



УДК 535.3; 53.06; 612.1

## ОПТИЧЕСКОЕ ПРОСВЕТЛЕНИЕ ЧЕРЕПНОЙ КОСТИ МНОГОКОМПОНЕНТНЫМИ ИММЕРСИОННЫМИ РАСТВОРАМИ И ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ЦЕРЕБРАЛЬНОГО ВЕНОЗНОГО КРОВОТОКА



Э. А. Генина, А. Н. Башкатов, О. В. Семячкина-Глушковская, В. В. Тучин

Генина Элина Алексеевна, кандидат физико-математических наук, доцент кафедры оптики и биофотоники; старший научный сотрудник лаборатории биомедицинской оптики Научно-образовательного института оптики и биофотоники, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского; ведущий научный сотрудник междисциплинарной лаборатории биофотоники, Томский национальный исследовательский государственный университет, eagenina@yandex.ru

Башкатов Алексей Николаевич, кандидат физико-математических наук, доцент кафедры оптики и биофотоники, заведующий лабораторией биомедицинской оптики Научно-образовательного института оптики и биофотоники, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского; ведущий научный сотрудник междисциплинарной лаборатории биофотоники, Томский национальный исследовательский государственный университет, a.n.bashkatov@mail.ru

Семячкина-Глушковская Оксана Валерьевна, доктор биологических наук, заведующая кафедрой физиологии человека и животных, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, glushkovskaya@mail.ru

Тучин Валерий Викторович, доктор физико-математических наук, заведующий кафедрой оптики и биофотоники; директор Научно-образовательного института оптики и биофотоники, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского; научный руководитель междисциплинарной лаборатории биофотоники, Томский национальный исследовательский государственный университет; заведующий лабораторией лазерной диагностики технических и живых систем, Институт проблем точной механики и управления РАН (Саратов), tuchinv@mail.ru

Большой практический интерес вызывает оптическое просветление костных тканей, что открывает возможность развития минимально инвазивных методов лазерной диагностики и терапии мозга. Целью данной работы является исследование оптического просветления черепной кости при использовании многокомпонентных оптических просветляющих агентов и возможности измерения церебрального кровотока. В работе исследовано оптическое просветление кости черепа крысы *ex vivo* и *in vivo* с помощью двух растворов, различающихся составом и показателями преломления и включающих этанол или тиазон в качестве усилителей проницаемости биоткани. Измерена кинетика коллимированного пропускания образцов кости в спектральном диапазоне 600–900 нм под действием данных растворов и проведена доплеровская оптическая когерентная томография (ДОКТ) сосудов головного мозга крысы. В течение 4 часов получено относительное увеличение коэффициента коллимированного пропускания под действием иммерсионных растворов с вклю-

чением этанола и тиазона соответственно на 15% и 80%. Эффективность оптического просветления костной ткани составила соответственно  $4.5 \pm 0.4$  и  $13.2 \pm 3.4\%$ . Использование растворов способствовало значительному улучшению визуализации крупной церебральной вены с помощью ДОКТ без повреждения черепной кости и позволило определить скорость кровотока в вене в нормальном состоянии (7 мм/с) и при воздействии адреналина (5.5 мм/с). Таким образом, показано, что применение данных растворов способствует увеличению глубины зондирования ДОКТ и улучшению визуализации сосудов мозга и может быть использовано при диагностике различных патологических изменений, в том числе нарушений кровоснабжения.

**Ключевые слова:** черепная кость, многокомпонентные иммерсионные растворы, коллимированное пропускание, доплеровская оптическая когерентная томография, эффективность оптического просветления, церебральный венозный кровоток.

DOI: 10.18500/1817-3020-2017-17-2-98-110

### Введение

В течение последних 25 лет наблюдается всё возрастающий интерес к разработке и применению оптических методов визуализации тканей и структур мозга для диагностики различных патологических изменений, в том числе нарушений кровоснабжения [1–4]. Такой интерес обусловлен уникальной информативностью, относительной простотой, безопасностью и достаточно низкой стоимостью оптических устройств по сравнению, например, с рентгеновской компьютерной томографией или магниторезонансной томографией.

Одним из самых простых и эффективных методов решения проблемы увеличения глубины и качества изображений внутритканевых структур, а также повышения точности спектроскопической информации от глубоких слоёв биотканей и крови является временное снижение светорассеяния в биотканях (оптическое просветление) [5, 6]. Оптическое иммерсионное просветление основывается на пропитывании (иммерсионировании) ткани биосовместимым химическим агентом – оптическим просветляющим агентом (ОПА) – обладающим достаточно высоким показателем преломления, чтобы, проникая во внутритканевую жидкость биоткани, он мог согласовать показатели преломления рассеи-



вателей и окружающей их среды. Для мягких насыщенных водой тканей важна еще осмолярность агентов, которая способствует временной дегидратации ткани, более плотной упаковке ее составляющих и соответственно меньшему рассеянию ткани [5, 6].

Большой практический интерес вызывает оптическое просветление не только мягких, но и твердых биотканей, таких как кость. В последние годы всё больше появляется работ, посвящённых оптическому просветлению костных тканей [7–11]. Целью этих работ является как визуализация клеточной архитектуры самой костной ткани, так и объектов, скрытых под ней, что открывает возможность развития минимально инвазивных методов лазерной диагностики и терапии мозга и других глубоколежащих тканей. Например, в работе [12] показано, что оптическое просветление кости с помощью глицерина наиболее эффективно в ИК диапазоне выше 1400 нм. Под действием пропиленгликоля, который помимо достаточно высокого показателя преломления обладает ещё и свойствами усилителя проницаемости ткани, оптическое просветление кости наблюдается и в видимом диапазоне. Однако для достижения существенного оптического просветления кости с помощью глицерина и других однокомпонентных иммерсионных агентов требуется достаточно длительный промежуток времени, что неприемлемо при исследованиях *in vivo*.

Разработка состава многокомпонентных ОПА для ускорения диффузии и обеспечения повышения эффективности оптического просветления различных биотканей является наиболее актуальной задачей развития этого направления [7, 11, 13–19]. Так, например, Wang с соавт. [7] показали, что минимальный диаметр микрососуда мозга мыши *in vivo*, разрешаемый при наблюдении через костную ткань после 25-минутного воздействия на поверхность черепа многокомпонентного ОПА (SOCS – skull optical clearing solution), составляет  $14.4 \pm 0.8$  мкм [7]. Среди химических усилителей диффузии ОПА в соединительные ткани упоминаются также диметилсульфоксид (ДМСО) [13], тиазон [14], пропиленгликоль [15], этанол [16] и другие [17–19].

Тиазон ( $C_{11}H_{13}O_3SN$ , молекулярная масса 239.29, нерастворим в воде) является веществом, используемым в медицине и косметологии для усиления диффузии медицинских препаратов в коже [14, 20–22]. Однако в работе [23] авторы отмечают снижение эффективности оптического просветления мышечной ткани при использо-

вании тиазона в смеси с пропиленгликолем за счёт появления в биоткани кристаллов тиазона, увеличивающих рассеяние.

Этанол также является растворителем, модифицирующим свойства барьера кожи. При достаточно высокой концентрации (~40%) этанол способствует образованию пор и существенно увеличивает транспорт веществ через поры, благодаря увеличению размера и/или плотности пор в эпидермальной мембране [16, 24]. В работах [25, 26] показано значительное увеличение скорости диффузии красителей через эпидермис при включении в состав раствора 40–50%-ного этанола.

Целью данной работы является исследование оптического просветления черепной кости при использовании ОПА, включающих этанол и тиазон в качестве усилителей проницаемости биоткани, и возможности измерения церебрального кровотока.

## 1. Строение и оптические свойства костной ткани

Костная ткань – особый вид соединительной ткани. Она является главной составной частью кости, образуя костные пластинки. В пластинчатой кости коллагеновые фибриллы межклеточного вещества, располагаясь параллельно, формируют слои – костные пластинки толщиной 3–7 мкм. Смежные пластинки всегда имеют различную ориентацию фибрилл. В пластинках расположены клеточные полости – лакуны – и соединяющие их костные каналы, в которых лежат костные клетки – остециты и их отростки. По системе лакун и костных каналов циркулирует тканевая жидкость, обеспечивающая обмен веществ в ткани [27]. В зависимости от плотности и расположения пластинок различают компактное и губчатое костное вещество. Плоские кости черепа построены из тонких пластинок компактного вещества, между которыми находится губчатое вещество, содержащее каналы для вен.

Структурные компоненты костной ткани состоят из неорганических компонентов и органического матрикса [28, 29]. Кристаллы костной ткани относятся к гидроксиапатитам, имеют форму пластинок или палочек. Они отвечают за компрессионную прочность кости. Другая часть минеральной фазы костной ткани представлена аморфным фосфатом кальция. Содержание аморфного фосфата кальция подвержено значительным колебаниям в зависимости от возраста [30].



Приблизительно 95% органического матрикса приходится на коллаген. Кроме коллагена в состав органического матрикса входят другие протеины, клетки крови и липиды [31]. Межклеточный органический матрикс компактной кости составляет около 20–40%, неорганические вещества – 50–70%, вода – 5–10% и липиды <3% [32]. В губчатой кости преобладают органические компоненты, которые составляют более 50%, на долю неорганических соединений приходится 33–40%. Количество воды сохраняется в тех же пределах, что и в компактной кости [30, 32]. По данным А. Уайта с соавт. [33], неорганические компоненты составляют около 1/4 объёма кости; остальную часть занимает органический матрикс. Вследствие различий в относительной удельной массе органических и неорганических компонентов на долю нерастворимых минералов приходится половина массы кости. Пористость костной ткани составляет от 5 до 10% [33].

Одним из главных компонентов живой кости является вода. Вода в кости находится в связанном состоянии с минеральной фазой, с органической фазой (коллаген и цементное вещество) или в свободном состоянии (объёмная вода) [34, 35]. Наиболее сильно связанная вода удерживается апатитоподобными кристаллами (около 35 мг воды/г минерала) [36]. Существенно менее сильно связанная фракция – это вода, удерживаемая коллагеновыми фибриллами. В неминерализованном состоянии коллагеновые волокна связывают большую объёмную фракцию воды (до 60%) [37]. Во время процесса кальцификации кристаллы апатита депонируются в органическом матриксе, постепенно замещая остеоидную воду и снижая её объёмную фракцию до 20%.

Показатель преломления цельной черепной кости оценивался Ascenzi и Fabry [38] при различных стадиях минерализации в диапазоне от 1.555 до 1.564. Компоненты этой ткани имеют следующие показатели преломления: апатиты – 1.604–1.650, остеоны – 1.559, гидратированный коллаген (I типа) – 1.43 и липиды ~ 1.45 [38, 39].

В видимой области спектра поглощение костной ткани очень мало; в ближнем инфракрасном диапазоне коэффициент поглощения не превышает  $4 \text{ см}^{-1}$  и определяется полосами поглощения воды и липидов [12, 40, 41]. Рассеяние костной ткани снижается с увеличением длины волны, что соответствует спектральному поведению рассеивающих характеристик большинства тканей [12, 42–44].

## 2. Материалы и методы

Поскольку ранее было показано, что оптическое просветление черепной кости с помощью однокомпонентных иммерсионных агентов требует длительного периода времени [12], при разработке составных иммерсионных растворов учитывались результаты исследований, представленных в работах [14, 20, 25, 26], где показано, что тиазон и этанол за счет частичного разрушения липидного слоя способствуют усилению проницаемости эпидермиса для глицерина и полиэтиленгликоля.

Для приготовления составных ОПА использовались этиловый спирт, дегидратированный глицерин («База № 1 Химреактивов», Россия), полиэтиленгликоль с молекулярной массой 300 Да (Sigma-Aldrich, Германия), тиазон ( $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{O}_3\text{SN}$ , Guangzhou Heming Trading Co., Китай) и дистиллированная вода.

В состав раствора № 1 вошли: этиловый спирт (45%), дегидратированный глицерин (25%), ПЭГ-300 (10%) и вода (20%). Показатель преломления раствора, измеренный с помощью рефрактометра Аббе ИРФ454Б2М (КОМЗ, Россия) на длине волны 589 нм составил  $n = 1.384$ .

В состав раствора № 2 вошли: ПЭГ-300 (80%) и тиазон (20%). Показатель преломления раствора на длине волны 589 нм составил  $n = 1.467$ .

Материалом для *ex vivo* исследования послужили 8 образцов верхней части черепной кости крысы *ex vivo*. Средняя толщина образцов составляла  $0.64 \pm 0.4$  мм, длина –  $13.1 \pm 2.2$  мм и ширина –  $10.5 \pm 0.6$  мм. Все образцы разделялись на 2 группы: I группа подвергалась воздействию раствора № 1, II группа – раствора № 2.

Измерение спектров коллимированного пропускания образцов черепной кости проводилось каждые 10–20 мин с помощью многоканального спектрометра USB4000-Vis-NIR (Ocean Optics, США) в течении 4–5 часов. Образец ткани закреплялся на пластиковой пластине площадью  $3.5 \times 1.5 \text{ см}^2$  с отверстием в центре площадью  $8 \times 8 \text{ мм}^2$  и помещался в стеклянную кювету объемом 5 мл с раствором исследуемого ОПА. Кювета устанавливалась между двумя волоконно-оптическими кабелями QP400-1-VIS-NIR (Ocean Optics, США) с внутренним диаметром 400 мкм. Для обеспечения коллимированности пучка на торцах волокон с помощью стандартных разъемов SMA-905 закреплялись коллиматоры 74-ACR (Ocean Optics, США). В качестве источника излучения использовалась галогенная лампа HL-2000 (Ocean Optics, США).



После каждого измерения коллимированного пропускания образцы извлекались из кюветы и взвешивались на электронных весах SA210 (Scientech, USA) с точностью  $\pm 1$  мг, затем помещались обратно в кювету. Все измерения проводились при комнатной температуре ( $\sim 20^\circ\text{C}$ ).

Коэффициент ослабления  $\mu_t$  рассчитывался на основе закона Бугера–Ламберта:

$$T_c(t) = \exp[-\mu_t(t)l], \quad (1)$$

где  $T_c(t)$  – временная зависимость коллимированного пропускания образца биоткани,  $l$  – толщина биоткани.

Эффективность оптического просветления (ЭОП) оценивалась с помощью выражения

$$\Delta\mu_t = \frac{\mu_t(t=0) - \mu_t(t)}{\mu_t(t=0)} \times 100\%, \quad (2)$$

где  $\mu_t(t=0)$  – начальный коэффициент ослабления интактного образца биоткани,  $\mu_t(t)$  – значение коэффициента ослабления в каждый момент времени измерений.

ЭОП рассчитывалась для каждого образца отдельно для всех длин волн в исследуемом спектральном диапазоне и усреднялась. Затем

значения ЭОП усреднялись по группе, и рассчитывалось стандартное отклонение.

Для демонстрации возможности транскраниальной визуализации сосудов головного мозга при оптическом просветлении черепной кости *in vivo* с помощью данных многокомпонентных растворов использовались 4 молодые здоровые беспородные лабораторные крысы (возраст 4 недели, вес 50–60 г). Крысы подвергались анестезии с помощью внутривенной инъекции кетамина (Sigma, США) 0.4 мг/кг. Слой кожи и мышечной ткани с верхней части головы на участке приблизительно  $5 \times 5$  мм<sup>2</sup> хирургически удалялся. Крысы были разделены на две группы. На поверхность черепа крысам из I и II групп наносился иммерсионный раствор № 1 и № 2 соответственно.

Для одной из крыс из I группы церебральный кровоток дополнительно исследовался до и после внутривенного введения адреналина (Sigma, США) 0.1 мг/кг, способствующего вазодилатации (расширению церебральных сосудов).

Для исследования крупной церебральной вены (*vena magna cerebri*) крысу помещали под углом  $120^\circ$  для лучшей визуализации вены (рис. 1).

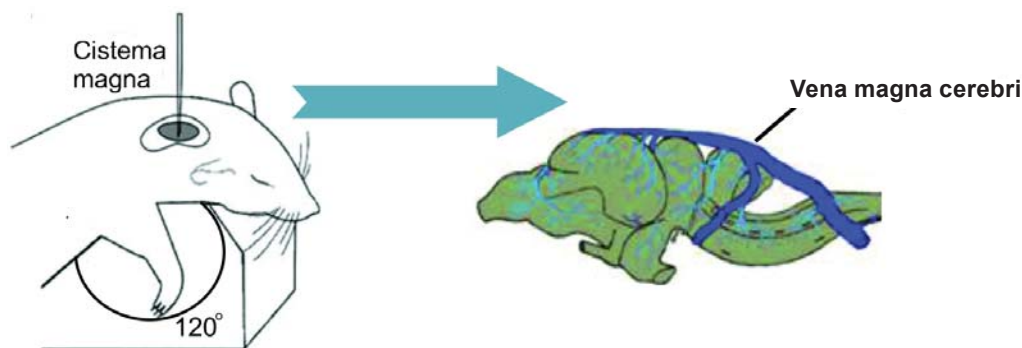


Рис. 1. Расположение крупной поверхностной вены мозга (*vena magna cerebri*) у крысы

Транскраниальное исследование церебрального венозного кровотока проводилось с помощью спектрального оптического доплеровского когерентного томографа OCS1300SS (Thorlabs, США). В качестве источника излучения в установке использовался суперлюминесцентный диод с центральной длиной волны 1325 нм и спектральной шириной полосы на полувысоте 100 нм. Оптическая глубина зондирования составляла до 3 мм, продольное разрешение – 12 мкм и поперечное разрешение – 25 мкм на воздухе.

Для оценки скорости кровотока в режиме доплеровской ОКТ (ДОКТ) использовалась методика, подробно описанная в работе [45]. На ДОКТ-изображениях распределение скорости потока маркировалось цветом.

### 3. Результаты и их обсуждение

На рис. 2 представлены типичные спектральная (*a*) и временная (*b*) зависимости изменения коллимированного пропускания образца черепной кости крысы. Данный образец принадлежал I группе, толщина его составляла  $0.53 \pm 0.01$  мм.





Хорошо видно, что с течением времени значение  $T_c$  во всём исследуемом спектральном диапазоне возрастает. Это связано с увеличением прозрачности биоткани за счёт, во-первых, удаления свободной воды из органического матрикса и, во-вторых, замещения её на иммерсионный агент. Показатель преломления используемого раствора № 1 (1.384) меньше, чем показатели преломления основных органических и неорганических компонентов ткани, вследствие этого полного согласования показателей преломления рассеивателей и внутритканевого матрикса не происходило, тем не менее, увеличение коллимированного пропускания за время наблюдения в спектральном диапазоне 600–900 нм в среднем составило  $15 \pm 1\%$ .

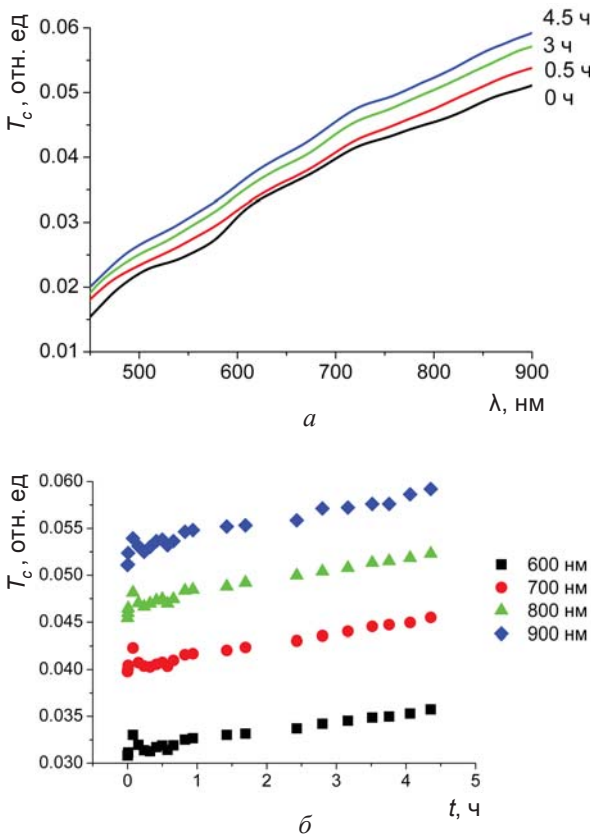


Рис. 2. Типичные спектральная (а) и временная (б) зависимости изменения значения коллимированного пропускания образца черепной кости крысы *ex vivo* в процессе воздействия многокомпонентного иммерсионного агента (этиловый спирт – 45%, дегидратированный глицерин – 25%, ПЭГ-300 – 10% и вода – 20%)

При использовании в качестве ОПА раствора № 2, обладающего более высоким показателем преломления (1.467), среднее увеличение значения коллимированного пропускания за время наблюдения составило более чем 1.8 раз.

Верке с соавт. [11] проанализировали относительное увеличение коллимированного пропускания ( $RT$ ) в спектральном диапазоне 360–1090 нм при просветлении трубчатых костей мыши *in vitro* под действием водорастворимых и водонерастворимых иммерсионных агентов, использующихся в стереомикроскопии, проекционной оптической спектрофотометрии и конфокальной микроскопии: Visikol ( $n = 1.44$ ,  $RT = 1.25 \pm 0.41$ ), ClearT2 (50% формамид + 20% PEG-8000,  $n = 1.45$ ,  $RT = 2.77 \pm 1.68$ ), FocusClear ( $n = 1.46$ ,  $RT = 2.29 \pm 1.17$ ), TDE (2, 2'-тиоидиэтанол,  $n = 1.47$ ,  $RT = 5.17 \pm 1.94$ ), SeeDB (80.2% водный раствор D-фруктозы,  $n = 1.5$ ,  $RT = 3.17 \pm 1.23$ ), MS (метилсалицилат,  $n = 1.51$ ,  $RT = 7.04 \pm 1.85$ ), BABB (25% бензилового спирта + 75% бензилбензоата,  $n = 1.53$ ,  $RT = 4.81 \pm 1.08$ ), THF-DBE (эфир тетрагидрофурандибензила,  $n = 1.56$ ,  $RT = 7.19 \pm 0.42$ ). Образцы костных сегментов перед началом исследований в течение 48 ч находились в растворе формалина. Средняя толщина образцов составляла 2.5 мм. Авторы добивались максимального оптического просветления, которое наступало за время воздействия ОПА от 24 ч до 4 дней.

Несмотря на различия в исследуемых объектах, а также времени и методах измерений, видно, что в целом значения, полученные в нашей работе, согласуются с данными, представленными в [11].

На основе результатов измерения кинетики изменения значений коллимированного пропускания с помощью уравнения (1) рассчитывались значения коэффициента ослабления. На рис. 3 представлена кинетика изменения значения  $\mu_t$  на нескольких длинах волн для образцов из I (а) и II (б) групп.

Изменение коэффициента ослабления биоткани вызвано встречной диффузией свободной воды из внутритканевого пространства и ОПА во внутритканевое пространство [6, 46, 47]. Величина коэффициента пропускания в основном определяется коэффициентом рассеяния [44]. В свою очередь, коэффициент рассеяния определяется в основном отношением показателей преломления рассеивателей биоткани и окружающей их среды [48], т.е. внутритканевой жидкости. Показатель преломления внутритканевой жидкости в каждый момент времени определяется концентрацией в ней просветляющего агента, а значение концентрации пропорционально  $\exp(-t/\tau_{осл})$ , где  $\tau_{осл}$  – характеристическое время диффузии каждого из компонентов просветляющих растворов, используемых в данных

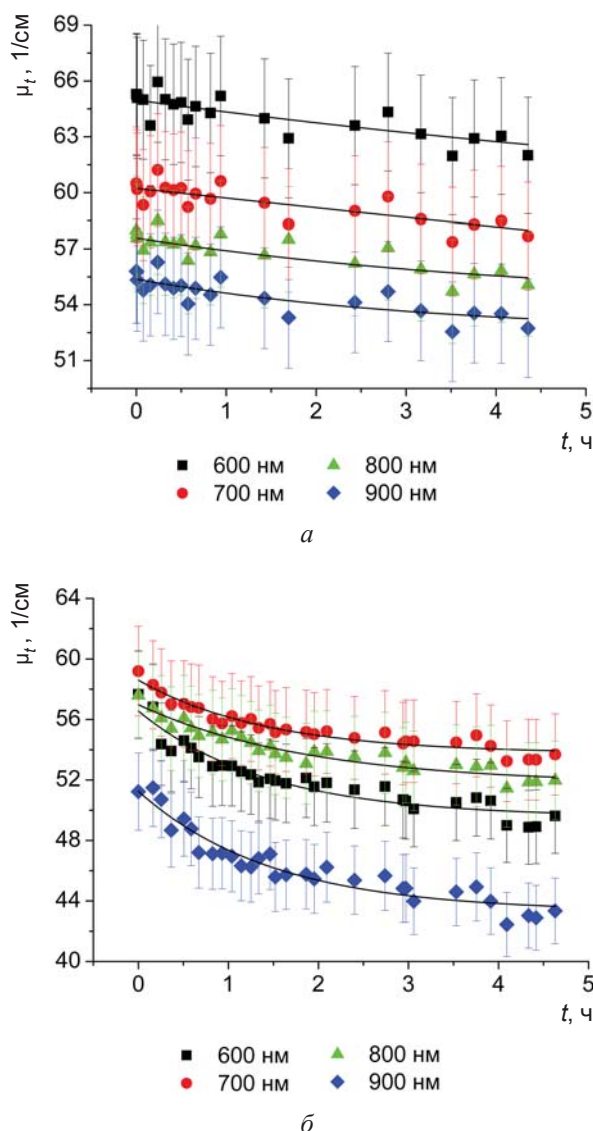


Рис. 3. Кинетика изменения значения коэффициента ослабления на нескольких длинах волн, усреднённая для образцов групп I (а) и II (б) под действием многокомпонентных иммерсионных агентов. Вертикальные отрезки обозначают среднеквадратическое отклонение

экспериментах для просветления костной ткани. Кроме того, скорость диффузии воды из костной ткани пропорциональна величине  $\exp(-t/\tau_w)$ , где  $\tau_w$  – характеристическое время диффузии воды [49, 50]. В силу этого временная зависимость  $\mu_t(t)$  аппроксимировалась выражением

$$\mu_t(t) = A \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) + \mu_t^0, \quad (3)$$

где  $A$  – эмпирическая константа, характеризующие величину оптического просветления, причем  $A + \mu_t^0 = \mu_t(t=0)$  – значение коэффициента ослабления в начальный момент времени,  $\mu_t^0$  – оста-

точное значение коэффициента ослабления после завершения процесса просветления,  $\tau$  – характеристическое время процесса, характеризующее как скорость проникновения в костную ткань каждого компонента просветляющих растворов, так и скорость выхода воды из биоткани. После усреднения по группам характеристическое время процесса просветления  $\tau$  составило  $4.0 \pm 0.7$  ч и  $1.5 \pm 0.2$  ч для I и II групп соответственно. Такое различие во временных характеристиках процесса оптического просветления может быть связано с тем, что тиазон является более эффективным усилителем проницаемости костной ткани, чем этанол.

Средняя ЭОП образцов через 4 ч, оцененная по формуле (2) и усреднённая по группам, составила  $4.5 \pm 0.4\%$  (I группа) и  $13.2 \pm 3.4\%$  (II группа).

ЭОП черепной кости человека *in vitro* под действием дегидратированного глицерина в течение часа, оценённая в спектральном диапазоне 1400–2000 нм по данным работы [12], составила  $16 \pm 11\%$ . Показатель преломления глицерина (1.47) более близок к значению показателя преломления цельной черепной кости (1.555), при этом дегидратированный глицерин вызывает значительную осмотическую дегидратацию тканей, что может объяснить достаточно высокое значение ЭОП.

В процессе оптического просветления наблюдалось снижение веса образцов, представленное на рис. 4, что связано, на наш взгляд, с их дегидратацией под действием гиперосмотических компонентов (глицерина и ПЭГ-300), входящих в состав ОПА. Кинетика дегидратации образцов биоткани анализировалась с помощью выражения [49]:

$$H_D(t) = \frac{M(t=0) - M(t)}{M(t=0)}, \quad (4)$$

где  $H_D$  – степень дегидратации биоткани;  $M(t=0)$  – масса образца биоткани в начальный момент времени, г;  $M(t)$  – масса образца биоткани в момент измерения, г.

Концентрация гиперосмотических ОПА во втором растворе (ПЭГ-300 – 80%) значительно превышает концентрацию ОПА в первом растворе (глицерин – 25% и ПЭГ-300 – 10%), вследствие чего и дегидратация в I группе ( $H_D = 0.05$ ) значительно меньше дегидратации во II группе ( $H_D = 0.13$ ) исследуемых образцов. Характеристическое время, рассчитанное с помощью аппроксимации экспоненциальной



зависимостью аналогичной выражению (2), в этих группах также различается: для группы I  $\tau$  составляет  $0.3 \pm 0.1$  ч, для группы II –  $1.1 \pm 0.4$  ч. Через 24 ч нами были проведены контрольные взвешивания образцов. В группе I заметного изменения веса образцов не происходило. Вес образцов из группы II увеличился по сравне-

нию с начальным приблизительно на 35%, что свидетельствует о замещении свободной воды во внутритканевом пространстве кости на иммерсионный раствор и также подтверждает более эффективное усиление проницаемости костной ткани тиазоном как для воды, так и для ПЭГ-300.

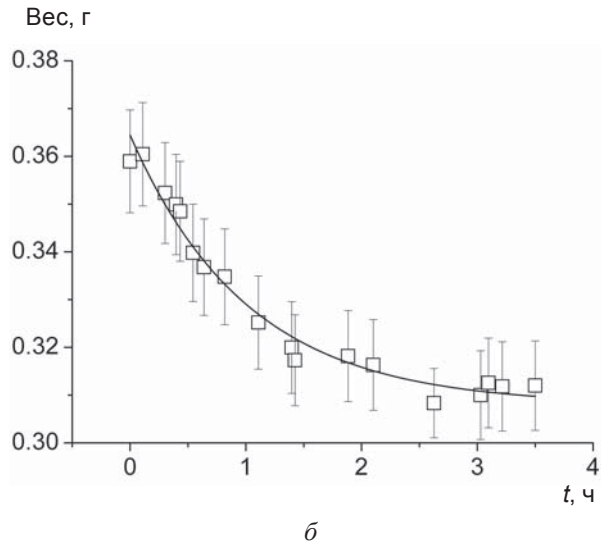
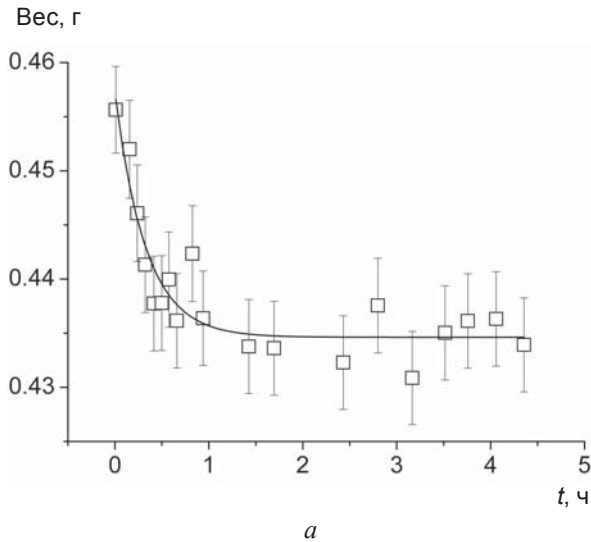


Рис. 4. Усреднённая кинетика изменения веса образцов из групп I (а) и II (б) под действием многокомпонентных иммерсионных агентов. Вертикальные отрезки обозначают среднеквадратическое отклонение

На рис. 5 представлены ДОКТ изображения крупной церебральной вены под неповреждённой черепной костью крысы из группы I без предварительного оптического просветления (а), через час после нанесения ОПА № 1 (б) и после внутривенной инъекции адреналина (в). На рис. 5, а видна *vena cerebri magna*, расположенная в центре изображения под черепной костью. Диаметр вены составляет 0.12 мм, оптическая толщина черепной кости над веной –  $0.53 \pm 0.03$  мм.

На рис. 5, б хорошо видно, что после воздействия ОПА продольный и поперечный размер изображения вены увеличился более чем в 1.6 раза. Оптическое просветление позволило повысить разрешение ДОКТ-изображения объекта. Скорость кровотока в крупной церебральной вене, оцененная по данным ДОКТ, составила 7 мм/с.

Внутривенная инъекция адреналина вызвала значительное увеличение диаметра *vena cerebri magna* (до 0.22 мм), что наблюдается на рис. 5, в, и снижение скорости церебрального кровотока (до 5.5 мм/с).

Рис. 6 демонстрирует ДОКТ-изображения черепной кости крысы из группы II до (а) и после (б) 20-минутного воздействия раствора № 2. На рис. 6, а крупная церебральная вена не визуализируется, что свидетельствует о сильном рассеянии костной ткани. Оптическая толщина черепной кости на участке наблюдения составляет  $1.2 \pm 0.2$  мм. Воздействие ОПА в течение 20 мин позволило визуализировать фрагмент вены, расположенный под неповреждённой черепной костью (см. рис. 6, б).

Время регистрации ДОКТ-изображений сосудов, представленных на рис. 5 и 6, соответствует времени их оптимальной визуализации.

В ряде работ показано, что ДОКТ в исследовании мозгового кровотока является достаточно эффективным оптическим методом анализа кровотока в норме и при патологии [51, 52], однако использование оптического просветления позволит значительно увеличить разрешающую способность при визуализации сосудов под неповреждённой черепной костью, что может повысить эффективность ранней диагностики инсульта и других нарушений мозговой гемодинамики.

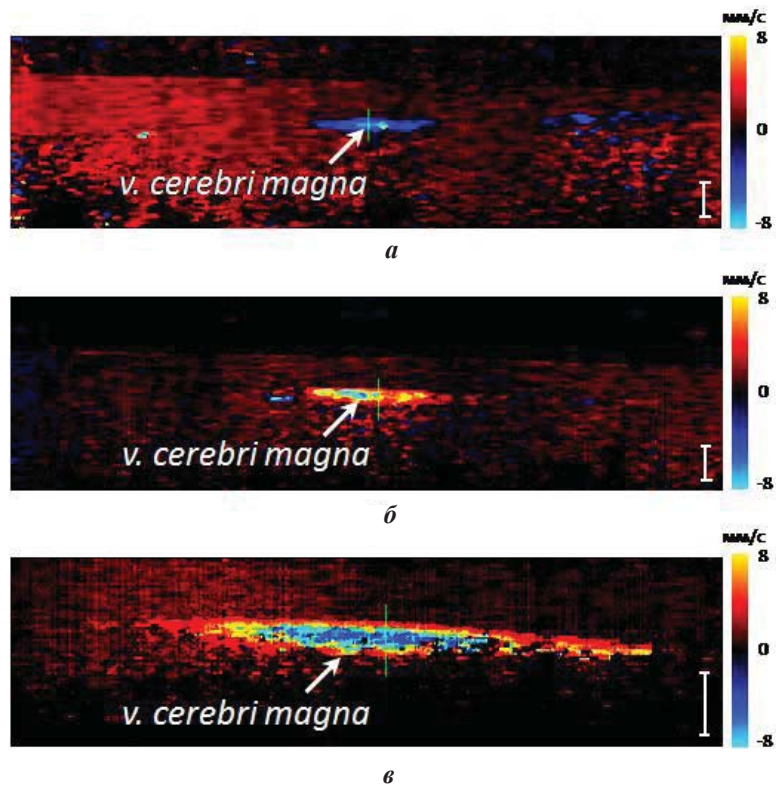


Рис. 5. ДОКТ-изображения черепной кости крысы из группы I: без предварительного оптического просветления (а), через час после нанесения многокомпонентного иммерсионного агента (этиловый спирт – 45%, дегидратированный глицерин – 25%, ПЭГ-300 – 10% и вода – 20%) (б) и последующей инъекции адреналина для увеличения диаметра вены с целью улучшения её визуализации (в). На изображениях видна крупная церебральная вена (*v. cerebri magna*). Вертикальные отрезки соответствуют оптической толщине 500 мкм. В правой части изображений показана шкала распределения скорости кровотока

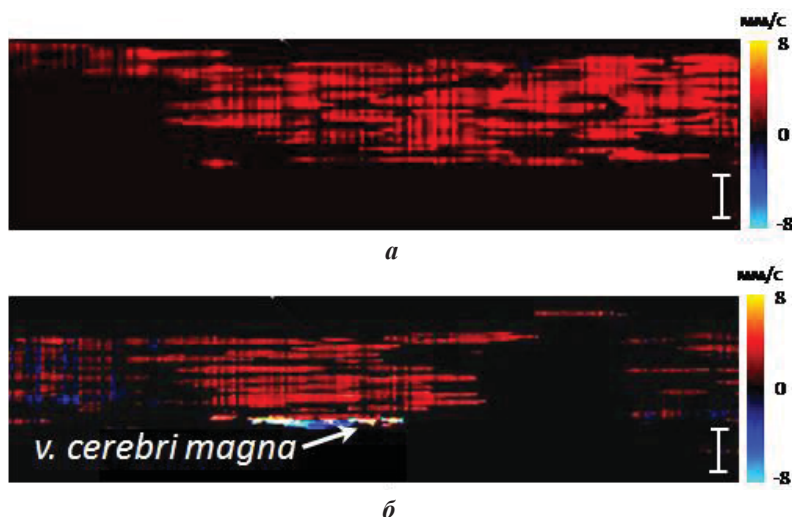


Рис. 6. ДОКТ-изображения черепной кости крысы из группы II: без предварительного оптического просветления (а), через 20 мин после нанесения иммерсионного агента (ПЭГ-300 – 80% и тиазон – 20%) (б). На рисунке видна крупная церебральная вена (*v. cerebri magna*). Вертикальные отрезки соответствуют оптической толщине 500 мкм. В правой части изображений показана шкала распределения скорости кровотока





### Заключение

В работе исследованы многокомпонентные иммерсионные растворы для оптического просветления костей черепа. В состав растворов помимо иммерсионных жидкостей с высоким показателем преломления (глицерин и ПЭГ-300) входили усилители проницаемости биотканей (этанол и тиазон), которые способствовали повышению скорости и эффективности оптического просветления. Исследования проводились *ex vivo* на образцах черепной кости крысы и *in vivo* на лабораторных животных. Измерена кинетика изменения коллимированного пропускания образцов кости в спектральном диапазоне 600–900 нм под действием данных растворов и проведена доплеровская оптическая когерентная томография сосудов головного мозга крысы. В течение 4 ч получено относительное увеличение коэффициента коллимированного пропускания под действием иммерсионных растворов с включением этанола и тиазона соответственно на 15 и 80%. Эффективность оптического просветления костной ткани составила соответственно  $4.5 \pm 0.4$  и  $13.2 \pm 3.4\%$ . Использование растворов способствовало значительному улучшению визуализации крупной церебральной вены без повреждения черепной кости и позволило оценить изменение диаметра вены и скорости кровотока в ней при медикаментозном воздействии.

### Благодарности

Авторы выражают благодарность Лычагову Владиславу Валерьевичу за помощь в работе с ДОКТ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (проект № 12.1223.2017/ПЧ) и гранта Президента РФ для государственной поддержки ведущих научных школ Российской Федерации НШ-7898.2016.2.

### Список литературы

1. Myllylä T., Toronov V., Claassen J., Kiviniemi V., Tuchin V. Near-infrared spectroscopy in multimodal brain research. Chapter 10 // Handbook of Optical Biomedical Diagnostics / ed. V. V. Tuchin. 2nd ed. : in 2 vol. Vol. 1: Light – Tissue Interaction. Bellingham : SPIE Press, 2016. P. 687–735.
2. Alderliesten T., De Vis J. B., Lemmers P. M. A., van Bel F., Benders M. J. N. L., Hendrikse J., Petersen E. T. Simultaneous quantitative assessment of cerebral physiology using respiratory-calibrated MRI and near-infrared spectroscopy in healthy adults // NeuroImage. 2014. Vol. 85, pt. 1. P. 255–263.
3. Tong Y., Bergethon P. R., Frederick B. D. An improved method for mapping cerebrovascular reserve using concurrent fMRI and near-infrared spectroscopy with Regressor Interpolation at Progressive Time Delays (RIP-TiDe) // NeuroImage. 2011. Vol. 56, № 4. P. 2047–2057.
4. Hoge R. D., Franceschini M. A., Covolan R. J. M., Huppert T., Mandeville J. B., Boas D. A. Simultaneous recording of task-induced changes in blood oxygenation, volume, and flow using diffuse optical imaging and arterial spin-labeling MRI // NeuroImage. 2005. Vol. 25, № 3. P. 701–707.
5. Zhu D., Larin K., Luo Q., Tuchin V. V. Recent progress in tissue optical clearing // Laser & Photonics Reviews. 2013. Vol. 7, № 5. P. 732–757.
6. Genina E. A., Bashkatov A. N., Sinichkin Yu. P., Yanina I. Yu., Tuchin V. V. Optical clearing of biological tissues: prospects of application in medical diagnostics and phototherapy // Journal of Biomedical Photonics & Engineering. 2015. Vol. 1, № 1. P. 22–58.
7. Wang J., Zhang Y., Xu Th., Luo Qm., Zhu D. An innovative transparent cranial window based on skull optical clearing // Laser Phys. Lett. 2012. Vol. 9. P. 469–473.
8. Bykov A., Hautala T., Kinnunen M., Popov A., Karhula S., Saarakkala S., Nieminen M.T., Tuchin V., Meglinski I. Imaging of subchondral bone by optical coherence tomography upon optical clearing of articular cartilage // J. Biophotonics. 2016. Vol. 9, № 3. P. 270–275.
9. Neu C. P., Novak T., Gilliland K. F., Marshall P., Calve S. Optical clearing in collagen- and proteoglycan-rich osteochondral tissues // Osteoarthritis. 2015. Vol. 23. P. 405–413.
10. Calve S., Ready A., Huppenbauer C., Main R., Neu C. P. Optical clearing in dense connective tissues to visualize cellular connectivity *in situ* // PLoS ONE. 2015. Vol. 10. e0116662.
11. Berke I. M., Miola J. P., David M. A., Smith M. K., Price C. Seeing through musculoskeletal tissues : improving *in situ* imaging of bone and the lacunar canalicular system through optical clearing // PLoS ONE. 2016. Vol. 11, № 3. e0150268.
12. Genina E. A., Bashkatov A. N., Tuchin V. V. Optical clearing of cranial bone // Advanced Optical Technologies. 2008. Vol. 2008. 267867.
13. Karma S., Homan J., Stoianovic C., Choi B. Enhanced fluorescence imaging with DMSO-mediated optical clearing // Journal of Innovative Optical Health Sciences. 2010. Vol. 3, № 3. P. 153–158.
14. Zhu D., Wang J., Zhi Z., Wen X., Luo Q. Imaging dermal blood flow through the intact rat skin with an optical clearing method // J. Biomed. Opt. 2010. Vol. 15. 026008.
15. Zhi Z., Han Z., Luo Q., Zhu D. Improve optical clearing of skin *in vitro* with propylene glycol as a penetration enhancer // Journal of Innovative Optical Health Sciences. 2009. Vol. 2, № 3. P. 269–278.
16. Sznitowska M. The influence of ethanol on permeation behavior of the porous pathway in the stratum corneum // Intern. J. Pharmacol. 1996. Vol. 137. P. 137–140.



17. Xu X., Zhu Q. Evaluation of skin optical clearing enhancement with Azone as a penetration enhancer // *Optics Communications*. 2007. Vol. 279. P. 223–228.
18. Jiang J., Wang R. K. How different molarities of oleic acid as enhancer exert its effect on optical clearing of skin tissue *in vitro* // *Journal of X-Ray Science and Technology*. 2005. Vol. 13. P. 149–159.
19. Chen K., Liang Y., Zhang Y. Study on reflection of human skin with liquid paraffin as the penetration enhancer by spectroscopy // *J. Biomed. Opt.* 2013. Vol. 18, № 10. 105001.
20. Zhong H., Guo Z., Wei H., Guo L., Wang C., He Y., Xiong H., Liu S. Synergistic effect of ultrasound and Thiazone - PEG 400 on human skin optical clearing *in vivo* // *Photochemistry and Photobiology*. 2010. Vol. 86. P. 732–737.
21. Wen X., Jacques S. L., Tuchin V. V., Zhu D. Enhanced optical clearing of skin *in vivo* and optical coherence tomography in-depth imaging // *J. Biomed. Opt.* 2012. Vol. 17, № 6. 066022.
22. Liu Y., Yang X., Zhu D., Luo Q. Optical clearing agents improve photoacoustic imaging in the optical diffusive regime // *Optics Letters*. 2013. Vol. 38, № 20. P. 4236–4239.
23. Jin X., Deng Z., Wang J., Ye Q., Mei J., Zhou W., Zhang C., Tian J. Study of the inhibition effect of thiazone on muscle optical clearing // *J. Biomed. Opt.* 2016. Vol. 21, № 10. 105004.
24. Kurihara-Bergstrom T., Knutson K., de Noble L. J., Goates C. Y. Percutaneous absorption enhancement of an ionic molecule by ethanol–water system in human skin // *Pharm. Res.* 1990. Vol. 7. P. 762–766.
25. Genina E. A., Bashkatov A. N., Tuchin V. V. Effect of ethanol on the transport of methylene blue through stratum corneum // *Medical Laser Application*. 2008. Vol. 23, № 1. P. 31–38.
26. Генина Э. А., Башкатов А. Н., Тучин В. В. Исследование влияния этанола на трансэпидермальный транспорт индоцианинового зелёного с помощью спектроскопии обратного рассеяния // *Изв. Сарат. ун-та, Нов. сер. Сер. Физика*. 2016. Т. 16, вып. 2. С. 91–96.
27. Гистология. Костная ткань. URL: [http://histologybook.ru/kostnaja\\_tkan.html](http://histologybook.ru/kostnaja_tkan.html) (дата обращения: 27.01.2017).
28. Boskey A., Mendelsohn R. Infrared analysis of bone in health and disease // *J. Biomed. Opt.* 2005. Vol. 10, № 3. 031102.
29. Ager III J. W., Nalla R. K., Breeden K. L., Ritchie R. O. Deep-ultraviolet Raman spectroscopy study of the effect of aging on human cortical bone // *J. Biomed. Opt.* 2005. Vol. 10, № 3. 034012.
30. Берёзов Т. Т., Коровкин Б. Ф. Биологическая химия. М. : Медицина, 1990. 543 с.
31. Pifferi A., Torricelli A., Taroni P., Bassi A., Chikoidze E., Giambattistelli E., Cubeddu R. Optical biopsy of bone tissue: a step toward the diagnosis of bone pathologies // *J. Biomed. Opt.* 2004. Vol. 9, № 3. P. 474–480.
32. Clarke B. Normal bone anatomy and physiology // *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2008. Vol. 3. P. S131–S139.
33. Уайт А., Хендлер Ф., Смит Э., Хилл Р., Леман И. Основы биохимии : в 3 т. М. : Мир, 1981. Т. 1, 539 с. ; Т. 2, 619 с. ; Т. 3, 731 с.
34. Fernández-Seara M. A., Wehrli S. L., Wehrli F. W. Diffusion of exchangeable water in cortical bone studied by nuclear magnetic resonance // *Biophysical Journal*. 2002. Vol. 82, № 1. P. 522–529.
35. Wilson E. E., Awonusi A., Morris M. D., Kohn D. H., Tecklenburg M. M. J., Beck L. W. Three structural roles for water in bone observed by solid-state NMR // *Biophysical Journal*. 2006. Vol. 90, № 10. P. 3722–3731.
36. Neuman W. F., Neuman M. W. The chemical dynamics of bone mineral. Chicago : University of Chicago Press, 1958. 209 p.
37. Wehrli F. W., Fernández-Seara M. A. Nuclear magnetic resonance studies of bone water // *Annals of Biomedical Engineering*. 2005. Vol. 33, № 1. P. 79–86.
38. Ascenzi A., Fabry C. Technique for dissection and measurement of refractive index of osteones // *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*. 1959. Vol. 6. P. 139–143.
39. Bourne G. H. The biochemistry and physiology of bone. N.Y. : Academic Press, 1956. 888 p.
40. Kou L., Labrie D., Chylek P. Refractive indices of water and ice in the 0.65–2.5 μm spectral range // *Appl. Opt.* 1993. Vol. 32. P. 3531–3540.
41. Martin K. A. Direct measurement of moisture in skin by NIR spectroscopy // *J. Soc. Cosmet. Chem.* 1993. Vol. 44. P. 249–261.
42. Ugryumova N., Matcher S. J., Attenburrow D. P. Measurement of bone mineral density via light scattering // *Phys. Med. Biol.* 2004. Vol. 49. P. 469–483.
43. Firbank M., Hiraoka M., Essenpreis M., Delpy D. T. Measurement of the optical properties of the skull in the wavelength range 650–950 nm // *Phys. Med. Biol.* 1993. Vol. 38. P. 503–510.
44. Bashkatov A. N., Genina E. A., Tuchin V. V. Tissue Optical Properties. Chapter 5 // *Handbook of Biomedical Optics* / eds. D. A. Boas, C. Pitris, N. Ramanujam. Boca Raton : Taylor & Francis Group ; L. : LLC ; N.Y. : CRC Press Inc., 2011. P. 67–100.
45. Semyachkina-Glushkovskaya O. V., Lychagov V. V., Bibikova O. A., Semyachkin-Glushkovskiy I. A., Sindeev S. S., Zinchenko E. M., Kassim M. M., Ali A.-F.F., Leith A. H., Ulanova M. V., Tuchin V. V. The experimental study of stress-related pathological changes in cerebral venous blood flow in newborn rats assessed by DOCT // *Journal of Innovative Optical Health Sciences*. 2013. Vol. 6, № 3. 1350023.
46. Genina E. A., Bashkatov A. N., Tuchin V. V. Tissue optical immersion clearing // *Expert Review of Medical Devices*. 2010. Vol. 7, № 6. P. 825–842.
47. Genina E. A., Bashkatov A. N., Larin K. V., Tuchin V. V. Light-tissue interaction at optical clearing. Chapter 7 // *Laser Imaging and Manipulation in Cell Biology* /



- ed. F. S. Pavone. Weinheim : Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2010. P. 115–164.
48. Борен К., Хафмен Д. Поглощение и рассеяние света малыми частицами. М. : Мир, 1986, 664 с.
49. Genina E. A., Bashkatov A. N., Korobko A. A., Zubkova E. A., Tuchin V. V., Yaroslavsky I. V., Altshuler G. B. Optical clearing of human skin: comparative study of permeability and dehydration of intact and photothermally perforated skin // *J. Biomed. Opt.* 2008. Vol. 13, № 2. 021102.
50. Котык А., Яначек К. Мембранный транспорт. М. : Мир, 1980. 341 с.
51. Синдеев С. С., Лычагов В. В., Бибикина О. А., Уланова М. В., Гекалюк А. С., Разубаева В. И., Агранович И. М., Аль Хассани Л., Аль-Фатле Ф., Тучин В. В., Семьякина-Глушковская О. В. Характеристика патологических изменений мозгового кровотока при развитии инсульта у гипертензивных крыс с помощью оптической когерентной томографии // Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2014. Т. 14, вып. 3. С. 76–80.
52. Srinivasan V. J., Jiang J. Y., Yaseen M. , Radhakrishnan H., Wu W., Barry S., Cable A. E., Boas D. A. Rapid volumetric angiography of cortical microvasculature with optical coherence tomography // *Opt. Lett.* 2010. Vol. 35, № 1. P. 43–45.

#### Образец для цитирования:

Генина Э. А., Башкатов А. Н., Семьякина-Глушковская О. В., Тучин В. В. Оптическое просветление черепной кости многокомпонентными иммерсионными растворами и визуализация церебрального венозного кровотока // Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Физика. 2017. Т. 17, вып. 2. С. 98–110. DOI: 10.18500/1817-3020-2017-17-2-98-110.

#### Optical Clearing of Cranial Bone by Multicomponent Immersion Solutions and Cerebral Venous Blood Flow Visualization

E. A. Genina, A. N. Bashkatov,  
O. V. Semyachkina-Glushkovskaya, V. V. Tuchin

Elina A. Genina, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya str., Saratov, 410012, Russia, eagenina@yandex.ru

Alexey N. Bashkatov, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya str., Saratov, 410012, Russia, a.n.bashkatov@mail.ru

Oxana V. Semyachkina-Glushkovskaya, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya str., Saratov, 410012, Russia, glushkovskaya@mail.ru

Valery V. Tuchin, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya str., Saratov, 410012, Russia, tuchinvv@mail.ru

**Background and Objectives:** Optical clearing of bone tissue is of great practical interest, which opens up the possibility of the development of minimally invasive laser diagnostics and brain therapy. The aim of this work is the study of the optical clearing of cranial bone using multicomponent optical clearing agents, and the possibility of the measurement of cerebral blood flow. **Materials and Methods:** Optical clearing of rat skull bone *ex vivo* and *in vivo* using two solutions with different compositions and refractive indices comprising ethanol or thiasone as biological tissue permeability enhancers, has been studied in the paper. Kinetics of collimated transmission of the bone samples under the influence of these solutions has been measured in the spectral range of 600–900 nm, and Doppler optical coherence tomography (DOCT) of rat cerebral vessels has been carried out. **Results:** Within 4 hours, a relative increase in the collimated transmittance under the action of the immersion solutions with inclusion of ethanol and thiasone by 15% and 80%, respectively, has been obtained. The effectiveness of optical clearing of bone tissue has been 4.5±0.4% and 13.2±3.4%, respectively. The use of the solutions has contributed to significant improvement of visualization of vena cerebri magna using DOCT without damage of the cranial bone and allowed determining the velocity of blood flow in the vein in the normal

state (7 mm/sec) as well as under the action of adrenaline (5.5 mm/sec). **Conclusion:** Thus, it is shown that the use of these solutions increases the probing depth of DOCT and improves the imaging of cerebral blood vessels, which can be used in the diagnosis of various pathological changes, including blood disorders.

**Key words:** cranial bone, multicomponent immersion solutions, collimated transmittance, Doppler optical coherence tomography, effectiveness of optical clearing, cerebral blood flow.

**Acknowledgements:** Authors also want to thank Vladislav V. Lychagov for his help with DOCT.

This work was supported by the Ministry of Education and Science of Russian Federation (project no. 12.1223.2017/PCCh) and grant of President of Russian Federation for the State support of leading scientific schools of the Russian Federation NSh-7898.2016.2.

#### References

1. Myllylä T., Toronov V., Claassen J., Kiviniemi V., Tuchin V. Near-infrared spectroscopy in multimodal brain research. Chapter 10. *Handbook of Optical Biomedical Diagnostics*. Ed. Valery V. Tuchin. 2nd ed.: in 2 vol. Vol. 1: Light – Tissue Interaction. Bellingham, SPIE Press, 2016, pp. 687–735.
2. Alderliesten T., De Vis J. B., Lemmers P. M. A., van Bel F., Benders, M.J.N.L., Hendrikse J., Petersen E. T. Simultaneous quantitative assessment of cerebral physiology using respiratory-calibrated MRI and near-infrared spectroscopy in healthy adults. *NeuroImage*, 2014, vol. 85, part 1, pp. 255–263.
3. Tong Y., Bergethon P. R., Frederick B. D. An improved method for mapping cerebrovascular reserve using concurrent fMRI and near-infrared spectroscopy with Regressor Interpolation at Progressive Time Delays (RIPTiDe). *NeuroImage*, 2011, vol. 56, no. 4, pp. 2047–2057.





4. Hoge R. D., Franceschini M. A., Covolan R. J. M., Huppert T., Mandeville J. B., Boas D. A. Simultaneous recording of task-induced changes in blood oxygenation, volume, and flow using diffuse optical imaging and arterial spin-labeling MRI. *NeuroImage*, 2005, vol. 25, no. 3, pp. 701–707.
5. Zhu D., Larin K., Luo Q., Tuchin V. V. Recent progress in tissue optical clearing. *Laser & Photonics Reviews*, 2013, vol. 7, no. 5, pp. 732–757.
6. Genina E. A., Bashkatov A. N., Sinichkin Yu. P., Yanina I. Yu., Tuchin V. V. Optical clearing of biological tissues: prospects of application in medical diagnostics and phototherapy. *Journal of Biomedical Photonics & Engineering*, 2015, vol. 1, no. 1, pp. 22–58.
7. Wang J., Zhang Y., Xu Th., Luo Qm., Zhu D. An innovative transparent cranial window based on skull optical clearing. *Laser Phys. Lett.*, 2012, vol. 9, pp. 469–473.
8. Bykov A., Hautala T., Kinnunen M., Popov A., Karhula S., Saarakkala S., Nieminen M. T., Tuchin V., Meglinski I. Imaging of subchondral bone by optical coherence tomography upon optical clearing of articular cartilage. *J. Biophotonics*, 2016, vol. 9, no. 3, pp. 270–275.
9. Neu C. P., Novak T., Gilliland K. F., Marshall P., Calve S. Optical clearing in collagen- and proteoglycan-rich osteochondral tissues. *Osteoarthr. Cartil.*, 2015, vol. 23, pp. 405–413.
10. Calve S., Ready A., Huppenbauer C., Main R., Neu C. P. Optical clearing in dense connective tissues to visualize cellular connectivity *in situ*. *PLoS ONE*, 2015, vol. 10, e0116662.
11. Berke I. M., Miola J. P., David M. A., Smith M. K., Price C. Seeing through musculoskeletal tissues: improving *in situ* imaging of bone and the lacunar canalicular system through optical clearing. *PLoS ONE*, 2016, vol. 11, no. 3, e0150268.
12. Genina E. A., Bashkatov A. N., Tuchin V. V. Optical clearing of cranial bone. *Advanced Optical Technologies*, 2008, vol. 2008, 267867.
13. Karma S., Homan J., Stoianovic C., Choi B. Enhanced fluorescence imaging with DMSO-mediated optical clearing. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, 2010, vol. 3, no. 3, pp. 153–158.
14. Zhu D., Wang J., Zhi Z., Wen X., Luo Q. Imaging dermal blood flow through the intact rat skin with an optical clearing method. *J. Biomed. Opt.*, 2010, vol. 15, 026008.
15. Zhi Z., Han Z., Luo Q., Zhu D. Improve optical clearing of skin *in vitro* with propylene glycol as a penetration enhancer. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, 2009, vol. 2, no. 3, pp. 269–278.
16. Sznitowska M. The influence of ethanol on permeation behavior of the porous pathway in the stratum corneum. *Int. J. Pharmacol.*, 1996, vol. 137, pp. 137–140.
17. Xu X., Zhu Q. Evaluation of skin optical clearing enhancement with Azone as a penetration enhancer. *Optics Communications*, 2007, vol. 279, pp. 223–228.
18. Jiang J., Wang R. K. How different molarities of oleic acid as enhancer exert its effect on optical clearing of skin tissue *in vitro*. *Journal of X-Ray Science and Technology*, 2005, vol. 13, pp. 149–159.
19. Chen K., Liang Y., Zhang Y. Study on reflection of human skin with liquid paraffin as the penetration enhancer by spectroscopy. *J. Biomed. Opt.*, 2013, vol. 18, no. 10, 105001.
20. Zhong H., Guo Z., Wei H., Guo L., Wang C., He Y., Xiong H., Liu S. Synergistic effect of ultrasound and Thiazone - PEG 400 on human skin optical clearing *in vivo*. *Photochemistry and Photobiology*, 2010, vol. 86, pp. 732–737.
21. Wen X., Jacques S.L., Tuchin V. V., Zhu D. Enhanced optical clearing of skin *in vivo* and optical coherence tomography in-depth imaging. *J. Biomed. Opt.*, 2012, vol. 17, no. 6, 066022.
22. Liu Y., Yang X., Zhu D., Luo Q. Optical clearing agents improve photoacoustic imaging in the optical diffusive regime. *Optics Letters*, 2013, vol. 38, no. 20, pp. 4236–4239.
23. Jin X., Deng Z., Wang J., Ye Q., Mei J., Zhou W., Zhang C., Tian J. Study of the inhibition effect of thiazone on muscle optical clearing. *J. Biomed. Opt.*, 2016, vol. 21, no. 10, 105004.
24. Kurihara-Bergstrom T., Knutson K., de Noble L. J., Goates C. Y. Percutaneous absorption enhancement of an ionic molecule by ethanol–water system in human skin. *Pharm. Res.*, 1990, vol. 7, pp. 762–766.
25. Genina E. A., Bashkatov A. N., Tuchin V. V. Effect of ethanol on the transport of methylene blue through stratum corneum. *Medical Laser Application*, 2008, vol. 23, no. 1, pp. 31–38.
26. Genina E. A., Bashkatov A. N., Tuchin V. V. Study of ethanol impact on the transepidermal transport of indocyanine green with backscattering spectroscopy. *Izv. Saratov Univ. (N.S.), Ser. Physics*, 2016, vol. 16, iss. 2, pp. 91–96. DOI: 10.18500/1817-3020-2016-16-2-91-96.
27. Histology. Bone tissue. Available at: [http://histologybook.ru/kostnaja\\_tkan.html](http://histologybook.ru/kostnaja_tkan.html) (accessed 27 January 2017) (in Russian).
28. Boskey A., Mendelsohn R. Infrared analysis of bone in health and disease. *J. Biomed. Opt.*, 2005, vol. 10, no. 3, 031102.
29. Ager III J. W., Nalla R. K., Breeden K. L., Ritchie R. O. Deep-ultraviolet Raman spectroscopy study of the effect of aging on human cortical bone. *J. Biomed. Opt.*, 2005, vol. 10, no. 3, 034012.
30. Berezov T. T., Korovkin B. F. *Biologicheskaya khimiya* [Biological chemistry]. Moscow, Medicine, 1990. 543 p. (in Russian).
31. Pifferi A., Torricelli A., Taroni P., Bassi A., Chikoidze E., Giambattistelli E., Cubeddu R. Optical biopsy of bone tissue: a step toward the diagnosis of bone pathologies. *J. Biomed. Opt.*, 2004, vol. 9, no. 3, pp. 474–480.
32. Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, 2008, vol. 3, pp. S131–S139.
33. White A., Hendler F., Smith E., Hill R., Leman I. *Osnovy biochimii* [Principles of biochemistry]: in 3th vol.





- Moscow, Mir, 1981, vol. 1, 539 p.; vol. 2, 619 p.; vol. 3, 731 p. (in Russian).
34. Fernández-Seara M.A., Wehrli S.L., Wehrli F.W. Diffusion of exchangeable water in cortical bone studied by nuclear magnetic resonance. *Biophysical Journal*, 2002, vol. 82, no. 1, pp. 522–529.
  35. Wilson E. E., Awonusi A., Morris M. D., Kohn D. H., Tecklenburg M. M. J., Beck L. W. Three structural roles for water in bone observed by solid-state NMR. *Biophysical Journal*, 2006, vol. 90, no. 10, pp. 3722–3731.
  36. Neuman W. F., Neuman M. W. *The chemical dynamics of bone mineral*. Chicago, University of Chicago Press, 1958. 209 p.
  37. Wehrli F. W., Fernández-Seara M. A. Nuclear magnetic resonance studies of bone water. *Annals of Biomedical Engineering*, 2005, vol. 33, no. 1, pp. 79–86.
  38. Ascenzi A., Fabry C. Technique for dissection and measurement of refractive index of osteones. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 1959, vol. 6, pp. 139–143.
  39. Bourne G. H. *The biochemistry and physiology of bone*. New York, Academic Press, 1956. 888 p.
  40. Kou L., Labrie D., Chylek P. Refractive indices of water and ice in the 0.65–2.5 $\mu\text{m}$  spectral range. *Appl. Opt.*, 1993, vol. 32, pp. 3531–3540.
  41. Martin K. A. Direct measurement of moisture in skin by NIR spectroscopy. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 1993, vol. 44, pp. 249–261.
  42. Ugryumova N., Matcher S.J., Attenburrow D. P. Measurement of bone mineral density via light scattering. *Phys. Med. Biol.*, 2004, vol. 49, pp. 469–483.
  43. Firbank M., Hiraoka M., Essenpreis M., Delpy D. T. Measurement of the optical properties of the skull in the wavelength range 650–950 nm. *Phys. Med. Biol.*, 1993, vol. 38, pp. 503–510.
  44. Bashkatov A. N., Genina E. A., Tuchin V. V. Tissue Optical Properties. Chapter 5. *Handbook of Biomedical Optics*. Eds. D. A. Boas, C. Pitris, N. Ramanujam. Boca Raton, London, New York, Taylor & Francis Group, LLC, CRC Press Inc., 2011, pp. 67–100.
  45. Semyachkina-Glushkovskaya O. V., Lychagov V. V., Bibikova O. A., Semyachkin-Glushkovskiy I. A., Sindeev S. S., Zinchenko E. M., Kassim M. M., Ali A.-F. F., Leith A. H., Ulanova M. V., Tuchin V. V. The experimental study of stress-related pathological changes in cerebral venous blood flow in newborn rats assessed by DOCT. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, 2013, vol. 6, no. 3, 1350023.
  46. Genina E. A., Bashkatov A. N., Tuchin V. V. Tissue optical immersion clearing. *Expert Review of Medical Devices*, 2010, vol. 7, no. 6, pp. 825–842.
  47. Genina E. A., Bashkatov A. N., Larin K. V., Tuchin V. V. Light-tissue interaction at optical clearing, Chapter 7. *Laser Imaging and Manipulation in Cell Biology*. Ed. F. S. Pavone. Weinheim, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2010, pp. 115–164.
  48. Bohren C. F., Huffman D. R. *Absorption and scattering of light by small particles*. New York, John Wiley & Sons Inc., 1983, 530 p.
  49. Genina E. A., Bashkatov A. N., Korobko A. A., Zubkova E. A., Tuchin V. V., Yaroslavsky I. V., Altshuler G. B. Optical clearing of human skin: comparative study of permeability and dehydration of intact and photothermally perforated skin. *J. Biomed. Opt.*, 2008, vol. 13, no. 2, 021102.
  50. Kotyk A., Yanacek K. *Membranny transport* [Membrane transport]. Moscow, Mir, 1980, 341 p. (in Russian).
  51. Sindeev S. S., Lychagov V. V., Bibikova O. A., Ulanova M. V., Gekaluk A. S., Razubaeva V. I., Agranovich I. M., Al Hassani L., Al-Fatle F., Tuchin V. V., Semyachkina-Glushkovskaya O. V. Characteristics of pathological changes in cerebral blood flow following stroke in hypertensive rats. *Izv. Saratov Univ. (N.S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2014, vol. 14, iss. 3. pp. 76–80 (in Russian).
  52. Srinivasan V. J., Jiang J. Y., Yaseen M., Radhakrishnan H., Wu W., Barry S., Cable A. E., Boas D. A. Rapid volumetric angiography of cortical microvasculature with optical coherence tomography. *Opt. Lett.*, 2010, vol. 35, no. 1, pp. 43–45.

**Cite this article as:**

Genina E. A., Bashkatov A. N., Semyachkina-Glushkovskaya O. V., Tuchin V. V. Optical Clearing of Cranial Bone by Multicomponent Immersion Solutions and Cerebral Venous Blood Flow Visualization. *Izv. Saratov Univ. (N.S.), Ser. Physics*, 2017, vol. 17, iss. 2, pp. 98–110 (in Russian). DOI: 10.18500/1817-3020-2017-17-2-98-110.