu bliskiej podczerwieni o dużej spójności przestrzennej i widmie o znacznej szerokości spektralnej.

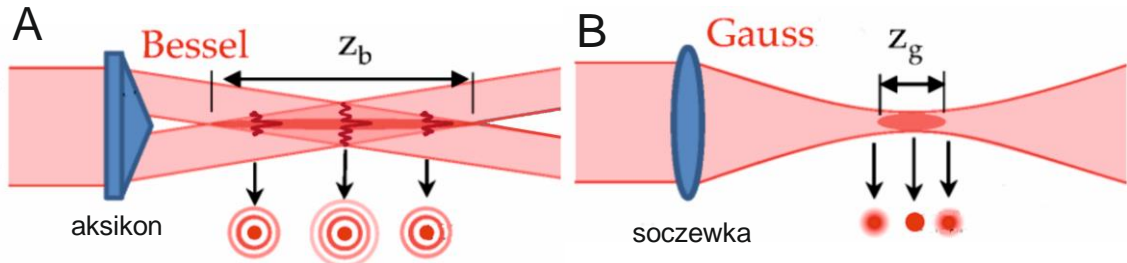
W układzie OCT promień światła wychodzący ze źródła jest rozdzielany na dwie wiązki: obiektową i referencyjną. Wiązka obiektowa jest kierowana przy użyciu skanerów na badany obiekt. Natomiast wiązka referencyjna odbija się od lustra referencyjnego i kierowana jest z powrotem tą samą drogą optyczną. Pomiar techniką OCT polega na rejestracji wiązki światła powstałego w wyniku interferencji wiązki obiektowej rozproszonej na nieciągłościach badanej struktury z odbitą od lustra wiązką referencyjną. Analiza sygnału OCT pochodzącego z obrazowanego obiektu dostarcza informacji o rozkładzie rozproszenia światła w głąb obiektu (oś Z). Otrzymaną pojedynczą linię skanowania w osi Z nazywa się A-skanem. Złożenie kolejnych pomiarów (A-skanów) wykonanych wzdłuż wiązki przesuwanej prostopadle do kierunku padania światła (kierunek X) daje dwuwymiarowy obraz przekroju (B-skan). B-skan odpowiada przekrojowi poprzecznemu obiektu, a jego szerokość zdeterminowana jest średnicą wiązki skanującej. Przesuwanie wiązki w osi Y umożliwia otrzymanie trójwymiarowego obrazu badanej struktury (Ryc. 1).

W systemach OCT można wykorzystać różne typy wiązki skanującej jak np. wiązka Gaussa lub wiązka Bessela. Wiązka Gaussa (wiązka gaussowska) powstaje w idealnej wnęce laserowej, w której gęstość energii skupiona jest do optymalnie małego rozmiaru. W ten sposób powstaje podstawowy mod poprzeczny (stały rozkład pola elektromagnetycznego w kierunku prostopadłym do kierunku propagacji wiązki), w którym rozkład natężenia światła opisywany jest funkcją Gaussa. Wiązka będąca wynikiem takiej generacji światła ma w pełni kontrolowane i deterministyczne parametry propagacji, dzięki czemu możliwa jest bardzo dokładna lokalizacja światła oświetlającego próbkę. Wiązka typu Bessela generowana jest przez przejście wiązki Gaussowskiej przez aksikon (soczewkę z jedną powierzchnią w kształcie stożka).

Wiązka typu Bessela cechuje się około dwukrotnie większą głębią ostrości niż wiązka Gaussa przy tej samej średnicy wiązki (Ryc. 2). Wpływa to istotnie na głębokość, z jakiej można otrzymać obrazy bez przesuwania obiektu w osi Z (Nguyen i wsp. 2020). Jednak układy optyczne generujące wiązkę typu Bessela są bardziej skomplikowane, a przez to mniej stabilne i wymagają częstszej kalibracji.



Ryc. 1. Schemat skanowania obiektu wiązką podczerwoną.



Ryc. 2. Schematy przedstawiające różnice między wiązką Bessela a wiązką Gaussa. (A) Wiązka Bessela z znacznie dłuższą głębią ostrości  $Z_b$ , niż wiązka Gaussa  $Z_g$  (B), (zmodyfikowane z Nguyen i wsp. 2020).

### Zastosowanie OCT w medycynie i badaniach podstawowych

Ze względu na swoją specyficzną budowę pierwszym obiektem do badań z użyciem OCT było oko. Początkowo za pomocą OCT obrazowano centralną część siatkówki. Jednak obecnie zakres diagnostyczny OCT jest znacznie szerszy, a przykładowe zastosowanie to obrazowanie: siatkówki w okolicy plamki żółtej, tarczy nerwu wzrokowego, zmian siatkówki poza plamką żółtą, zmian w pęcherzyku plamkowo – tarczowym, naczyńiówki, ciała szklistego czy rogówki. Dodatkowo OCT pozwala na diagnozowanie jaskry i ocenę zastosowanej terapii.

Od pewnego czasu opracowywane są i ulepszone endoskopowe układy OCT. Tego typu endoskopy mają zastosowanie w kardiologii jako narzędzie diagnostyczne w zawałach serca (Karimi Gaolugahi 2021). Udane próby wykonania angioplastyki wieńcowej pod kontrolą OCT potwierdzają użyteczność tej techniki w interwencjach po zawale serca. OCT pozwala dokładnie ocenić patologię ściany naczynia, umożliwia wykrycie z wysoką rozdzielczością obecności zarówno blaszki miażdżycowej jak i zakrzepu w świetle tętnicy (Tearney i wsp. 2012). Ponadto na podstawie obrazów OCT można dobrać odpowiednią szerokość i długość stentu, ocenić efekt zabiegu, i uzyskać informację na temat mechanizmu ewentualnie pojawiających się powikłań (Rychlak i wsp. 2019). Endoskopowa tomografia OCT jest wykorzystywana również do obserwacji zmian w układzie pokarmowym, np. przy diagnozie przełyku Baretta, chorób żołądka, jelita cienkiego i grubego, obrazowaniu przewodów żółciowych, oraz innych tkanek i narządów, jak pęcherz moczowy czy oskrzela. Stosowna jest także w laryngologii i ginekologii (Gora i wsp. 2017). Przeprowadzono również doświadczalne próby endoskopowego obrazowania OCT *ex-vivo* i *in-vivo* naczyń krwionośnych w mózgu (Ughi i wsp. 2020).

Dzięki unikalnym właściwościom tomografia OCT jest coraz częściej wykorzystywana do obrazowania tkanek *in-vitro* i *in-vivo* w badaniach naukowych. Aby dobrze wykorzystać potencjał techniki OCT należy poznać właściwości rozpraszające i absorbujące poszczególnych badanych struktur. Właściwości te istotnie wpływają na uzyskany obraz badanego obiektu. Przykładowo, w badaniu skrzepów krwi obrazy OCT istotnie różniły się w zależności od procentowej zawartości erytrocytów. Im większa zawartość czerwonych krwinek w skrzepie tym sygnał rozproszenia jest bardziej widoczny (Ding i wsp. 2021). Odwrotna sytuacja została zaobserwowana w przypadku skrawków mózgu z widocznym glejakiem. Gęsto ułożone komórki nowotworowe silnie absorbują światło, co przekłada się na słaby sygnał rozproszenia (Yashin i wsp. 2019). Coraz częściej podejmowane są próby odróżnienia komórek nowotworowych skóry od prawidłowych za pomocą OCT. Najnowsze badania pokazują przydatność OCT w identyfikowaniu komórek nowotworowych raka płaskonabłonkowego (Lenoir i wsp. 2021) oraz raka podstawnkomórkowego (Ruini i wsp. 2021).

Optyczna tomografia może znaleźć ważne zastosowanie w onkologii przy śródoperacyjnej analizie marginesu chirurgicznego guzów. Ograniczone możliwości analizy nacieków nowotworowych w obszarach marginesów stanowi istotne wyzwanie

w onkologii. Obecnie granice tą bada się w wyciętej tkance. Pierwszy etap jest wykonywany podczas operacji, a drugi po zabiegu. Takie podejście jest czasochłonne i stwarza ryzyko pozostawienia komórek nowotworowych *in-situ*. Przeprowadzone dotąd badania wskazują na potencjalną przydatność tomografii OCT w analizie marginesu chirurgicznego (Foo i wsp. 2021, Obade i wsp. 2021, Dornbush i wsp. 2021).

Trwają również badania nad zastosowaniem OCT w stomatologii gdzie może być metodą pomocną do wykrywania próchnicy, demineralizacji szkliwa, analizy wypełnień, wizualizacji kanałów korzeni zębowych. Przeprowadzono także badania nad zastosowaniem tej techniki do obrazowania zmienionych nowotworowo tkanek jamy ustnej, a uzyskane wyniki wskazują, że OCT może być przydatne przy wyznaczaniu obszaru, z którego ma być wykonana biopsja (Ali i wsp. 2021).

### **OCT jako metoda angiograficzna**

OCT jest metodą niezwykle czułą na ruch skanowanych obiektów. Skanowane struktury, będące w ruchu, silnie modyfikują komponent fazowy sygnału mierzonego od rozpraszającej światło próbki. Właściwość ta pozwala na bardzo skuteczną filtrację sygnału statycznego i tym samym wizualizację naczyń krwionośnych bez użycia dodatkowego kontrastu, (Ossowski i wsp. 2015). Obraz angiograficzny OCT uzyskuje się przez porównanie sygnału rozproszenia pomiędzy kolejnymi B-skanami wykonanymi w dokładnie tym samym miejscu. W ten sposób uzyskuje się angiograficzne obrazy przekrojów (B-scany). Różnica w kontraście fazowym pomiędzy kolejno wykonanymi B-skanami z dużą gęstością czasową pozwala obrazować jedynie poruszające się obiekty. W przypadku naczyń krwionośnych sprowadza się to do obrazowania ruchu erytrocytów, które najsilniej rozpraszają światło w kierunku wstecznym. .

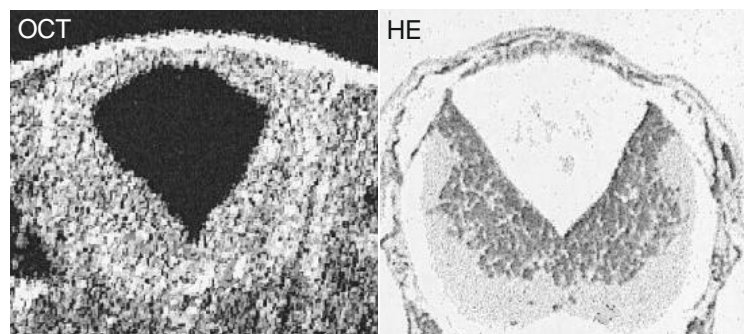
Początkowo obrazy angiograficzne OCT wykonywano w trakcie obrazowania dna gałki ocznej. Angiografia OCT oka może zostać wykorzystana do diagnozy początkowej fazy zwyrodnienia plamki żółtej związanego z wiekiem. Istnieje pogląd, że zmniejszony przepływ krwi w naczyniówce oka może poprzedzać progresję choroby (Boltz 2010). Wykazano również, że angiografia OCT oczu chorych na cukrzycę umożliwia wykrycie wielu nieprawidłowości naczyniowo-naczyniówkowych i/lub nieprawidłowości mikronaczyniowych siatkówki, takich jak mikro-tętniaki, przebudowa

naczyń przylegających do strefy beznaczyniowej dołka (FAZ), powiększona FAZ oraz krętość i poszerzenie naczyń włosowatych (Carlo i wsp. 2015).

Obecnie trwają próby badania unaczynienia mózgu za pomocą OCT na modelach zwierzęcych (Tamborski i wsp. 2016). OCT może być przydatna do oceny hemodynamicznych zmian po udarze niedokrwiennym, monitorowaniu reperfuzji czy oceny angiogenezy (Dolezyczek i wsp. 2020a). Angiografia OCT pozwala analizować unaczynienie guzów mózgu *in-vivo*, które jest bardzo istotnym parametrem wpływającym na proliferację komórek nowotworowych i możliwość tworzenia przerzutów (Dolezyczek i wsp. 2020b).

### OCT jako metoda obrazowania mózgu

Centralny Układ Nerwowy jest dobrym obiektem dla obrazowania OCT ze względu na jego częściową transparentność dla światła podczerwonego. Pierwsze próby obrazowania Centralnego Układu Nerwowego *in-vivo* przeprowadzono na embrionach żaby *Xenopus laevis* w 1996 roku (Boppart i wsp. 1996). Zauważono istotne różnice we właściwościach rozpraszających poszczególnych struktur mózgowia. Autorzy porównali obrazy OCT z odpowiadającymi im skrawkami wybarwionymi hematoksyliną i eozyną, sugerując możliwość zastosowania w niektórych badaniach tomografii optycznej, zamiast barwień histologicznych (Ryc. 3).



Ryc. 3. Pierwsze próby obrazowania mózgu za pomocą OCT.

Porównanie obrazów przekroju tyłomózgowia *Xenopus laevis* wykonanego metodą OCT i HE. Rycina wykonana na podstawie zmodyfikowanych zdjęć z pracy Boppart i wsp. (1996r).

W 1998 roku przeprowadzono pierwsze obrazowanie mózgu szczura *in-vivo* poprzez chirurgicznie wykonany otwór w czaszce. Jednak zaprezentowana metoda pozwalała na jednokrotne obrazowanie, po którym zwierzęta uśmiercano w celu wykonania barwień histologicznych (Roper i wsp. 1998).

Aby zastosować OCT do wielokrotnego obrazowania mózgu u tego samego osobnika należy przeprowadzić odpowiednie chirurgiczne zabiegi, takie jak ścienienie czaszki (Srinivasan i wsp. 2013) czy wykonanie okienka czaszkowego (Tamborski i wsp. 2016). Dlatego obecnie OCT do obrazowania mózgu stosuje się głównie w badaniach naukowych z wykorzystaniem zwierząt laboratoryjnych. Ograniczenie to nie wyklucza wykorzystania OCT w trakcie otwartych operacji mózgu, gdzie może posłużyć jako dodatkowe narzędzie diagnostyczne.

W 2003 roku wykonano pionierskie obrazowanie mózgu za pomocą OCT po przez specjalne okienko czaszkowe u kota. Zauważono regionalne różnice w sygnale rozproszenia, które wiązano z lokalnymi zmianami w przepływie krwi, morfologii komórek czy zmianami zapalnymi w mózgu (Maheswari i wsp. 2003).

Badania wykonane z użyciem OCT mogą być również przydatne do oceny plastyczności neuronalnej. Zarówno synapsy, jak i mitochondria cechują się silnymi właściwościami rozpraszającymi. Wykazano istotne wzmocnienie sygnału rozproszenia w obszarach kory M1 i S1 lewej półkuli w mysim modelu chronicznego bólu, polegającym na podwiązaniu prawego nerwu kulszowego (Ooi i wsp. 2006).

OCT jako metoda nieinwazyjna i bezkontaktowa może być wykorzystana do obrazowania strukturalnego, jak i angiograficznego tkanki mózgu. Należy jednak pamiętać o technicznych ograniczeniach OCT, wynikających z możliwości penetracji wiązki skanującej w głąb obrazowanego obiektu.

### **OCT a inne metody obrazowania mózgu.**

Wśród obecnie stosowanych metod obrazowania mózgu można wyróżnić: rezonans magnetyczny (MRI), tomografię komputerową (CT), ultrasonografię (USG), mikroskopię dwufotonową. Każda z tych technik charakteryzuje się pewnymi zaletami, jak i wadami (Tabela 1). OCT cechuje się wysoką rozdzielczością przestrzenną (od jednego do kilku mikrometrów) i czasową (kilkanaście sekund), oraz wykorzystuje nieinwazyjną wiązkę światła podczerwonego do obrazowania. Jest to szczególnie istotne przy wielokrotnym obrazowaniu tego samego obszaru mózgu. Przykładowo stosowanie CT do wielodniowych obserwacji mózgu może wywoływać negatywny wpływ promieniowania rentgenowskiego na tkankę. Ponadto dzięki odpowiednio dobranym protokołom skanowania OCT w trakcie jednego obrazowania można uzyskać zarówno dane strukturalne, jak i angiograficzne.



Kolejną techniką stosowaną do obrazowania mózgu jest MRI, która bazuje na promieniowaniu elektromagnetycznym. Za pomocą MRI o polu magnetycznym 1,5 Tesli obrazowano przebiegu udaru mózgu u szczura z rozdzielczością przestrzenną około 1,5 mm (Chen i wsp. 2007). Dla zwiększenia rozdzielczości obrazowania do 45  $\mu\text{m}$  zbudowano doświadczalny układ o mocy 9,5 Tesli (Wang i wsp. 2020). Jednak nawet taki MRI charakteryzuje się znacznie niższą rozdzielczością niż OCT.

Do obrazowania mózgu z wysoką rozdzielczością w badaniach podstawowych wykorzystuje się również mikroskopię dwufotonową. Mikroskopia dwufotonowa umożliwia obrazowanie zarówno naczyń krwionośnych, jak i komórek nerwowych mózgu. Jednak wymaga użycia dodatkowych barwników kontrastujących podawanych dożylnie lub stosowania w doświadczeniach transgenicznym zwierząt laboratoryjnych (np. myszy GFP), (Crowe and Ellis-Davies, 2018). Zalety i wady wymienionych technik podsumowuje Tabela 1.

Tabela 1. Zalety i wady wybranych metod do obrazowania mózgu myszy

Metoda obrazowania	Zalety	Wady
MRI	Duży obszar obrazowania, możliwość obrazowania całego mózgu	Niska rozdzielczość Stosowanie kontrastu do angiografii Ekspozycja na pole elektromagnetyczne
CT	Duży obszar obrazowania, możliwość obrazowania całego mózgu	Niska rozdzielczość Stosowanie kontrastu do angiografii Ekspozycja na promieniowanie rentgenowskie
USG	Nieinwazyjność Małe rozmiary	Niska rozdzielczość Ograniczone obrazowanie przez czaszkę
Mikroskopia dwufotonowa	Wysoka rozdzielczość	Potrzeba stosowania kontrastu Ograniczona głębokość obrazowania w osi Z Konieczność założenia okienka czaszkowego lub ścienienia czaszki
OCT	Obrazowanie bez kontrastu, zarówno struktury, jak i unaczynienia Wysoka rozdzielczość Nieinwazyjność światła skanującego.	Ograniczona głębokość obrazowania w osi Z Konieczność założenia okienka czaszkowego lub ścienienia czaszki

## **2. Cel pracy**

### **Cel ogólny**

Celem ogólnym rozprawy była ocena przydatności unikalnych właściwości OCT do oceny strukturalnych i angiograficznych zmian w korze mózgu myszy po niedokrwiennym udarze fotoczulenowym i w doświadczalnym modelu glejaka.

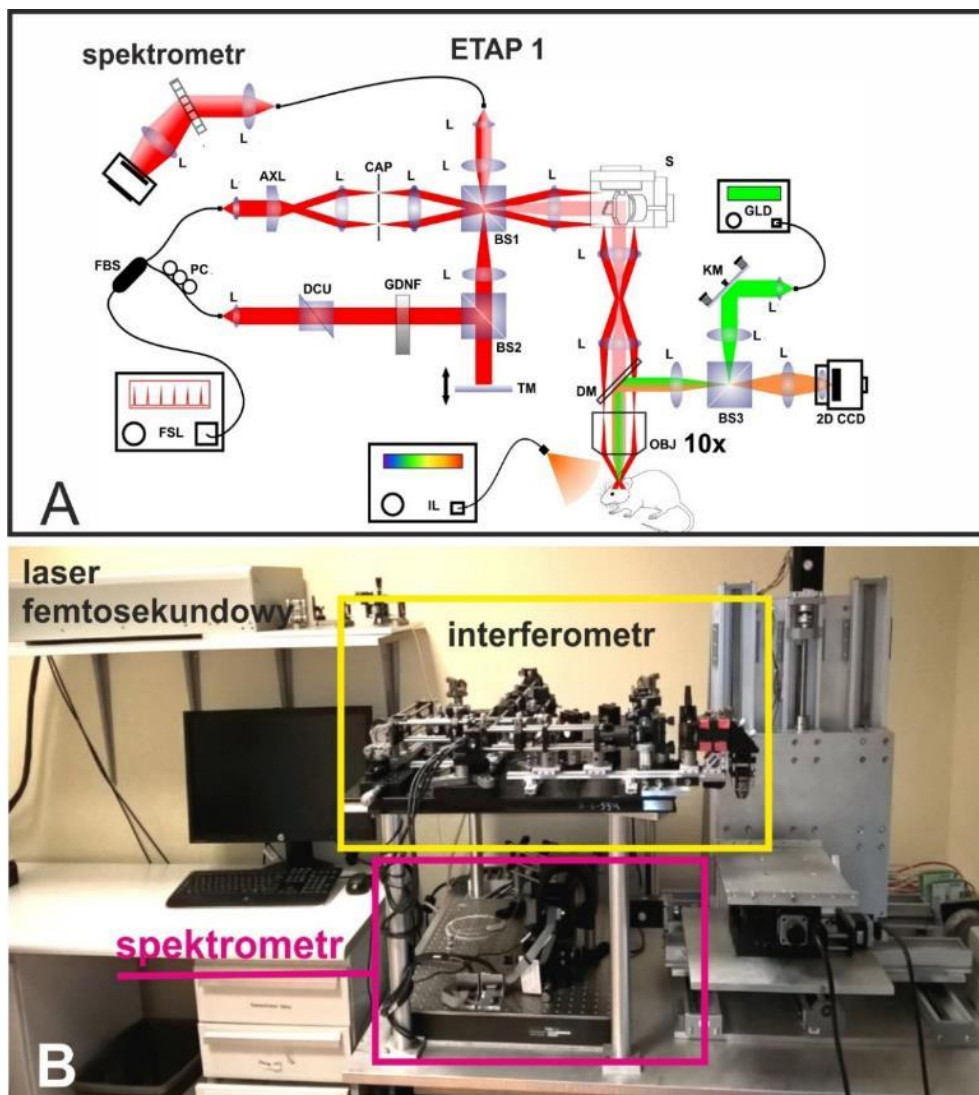
### **Cele szczegółowe**

Pierwszym celem szczegółowym pracy było opracowanie systemu OCT do obrazowania i analizy zmian w tkance mózgowej i jej unaczynieniu u myszy na modelach udaru niedokrwiennego i glejaka.

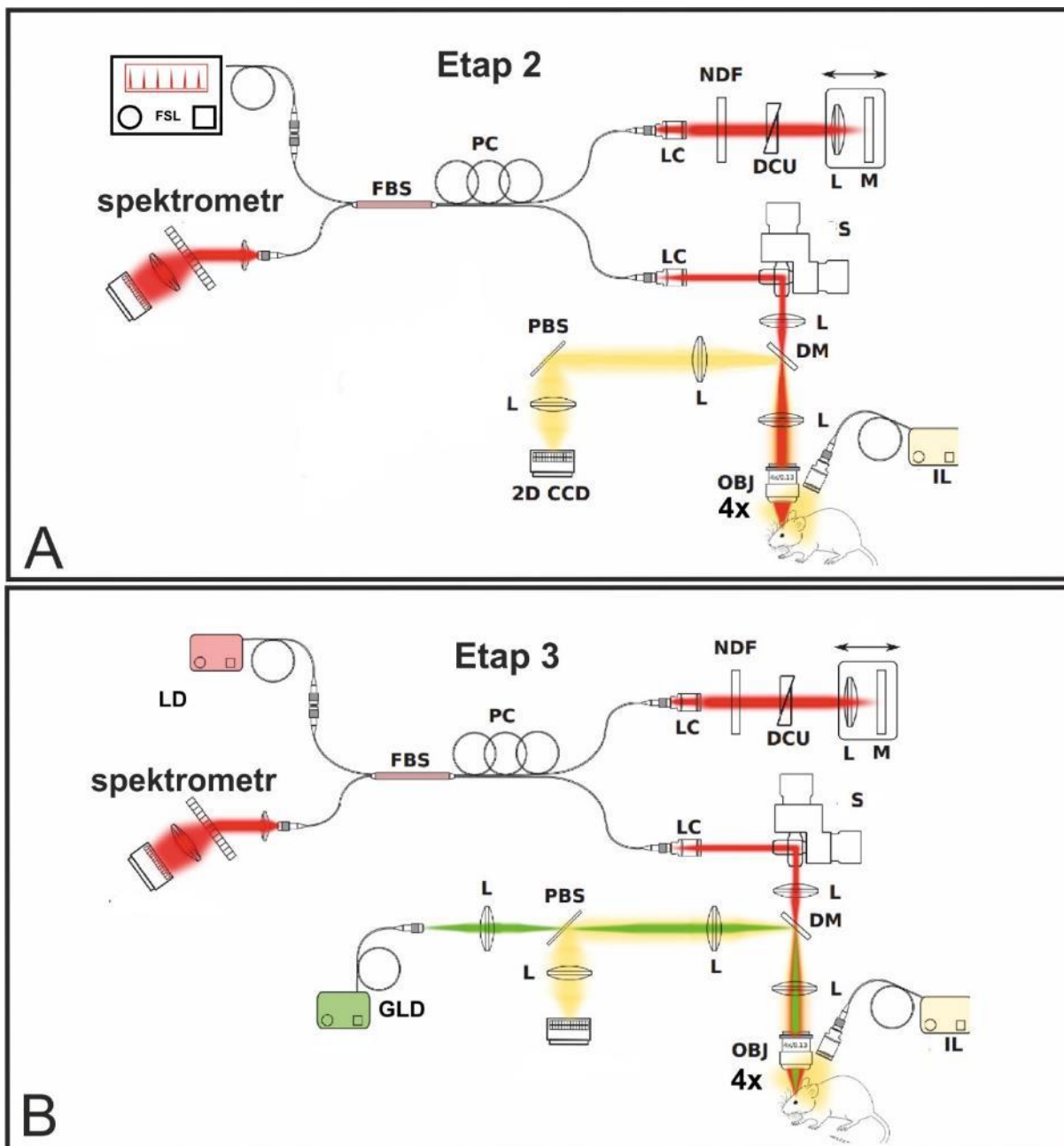
Drugim celem szczegółowym pracy była analiza zmian strukturalnych i angiograficznych na obrazach OCT mózgu oraz próba ich korelacji ze zmianami na poziomie komórkowym w tkance nerwowej i naczyniach uwidocznionych za pomocą procedur histologicznych.

### 3. Projekt Badawczy

Projekt badawczy obejmował trzy etapy. W celu uzyskania optymalnych i powtarzalnych wyników, na każdym etapie badań prototypowy układ OCT był odpowiednio optymalizowany we współpracy z zespołem Optyki Fizycznej i Biofotoniki, Instytutu Chemii Fizycznej PAN, kierowanym przez prof. Macieja Wojtkowskiego. Schematy układów OCT zastosowanych w kolejnych etapach pracy przedstawia Rycina 4 i Rycina 5.



Ryc. 4. Układ OCT z interferometrem Macha-Zehndera zastosowany do obrazowania mózgu myszy w pierwszym etapie badań: z wiązką skanującą typu Bessela, obiektywem 10x oraz diodą emitującą światło zielone do indukcji udaru (GLD). (A) Schemat układu, (B) zdjęcie układu z zaznaczonym źródłem światła (laser femtosekundowy), interferometrem i spektrometrem. Dokładny opis wszystkich elementów optycznych umieszczony jest w załączonej publikacji 1 (Dolezyczek i wsp. 2020a).



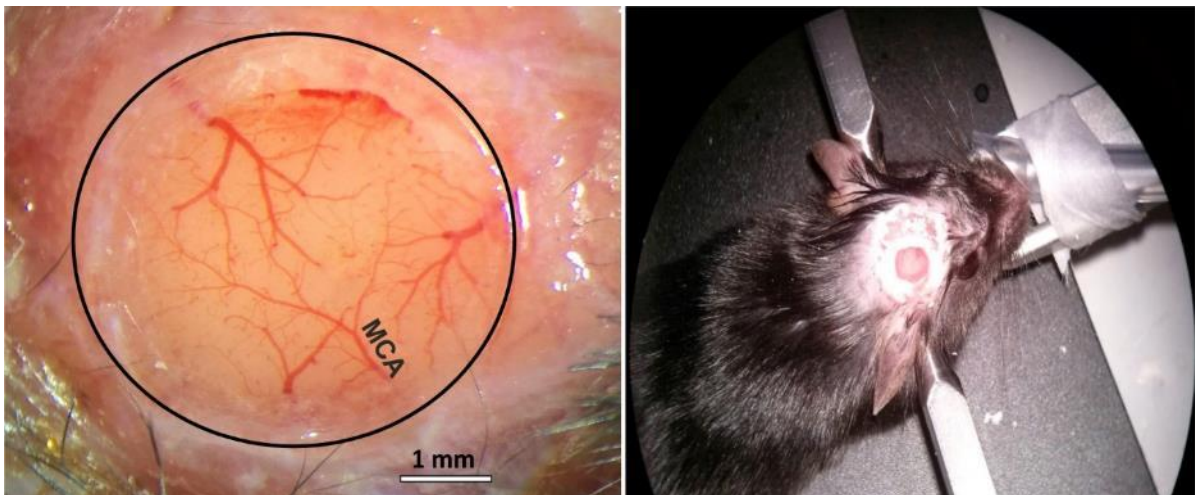
Ryc. 5. OCT z interferometrem Michelsona. (A) Układ zastosowany w drugim etapie badań z wiązką typu Gaussa i obiektywem 4x. (B) Układ z dodatkową drogą optyczną dla światła zielonego oraz diodą laserową (LD) jako źródło światła, zastosowana w trzecim etapie badań. Dokładny opis wszystkich elementów optycznych zastosowanych w drugim i trzecim etapie badań umieszczony jest odpowiednio w publikacji 2 (Dolezyczek i wsp. 2020b) i publikacji 3 (Dolezyczek i wsp. 2022) .

## Podsumowanie pierwszego etapu badań (Publikacja 1).

Wyniki z tego etapu zostały szczegółowo przedstawione w publikacji:

**Dolezyczek H, Tamborski S, Majka P, Sampson D, Wojtkowski M, Wilczyński G, Szkulmowski M, Malinowska M. *In vivo* brain imaging with multimodal optical coherence microscopy in a mouse model of thromboembolic photochemical stroke. *Neurophotonics*. 2020 Jan;7(1):015002.**

W pierwszym etapie został skonstruowany układ OCT, który składał się z interferometru typu Macha-Zhendera indukującego wiązkę Bessela z obiektywem x10, spektrometru, oraz kamery podglądu (Ryc. 4A, B). Źródłem światła dla wiązki skanującej tkankę mózgową przez implantowane okienko czaszkowe (Ryc. 6) był laser femtosekundowy (Fusion Femtolasers, Austria). W system OCT wbudowano diodę laserową emitującą wiązkę światła zielonego do indukcji udaru fotouczuleniowego. Istotne w tym prototypie jest to, że drogi optyczne wiązki skanującej i wiązki światła zielonego biegły przez ten sam obiektyw. Układ ten zbudowano na potrzeby obrazowania wczesnych zmian w rejonie ischemii po udarze w czasie rzeczywistym.



Ryc. 6. Unaczynienie powierzchni kory mózgu myszy widoczne przez okienko czaszkowe umiejscowione nad odgałęzieniem tętnicy środkowej mózgu (MCA), oraz mysz C57Bl/j6 przygotowana do obrazowania za pomocą OCT.

Opracowany model udaru wywoływany był poprzez naświetlanie zielonym światłem wybranego odgałęzienia środkowej tętnicy mózgu (ang. Middle Cerebral Artery, MCA). Zwierzęciu podano Róż Bengalski, który po przedostaniu się do krwiobiegu był

aktywowany w tętnicy, w miejscu jej naświetlania. Powodowało to powstawanie zakrzepów i miejscowe niedokrwienie tkanki mózgowej (Ryc. 7).



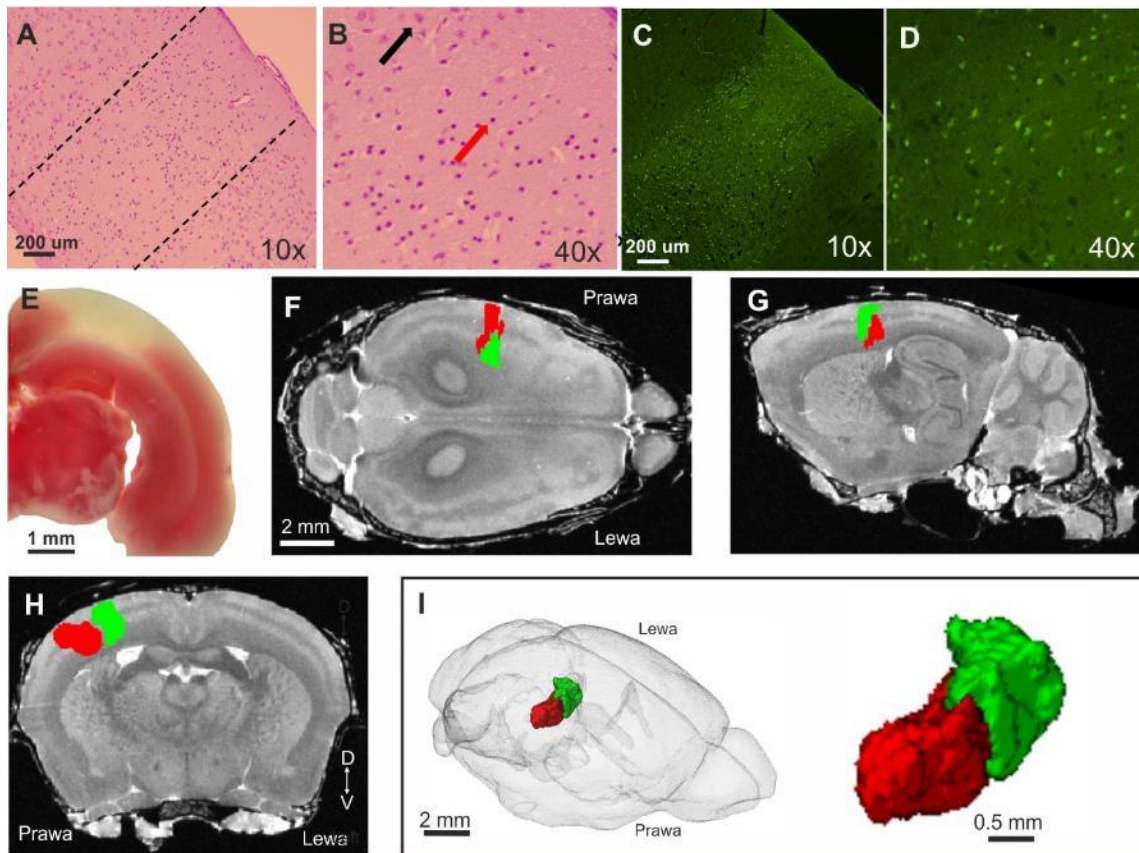
Ryc. 7. Indukcja udaru fotoczuleniowego poprzez naświetlanie pojedynczego odgałęzienia tętnicy środkowej mózgu (MCA). Zdjęcia wykonane kamerą podglądu, techniką jasnego pola, przed udarem (z lewej), w trakcie naświetlania (środek), 1 godz. po udarze (z prawej).

### Najważniejsze wyniki

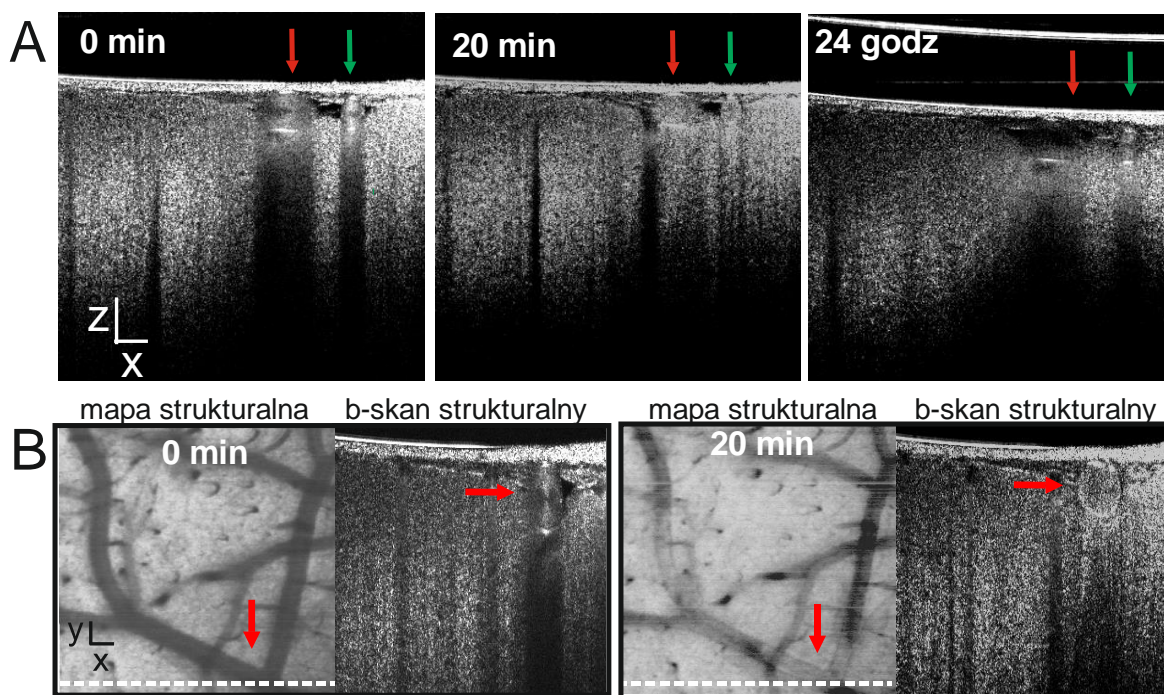
Skuteczność opracowanej metody udaru została potwierdzona histologicznie za pomocą barwień hematoksyliną/eozyną (HE), (Ryc. 8A, B), FluoroJade (FJ), (Ryc. 8 C, D), oraz chlorkiem 2,3,5-trójfenylo-tetrazoliowym (TTC), (Ryc. 8E) oraz za pomocą 3D rekonstrukcji skrawków seryjnych barwionych FJ (Ryc. 8F-I). Wykazano duże zróżnicowanie w wielkości, zasięgu i kształcie obszaru zawierającego degenerujące neurony, a u poszczególnych myszy obszar niedokrwienia obejmował różne części kory mózgowej.

W wyniku obrazowania mózgu myszy otrzymano: B-skany strukturalne i angiograficzne, będące przekrojem mózgu w osi Z (max głębokość ok 600 µm). Po spłaszczeniu w osi Z wszystkich B-skanów strukturalnych lub angiograficznych ze skanowanego obszaru uzyskuje się odpowiednio mapy strukturalne lub mapy angiograficzne (angiomapy). Obrazy strukturalne dają informacje o właściwościach rozpraszających poszczególnych elementów tkankowych, a angiograficzne o ruchu erytrocytów w naczyniach krwionośnych. Analiza obrazów OCT wykazała istotne różnice w sygnale rozpraszania przed, w trakcie i po udarze. Na strukturalnych B-skanach sygnał rozproszenia, dobrze widoczny przed udarem (0 min.), częściowo zanika w obszarze niedokrwienia w kolejnych punktach czasowych (20 min. i 24 h), (Ryc. 9A). Obrazy strukturalne uwidocznily również tworzenie się zakrzepu w świetle tętnicy w miejscu naświetlanym zielonym laserem (Ryc. 9B).





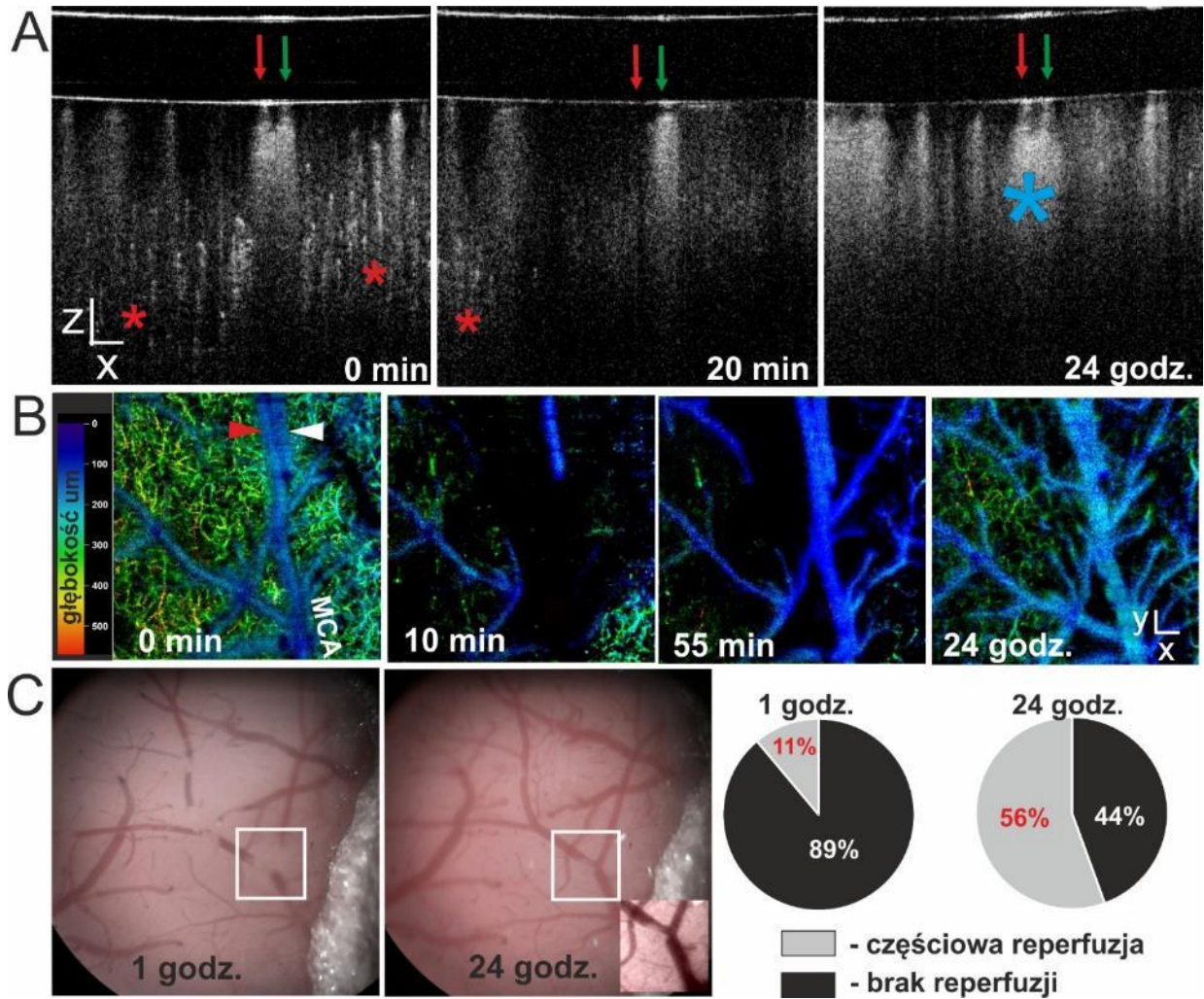
Ryc. 8. Histologiczna ocena obszaru niedokrwienia oraz rekonstrukcja 3D ogniska 24 godziny po udarze. (A-B) Skrawki mózgu barwione H/E, obszar między liniami przerywanymi z ciemno wybarwionymi obumierającymi komórkami (przykładowa komórka zaznaczona czerwoną strzałką), czarna strzałka wskazuje komórkę prawidłową. (C-D) Barwienie FJ z widocznymi degenerującymi neuronami. (E) Skrawek mózgu wybarwiony TTC z jasnym obszarem niedokrwienia. (F-I) Rekonstrukcja 3D obszaru z degenerującymi neuronami wykonana na podstawie seryjnych skrawków mózgu barwionych FJ.



Ryc. 9. Obrazy strukturalne OCT. (A) B-skany strukturalne w kolejnych punktach czasowych. Strzałki wskazują przekrój poprzeczny odgałęzienia MCA, powyżej naświetlanego zielonym laserem rozgałęzienia. (B) Mapy i B-skany strukturalne przedstawiające tworzenie się zakrzepu w miejscu naświetlania (czerwona strzałka), biała przerywana linia wyznacza przekrój zaprezentowany na B-skanach. Skala = 100  $\mu\text{m}$ .

Na B-skanach angiograficznych (Ryc. 10) uwidoczniono ograniczenie przepływu krwi w odgałęzieniu MCA po udarze (20 min., czerwona strzałka), w postaci zaniku sygnału pochodzącego od płynących erytrocytów. Ponadto wykazano utrzymujący się po 20 min. do 24 godz. zanik sygnału z naczyń kapilarnych z głębszych warstw kory (poniżej 100  $\mu\text{m}$  od powierzchni), pomimo częściowej reperfuzji w tętnicy powierzchniowej (Ryc. 10A, B, 24 godz.). Powyższy wynik potwierdziły dane ilościowe na podstawie angiomap (Ryc. 10B). Wykazano stopniowy wzrost całkowitego przepływu krwi w warstwach powierzchniowych (między 35 min. a 24 godz.) w przeciwieństwie do stale utrzymującego się ograniczonego przepływu krwi w warstwie głębszej (320-640  $\mu\text{m}$ ), (Ryc. 10B, wykres). Ponadto po 24 godzinach na B-skanach angiograficznych w obszarze udaru zaobserwowano wzmocnienie sygnału rozpraszania w okolicy dużych naczyń (Ryc. 10A, 24 godz.). Dodatkowa ocena powierzchownego unaczynienia po udarze, za pomocą obrazów z kamery podglądu, wykazała wystąpienie częściowej reperfuzji po 1 godz. u 11% natomiast po 24 godz. u 54% myszy (Ryc. 10C).





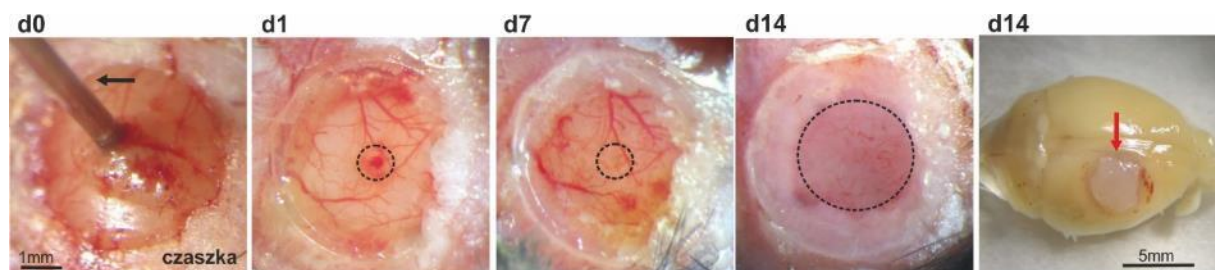
Ryc. 10. Analiza unaczynienia mózgu myszy po udarze za pomocą systemu OCT. (A) B-skany angiograficzne uwidaczniające zanik przepływu krwi w naczyniach po udarze. Czerwona strzałka – naświetlana tętnica, zielona strzałka – żyła ułożona równoległe do tętnicy, czerwone gwiazdki – sygnał z naczyń w głębszych obszarach kory, niebieska gwiazdka – wzmocniony sygnał pod naczyniami powierzchniowymi 24 godz. po udarze. (B) Mapy angiograficzne pokazujące zmiany w przepływie krwi w wybranych punktów czasowych oraz wykres przedstawiający przepływ krwi na poszczególnych głębokościach kory. (C) Zdjęcia powierzchniowego unaczynienia mózgu wykonane kamerą podglądu na podstawie których oceniono reperfuzję w naświetlanej tętnicy. Skala = 100  $\mu$ m

## Podsumowanie drugiego etapu badań (Publikacja 2).

Wyniki z tego etapu zostały szczegółowo przedstawione w publikacji:

**Dolezyczek H, Rapolu M, Niedzwiedziuk P, Karnowski K, Borycki D, Dzwonek J, Wilczynski G, Malinowska M, Wojtkowski M. Longitudinal in-vivo OCM imaging of glioblastoma development in the mouse brain. Biomed Opt Express. 2020 Aug 12;11(9):5003-5016.**

W drugim etapie układ OCT został zoptymalizowany poprzez zamianę interferometru Macha-Zhendera, generującego wiązkę skanującą typu Bessela, na interferometr Michelsona generujący wiązkę skanującą typu Gaussa. Zastosowano obiektyw x4, co umożliwiło skanowanie większego obszaru kory mózgowej (x, y, z - 2,8 mm x 2,8 mm x 2 mm), (Ryc. 5A). Tak zmodyfikowany układ został zweryfikowany w obrazowaniu guza glejaka w mózgu myszy. Było to unikalne na świecie zastosowanie przyżyciowej wizualizacji rozwoju guza mózgu u myszy za pomocą OCT. Na potrzeby tego doświadczenia opracowano metodę iniekcji mysich komórek glejaka GI261 za pomocą strzykawki Hamiltona do kory mózgu, którą następnie przykryto okienkiem czaszkowym (Ryc. 11). Obrazowanie mózgu prowadzono w punktach czasowych tj. w 1, 3, 11 i 14 dniu. Na podstawie uzyskanych obrazów OCT analizowano unaczynienie oraz dynamikę wzrostu guza. Uzyskane obrazy OCT glejaka po 14 dniach korelowano z obrazami guza widocznymi na skrawkach mózgu barwionymi hematoksyliną/eozyną.

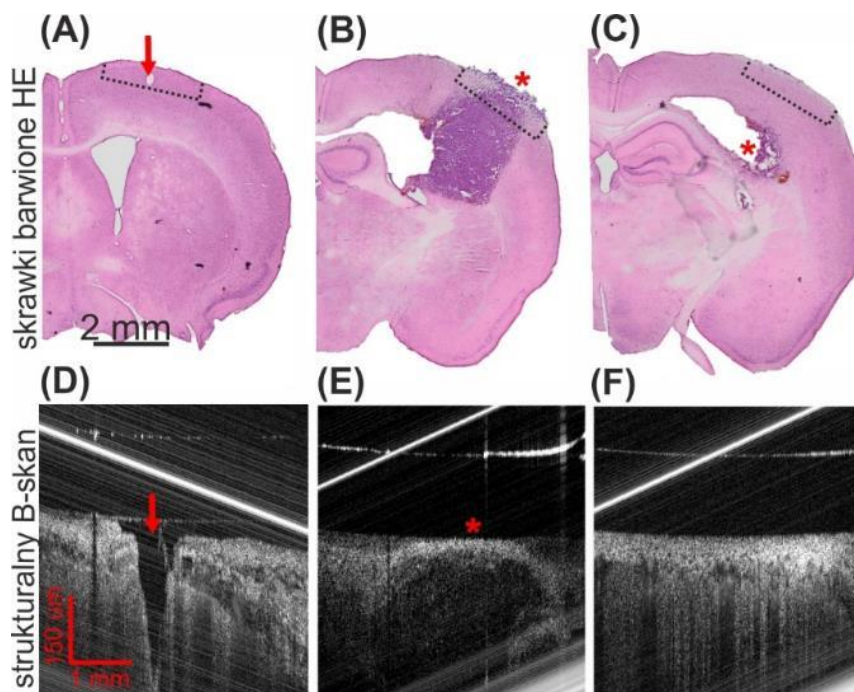


Ryc. 11. Implantacja komórek glejaka i wzrost guza w czasie 14 dni. (d0) Czarna strzałka wskazuje igłę w trakcie iniekcji komórek glejaka. (d1-d14) Etapy wzrostu guza. Zdjęcia wykonane pod mikroskopem operacyjnym.

### Najważniejsze wyniki:

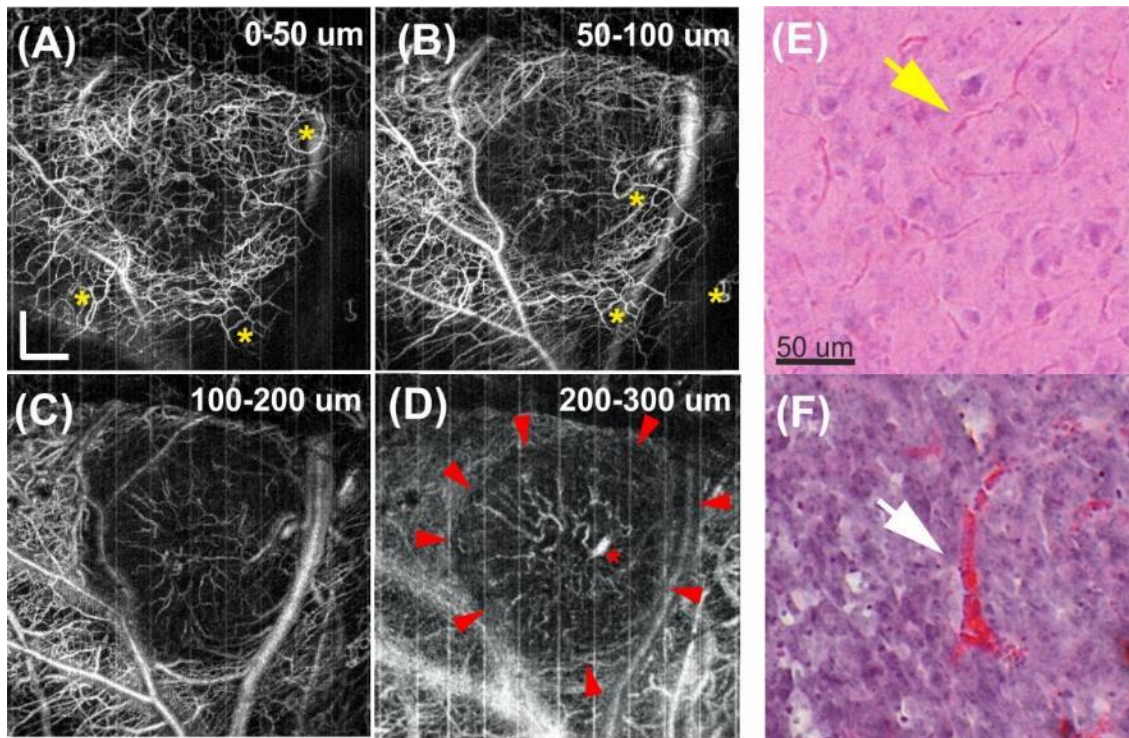
Opracowana metoda iniekcji komórek mysiego glejaka została pozytywnie zweryfikowana za pomocą barwienia H/E. W 14 dniu barwienie to wykazało obecność guza widocznego na skrawkach mózgu jako ciemnofioletowy obszar otoczony zdrową różową tkanką (Ryc. 12A-C). Strukturalne B-skany również uwidoczniły obszar objęty przez guza, widoczny jako hiporefleksyjny rejon (o słabym sygnale rozproszenia), otoczony obszarem zdrowej tkanki, widocznej jako rejon hiperrefleksyjny (o silnym sygnale rozproszenia), (Ryc. 12D-F).

Bazując na strukturalnych B-skanach i mapach strukturalnych obserwowano dynamikę rozwoju guza, którego średnica przykładowo u myszy (M1) wynosiła 0,6 mm w dniu 3, 2 mm w dniu 11, a 2,3 mm w dniu 14. Obrazy angiograficzne uwidoczniły silną angiogenezę w obszarze wzrostu glejaka, z charakterystycznymi nowopowstałymi naczyniami o nieregularnych kształtach (Ryc. 13A-D). Podobne naczynia uwidocznilo histologicznie na skrawkach mózgu za pomocą barwienia H/E. (Ryc. 13E-F).



Ryc. 12. Korelacja sygnałów widocznych na obrazach OCT ze zmianami w tkance uwidocznionymi barwieniem H/E, (A,D). Miejsce po igle zaznaczone czerwoną strzałką. (B,E) Guz oznaczony czerwoną gwiazdką. (C,F) Obszar kontrolny, bez widocznego guza w korze.





Ryc. 13. Unaczynienie guza glejaka w 14 dniu rozwoju. (A-D) Mapy angiograficzne na poszczególnych głębokościach kory mózgu. Żółte gwiazdki pokazują nieprawidłowe nowopowstałe naczynia krwionośne. Skala = 400  $\mu\text{m}$ . (E) Prawidłowe naczynia krwionośne, barwienie H/E (żółta strzałka). (F) Poszerzone naczynie krwionośne w guzie, podobne naczynie widoczne na angiomapie (D, czerwona gwiazdka).

### **Podsumowanie trzeciego etapu badań (Publikacja 3).**

Wyniki z tego etapu zostały szczegółowo przedstawione w publikacji:

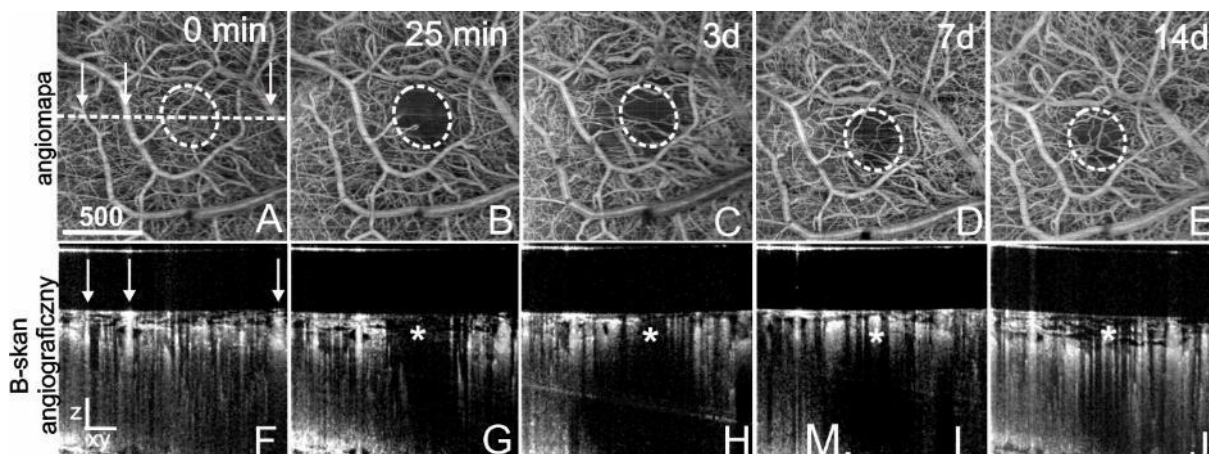
**Doleżyczek H, Kasprzycki P, Włodarczyk J, Wojtkowski M, and Malinowska M. Optical Coherence Tomography reveals heterogeneity of the brain tissue and vasculature in the ischemic region after photothrombotic stroke in mice. Acta Neurobiologiae Experimentalis, vol: 82, 2022.**

W trzecim etapie przeprowadzono ocenę obszaru niedokrwienia mózgu za pomocą tomografii optycznej oraz barwień histologicznych w ogniskowym modelu udaru. W celu zapewnienia bardziej stabilnych parametrów obrazowania dokonano kolejnej optymalizacji układu OCT. Zamieniono mało stabilny laser femtosekundowy na diodę laserową (Superlum M-T-850-HP-I), co wyeliminowało konieczność kalibracji źródła światła wiązki skanującej. Dodatkowo do interferometru Michelsona dobudowano diodę emitującą światło zielone do indukcji udaru fotouczuleniowego u myszy. Podobnie jak w pierwszym etapie projektu, drogi optyczne wiązki skanującej i wiązki światła zielonego do indukcji udaru biegły przez ten sam obiektyw x4. Średnica wiązki światła zielonego w ognisku została ustawiona na 400  $\mu\text{m}$ , tak by naświetlać niewielki obszar kory z pominięciem dużych naczyń krwionośnych. Na podstawie obrazów OCT dokonano analizy zmian w obszarze niedokrwienia w czasie 14 dni od indukcji udaru. Oceniono ilościowo proces angiogenezy/reperfuzji w punktach czasowych: 25 minut oraz 3, 7 i 14 dni od jego indukcji. Zbadano korelację sygnałów rozproszenia OCT w rejonach hiporefleksyjnych i hiperrefleksyjnych w obszarze rdzenia i penumbry ze zmianami na poziomie komórkowym w tkance nerwowej, uwidocznionymi za pomocą procedur histologicznych.

#### Najważniejsze wyniki:

Na podstawie obrazowania OCT i barwień histologicznych wykazano, że zastosowana metoda indukcji udaru powoduje powstanie obszaru niedokrwienia o powtarzalnym rozmiarze u badanej grupy myszy. Region kory o ograniczonym przepływie krwi był dobrze widoczny na obrazach angiograficznych, B-skanach i angiomapach (Ryc. 14), natychmiast po zakończeniu naświetlania zielonym laserem jako ciemny obszar, pozbawiony naczyń krwionośnych, o średnicy od 200 do 500  $\mu\text{m}$

(Ryc. 14B, G). W ciągu kolejnych 14 dni w obszarze tym uwidoczniły się naczynia krwionośne na skutek angiogenezy/reperfuzji (Ryc. 15C-D, H-J). W dniach 3 i 7 po udarze, angiograficzne B-skany uwidoczniły przepływ krwi, głównie w powierzchniowej warstwie kory (Ryc. 14H, I, biała gwiazdka). W dniu 14 sygnał angiograficzny widoczny był również w głębszych warstwach kory (Ryc. 14J).

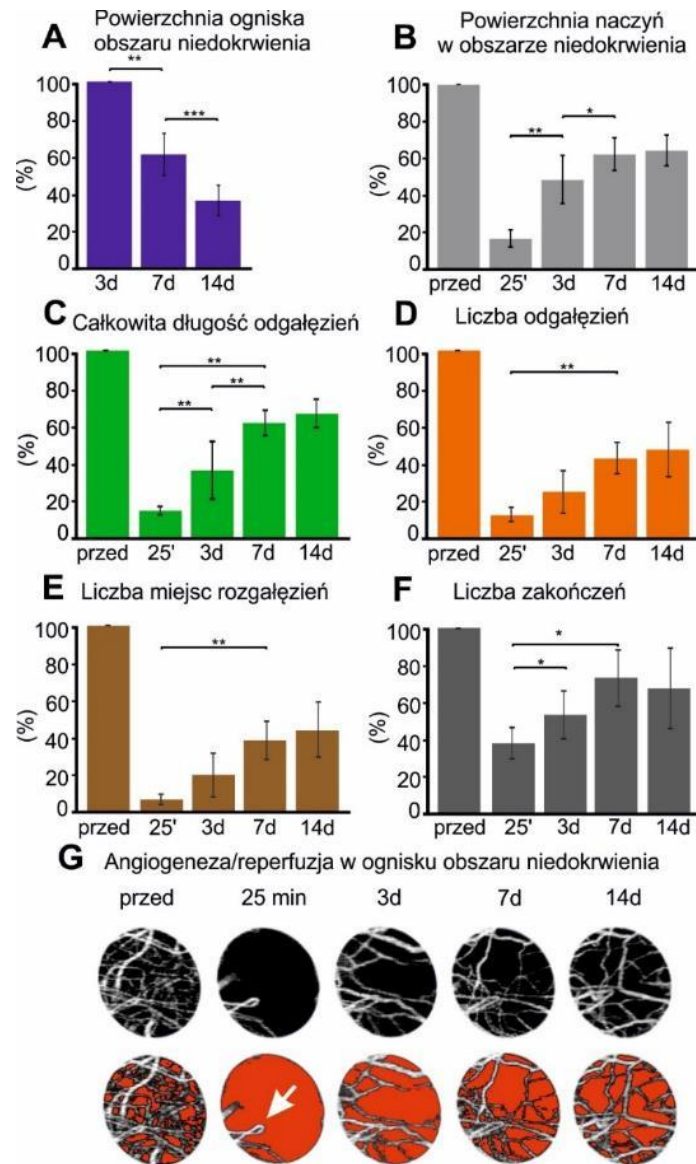


Ryc. 14. Obrazy angiograficzne ilustrujące zmiany w unaczynieniu mózgu myszy w trakcie 14 do udaru. (A-E) Angiogramy, (F-J) B-skany. Obszar o ograniczonym przepływie krwi został otoczony białą przerywaną linią na angiogramach i gwiazdkami na B-skanach. Strzałki wskazują duże naczynia powierzchniowe. Prosta przerywana biała linia wyznacza miejsce, z którego przedstawiono B-skany. Skala z = 100  $\mu$ m; x,y = 200  $\mu$ m.

Na podstawie angiogramów dokonano ilościowej analizy procesu angiogenezy/reperfuzji w kolejnych punktach czasowych (Ryc. 15). Analizowano parametry charakteryzujące unaczynienie w obszarze niedokrwienia tj.: powierzchnia naczyń, całkowita długość odgałęzień, liczba odgałęzień, liczba miejsc rozgałęzień i liczba zakończeń naczyń. Uzyskane wyniki wskazały na obecność intensywnej angiogenezy głównie w pierwszych 7 dniach od indukcji udaru (Ryc. 15B-F).

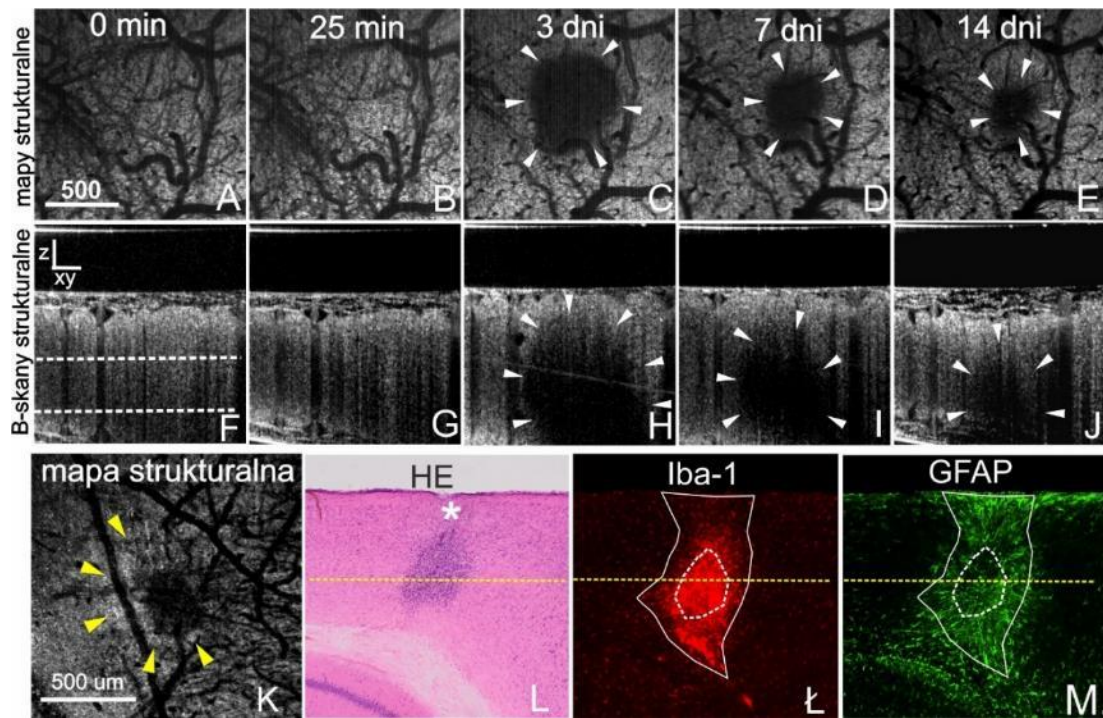
Trzeciego dnia od udaru na obrazach strukturalnych OCT zaobserwowano charakterystyczny hiporefleksyjny rejon w miejscu naświetlania światłem zielonym (Ryc. 16C, H). Analiza statystyczna wykazała, że powierzchnia tego obszaru zmniejszyła się o 40% w dniu 7 i o 70% w dniu 14 (Ryc. 16A). Obszar hiporefleksyjny na obrazach strukturalnych z rejonu niedokrwienia korelował z obecnością gęsto upakowanych komórek o nieregularnych, intensywnie wybarwionych jądrach z niewielką ilością cytoplazmy, obecnych na skrawkach mózgu barwionych H/E (Ryc. 16L) oraz z komórkami mikrogleju/makrofagami barwionymi immunocytochemicznie

na IBA-1 (Ryc. 16Ł). Obszar hiporefleksyjny na obrazach strukturalnych u niektórych myszy otoczony był hiperrefleksyjnym pierścieniem (Ryc. 16K, Ryc. 17A), który korelował z obecnością aktywowanych, hipertroficznymi astrocytów, wybarwionych na obecność GFAP (Ryc. 17M, Ryc. 18B). Szerokości obszarów hipo – i hiperrefleksyjnych nie różniły się statystycznie od szerokości obszarów wyznakowanych na obecność Iba-1 i GFAP (Ryc. 18).

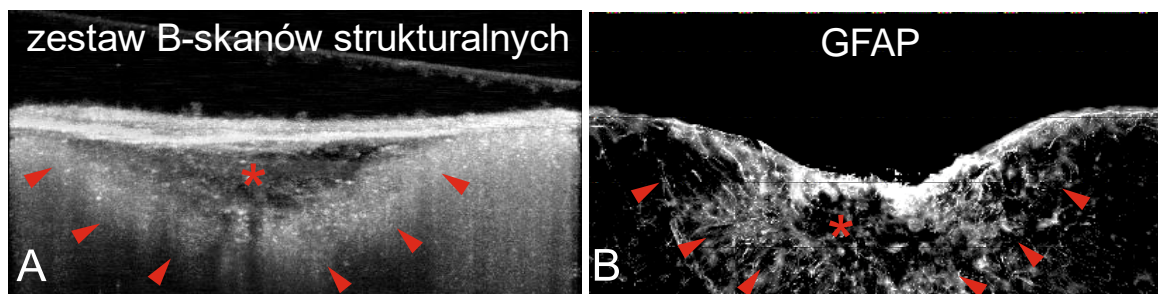


Ryc. 15. Ilościowa analiza obszaru niedokrwienia w czasie 14 dni. (A) Pole powierzchni obszaru hiporefleksyjnego widocznego na mapach strukturalnych (n=7). (B-F) Pomiary parametrów charakteryzujących unaczynienie centralnej części obszaru niedokrwienia (n=6). (G) Przykłady centralnej części obszaru niedokrwienia, górny panel oryginalne obrazy OCT, dolny panel po segmentacji (w programie ImageJ). Słupki błędów przedstawiają odchylenie standardowe \* p≤0,05, \*\* p≤0,01, \*\*\* p≤0,001 (test Wilcoxon'a)





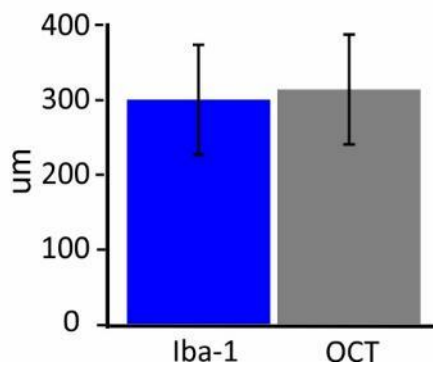
Ryc. 16. Obrazy strukturalne OCT i korelacja sygnału OCT z obecnością specyficznych populacji komórek w rejonie ogniska udaru. (A-E) Mapy strukturalne i (F-J) B-skany strukturalne przedstawiające zmiany w sygnale rozpraszania w kolejnych punktach czasowych. Białe grotki wskazują hiporefleksyjne ognisko udaru. (K-M) Korelacja hiporefleksyjnego ogniska i hiperrefleksyjnej otoczki (żółte grotki) z komórkami mikrogleju (Iba-1) i aktywowanymi antracytami (GFAP). Białe linie przerywane wskazują przedział głębokości przedstawionych na angiomapach (A-E). Żółte linie wyznaczają głębokość mapy strukturalnej (K).



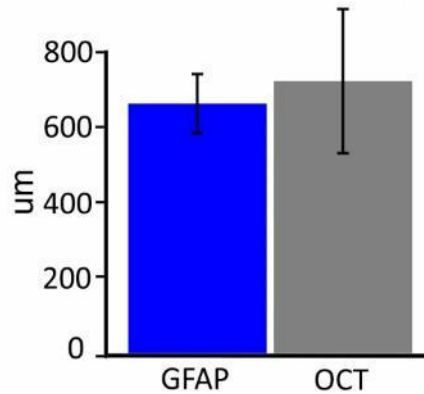
Ryc. 17. Korelacja hiperrefleksyjnego (A) obszaru (czerwone grotki) otaczającego ognisko udaru (czerwone gwiazdki) z astrocytami wyznakowanymi immunocytochemicznie (B).



Szerokość obszaru z mikroglejem/makrofagami (IBA-1) i hiporefleksyjnego obszaru (OCT)



Szerokość obszaru astroglejozy (GFAP) i hiperrefleksyjnej otoczki (OCT)



Ryc. 18. Ilościowa analiza korelacji szerokości hipo- i hiperrefleksyjnych obszarów na obrazach OCT z szerokością obszarów wybarwionych immunocytochemicznie Iba-1 i GFAP w dniu 14 od indukcji udaru. n=6 (brak istotnych statystycznie różnic, test Wilcoxon'a).

#### 4. Wnioski

- W wyniku przeprowadzonych badań wykazano, że prototypowy wielofunkcyjny układ OCT pozwala na połączenie funkcjonalności narzędzia do indukcji udaru z obrazowaniem i kwantyfikacją skutków tego procesu, tak dla wczesnych, jak i późnych zmian zachodzących w mózgu na skutek niedokrwienia.
- Analiza charakterystycznych sygnałów rozpraszania zidentyfikowanych w obszarze niedokrwienia metodą OCT i ich histologiczna weryfikacja pozwoliła na ich korelację z zmianami na poziomie komórkowym.
- Pokazano po raz pierwszy, że technika OCT może być wykorzystana do przyżyciowej oceny wzrostu guza mózgu myszy oraz ilościowej analizy angiogenezy w jego otoczeniu.
- Przedstawione w rozprawie metody mogą być wykorzystane do oceny skuteczności potencjalnych środków farmakologicznych do leczenia udaru oraz glejaka mózgu.

## 5. Bibliografia

- Ali S, Gilani SBS, Shabbir J, Almulhim KS, Bugshan A, Farooq I. 2021. Optical coherence tomography's current clinical medical and dental applications: a review. *F1000Res*. 22;10:310. doi: 10.12688/f1000research.52031.1.
- Boltz A, Luksch A, Wimpissinger B, Maar N, Weigert G, Frantal S, Brannath W, Garhöfer G, Ergun E, Stur M, Schmetterer L. 2010. Choroidal blood flow and progression of age-related macular degeneration in the fellow eye in patients with unilateral choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 51(8):4220-5. doi: 10.1167/iovs.09-4968.
- Boppart SA, Bouma BE, Brezinski ME, Tearney GJ, Fujimoto JG. 1996. Imaging developing neural morphology using optical coherence tomography. *J Neurosci Methods*. 70(1):65-72. doi: 10.1016/S0165-0270(96)00104-5.
- Carlo TE, Romano A, Waheed NK, Duker JS. 2015. A review of optical coherence tomography angiography (OCTA). *Int J Retina Vitreous*. 1:5. doi: 10.1186/s40942-015-0005-8.
- Chen F, Suzuki Y, Nagai N, Jin L, Yu J, Wang H, Marchal G, Ni Y. 2007. Rodent stroke induced by photochemical occlusion of proximal middle cerebral artery: evolution monitored with MR imaging and histopathology. *Eur J Radiol*. 63(1):68-75. doi: 10.1016/j.ejrad.2007.01.005.
- Coker JG, Duker JS. 1996. Macular disease and optical coherence tomography. *Curr Opin Ophthalmol*. 7(3):33-8. doi:10.1097/00055735-199606000-00006.
- Crowe SE, Ellis-Davies GC. 2014. Longitudinal in vivo two-photon fluorescence imaging. *J Comp Neurol*. 522(8):1708-1727. doi:10.1002/cne.23502
- Ding Y, Abbasi M, Eltanahy AM, Jakaitis DR, Dai D, Kadirvel R, Kallmes DF, Brinjikji W. 2021. Assessment of Blood Clot Composition by Spectral Optical Coherence Tomography: An In Vitro Study. *Neurointervention*. 16(1):29-33. doi: 10.5469/neuroint.2020.00297.
- Doleżyczek H, Tamborski S, Majka P, Sampson D, Wojtkowski M, Wilczyński G, Szkulmowski M, Malinowska M. 2020a. In vivo brain imaging with multimodal optical coherence microscopy in a mouse model of thromboembolic photochemical stroke. *Neurophotonics*. 7(1):015002. doi: 10.1117/1.NPh.7.1.015002.
- Doleżyczek H, Rapolu M, Niedzwiedziuk P, Karnowski K, Borycki D, Dzwonek J, Wilczynski G, Malinowska M, Wojtkowski M. 2020b. Longitudinal in-vivo OCM imaging of glioblastoma development in the mouse brain. *Biomed Opt Express*. 11(9):5003-5016. doi: 10.1364/BOE.400723.
- Doleżyczek H, Kasprzycki P, Włodarczyk J, Wojtkowski M, and Malinowska M. 2022. Optical Coherence Tomography reveals heterogeneity of the brain tissue and vasculature in the ischemic region after photothrombotic stroke in mice. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*. 82(1):106-119. doi: 10.55782/ane-2022-010.
- Dornbusch JA, Selmic LE, Huang PC, Samuelson JP, McLaughlin EM, Wavreille VA, Ogden JA, Abrams B, Kalamaras A, Green E, Hostnik ET, Every L, Fuerst JA, Jennings R, Premanandan C, Lorbach JN, Linn SC, Alex A, Sorrells JE, Yang L, Boppart SA. 2021. Diagnostic accuracy of optical coherence tomography for assessing surgical margins of canine soft tissue sarcomas in observers of different specialties. *Vet Surg*. 50(1):111-120. doi: 10.1111/vsu.13510
- Fercher AF, Hitzenberger CK, Drexler W, Kamp G, Sattmann H. 1993. In vivo optical coherence tomography. *Am J Ophthalmol*. 116(1):113-4. doi: 10.1016/s0002-9394(14)71762-3.

- Foo KY, Kennedy KM, Zilkens R, Allen WM, Fang Q, Sanderson RW, Anstie J, Dessauvagie BF, Latham B, Saunders CM, Chin L, Kennedy BF. **2021**. Optical palpation for tumor margin assessment in breast-conserving surgery. *Biomed Opt Express*. 12(3):1666-1682. doi: 10.1364/BOE.415888.
- Gora MJ, Suter MJ, Tearney GJ, Li X. **2017**. Endoscopic optical coherence tomography: technologies and clinical applications [Invited]. *Biomed Opt Express*. 8(5):2405-2444. doi: 10.1364/BOE.8.002405.
- Hee MR, Bauman CR, Puliafito CA, Duker JS, Reichel E, Wilkins JR, Coker JG, Schuman JS, Swanson EA, Fujimoto JG. **1996**. Optical coherence tomography of age-related macular degeneration and choroidal neovascularization. *Ophthalmology*. 103(8):1260-70. doi: 10.1016/s0161-6420(96)30512-5.
- Huang D, Swanson EA, Lin CP, Schuman JS, Stinson WG, Chang W, Hee MR, Flotte T, Gregory K, Puliafito CA, et al. **1991**. Optical coherence tomography. *Science*. 254(5035):1178-81. doi: 10.1126/science.1957169.
- Karimi Galougahi K, Shlofmitz E, Jeremias A, Petrossian G, Mintz GS, Maehara A, Shlofmitz R, Ali ZA. **2021**. Optical Coherence Tomography in Acute Coronary Syndromes. *Interv Cardiol Clin*. 10(3):323-332. doi: 10.1016/j.iccl.2021.03.004.
- Kowiański P, Lietzau G, Dziewiątkowski J, Moryś J. **2009**. Doświadczalne Modele udaru mózgowia. *Udar Mózgu*. 11 (2): 70-79.
- Lamallice L, Le Boeuf F, Huot J. **2007**. Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circ Res*. 100(6):782-94. doi: 10.1161/01.RES.0000259593.07661.1e.
- Lenoir C, Cinotti E, Tognetti L, Orte Cano C, Diet G, Miyamoto M, Rocq L, Trépant AL, Perez-Anker J, Puig S, Malvey J, et al. **2021**. Line-field confocal optical coherence tomography of actinic keratosis: a case series. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 35(12):e900-e902. doi: 10.1111/jdv.17548.
- Lee RHC, Lee MHH, Wu CYC, Couto E Silva A, Possoit HE, Hsieh TH, Minagar A, Lin HW. **2018**. Cerebral ischemia and neuroregeneration. *Neural Regen Res*. 13(3):373-385. doi: 10.4103/1673-5374.228711.
- Maheswari RU, Takaoka H, Kadono H, Homma R, Tanifuji M. **2003**. Novel functional imaging technique from brain surface with optical coherence tomography enabling visualization of depth resolved functional structure in vivo. *J Neurosci Methods*. 124(1):83-92. doi: 10.1016/s0165-0270(02)00370-9.
- Nguyen HD, Sedao X, Mauclair C, Bidron G, Faure N, Moreno E, Colombier JP, Stoian R. **2020**. Non-Diffractive Bessel Beams for Ultrafast Laser Scanning Platform and Proof-Of-Concept Side-Wall Polishing of Additively Manufactured Parts. *Micromachines* (Basel). 11(11):974. doi: 10.3390/mi11110974.
- Obade AY, Pandarathodiyil AK, Oo AL, Warnakulasuriya S, Ramanathan A. **2021**. Application of optical coherence tomography to study the structural features of oral mucosa in biopsy tissues of oral dysplasia and carcinomas. *Clin Oral Investig*. 25(9):5411-5419. doi: 10.1007/s00784-021-03849-0.
- Ooi Y, Satomura Y, Seki J, Yanagida T, Seiyama A. **2006**. Optical coherence tomography reveals in vivo cortical plasticity of adult mice in response to peripheral neuropathic pain. *Neurosci Lett*. 397(1-2):35-9. doi: 10.1016/j.neulet.2005.12.010.
- Ossowski P, Raiter-Smiljanic A, Szkulmowska A, Bukowska D, Wiese M, Derzsi L, Eljaszewicz A, Garstecki P, Wojtkowski M. **2015**. Differentiation of morphotic elements in human blood using optical coherence tomography and a microfluidic setup. *Opt Express*. 23(21):27724-38. doi: 10.1364/OE.23.027724.
- Paciaroni M, Caso V, Agnelli G. **2009**. The concept of ischemic penumbra in acute stroke and therapeutic opportunities. *Eur Neurol*. 61(6):321-30. doi: 10.1159/000210544.

- Ruini C, Schuh S, Gust C, Kendziora B, Frommherz L, French LE, Hartmann D, Welzel J, Sattler EC. **2021**. Line-field confocal optical coherence tomography for the in vivo real-time diagnosis of different stages of keratinocyte skin cancer: a preliminary study. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 35(12):2388-2397. doi: 10.1111/jdv.17603.
- Rychlak RP, Nowak G, Zalewski J. **2019**. Optical coherence tomography in patients with acute myocardial infarction. *Kardiol Inwazyjna*. 14(1):13-21
- Rojek A, Zub W, Waliszewska-Prosół M, Bładowska J, Obara K, Ejma M. **2015**. Wieloletnie przeżycie chorych z glejakiem wielopostaciowym — opisy przypadków. *Polski Przegląd Neurologiczny*; 12 (2): 107–115
- Roper SN, Moores MD, Gelikonov GV, Feldchtein FI, Beach NM, King MA, Gelikonov VM, Sergeev AM, Reitze DH. **1998**. In vivo detection of experimentally induced cortical dysgenesis in the adult rat neocortex using optical coherence tomography. *J Neurosci Methods*. 80(1):91-8. doi: 10.1016/s0165-0270(97)00202-1.
- Schilling M, Besselmann M, Müller M, Strecker JK, Ringelstein EB, Kiefer R. **2005**. Predominant phagocytic activity of resident microglia over hematogenous macrophages following transient focal cerebral ischemia: an investigation using green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice. *Exp Neurol*. 196(2):290-7. doi: 10.1016/j.expneurol.2005.08.004.
- Schroeter M, Jander S, Stoll G. **2002**. Non-invasive induction of focal cerebral ischemia in mice by photothrombosis of cortical microvessels: characterization of inflammatory responses. *J Neurosci Methods*. 117(1):43-9. doi: 10.1016/s0165-0270(02)00072-9.
- Srinivasan VJ, Mandeville ET, Can A, Blasi F, Klimov M, Daneshmand A, Lee JH, Yu E, Radhakrishnan H, Lo EH, Sakadžić S, Eikermann-Haerter K, Ayata C. **2013**. Multiparametric, longitudinal optical coherence tomography imaging reveals acute injury and chronic recovery in experimental ischemic stroke. *PLoS One*. 8(8):e71478. doi: 10.1371/journal.pone.0071478.
- Swidzińska E, Naumnik W, Chyczewska E. **2006**. Angiogeneza i neoangiogeneza – znaczenie w raku płuca i innych nowotworach. *Pneumonol. Alergol. Pol*. 74: 414–420
- Tamborski S, Lyu HC, Dolezyczek H, Malinowska M, Wilczynski G, Szlag D, Lasser T, Wojtkowski M, Szkulmowski M. **2016**. Extended-focus optical coherence microscopy for high-resolution imaging of the murine brain. *Biomed Opt Express*. 7(11):4400-4414. doi: 10.1364/BOE.7.004400.
- Targowski P, Rouba BJ, Karaszkiwicz P, Iwanicka P, Tymińska-Widmer L, Łękawa-Wysłouch T, Kwiatkowska EA, Sylwestrzak M. **2009**. Optical Coherence Tomography OCT – a novel tool for art conservation and cataloguing. *Conservation News*. 26/2009
- Tearney GJ, Regar E, Akasaka T, Adriaenssens T, Barlis P, Bezerra HG, Bouma B, Bruining N, Cho JM, Chowdhary S, Costa MA, de Silva R, Dijkstra J, Di Mario C, Dudek D, Falk E, Feldman MD, Fitzgerald P, Garcia-Garcia HM, Gonzalo N, Granada JF, Guagliumi G, Holm NR, Honda Y, Ikeno F, Kawasaki M, Kochman J, Koltowski L, Kubo T, Kume T, Kyono H, Lam CC, Lamouche G, Lee DP, Leon MB, Maehara A, Manfrini O, Mintz GS, Mizuno K, Morel MA, Nadkarni S, Okura H, Otake H, Pietrasik A, Prati F, Räber L, Radu MD, Rieber J, Riga M, Rollins A, Rosenberg M, Sirbu V, Serruys PW, Shimada K, Shinke T, Shite J, Siegel E, Sonoda S, Suter M, Takarada S, Tanaka A, Terashima M, Thim T, Uemura S, Ughi GJ, van Beusekom HM, van der Steen AF, van Es GA, van Soest G, Virmani R, Waxman S, Weissman NJ, Weisz G. **2012**. International Working Group for Intravascular Optical Coherence Tomography (IWG-IVOC). Consensus standards for acquisition, measurement, and reporting of intravascular optical coherence tomography studies: a report from the International Working Group for Intravascular Optical Coherence Tomography Standardization and Validation. *J Am Coll Cardiol*. 59(12):1058-72. doi: 10.1016/j.jacc.2011.09.079.
- Ughi GJ, Marosfoi MG, King RM, Caroff J, Peterson LM, Duncan BH, Langan ET, Collins A, Leporati A, Rousselle S, Lopes DK, Gounis MJ, Puri AS. **2020**. A neurovascular high-frequency optical coherence tomography system enables in situ cerebrovascular volumetric microscopy. *Nat Commun*. 11(1):3851. doi: 10.1038/s41467-020-17702-7.

Wang N, Anderson RJ, Ashbrook DG, Gopalakrishnan V, Park Y, Priebe CE, Qi Y, Laoprasert R, Vogelstein JT, Williams RW, Johnson GA. **2020**. Variability and heritability of mouse brain structure: Microscopic MRI atlases and connectomes for diverse strains. *Neuroimage*. 222:117274. doi: 10.1016/j.neuroimage.2020.117274.

Wojtkowski M, Leitgeb R, Kowalczyk A, Bajraszewski T, Fercher AF. **2002**. In vivo human retinal imaging by Fourier domain optical coherence tomography. *J Biomed Opt*. Jul;7(3):457-63. doi: 10.1117/1.1482379.

World Health Organisations, "The top causes of death." 2018, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>

Yashin KS, Kiseleva EB, Gubarkova EV, Moiseev AA, Kuznetsov SS, Shilyagin PA, Gelikonov GV, Medyanik IA, Kravets LY, Potapov AA, Zagaynova EV, Gladkova ND. **2019**. Cross-Polarization Optical Coherence Tomography for Brain Tumor Imaging. *Front Oncol*. 9:201. doi: 10.3389/fonc.2019.00201.

Zbesko JC, Nguyen TV, Yang T, Frye JB, Hussain O, Hayes M, Chung A, Day WA, Stepanovic K, Krumberger M, Mona J, Longo FM, Doyle KP. 2018. Glial scars are permeable to the neurotoxic environment of chronic stroke infarcts. *Neurobiol Dis*. 112:63-78. doi: 10.1016/j.nbd.2018.01.007.

## II. SUMMARY OF PROFESSIONAL ACCOMPLISHMENTS



**Hubert Doleżyczek**

**Imaging vascular network and brain tissue changes in mouse models of ischemic stroke and glioblastoma using optical coherence tomography**

Doctoral thesis research carried out  
at the Laboratory of Molecular and Systemic  
Neuromorphology  
Nencki Institute of Experimental Biology  
Polish Academy of Sciences

**SUPERVISOR**

**Prof. Grzegorz Wilczyński †**

**Prof. Jakub Włodarczyk**

**SECOND SUPERVISOR**

**Prof. Maciej Wojtkowski**

**ASSISTANT SUPERVISOR**

**Dr Monika Malinowska**

Warsaw 2022

## Abstract

Both ischemic stroke and glioblastoma are brain diseases that affect enormous numbers of people around the world. The development of innovative techniques for *in-vivo* imaging of brain pathological changes may significantly accelerate the process of searching for new therapeutic agents. Such a technique is Optical Coherence Tomography (OCT).

OCT is a non-invasive, non-contact, interferometric imaging method based on detection of backscattered light from external and internal structural elements of the examined object. The source of contrast in this method is light scattering on the scanned brain structures without the need of administering additional contrast agents. OCT allows for fast, three-dimensional imaging with high resolution of a few microns. OCT technique is used clinically in eye diagnostics, experimentally e.g. in dermatology or cardiology and in basic research for imaging of biological tissues both *in-vitro* and *in-vivo*. The study presented in the dissertation aimed to evaluate the applicability of OCT for imaging of structural and angiographic changes in the brain of mice in models of phototoxic stroke and glioblastoma. Another aim of the study was an attempt to correlate of OCT signals with changes in the nervous tissue and vessels visualized histologically. For the dissertation, a prototype OCT system was developed, and optimized during subsequent stages of the project, and the method was validated for its usefulness in quantifying biomarkers that characterize lesion development.

First, I used an OCT system, which combined optical coherence microscopy, bright field microscopy and a system with a laser diode emitting a green light beam to induce a stroke. This system was designed to provide *in-vivo* imaging of the cerebral cortex through the cranial window 24 hours after a stroke. By means of the OCT, the cerebral vascular network was visualized with high temporal and spatial resolution before, during and after the stroke. A modified mouse model of phototoxic stroke was used, in which a single branch of the Middle Cerebral Artery was illuminated with green light. The stroke model was positively histologically verified. Using OCT I found that despite reperfusion of the brain's surface arteries 24 hours after the stroke, there was no blood flow in the vessels in the deeper regions of the cortex. Moreover, after 24 hours, the angiographic images in the area of the stroke showed an enhancement of the scattering signal in the area of large vessels.

Subsequently, the OCT system was optimized by changing the interferometer and the scanning beam type. This modification increased the stability of the OCT system, which had a positive effect on reproducibility and quality of acquired images during long-term imaging. The system was used for long-term (14 days) *in-vivo* imaging of glioblastoma tumor development in the mouse brain. For this experiment, a method was developed to inject GL261 glioblastoma cells into the cerebral cortex, which finally was covered with a cranial window. Histological staining at day 14 showed the presence of a solid tumor visible on the brain sections. Structural OCT images revealed hyporeflective (dark) tumor region, surrounded by a hyper-reflective (bright) region of normal tissue. Strong angiogenesis has been demonstrated in the area of glioblastoma growth at successive time points, with characteristic irregularly shaped newly formed vessels. Similar vessels were visualized histologically.

Finally, an assessment of angiogenesis in the ischemic area was performed and an attempt was made to correlate the hypo- and hyper-reflective areas with changes in the nervous tissue and vessels visualized histologically. In order to ensure more stable scanning parameters, the light source, a non-stable femtosecond laser, was replaced with a laser diode. Additionally, a green light beam was introduced into the interferometer to induce the focal (approx. 400  $\mu\text{m}$ ) stroke, which size was verified histologically. The region of the cortex with limited blood flow was clearly visible on angiographic images as a dark area devoid of blood vessels. During the next 14 days, blood vessels appeared in this area due to angiogenesis and reperfusion. During the first 7 days after the stroke, angiographic images revealed vessels mainly in the surface layer, and on day 14 also in the deeper layers of the cortex. On the third day after the stroke, structural OCT images showed a hyporeflective area in the ischemic core, the area of which was reduced by 70% on day 14. This area correlated with the area with microglia/macrophages present on stained sections of the brain. In some mice, the hyporeflective area was surrounded by a hyperreflective halo that correlated with the presence of activated astrocytes.

This study demonstrated that the prototype multifunctional OCT system is a good tool for stroke induction and imaging of early and late changes in the brain after stroke. The analysis of scattering signals identified in the ischemia area by OCT and their histological verification allowed for their correlation with changes at the cellular level. It has been shown that the OCT technique can be used to assess the growth of a mouse brain tumor *in-vivo* and to observe angiogenesis in its environment.



## **1. Introduction**

### **Stroke**

Stroke is a pathological condition caused by reduced perfusion affecting a particular area of the brain due to restriction of blood flow in cerebral vessels. Ischemic stroke occurs as a result of narrowing of the vessel lumen due to pathological conditions of the vessel wall or due to thrombotic or embolic material in the vessel lumen. In addition to ischemic stroke, hemorrhagic and subarachnoid strokes are identified, however, they are less common. This condition is one of the leading causes of death worldwide, and the number of patients is increasing every year (WHO, 2018). Thrombolytic drugs such as recombinant tissue plasminogen activator (rtPA) are used in the treatment of stroke, but the effectiveness of this therapy strictly depends on the time of drug administration after acute event (maximum is 4.5 hours) (Rabinstein et al., 2017). The search for an effective therapy that limits the size of the infarct area continues, catalyzing the need for further research into the pathophysiology of stroke. In order to develop a new pharmacological agent, adequate preclinical studies are necessary. Experiments conducted on laboratory animals are an important part of the research. Two main types of experimentally induced strokes can be distinguished - global ischemia and focal stroke. Commonly used models of focal brain stroke include thromboembolic photochemical stroke (photothrombotic), stroke induced by thrombin injection into the middle cerebral artery (MCA), direct coagulation of an MCA branch, or stroke induced by insertion of a monofilament surgical thread into the arterial lumen (Kowiański et al., 2009). However, it seems that among the above models, photothrombotic stroke offers a unique opportunity to induce ischemia within a reproducible area that depends on the diameter of the light beam directed at the cerebral cortex (Schroeter et al., 2002). This allows for the induction of a small stroke, which provides an opportunity to observe both the ischemic core and the ischemic penumbra. To analyze changes in the brain after stroke in real time, intravital imaging methods are desirable, allowing multiple observations with high resolution of the same area in a given animal.

### **Brain tissue changes after stroke**

As a result of ischemia, nerve cells deprived of oxygen and glucose are exposed to an energy deficit. In the absence of substrates, ATP synthesis is inhibited. ATP

deficiency disrupts basic cellular functions, resulting in membrane depolarization (due to inhibition of sodium-potassium pump activity), influx of chlorine and calcium ions, water, and cell swelling. Additionally, glutamate released during depolarization is not taken up from the extracellular space, leading to excitotoxicity. Ischemia induces inflammation, leading to an activation and migration of astrocytes and microglia (Lee et al., 2018). After a stroke, cerebral edema is also observed, which results from damage to the blood-brain barrier. Damaged neural tissue is removed by phagocytic cell activity, with resident microglia being activated first, then macrophages migrating from the bloodstream into the ischemic tissue (Margaritescu et al., 2009). In a temporal model of occlusion of the MCA, maximal numbers of activated microglia were observed on day 2 after stroke induction and migrating macrophages on day 4 (Schilling et al., 2005).

Two zones can be distinguished in the area of ischemia, the core of the lesion (infarct) and the area of penumbra surrounding the core. In the core, due to severe reduction in perfusion, necrosis occurs, where almost all cells die in a relatively short time. In contrast, a slow process of cell degeneration is observed in the penumbra area, mainly by programmed death (apoptosis), which can last for days or even weeks. The penumbra is an area of the brain with partial perfusion that prevents complete neuronal degeneration to some extent. In this area, nerve cells can regenerate if blood flow is restored (Paciaroni et al., 2009). In the penumbra, activated astrocytes along with microglia form a glial scar that separates the necrotic area from the intact neural tissue (Zbesko et al., 2018).

## **Angiogenesis**

After stroke, angiogenesis takes place in the ischemic area. Generally, new blood vessels are formed through the process of vasculogenesis or angiogenesis. Vasculogenesis is the process of vessel formation primarily at the embryonic stage, where endothelial cells are formed from hemangioblast stem cells. The endothelial cells then proliferate and form new vessels. In contrast, angiogenesis begins with the activation of endothelial cells within existing vessels. After degradation of the basement membrane and extracellular matrix, endothelial cells migrate to the target site, in response to chemoattractants such as vascular endothelial growth factor (VEGF) and fibroblast growth factor (bFGF) (Lamalice et al., 2007). In physiological states, angiogenesis occurs, for example, during wound healing and in the regeneration of

endometrial vessels during the menstrual cycle. The formation of new vessels often occurs in the course of pathological processes related to hypoxia, such as asthma or inflammation, including chronic inflammation of the gastrointestinal mucosa. Angiogenesis plays an important role during tumorigenesis, where newly formed blood vessels supply oxygen and nutrients to rapidly dividing cancer cells. In addition, strong vascularization of tumors facilitates tumor cell migration and metastasis formation (Swidzińska et al., 2006).

In the first few days after a stroke, some blood vessels (especially capillaries) degenerate. Only a rapid restoration of blood flow can limit the area of damage and at least partially restore the physiological functions of the nerve tissue. Blood flow improvement often occurs through an early spontaneous reperfusion, but an important process after stroke is the formation of a new vascular network in the area of ischemia (Hatakeyama et al., 2020). The process of angiogenesis affects the size of the lesion area and the recovery time of the tissue.

### **Glioblastoma**

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common brain tumor of glial origin and belongs to the primary intracranial tumors. It is characterized by extremely high invasiveness and rapid growth, leading to destruction of surrounding tissue. The World Health Organization has classified it as grade IV (highest) malignancy.

The macroscopic image of the tumor is heterogeneous. GBM is characterized by high cellular differentiation with marked atypia and extremely abundant proliferating cells. It is characterized by the formation of multiple infiltrates, intense angiogenesis, the presence of necrotic areas surrounded by zones of palisaded cells and hemorrhagic foci. Unfortunately, despite an ongoing search for appropriate therapy, no effective treatment for GBM has been found to date, and most patients die within months from the diagnosis (Rojek et al., 2015). GBM research has been conducted for years on both cell lines and laboratory animals. One of the more commonly used cell lines is GI261, which was obtained by injecting 3-methylchloranthene into the cerebral cortex of C57Bl/J6 mice. When injected into the brains of mice, GI261 cells form a solid tumor, similar to the GBM in humans.

To assess cerebral vascularization and angiogenesis, it is important to develop new, intravital minimally invasive imaging techniques. One potential technique appears

to be Optical Coherence Tomography (OCT) (Wojtkowski et al., 2002, Targowski et al., 2009, Srinivasan et al., 2013; Tamborski et al., 2016).

### **Optical Coherence Tomography (OCT)**

OCT is a non-invasive, non-contact, interferometric imaging method that relies on the detection of backscattered light on the external and internal structural elements of the object under study. This method is based on differences in the natural optical properties of the structures and does not require the use of additional contrast agents. OCT allows for rapid three-dimensional imaging of the objects under study with a high resolution of a few micrometers. The first work on OCT began in the late 20th century. In 1991, an OCT system was presented with which human retina and coronary arteries probes were imaged *in vitro* (Huang et al., 1991). In 1993, the utility of OCT as a method for *in vivo* imaging of the human eye was demonstrated (Fercher et al., 1993). Subsequent studies have shown that OCT imaging of the eye can be helpful in diagnosing diseases such as macular degeneration, macular edema, and retinopathy (Cocker et al., 1996). The utility of OCT for the imaging of choroidal neovascularization has also been observed (Hee et al., 1996). In the following years, the OCT technique developed rapidly. An important moment was the development of a new method for backscattered light detection using Fourier transformation and the construction of the first Fourier domain OCT (FD-OCT) system for *in vivo* imaging of the human eye (Wojtkowski et al., 2002). Fourier domain OCT differs from older tomographs by the presence of a spectrometer and the immobilization of a reference mirror, resulting in a more than 100-fold reduction in object scanning time and significantly higher system sensitivity. The high sensitivity of OCT is particularly important for intravital imaging where sample exposure time is strongly limited. Current optical tomographs require a small fraction of the light returning from the object ( $1/10^{10}$ ) so that lower power light sources can be used for imaging (Targowski et al., 2009). The most commonly used light sources in OCT scanners are femtosecond lasers with relatively high power and superluminescent diodes, which emit near-infrared light with high spatial coherence and a spectrum with significant spectral width.

In the OCT system, the beam of light coming from the source is split into two beams, the scanning beam and the reference beam. The scanning beam is directed using scanners to the object under study. The reference beam, on the other hand, reflects off the reference mirror and is directed back along the same optical path. OCT

measurements are based on the registration of the light beam resulting from the interference of the scanning beam scattered on the discontinuities of the examined structure with the reference beam reflected from the mirror. Analysis of the OCT signal from the imaged object provides information about the distribution of light scattering into the object (Z axis). The resulting single scan line in the Z-axis is called an A-scan. A composite of successive measurements (A-scans) taken along the beam moved perpendicular to the direction of incidence (X-direction) gives a two-dimensional image of the cross section (B-scan). The B-scan corresponds to the cross section of the object and its width is determined by the diameter of the scanning beam. By moving the beam along the Y axis, a three-dimensional image of the structure under study can be obtained (Fig. 1).

Different types of scanning beams such as Gaussian beam or Bessel beam can be used in the OCT systems. The Gaussian beam is created in an ideal laser cavity in which the energy density is concentrated to an optimally small size. This produces a basic transverse mode (a constant distribution of the electromagnetic field in the direction perpendicular to the beam propagation direction) in which the light intensity distribution is described by the Gaussian function. The beam resulting from this light generation has fully controllable and deterministic propagation parameters so that very precise localization of the light illuminating the sample is possible. A Bessel type beam is generated by passing the Gaussian beam through an axicon (a lens with a conical surface). The Bessel type beam has approximately twice the depth of field of the Gaussian beam for the same beam diameter (Fig. 2). This significantly affects the depth from which images can be obtained without moving the object along the Z axis (Nguyen et al., 2020). However, Bessel type beam-generating optics are more complicated and thus less stable and require more frequent calibration.

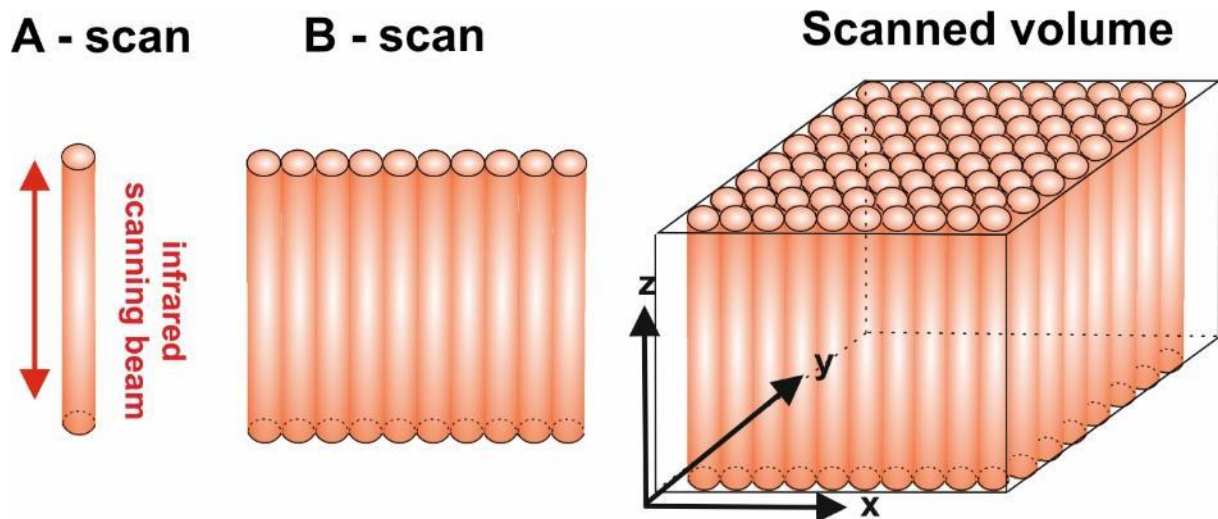


Fig. 1. Schematic of a scanned object using an infrared beam.

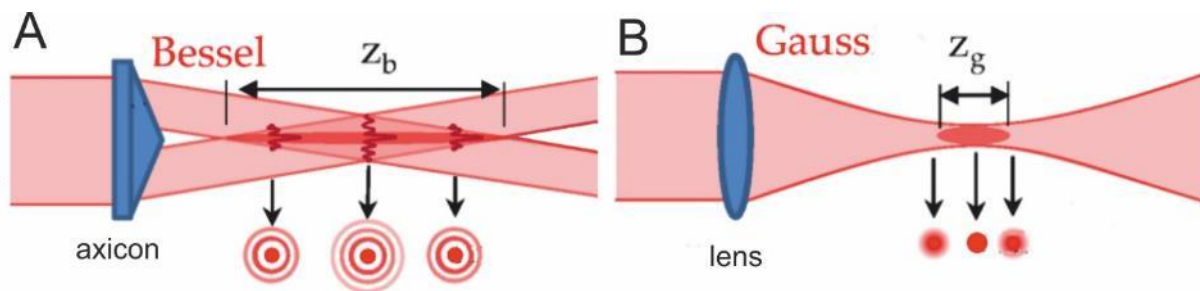


Fig. 2. Diagrams showing the differences between the Bessel beam and the Gaussian beam. (A) Bessel beam with much longer depth of field  $Z_b$ , than Gaussian beam  $Z_g$  (B) (modified from Nguyen et al., 2020).

### Applications of OCT in medicine and basic research

Because of its specific structure, the first organ to be studied using OCT was the eye. Initially, OCT was used to image the central part of the retina. Nowadays, however, the diagnostic range of OCT is much broader, and examples include imaging of the retina in the macular region, the optic nerve disc, retinal changes outside the macula, changes in the subretinal bleb, the choroid, the vitreous body or the cornea. Additionally, OCT allows for the diagnosis of glaucoma and evaluation of the therapy used.

Endoscopic OCT systems have been developed and improved for some time. Such endoscopes have applications in cardiology as a diagnostic tool in myocardial infarctions (Karimi and Gaolugahi, 2021). Successful trials of OCT-guided coronary angioplasty confirm the utility of this technique in interventions after myocardial

infarction. OCT allows for an accurate assessment of the pathology of the vessel wall, enabling high resolution detection of both plaque and thrombus in the arterial lumen (Tearney et al., 2012). Moreover, based on OCT images, it is possible to select the appropriate width and length of the stent, assess the effect of the procedure, and obtain information on the mechanism of any complications that may occur (Rychlak et al., 2019). Endoscopic OCT is also used to observe changes in the gastrointestinal tract, such as in the diagnosis of Barrett esophagus, gastric, small and large intestinal diseases, imaging of bile ducts, and other tissues and organs such as the bladder and bronchi. It is also used in ENT and gynecology (Gora et al., 2017). There have also been experimental trials of *ex vivo* and *in vivo* endoscopic OCT imaging of blood vessels in the brain (Ughi et al., 2020).

Due to its unique properties, OCT is increasingly being used for *in vitro* and *in vivo* tissue imaging in research. To make good use of the potential of the OCT technique, it is necessary to know the scattering and absorbing properties of the different structures under study. These properties significantly affect the resulting image of the object. For example, in the study of blood clots, OCT images were significantly different depending on the percentage of erythrocytes. The higher the red blood cell count of the clot, the more prominent the dispersion signal (Ding et al., 2021). The opposite was observed for brain slides with visible GBM. Densely arranged tumor cells strongly absorb light, which translates into a weak scattering signal (Yashin et al., 2019). Attempts are being made to distinguish skin cancer cells from normal cells using OCT. Recent studies demonstrate the utility of OCT in identifying squamous cell carcinoma (Lenoir et al., 2021) and basal cell carcinoma (Ruini et al., 2021).

OCT may find important applications in oncology for intraoperative surgical margin analysis of tumors. The limited ability to analyze tumor infiltration in margin areas is a significant challenge in oncology. Currently, this margin is examined in excised tissue. The first step is done during surgery and the second step is done after surgery. This approach is time-consuming and risks leaving cancer cells *in situ*. Studies performed to date indicate the potential utility of OCT tomography in surgical margin analysis (Foo et al., 2021; Obade et al., 2021; Dornbush et al., 2021).

OCT is also being researched for use in dentistry, where it can be a helpful method for detecting caries, demineralization of enamel, analysis of fillings, and visualization of dental root canals. Studies have also been conducted on the application of this technique to the imaging of cancerously altered oral tissues, and the



results indicate that OCT may be useful in delineating the area from which a biopsy is to be taken (Ali et al., 2021).

### **OCT as an angiographic method**

OCT is a method extremely sensitive to motion of the scanned objects. The scanned structures, being in motion, strongly modify the phase component of the signal measured from the light-scattering sample. This property allows very efficient filtering of the static signal and thus visualization of blood vessels without the use of additional contrast (Ossowski et al., 2015). An OCT angiographic image is obtained by comparing the scatter signal between consecutive B-scans taken at exactly the same location. In this way, angiographic cross-sectional images (B-scans) are obtained. The difference in phase contrast between consecutively taken B-scans with high temporal density allows imaging only moving objects. In the case of blood vessels, this comes down to imaging the movement of erythrocytes, which scatter light most strongly in the retrograde direction.

Initially, OCT angiographic images were performed during fundus imaging. OCT angiography of the eye can be used to diagnose the early stages of age-related macular degeneration. There is a view that reduced blood flow in the choroid of the eye may precede disease progression (Boltz, 2010). OCT angiography of retina in diabetic patients has also been shown to detect many retinal vascular and/or microvascular abnormalities, such as microaneurysms, vascular remodeling adjacent to the nonvascular zone of the fovea (ZF), enlarged ZF, and capillary tortuosity and dilatation (Carlo et al., 2015).

Currently, there are ongoing attempts to study brain vascularization using OCT in animal models (Tamborski et al., 2016). OCT may be useful for assessing hemodynamic changes after ischemic stroke, monitoring reperfusion, or evaluating angiogenesis (Dolezyczek et al., 2020a). OCT angiography allows us to analyze the *in vivo* vascularization of brain tumors, which is a very important parameter affecting tumor cell proliferation and the possibility of metastasis formation (Dolezyczek et al., 2020b).

### **OCT as a method of brain imaging**

The central nervous system is a good structure for OCT imaging because of its partial transparency to infrared light. The first attempts to image the central nervous

system *in vivo* were performed on embryos of the frog *Xenopus laevis* in 1996 (Boppart et al., 1996). Significant differences were observed in the scattering properties of the different brain structures. The authors compared OCT images with corresponding slides stained with hematoxylin and eosin (H/E), suggesting the possibility of using optical tomography instead of histological staining in some studies (Fig. 3).

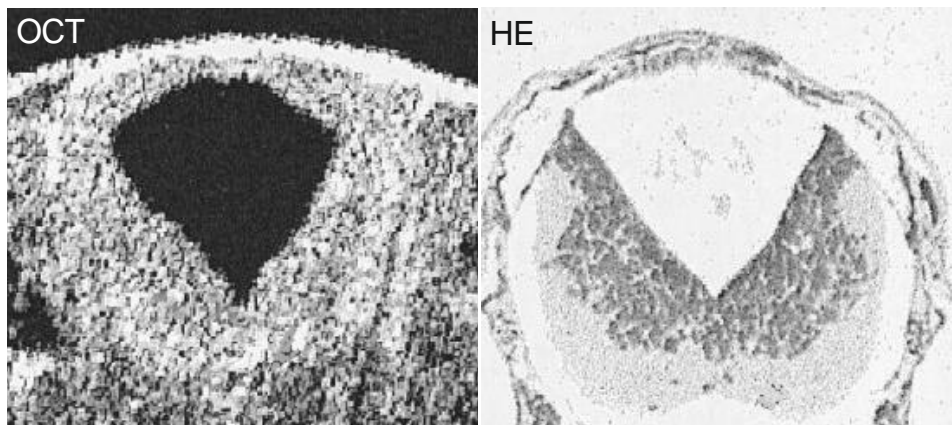


Fig. 3. First attempts at brain imaging with OCT. Comparison of OCT and H/E images of the *Xenopus laevis* hindbrain section. Figure taken from modified images from the paper by Boppart et al. (1996).

In 1998, the first *in vivo* imaging of the rat brain was performed through a surgically made hole in the skull. However, the method presented here allowed for single imaging, after which the animals were sacrificed for histological staining (Roper et al., 1998).

To use OCT for multiple brain imaging in the same individual, appropriate surgical procedures such as skull-thinning (Srinivasan et al., 2013) or cranial windowing (Tamborski et al., 2016). Therefore, currently, OCT for brain imaging is mainly used in research studies using laboratory animals. This limitation does not preclude the use of OCT during open brain surgery, where it can serve as an additional diagnostic tool.

In 2003, pioneering OCT brain imaging was performed through a special cranial window in a cat. Regional differences in scatter signal have been noted and have been associated with local changes in blood flow, cell morphology, or inflammatory changes in the brain (Maheswari et al., 2003).

Studies performed with OCT may also be useful for assessing neuronal plasticity. Both synapses and mitochondria are characterized by strong scattering

properties. Significant enhancement of scatter signal in M1 and S1 cortical areas of the left hemisphere has been demonstrated in a mouse model of chronic pain involving ligation of the right sciatic nerve (Ooi et al., 2006).

OCT as a non-invasive and non-contact method can be used for structural as well as angiographic imaging of brain tissue. However, one must keep in mind the technical limitations of OCT due to the ability of the scanning beam to penetrate deep into the imaged object.

### **OCT versus other brain imaging modalities.**

Current brain imaging modalities include magnetic resonance imaging (MRI), computed tomography (CT), ultrasonography (US), and two-photon excitation microscopy. Each of these techniques has certain advantages as well as disadvantages (Table 1). OCT has high spatial (one to several micrometers) and temporal (several seconds) resolution and uses a non-invasive infrared light beam for imaging. This is especially important when imaging the same area of the brain repeatedly. For example, the use of CT for multi-day observations of the brain may cause adverse effects of X-rays on the tissue. Furthermore, with appropriately selected OCT scanning protocols, both structural and angiographic data can be obtained during a single imaging.

Another technique used for brain imaging is MRI, which is based on electromagnetic radiation. Using MRI with a magnetic field of 1.5 Tesla, the course of stroke in a rat was imaged with a spatial resolution of approximately 1.5 mm (Chen et al., 2007). To increase the imaging resolution to 45  $\mu\text{m}$ , an experimental system with 9.5 Tesla magnetic field was built (Wang et al., 2020). However, even such MRI has much lower resolution than OCT.

Two-photon excitation microscopy is also used for high-resolution brain imaging in basic research. Two-photon excitation microscopy allows imaging of both blood vessels and nerve cells of the brain. However, it requires the use of additional contrast dyes administered intravenously or the use of transgenic laboratory animals (e.g., GFP mice) in experiments (Crowe and Ellis-Davies, 2018). The advantages and disadvantages of the listed techniques are summarized in Table 1.

Table 1. Advantages and disadvantages of selected methods for mouse brain imaging

Imaging method	Advantages	Disadvantages
MRI	Large field of view, possibility of whole brain imaging	Low resolution Use of contrast for angiography Exposure to electromagnetic fields
CT	Large field of view, possibility of whole brain imaging	Low resolution Use of contrast for angiography X-ray exposure
US	Non-invasiveness Small dimensions	Low resolution Limited imaging through the skull
Two-photon excitation microscopy	High resolution	The need for contrast use Limited Z-axis imaging depth The need for a cranial window or thinned-skull
OCT	Non-contrast imaging of both structure and vascularization High resolution Non-invasiveness of the scanning light.	Limited Z-axis imaging depth The need for a cranial window or thinned-skull

## **2. Aim of the study**

### **General objective**

The general objective of the paper was to evaluate the utility of the unique properties of OCT for assessing structural and angiographic changes in mouse cerebral cortex after ischemic photothrombotic stroke and in an experimental model of GBM.

### **Specific objectives**

The first specific objective of the paper was to develop an OCT system for imaging and analysis of changes in brain tissue and its vascularization in mouse models of ischemic stroke and GBM.

The second specific objective of the paper was to analyze structural and angiographic changes on OCT images of the brain and to try to correlate them with changes at the cellular level in neural tissue and vessels visualized by histological procedures.

### 3. Research Project

The research project included three stages. In order to obtain optimal and reproducible results, at each stage of the research the prototype OCT system was properly optimized in cooperation with the team of Physical Optics and Biophotonics, Institute of Physical Chemistry of the Polish Academy of Sciences, led by Prof. Maciej Wojtkowski. Schematics of the OCT systems used in the subsequent stages of the work are shown in Figure 4 and Figure 5.

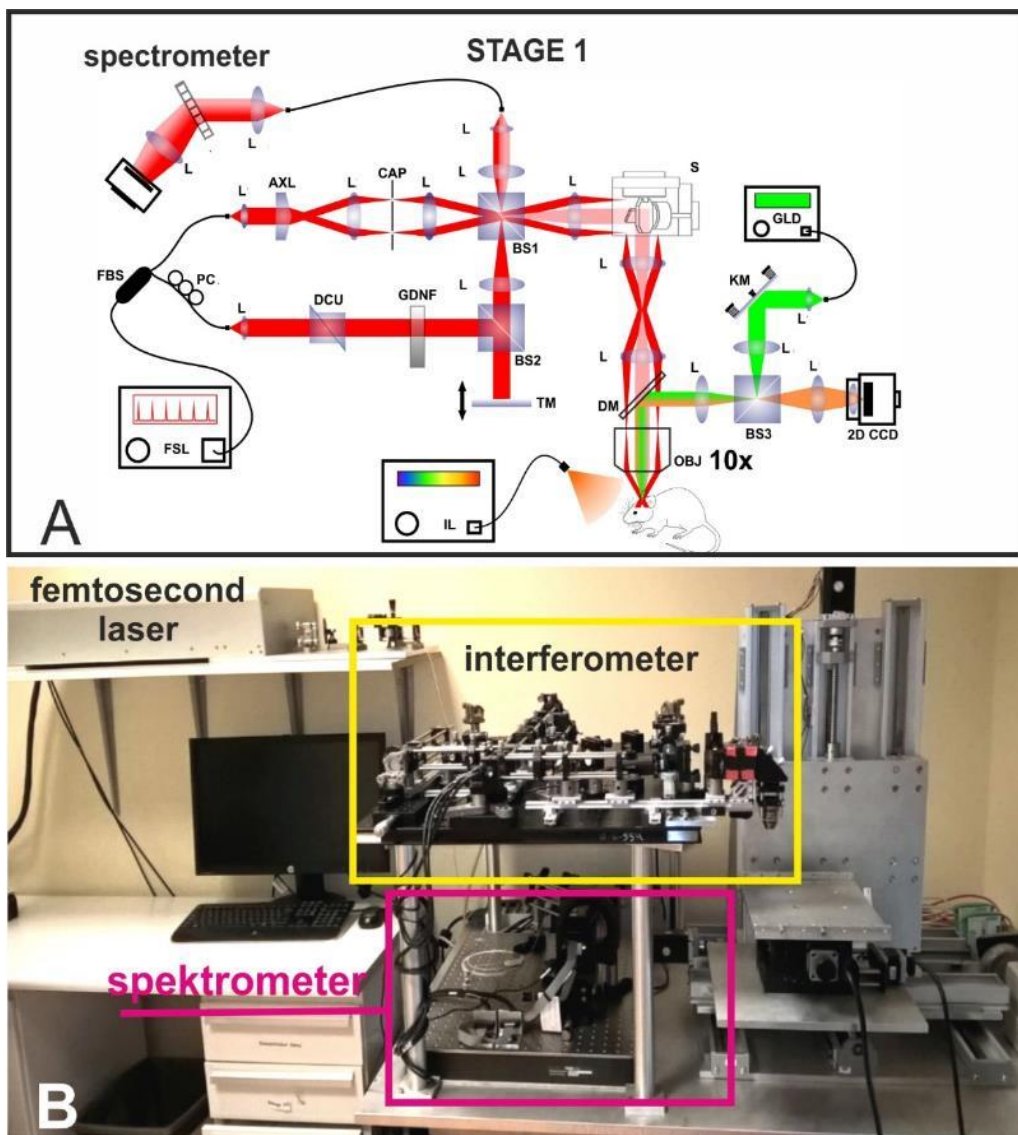


Fig. 4. OCT system with Mach-Zehnder interferometer used for imaging the mouse brain in the first stage of the study with the Bessel beam, a 10x lens, and a green light emitting diode for stroke induction (GLD). (A) Schematic of the system, (B) photo of the system with the light source (femtosecond laser), interferometer and spektrometer marked. A detailed description of all optical components is provided in the accompanying publication 1 (Dolezyczek et al., 2020a).

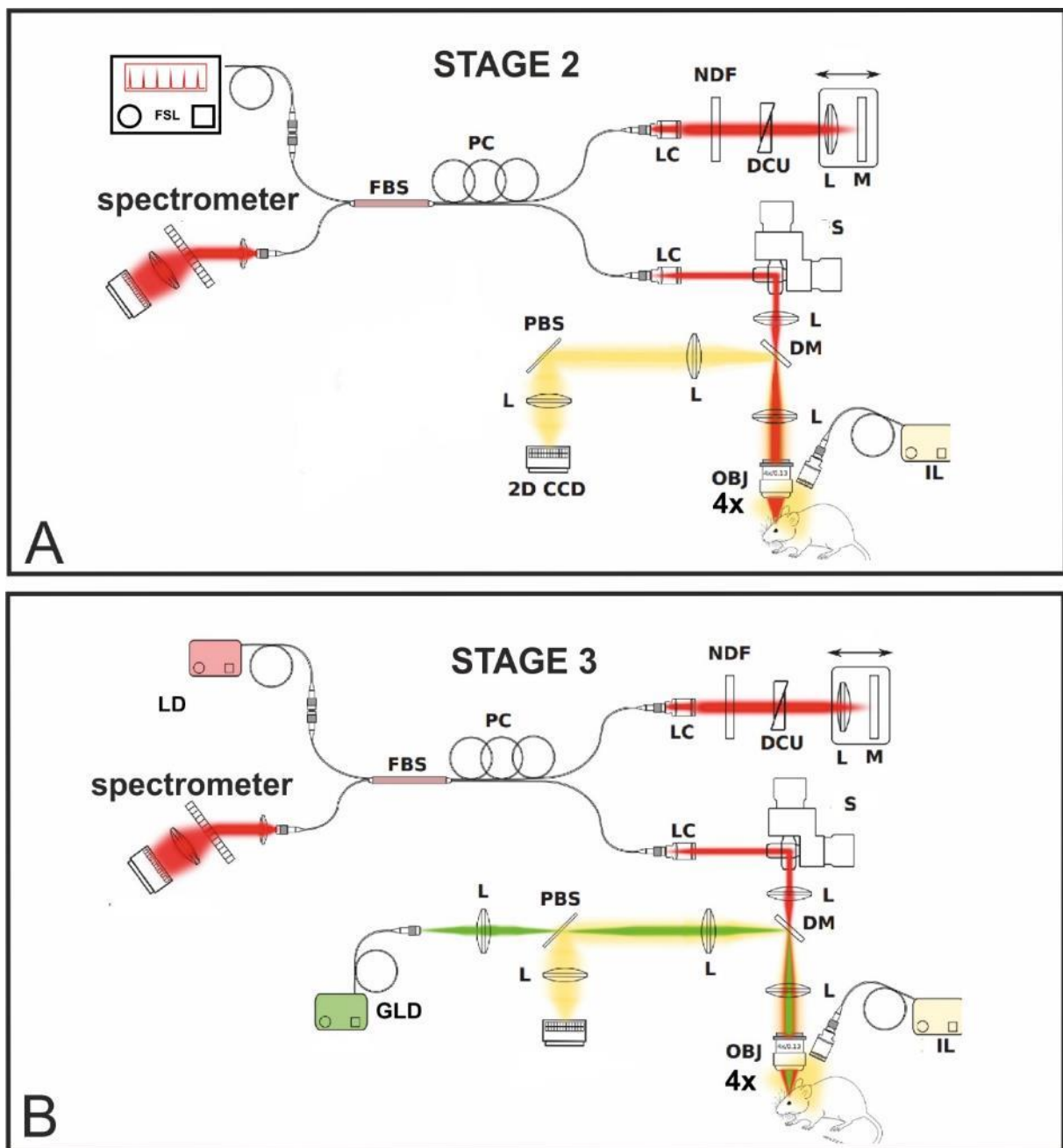


Fig. 5. OCT with a Michelson interferometer. (A) The system used in the second stage of the study with the Gaussian beam and a 4x lens. (B) A system with an additional optical path for green light and a laser diode (LD) as a light source, used in the third stage of research. A detailed description of all the optical elements used in the second and third stages of the study is included in publication 2 (Dolezyczek et al., 2020b) and publication 3 (Dolezyczek et al., 2022).



## Summary of the first stage of the study (Publication 1).

Results from this stage are detailed in the following publication:

**Dolezyczek H, Tamborski S, Majka P, Sampson D, Wojtkowski M, Wilczyński G, Szkulmowski M, Malinowska M. *In vivo* brain imaging with multimodal optical coherence microscopy in a mouse model of thromboembolic photochemical stroke. *Neurophotonics*. 2020 Jan;7(1):015002.**

In the first stage, the OCT system was constructed, which consisted of a Mach-Zehnder type Bessel beam inducing interferometer with a  $\times 10$  lens, a spectrometer, and a viewing camera (Fig. 4A, B). The light source for the beam scanning brain tissue through the implanted cranial window (Fig. 6) was a femtosecond laser (Fusion Femtolasers, Austria). A laser diode emitting a green light beam for photothrombotic stroke induction was embedded in the OCT system. What is significant about this prototype is that the optical paths of the scanning beam and the green light beam ran through the same lens. This system was built for real-time imaging of early changes in the ischemic region after stroke.

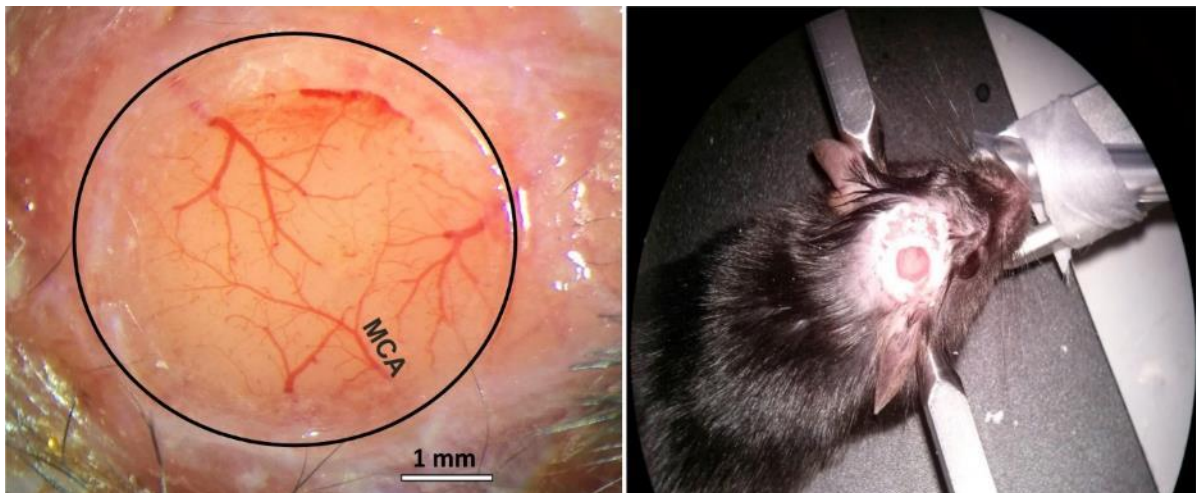


Fig. 6. Vascularization of the mouse cerebral cortex surface as seen through a cranial window located over the branch of the MCA, and a C57Bl/J6 mouse prepared for OCT imaging.

The developed stroke model was induced by green light irradiation of a selected branch of the MCA. The animal was administered Rose Bengal, which was activated in the

artery at the site of irradiation after entering the bloodstream. This caused thrombus formation and local ischemia of brain tissue (Fig. 7).

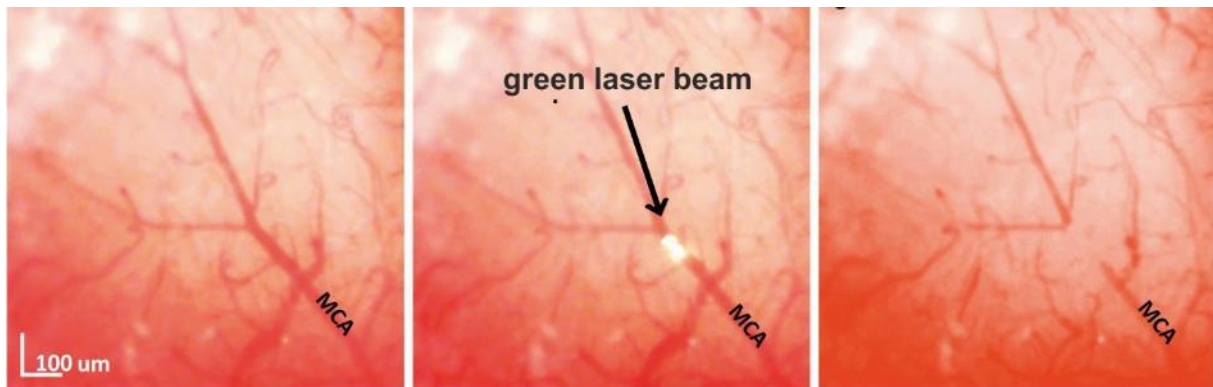


Fig. 7. Induction of photothrombotic stroke by irradiation of a single branch of the MCA. Images taken with the preview camera, bright-field technique, before stroke (left), during exposure (middle), and 1 hour after stroke (right).

### Key findings

The efficacy of the developed stroke method was confirmed histologically by H/E staining, (Figure 8A, B), FluoroJade (FJ), (Figure 8 C, D), and 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining, (Figure 8E) and by 3D reconstruction of FJ-stained serial slides (Figure 8F-I). There was wide variation in the size, extent, and shape of the area containing degenerating neurons, and in individual mice the area of ischemia involved different parts of the cortex.

Mouse brain imaging resulted in structural and angiographic B-scans, which are Z-axis cross-sections of the brain (max depth approximately 600 μm). When all structural or angiographic B-scans from the scanned area were flattened in the Z-axis, structural maps or angiographic maps (angiomaps) were obtained, respectively. Structural images give information about the scattering properties of individual tissue elements, and angiographic images give information about the movement of erythrocytes in blood vessels. Analysis of OCT images revealed significant differences in scatter signal before, during, and after stroke. In the structural B-scans, the scatter signal, well visible before stroke (0 min), partially disappears in the ischemic area at subsequent time points (20 min and 24 h), (Fig. 9A). Structural images also visualized thrombus formation in the arterial lumen at the site irradiated with the green laser (Fig. 9B).

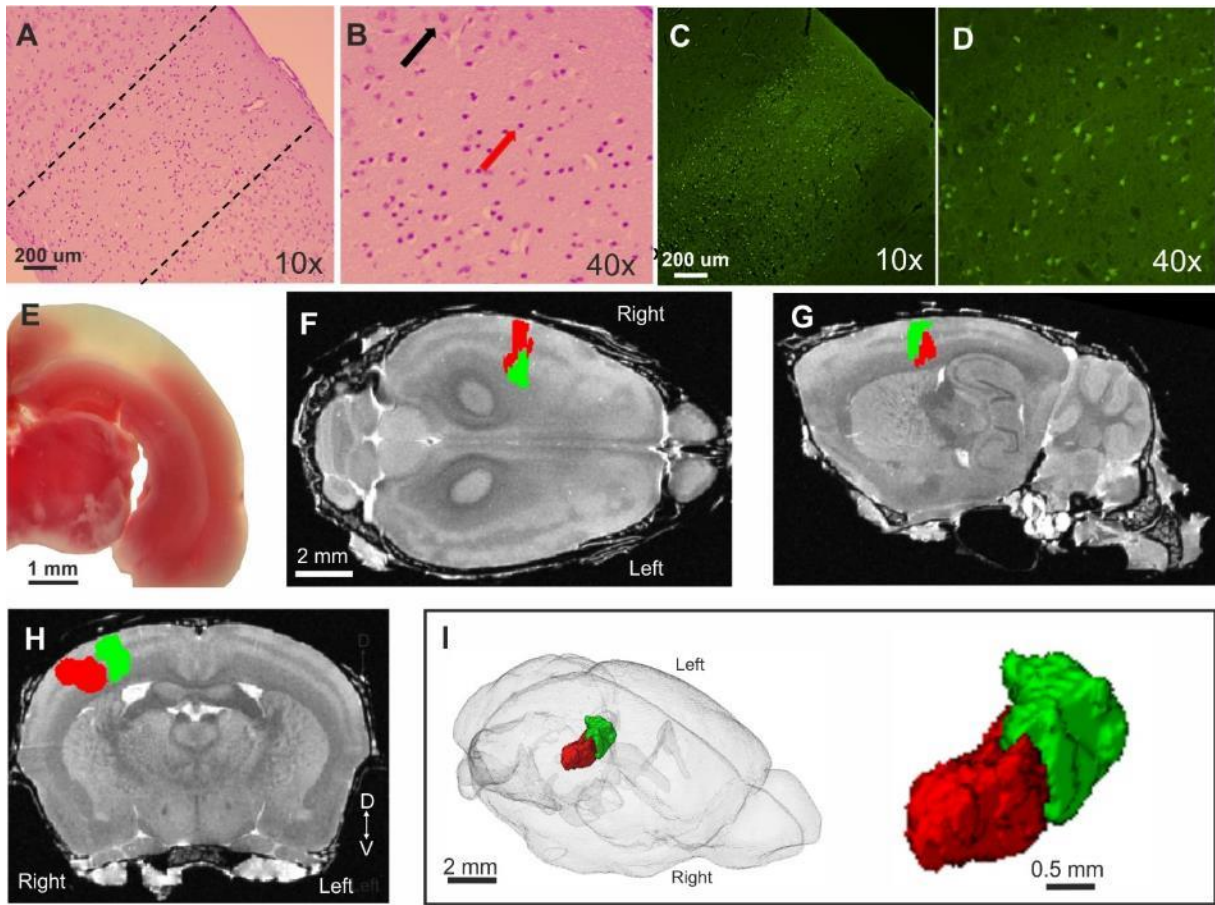


Fig. 8. Histological evaluation of the ischemic area and 3D reconstruction of the ischemic core 24 hours after stroke. (A-B) H/E-stained brain slides, area between dashed lines with darkly stained dying cells (example cell indicated by red arrow), black arrow indicates normal cell. (C-D) FJ staining with visible degenerating neurons. (E) TTC stained brain slide with a bright area of ischemia. (F-I) 3D reconstruction of the area with degenerating neurons made from serial FJ-stained brain slides.



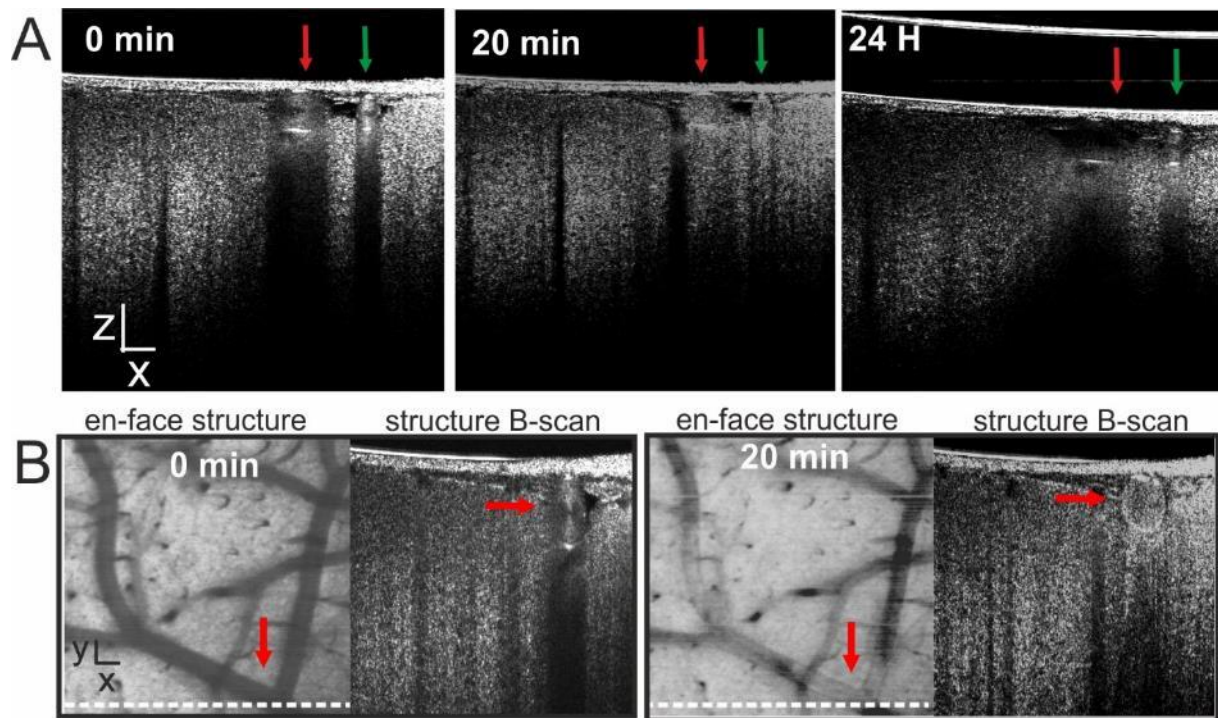


Fig. 9. OCT structural images. (A) B-scans of the structure at consecutive time points. Arrows indicate the cross section of MCA branches, above the green laser-illuminated branch. (B) Maps and structural B-scans showing thrombus formation at the exposure site (red arrow), the white dashed line delineates the cross section presented in the B-scans. Scale = 100  $\mu$ m.

B-scan angiography (Figure 10) showed a restriction of blood flow in the MCA branch after stroke (20 minutes, red arrow), in the form of disappearance of signal from flowing erythrocytes. In addition, a persistent loss of signal from capillary vessels from deeper layers of the cortex (below 100  $\mu$ m from the surface) was demonstrated after 20 minutes to 24 hours, despite partial reperfusion in the superficial artery (Fig. 10A, B, 24 hrs). The above result was confirmed by quantitative data based on angiomaps (Fig. 10B). There was a gradual increase in total blood flow in the superficial layers (between 35 min and 24 h) in contrast to a consistently limited blood flow in the deeper layer (320-640  $\mu$ m), (Figure 10B, graph). In addition, after 24 hours, an enhancement of the scattering signal in the large vessel region was observed on B-scans in the stroke area (Figure 10A, 24 hours). Additional assessment of superficial vascularization after stroke, using images from the preview camera, showed the onset of partial reperfusion at 1 hour in 11% and at 24 hours in 56% of mice (Fig. 10C).

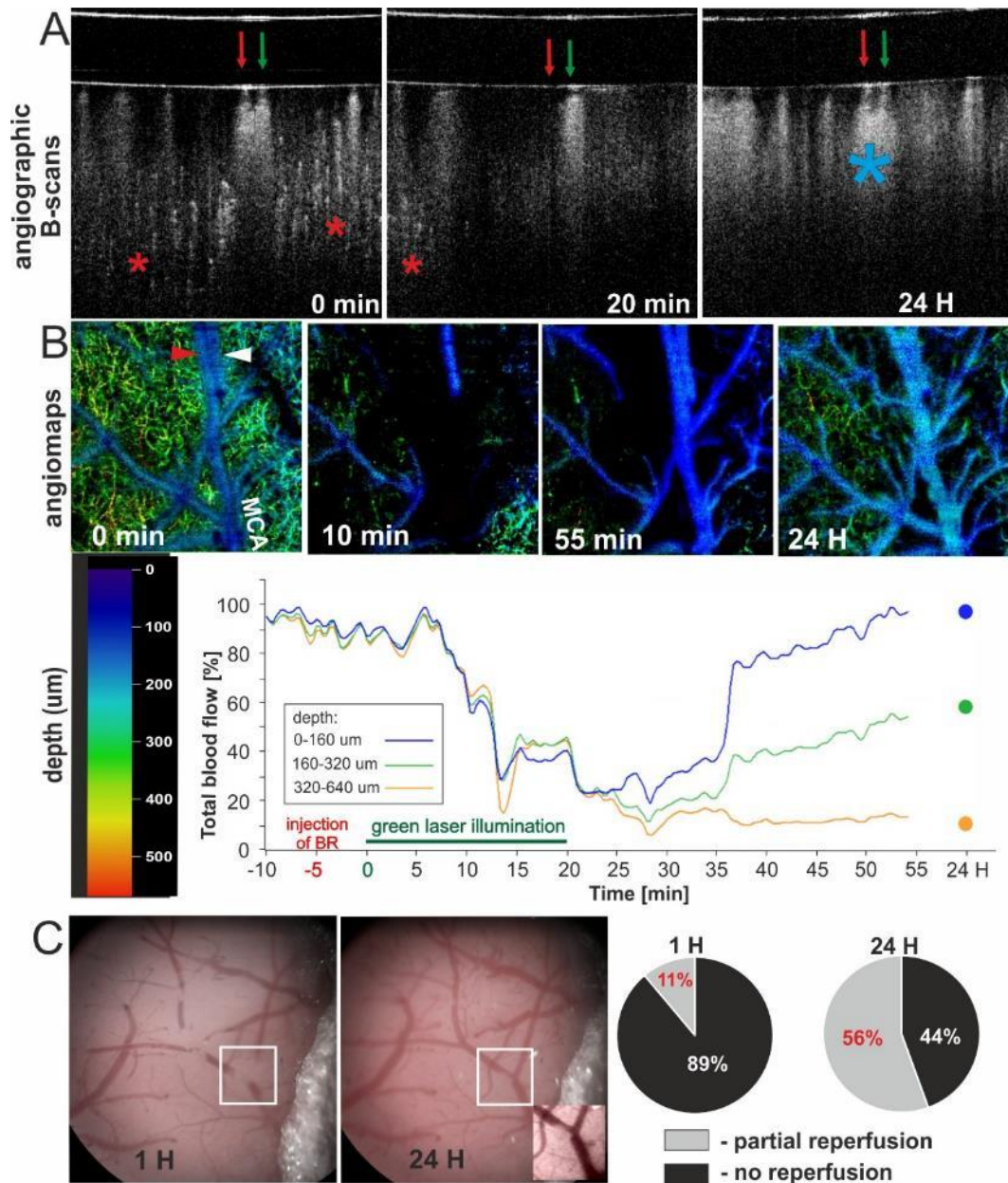


Fig. 10. Analysis of mouse brain vascularization after stroke using the OCT system. (A) B-scans of angiography showing blood flow loss in vessels after stroke. Red arrow - exposed artery, green arrow - vein parallel to artery, red asterisks - signal from vessels in deeper areas of cortex, blue asterisk - enhanced signal under surface vessels 24 hours after stroke. (B) Angiographic maps showing changes in blood flow at selected time points and a graph showing blood flow at each cortical depth. (C) Photographs of the superficial cerebral vasculature taken with the preview camera to assess reperfusion in the exposed artery. Scale = 100  $\mu$ m.

## Summary of the second stage of the study (Publication 2).

Results from this stage are detailed in the following publication:

**Dolezyczek H, Rapolu M, Niedzwiedziuk P, Karnowski K, Borycki D, Dzwonek J, Wilczynski G, Malinowska M, Wojtkowski M. Longitudinal in-vivo OCM imaging of glioblastoma development in the mouse brain. Biomed Opt Express. 2020 Aug 12;11(9):5003-5016.**

In the second stage, the OCT system was optimized by replacing the Mach-Zehnder interferometer generating the Bessel type scanning beam with a Michelson interferometer generating the Gaussian scanning beam. A  $\times 4$  lens was used, which allowed a larger area of the cortex to be scanned ( $x, y, z - 2.8 \text{ mm} \times 2.8 \text{ mm} \times 2 \text{ mm}$ ), (Fig. 5A). Such a modified system was verified in imaging of GBM tumors in the mouse brain. This was a globally unique application of intravital visualization of brain tumor development in mice using OCT. For this experiment, a method was developed to inject mouse GI261 GBM cells using a Hamilton syringe into the cerebral cortex, which was then covered by a cranial window (Fig. 11). Brain imaging was conducted at time points, i.e. day 1, 3, 11 and 14. The vascularization and dynamics of tumor growth were analyzed using the acquired OCT images. The resulting OCT images of GBM after 14 days were correlated with tumor images seen on H/E-stained brain slides.

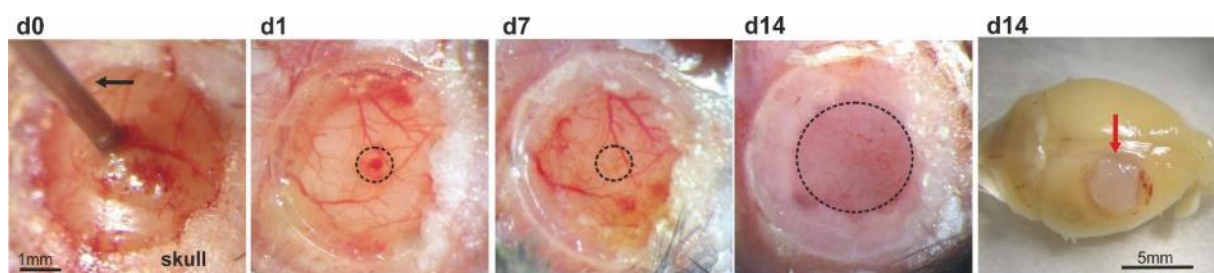


Fig. 11. Implantation of GBM cells and tumor growth at 14 days. (d0) Black arrow points on the needle of Hamilton syringe used for delivery of the cells. (d1-d14) Stages of tumor growth. Images taken under the operating microscope.



### Key findings:

The developed method of injecting mouse GBM cells was positively verified by H/E staining. At day 14, this staining showed the presence of a tumor visible on the brain slides as a dark purple area surrounded by healthy pink tissue (Fig. 12A-C). Structural B-scans also highlighted the area covered by the tumor, visible as a hyporeflexive region (with weak scatter signal), surrounded by an area of healthy tissue, visible as a hyperreflective region (with strong scatter signal), (Fig. 12D-F).

Based on structural B-scans and structural maps, we observed the dynamics of tumor growth, which, for example, in mice (M1) was 0.6 mm in diameter at day 3, 2 mm at day 11, and 2.3 mm at day 14. Angiographic images showed strong angiogenesis in the GBM growth area, with characteristic newly formed irregularly shaped vessels (Fig. 13A-D). Similar vessels were visualized histologically on brain slides using H/E staining. (Fig. 13E-F).

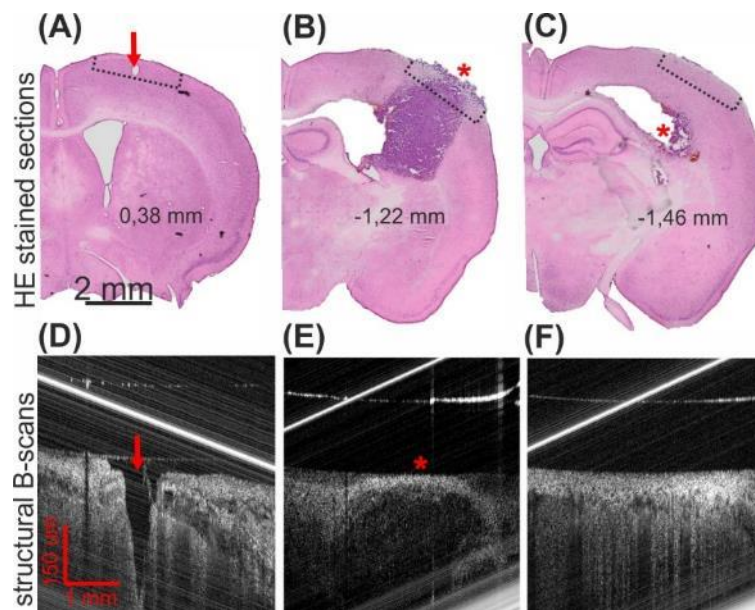


Fig. 12. Correlation of signals seen on OCT images with tissue changes visualized by H/E staining, (A, D). Needle site marked with a red arrow. (B, E) Tumor marked with a red asterisk. (C, F) Control area with no visible tumor in the cortex.



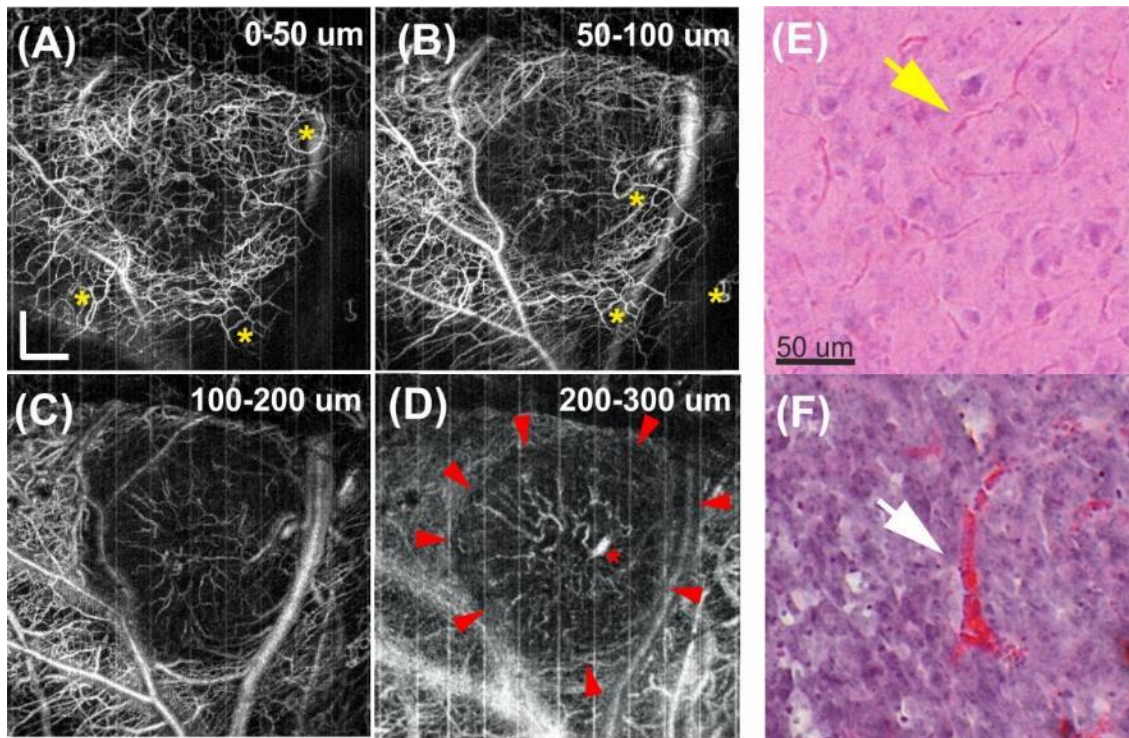


Fig. 13. Vascularization of a GBM tumor at day 14 of development. (A-D) Angiographic maps at different depths of the cerebral cortex. Yellow stars show abnormal newly formed blood vessels. Scale = 400  $\mu$ m. (E) Normal blood vessels, H/E staining (yellow arrow). (F) Dilated blood vessel in tumor, similar vessel seen on angiomap (D, red asterisk).

### **Summary of the third stage of research (Publication 3).**

Results from this stage are detailed in the following publication:

**Doleżyczek H, Kasprzycki P, Włodarczyk J, Wojtkowski M, and Malinowska M. Optical Coherence Tomography reveals heterogeneity of the brain tissue and vasculature in the ischemic region after photothrombotic stroke in mice. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, vol: 82, 2022.**

In the third stage, the area of brain ischemia was evaluated by OCT and histological staining in a focal stroke model. Another optimization of the OCT system was performed to provide more stable imaging parameters. The unstable femtosecond laser was replaced with a laser diode (Superlum M-T-850-HP-I), eliminating the need to calibrate the scanning beam light source. In addition, a green light emitting diode was added to the Michelson interferometer for the induction of photothrombotic stroke in mice. As in the first stage of the project, the optical paths of the scanning beam and the green light beam for stroke induction ran through the same x4 lens. The diameter of the green light beam at the core was set to 400  $\mu\text{m}$  to illuminate a small area of the cortex excluding large blood vessels. Changes in the ischemic area at 14 days after stroke induction were analyzed from OCT images. The angiogenesis/reperfusion process at time points 25 minutes and 3, 7 and 14 days after its induction were quantified. The correlation of OCT scatter signals in hyporeflective and hyperreflective regions in the core and penumbra with cell-level changes in neural tissue, visualized by histological procedures, was investigated.

#### Key findings:

On the basis of OCT imaging and histological staining, the stroke induction method used was shown to produce an area of ischemia of reproducible size in the group of mice studied. The region of cortex with restricted blood flow was clearly visible on angiographic images, B-scans, and angiomaps (Fig. 14), immediately after the end of green laser irradiation as a dark area, devoid of blood vessels, with a diameter of 200 to 500  $\mu\text{m}$  (Fig. 14B, G). Over the next 14 days, blood vessels became visible in the area due to angiogenesis/reperfusion (Fig. 15C-D, H-J). On days 3 and 7 after stroke, angiographic B-scans showed blood flow, mainly in the superficial layer of the

cortex (Fig. 14H, I, white asterisk). On day 14, the angiographic signal was also visible in the deeper layers of the cortex (Fig. 14J).

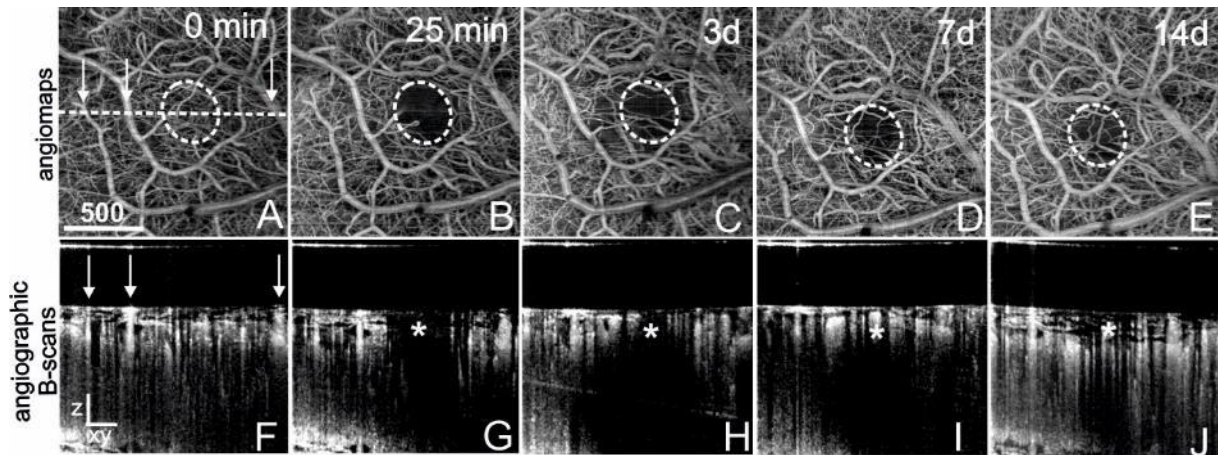


Fig. 14. Angiographic images illustrating changes in mouse cerebral vascularization during 14 to stroke. (A-E) Angiomaps, (F-J) B-scans. The area of restricted blood flow was surrounded by a white dashed line on angiomaps and asterisks on B-scans. Arrows indicate large surface vessels. The straight dashed white line marks the location from which the B-scans were presented. Scale  $z = 100 \mu\text{m}$ ;  $x,y = 200 \mu\text{m}$ .

Based on the angiomaps, quantitative analysis of the angiogenesis/reperfusion process was performed at consecutive time points (Fig. 15). Parameters characterizing vascularization in the ischemic area were analyzed, i.e., vessel area, total branch length, number of branches, number of branching sites, and number of vessel endings. The results indicated the presence of intense angiogenesis mainly in the first 7 days after stroke induction (Fig. 15B-F).

On the third day after stroke, a characteristic hyporeflective region at the site of green light irradiation was observed on structural OCT images (Fig. 16C, H). Statistical analysis showed that this area decreased by 40% on day 7 and by 70% on day 14 (Fig. 16A). The hyporeflective area on structural images from the ischemic region correlated with the presence of densely packed cells with irregular, intensely stained nuclei with little cytoplasm, present on H/E-stained brain slides (Fig. 16L) and with microglia/macrophages immunocytochemically stained for IBA-1 (Fig. 16La). The hyporeflective area on structural images in some mice was surrounded by a hyperreflective ring (Fig. 17A), which correlated with the presence of activated, hypertrophic astrocytes stained for GFAP (Fig. 17M and Fig. 18B). The widths of hypo-

and hyperreflective areas were not statistically different from those of areas labeled for Iba-1 and GFAP (Fig. 18).

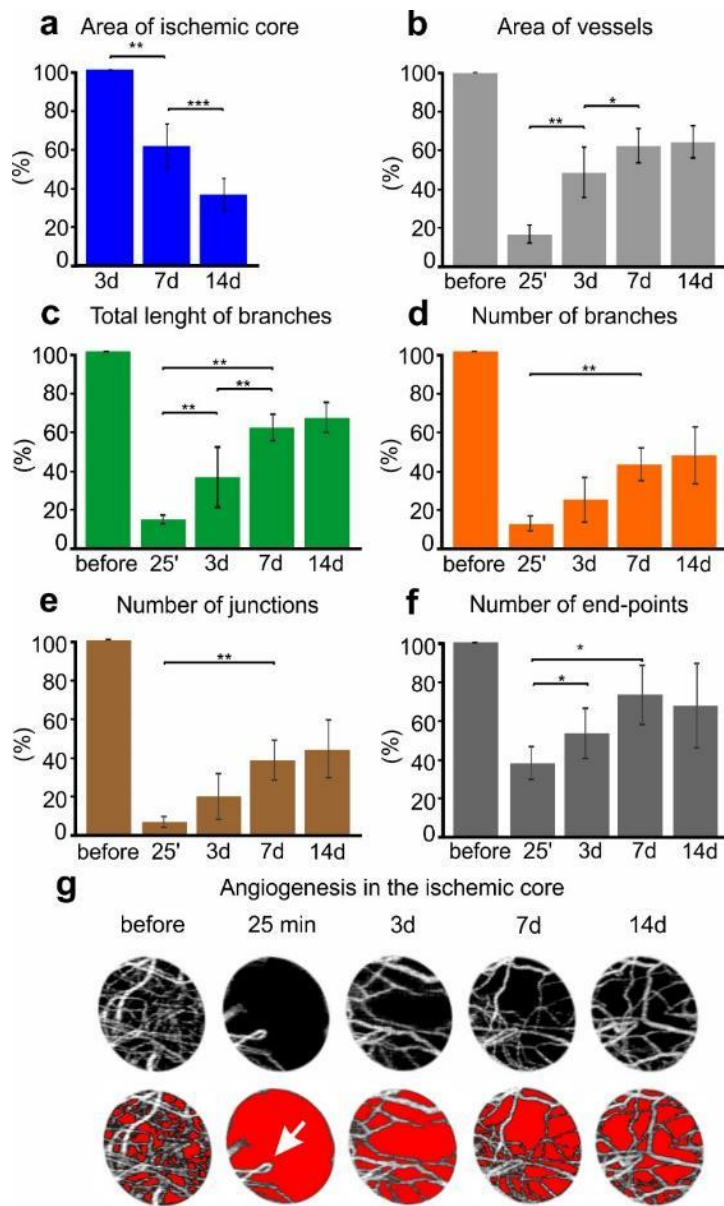


Fig. 15. Quantitative analysis of ischemic area at 14 days. (A) Area of the hyporeflective region seen in the structural maps (n=7). (B-F) Measurements of parameters characterizing the vascularization of the central part of the ischemic area (n=6). (G) Examples of the central part of the ischemic area, upper panel original OCT images, lower panel after segmentation (in ImageJ software). Error bars represent standard deviation \*p≤0.05, \*\*p≤0.01, \*\*\*p≤0.001 (Wilcoxon test)



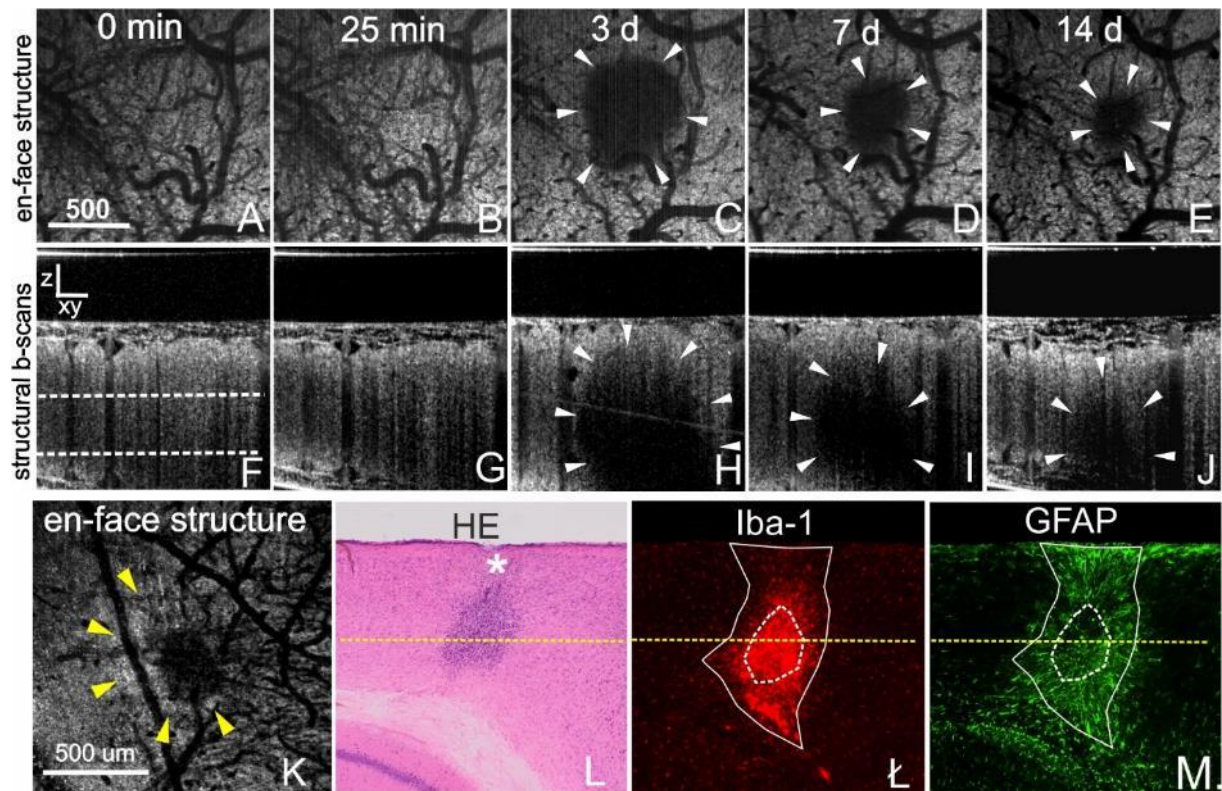


Fig. 16. Structural OCT images and correlation of OCT signal with the presence of specific cell populations in the stroke core region. (A-E) Structural maps and (F-J) B-scans showing changes in signal scatter at successive time points. White arrowheads indicate a hyporeflective stroke core. (K-M) Correlation of hyporeflective core and hyperreflective penumbra (yellow arrowheads) with microglia cells (Iba-1) and activated astrocytes (GFAP). White dashed lines indicate the depth interval depicted on the angiograms (A-E). The yellow lines mark the depth of the structural map (K).

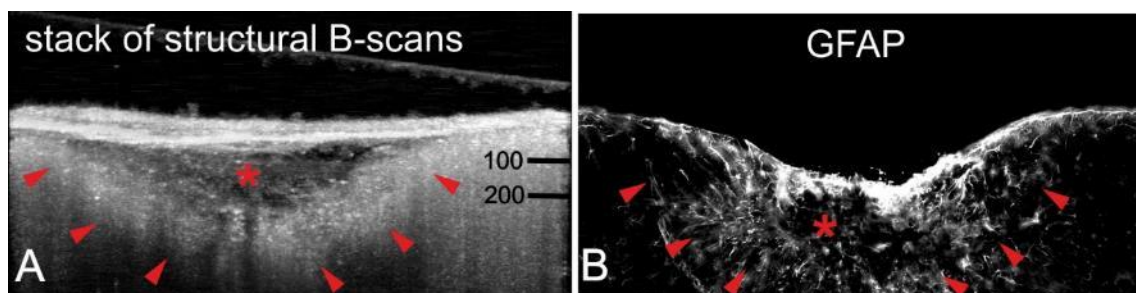


Fig. 17. Correlation of the hyperreflective (A) area (red arrowheads) surrounding the stroke core (red asterisks) with immunocytochemically labeled astrocytes (B).

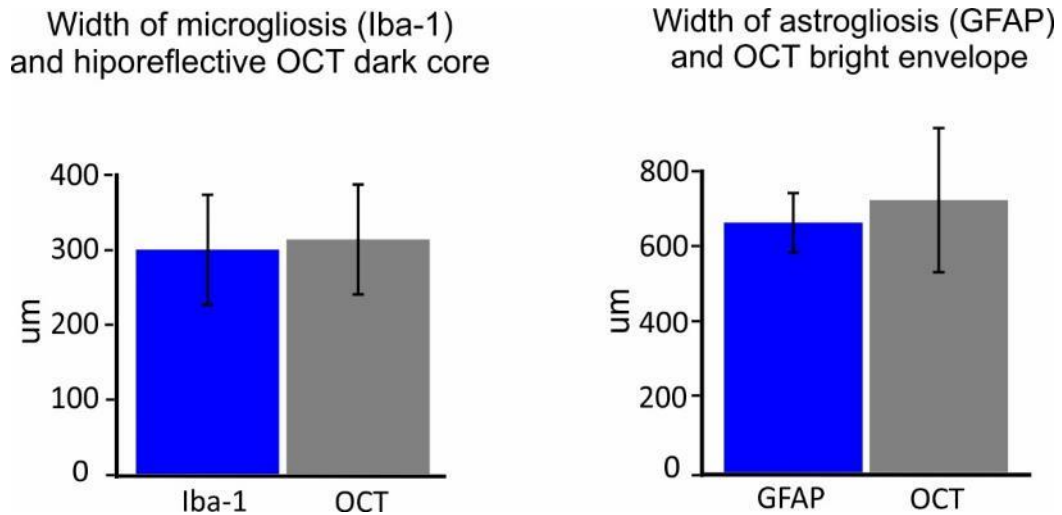


Fig. 18. Quantitative analysis of the correlation of the width of hypo- and hyperreflective areas on OCT images with the width of areas immunocytochemically stained with Iba-1 and GFAP at day 14 after stroke induction. n=6 (no statistically significant differences, Wilcoxon test).

#### 4. Conclusions

- As a result of this study, a prototype multifunctional OCT system was shown to combine the functionality of a stroke induction tool with imaging and quantification of the effects of this process, both for early and late changes in the brain due to ischemia.
- Analysis of the characteristic scattering signals identified in the ischemic area by OCT and their histological verification allowed their correlation with changes at the cellular level.
- We show for the first time that the OCT technique can be used for the intravital assessment of mouse brain tumor growth and quantitative analysis of angiogenesis in the surrounding area.
- The methods presented in the paper can be used to evaluate the efficacy of potential pharmacological agents for the treatment of stroke and GBM.

## 5. References

- Ali S, Gilani SBS, Shabbir J, Almulhim KS, Bugshan A, Farooq I. 2021. Optical coherence tomography's current clinical medical and dental applications: a review. *F1000Res*. 22;10:310. doi: 10.12688/f1000research.52031.1.
- Boltz A, Luksch A, Wimpissinger B, Maar N, Weigert G, Frantal S, Brannath W, Garhöfer G, Ergun E, Stur M, Schmetterer L. 2010. Choroidal blood flow and progression of age-related macular degeneration in the fellow eye in patients with unilateral choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 51(8):4220-5. doi: 10.1167/iovs.09-4968.
- Boppart SA, Bouma BE, Brezinski ME, Tearney GJ, Fujimoto JG. 1996. Imaging developing neural morphology using optical coherence tomography. *J Neurosci Methods*. 70(1):65-72. doi: 10.1016/S0165-0270(96)00104-5.
- Carlo TE, Romano A, Waheed NK, Duker JS. 2015. A review of optical coherence tomography angiography (OCTA). *Int J Retina Vitreous*. 1:5. doi: 10.1186/s40942-015-0005-8.
- Chen F, Suzuki Y, Nagai N, Jin L, Yu J, Wang H, Marchal G, Ni Y. 2007. Rodent stroke induced by photochemical occlusion of proximal middle cerebral artery: evolution monitored with MR imaging and histopathology. *Eur J Radiol*. 63(1):68-75. doi: 10.1016/j.ejrad.2007.01.005.
- Coker JG, Duker JS. 1996. Macular disease and optical coherence tomography. *Curr Opin Ophthalmol*. 7(3):33-8. doi:10.1097/00055735-199606000-00006.
- Crowe SE, Ellis-Davies GC. 2014. Longitudinal in vivo two-photon fluorescence imaging. *J Comp Neurol*. 522(8):1708-1727. doi:10.1002/cne.23502
- Ding Y, Abbasi M, Eltanahy AM, Jakaitis DR, Dai D, Kadirvel R, Kallmes DF, Brinjikji W. 2021. Assessment of Blood Clot Composition by Spectral Optical Coherence Tomography: An In Vitro Study. *Neurointervention*. 16(1):29-33. doi: 10.5469/neuroint.2020.00297.
- Doleżyczek H, Tamborski S, Majka P, Sampson D, Wojtkowski M, Wilczyński G, Szkulmowski M, Malinowska M. 2020a. In vivo brain imaging with multimodal optical coherence microscopy in a mouse model of thromboembolic photochemical stroke. *Neurophotonics*. 7(1):015002. doi: 10.1117/1.NPh.7.1.015002.
- Doleżyczek H, Rapolu M, Niedzwiedziuk P, Karnowski K, Borycki D, Dzwonek J, Wilczynski G, Malinowska M, Wojtkowski M. 2020b. Longitudinal in-vivo OCM imaging of glioblastoma development in the mouse brain. *Biomed Opt Express*. 11(9):5003-5016. doi: 10.1364/BOE.400723.
- Doleżyczek H, Kasprzycki P, Włodarczyk J, Wojtkowski M, and Malinowska M. 2022. Optical Coherence Tomography reveals heterogeneity of the brain tissue and vasculature in the ischemic region after photothrombotic stroke in mice. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*. 82(1):106-119. doi: 10.55782/ane-2022-010.
- Dornbusch JA, Selmic LE, Huang PC, Samuelson JP, McLaughlin EM, Wavreille VA, Ogden JA, Abrams B, Kalamaras A, Green E, Hostnik ET, Every L, Fuerst JA, Jennings R, Premanandan C, Lorbach JN, Linn SC, Alex A, Sorrells JE, Yang L, Boppart SA. 2021. Diagnostic accuracy of optical coherence tomography for assessing surgical margins of canine soft tissue sarcomas in observers of different specialties. *Vet Surg*. 50(1):111-120. doi: 10.1111/vsu.13510
- Fercher AF, Hitzenberger CK, Drexler W, Kamp G, Sattmann H. 1993. In vivo optical coherence tomography. *Am J Ophthalmol*. 116(1):113-4. doi: 10.1016/s0002-9394(14)71762-3.



- Foo KY, Kennedy KM, Zilkens R, Allen WM, Fang Q, Sanderson RW, Anstie J, Dessauvagie BF, Latham B, Saunders CM, Chin L, Kennedy BF. **2021**. Optical palpation for tumor margin assessment in breast-conserving surgery. *Biomed Opt Express*. 12(3):1666-1682. doi: 10.1364/BOE.415888.
- Gora MJ, Suter MJ, Tearney GJ, Li X. **2017**. Endoscopic optical coherence tomography: technologies and clinical applications [Invited]. *Biomed Opt Express*. 8(5):2405-2444. doi: 10.1364/BOE.8.002405.
- Hee MR, Baumal CR, Puliafito CA, Duker JS, Reichel E, Wilkins JR, Coker JG, Schuman JS, Swanson EA, Fujimoto JG. **1996**. Optical coherence tomography of age-related macular degeneration and choroidal neovascularization. *Ophthalmology*. 103(8):1260-70. doi: 10.1016/s0161-6420(96)30512-5.
- Huang D, Swanson EA, Lin CP, Schuman JS, Stinson WG, Chang W, Hee MR, Flotte T, Gregory K, Puliafito CA, et al. **1991**. Optical coherence tomography. *Science*. 254(5035):1178-81. doi: 10.1126/science.1957169.
- Karimi Galougahi K, Shlofmitz E, Jeremias A, Petrossian G, Mintz GS, Maehara A, Shlofmitz R, Ali ZA. **2021**. Optical Coherence Tomography in Acute Coronary Syndromes. *Interv Cardiol Clin*. 10(3):323-332. doi: 10.1016/j.iccl.2021.03.004.
- Kowiański P, Lietzau G, Dziewiątkowski J, Moryś J. **2009**. Doświadczalne Modele udaru mózgowia. *Udar Mózgu*. 11 (2): 70-79.
- Lamalice L, Le Boeuf F, Huot J. **2007**. Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circ Res*. 100(6):782-94. doi: 10.1161/01.RES.0000259593.07661.1e.
- Lenoir C, Cinotti E, Tognetti L, Orte Cano C, Diet G, Miyamoto M, Rocq L, Trépant AL, Perez-Anker J, Puig S, Malveyh J, et al. **2021**. Line-field confocal optical coherence tomography of actinic keratosis: a case series. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 35(12):e900-e902. doi: 10.1111/jdv.17548.
- Lee RHC, Lee MHH, Wu CYC, Couto E Silva A, Possoit HE, Hsieh TH, Minagar A, Lin HW. **2018**. Cerebral ischemia and neuroregeneration. *Neural Regen Res*. 13(3):373-385. doi: 10.4103/1673-5374.228711.
- Maheswari RU, Takaoka H, Kadono H, Homma R, Tanifuji M. **2003**. Novel functional imaging technique from brain surface with optical coherence tomography enabling visualization of depth resolved functional structure in vivo. *J Neurosci Methods*. 124(1):83-92. doi: 10.1016/s0165-0270(02)00370-9.
- Nguyen HD, Sedao X, Mauclair C, Bidron G, Faure N, Moreno E, Colombier JP, Stoian R. **2020**. Non-Diffractive Bessel Beams for Ultrafast Laser Scanning Platform and Proof-Of-Concept Side-Wall Polishing of Additively Manufactured Parts. *Micromachines* (Basel). 11(11):974. doi: 10.3390/mi11110974.
- Obade AY, Pandarathodiyil AK, Oo AL, Warnakulasuriya S, Ramanathan A. **2021**. Application of optical coherence tomography to study the structural features of oral mucosa in biopsy tissues of oral dysplasia and carcinomas. *Clin Oral Investig*. 25(9):5411-5419. doi: 10.1007/s00784-021-03849-0.
- Ooi Y, Satomura Y, Seki J, Yanagida T, Seiyama A. **2006**. Optical coherence tomography reveals in vivo cortical plasticity of adult mice in response to peripheral neuropathic pain. *Neurosci Lett*. 397(1-2):35-9. doi: 10.1016/j.neulet.2005.12.010.
- Ossowski P, Raiter-Smiljanic A, Szkulmowska A, Bukowska D, Wiese M, Derzsi L, Eljaszewicz A, Garstecki P, Wojtkowski M. **2015**. Differentiation of morphotic elements in human blood using optical coherence tomography and a microfluidic setup. *Opt Express*. 23(21):27724-38. doi: 10.1364/OE.23.027724.
- Paciaroni M, Caso V, Agnelli G. **2009**. The concept of ischemic penumbra in acute stroke and therapeutic opportunities. *Eur Neurol*. 61(6):321-30. doi: 10.1159/000210544.

- Ruini C, Schuh S, Gust C, Kendziora B, Frommherz L, French LE, Hartmann D, Welzel J, Sattler EC. **2021**. Line-field confocal optical coherence tomography for the in vivo real-time diagnosis of different stages of keratinocyte skin cancer: a preliminary study. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 35(12):2388-2397. doi: 10.1111/jdv.17603.
- Rychlak RP, Nowak G, Zalewski J. **2019**. Optical coherence tomography in patients with acute myocardial infarction. *Kardiol Inwazyjna*. 14(1):13-21
- Rojek A, Zub W, Waliszewska-Prosół M, Bładowska J, Obara K, Ejma M. **2015**. Wieloletnie przeżycie chorych z glejakiem wielopostaciowym — opisy przypadków. *Polski Przegląd Neurologiczny*; 12 (2): 107–115
- Roper SN, Moores MD, Gelikonov GV, Feldchtein FI, Beach NM, King MA, Gelikonov VM, Sergeev AM, Reitze DH. **1998**. In vivo detection of experimentally induced cortical dysgenesis in the adult rat neocortex using optical coherence tomography. *J Neurosci Methods*. 80(1):91-8. doi: 10.1016/s0165-0270(97)00202-1.
- Schilling M, Besselmann M, Müller M, Strecker JK, Ringelstein EB, Kiefer R. **2005**. Predominant phagocytic activity of resident microglia over hematogenous macrophages following transient focal cerebral ischemia: an investigation using green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice. *Exp Neurol*. 196(2):290-7. doi: 10.1016/j.expneurol.2005.08.004.
- Schroeter M, Jander S, Stoll G. **2002**. Non-invasive induction of focal cerebral ischemia in mice by photothrombosis of cortical microvessels: characterization of inflammatory responses. *J Neurosci Methods*. 117(1):43-9. doi: 10.1016/s0165-0270(02)00072-9.
- Srinivasan VJ, Mandeville ET, Can A, Blasi F, Klimov M, Daneshmand A, Lee JH, Yu E, Radhakrishnan H, Lo EH, Sakadžić S, Eikermann-Haerter K, Ayata C. **2013**. Multiparametric, longitudinal optical coherence tomography imaging reveals acute injury and chronic recovery in experimental ischemic stroke. *PLoS One*. 8(8):e71478. doi: 10.1371/journal.pone.0071478.
- Swidzińska E, Naumnik W, Chyczewska E. **2006**. Angiogeneza i neoangiogeneza – znaczenie w raku płuca i innych nowotworach. *Pneumonol. Alergol. Pol*. 74: 414–420
- Tamborski S, Lyu HC, Dolezyczek H, Malinowska M, Wilczynski G, Szlag D, Lasser T, Wojtkowski M, Szkulmowski M. **2016**. Extended-focus optical coherence microscopy for high-resolution imaging of the murine brain. *Biomed Opt Express*. 7(11):4400-4414. doi: 10.1364/BOE.7.004400.
- Targowski P, Rouba BJ, Karaszkiwicz P, Iwanicka P, Tymińska-Widmer L, Łękawa-Wysłouch T, Kwiatkowska EA, Sylwestrzak M. **2009**. Optical Coherence Tomography OCT – a novel tool for art conservation and cataloguing. *Conesrwtion News*. 26/2009
- Tearney GJ, Regar E, Akasaka T, Adriaenssens T, Barlis P, Bezerra HG, Bouma B, Bruining N, Cho JM, Chowdhary S, Costa MA, de Silva R, Dijkstra J, Di Mario C, Dudek D, Falk E, Feldman MD, Fitzgerald P, Garcia-Garcia HM, Gonzalo N, Granada JF, Guagliumi G, Holm NR, Honda Y, Ikeno F, Kawasaki M, Kochman J, Koltowski L, Kubo T, Kume T, Kyono H, Lam CC, Lamouche G, Lee DP, Leon MB, Maehara A, Manfrini O, Mintz GS, Mizuno K, Morel MA, Nadkarni S, Okura H, Otake H, Pietrasik A, Prati F, Räber L, Radu MD, Rieber J, Riga M, Rollins A, Rosenberg M, Sirbu V, Serruys PW, Shimada K, Shinke T, Shite J, Siegel E, Sonoda S, Suter M, Takarada S, Tanaka A, Terashima M, Thim T, Uemura S, Ughi GJ, van Beusekom HM, van der Steen AF, van Es GA, van Soest G, Virmani R, Waxman S, Weissman NJ, Weisz G. **2012**. International Working Group for Intravascular Optical Coherence Tomography (IWG-IVOCT). Consensus standards for acquisition, measurement, and reporting of intravascular optical coherence tomography studies: a report from the International Working Group for Intravascular Optical Coherence Tomography Standardization and Validation. *J Am Coll Cardiol*. 59(12):1058-72. doi: 10.1016/j.jacc.2011.09.079.
- Ughi GJ, Marosfoi MG, King RM, Caroff J, Peterson LM, Duncan BH, Langan ET, Collins A, Leporati A, Rousselle S, Lopes DK, Gounis MJ, Puri AS. **2020**. A neurovascular high-frequency optical coherence tomography system enables in situ cerebrovascular volumetric microscopy. *Nat Commun*. 11(1):3851. doi: 10.1038/s41467-020-17702-7.

Wang N, Anderson RJ, Ashbrook DG, Gopalakrishnan V, Park Y, Priebe CE, Qi Y, Laoprasert R, Vogelstein JT, Williams RW, Johnson GA. **2020**. Variability and heritability of mouse brain structure: Microscopic MRI atlases and connectomes for diverse strains. *Neuroimage*. 222:117274. doi: 10.1016/j.neuroimage.2020.117274.

Wojtkowski M, Leitgeb R, Kowalczyk A, Bajraszewski T, Fercher AF. **2002**. In vivo human retinal imaging by Fourier domain optical coherence tomography. *J Biomed Opt*. Jul;7(3):457-63. doi: 10.1117/1.1482379.

World Health Organisations, "The top causes of death." 2018, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>

Yashin KS, Kiseleva EB, Gubarkova EV, Moiseev AA, Kuznetsov SS, Shilyagin PA, Gelikonov GV, Medyanik IA, Kravets LY, Potapov AA, Zagaynova EV, Gladkova ND. **2019**. Cross-Polarization Optical Coherence Tomography for Brain Tumor Imaging. *Front Oncol*. 9:201. doi: 10.3389/fonc.2019.00201.

Zbesko JC, Nguyen TV, Yang T, Frye JB, Hussain O, Hayes M, Chung A, Day WA, Stepanovic K, Krumberger M, Mona J, Longo FM, Doyle KP. 2018. Glial scars are permeable to the neurotoxic environment of chronic stroke infarcts. *Neurobiol Dis*. 112:63-78. doi: 10.1016/j.nbd.2018.01.007.