

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ИММЕРСИОННЫХ АГЕНТОВ НА ВЕСОВЫЕ И ГЕОМЕТРИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ТКАНИ МИОКАРДА *in vitro*

© 2018 г. Д.К. Тучина\* \*\* \*\*\*, А.Н. Башкатов\* \*\*,  
Э.А. Генина\* \*\*, В.В. Тучин\* \*\* \*\*\*\*

\*Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского,  
410012, Саратов, ул. Астраханская, 83

\*\*Национальный исследовательский Томский государственный университет, 634050, Томск, просп. Ленина, 36

\*\*\*Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 38

\*\*\*\*Институт проблем точной механики и управления РАН, 410028, Саратов, ул. Рабочая, 24

E-mail: tuchinadk@mail.ru

Поступила в редакцию 21.11.17 г.

Представлены результаты исследования влияния 40%-го раствора глюкозы и 60%-го раствора глицерина на весовые и геометрические параметры миокарда *in vitro* с целью повышения точности определения коэффициентов диффузии глюкозы и глицерина в миокарде путем учета в математическом алгоритме изменений геометрии образца ткани и содержания воды в ней. В ходе экспериментальных исследований измерена кинетика изменения веса, толщины, площади и объема образцов миокарда свиньи *in vitro* во время их иммерсии в исследованных растворах. Величина каждого измеряемого параметра начинает снижаться сразу же после помещения образцов миокарда в иммерсионные агенты (сжатие ткани), после чего наблюдается постепенный рост как веса, так и геометрических параметров образца (набухание ткани), после завершения которого практически во всех случаях достигается насыщение. Путем аппроксимации кинетики изменения измеренных величин произведена оценка степени дегидратации, а также характеристических времен поперечного и продольного сжатия и набухания миокарда. Выявлена более значительная и быстрая дегидратация ткани миокарда в случае применения 60%-го раствора глицерина, в то время как 40%-й раствор глюкозы вызывал более сильное и быстрое набухание миокарда.

Ключевые слова: миокард, глицерин, глюкоза, оптическое просветление, дегидратация, набухание.

DOI: 10.1134/S0006302918050174

По данным Всемирной организации здравоохранения сердечно-сосудистые заболевания являются самой распространенной причиной смертности во всем мире. Наряду с традиционными методами лечения и диагностики сердечно-сосудистых заболеваний быстро развиваются оптические методы, которые имеют большие перспективы использования в ближайшем будущем для диагностики и терапии в кардиологии [1–4]. Однако несмотря на многочисленные преимущества в использовании оптических методов, их применение связано с некоторыми ограничениями. Одна из проблем связана с высоким рассеянием излучения видимого и ближнего инфракрасного спектральных диапазонов в биологических тканях, что существенно ограничивает глубину проникновения света в ткань. В случае мышечной ткани это объясняется неоднородностью ткани, а именно ее во-

локнистой структурой, окруженной аморфным базовым веществом, которые имеют разные показатели преломления [5]. Одним из путей решения данной проблемы является «оптическое просветление» биотканей – метод управления оптическими свойствами биологических тканей путем воздействия на биологические ткани гиперосмотическими иммерсионными агентами [5]. В результате такого взаимодействия межклеточная жидкость частично замещается иммерсионным агентом с показателем преломления более высоким по сравнению с показателем преломления внутритканевой жидкости и близким к показателю преломления структурных компонентов ткани. В результате это приводит к уравниванию показателей преломления межклеточной жидкости и тканевых структур (коллагеновых волокон, клеточных органелл и т.д.) и, следовательно, к снижению

**Таблица 1.** Значения показателя преломления ( $n$ ), вязкости ( $\eta$ ), осмолярности ( $Osm$ ), молекулярной массы ( $Mr$ ), гидродинамического радиуса молекул ( $R_M$ ), pH иммерсионных агентов

Иммерсионный агент	$n_{589 \text{ нм}}$	$\eta$ , сП	$Osm$ , осмоль/л	$Mr$ , Да	$R_M$ , Å	pH
60%-й раствор глицерина	1,414	11 (20°C) [13,14]	12,48	92 [14]	2,6–3,1 [16]	4
40%-й раствор глюкозы	1,391	63 (60°C) [15]	2,22	180 [14]	3,6 [17]	3

светорассеяния в биоткани и увеличению глубины проникновения в нее света. Оптическое просветление биоткани представляет собой сложный процесс: при взаимодействии иммерсионного агента с биологической тканью происходит диффузия молекул агента в ткань, а также дегидратация биоткани, что влечет за собой изменение упаковки тканевых структур, что приводит к изменению размеров образца ткани [5,6]. Изменение геометрии ткани во время ее оптического просветления необходимо учитывать для более точного определения скорости диффузии иммерсионного агента и распределения света внутри ткани при оптической диагностике либо фототерапии различных заболеваний. Наряду с прочими, в качестве иммерсионных агентов широко используются растворы глюкозы и глицерина разных концентраций [6–10], так как они являются биологически совместимыми, обладают необходимой осмолярностью и достаточно высоким показателем преломления. Так, например, в работах [11,12] исследованы дегидратация, продольное и поперечное сжатие кожи при воздействии на нее растворов глюкозы и глицерина и была показана высокая эффективность данных растворов для оптического просветления биоткани.

Целью настоящего исследования являлось изучение влияния таких иммерсионных агентов, как водные 40%-й раствор глюкозы и 60%-й раствор глицерина на весовые и геометрические параметры ткани миокарда, что позволяет судить о степени дегидратации, поперечного и продольного сжатия и набухания ткани миокарда при воздействии иммерсионных агентов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве иммерсионных агентов использовали водный 40%-й раствор глюкозы («НовосибХимФарм» Новосибирск, Россия) и водный 60%-й раствор глицерина. Водный 60%-й раствор глицерина был получен путем смешивания дегидратированного глицерина («База № 1 химреактивов», Старая Купавна, Россия) и дистиллированной воды. Значения показателя преломления, вязкости, осмолярности, молекулярной массы, гидродинамического радиуса молекул, pH использованных иммерсионных аген-

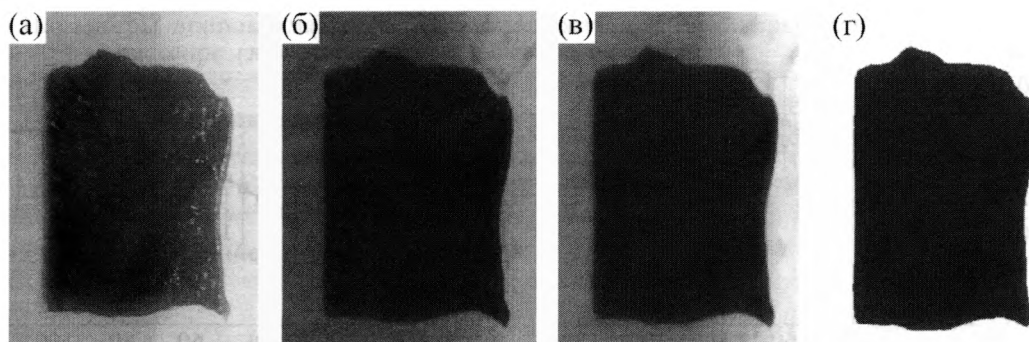
тов представлены в табл. 1. Показатели преломления растворов измеряли с помощью рефрактометра Аббе ИРФ-454Б2М («ЛОМО», Россия) на длине волны 589 нм.

Осмолярность раствора глицерина рассчитывали следующим образом. Молярную концентрацию определяли по формуле  $C_M = \frac{\rho}{M}$  [18], где  $C_M$  – молярная концентрация раствора,  $\rho$  – плотность раствора,  $M$  – молярная масса растворенного вещества. Для неэлектролитов молярная концентрация (1 моль/л) равна осмолярности (1 осмоль/л) [19]. В результате осмолярность 60%-го раствора глицерина равна 12,48 осмоль/л, а осмолярность 40%-го раствора глюкозы равна 2,22 осмоль/л, таким образом, осмолярность раствора глицерина приблизительно в 5,5 раза выше осмолярности раствора глюкозы.

pH растворов измеряли с помощью pH-метра pH-410 («НПО Аквилон», Подольск, Россия) с погрешностью прибора  $\pm 0,05$ .

Тонкие образцы миокарда размерами около  $15 \times 20$  мм вырезали скальпелем из сердца свиньи. Затем проводили измерения веса и толщины, а также регистрацию изображения интактного образца миокарда, далее образец помещали на 5 мин в иммерсионный агент, после чего вновь проводили измерения веса и толщины и регистрацию изображения. Измерения продолжались в течение 2 ч. Весовые измерения проводили на электронных весах SA210 (Scientech, США) с точностью  $\pm 1$  мг. Толщину образцов, помещенных между двумя предметными стеклами, измеряли в пяти точках микрометром с точностью  $\pm 5$  мкм, после чего значения усредняли.

Из полученных цифровых изображений вычисляли площадь образца. С помощью масштабной линейки определяли коэффициент перехода от линейных размеров в пикселях к линейным размерам в миллиметрах и размер всего изображения. Для оценки площади образца сначала изображение обрабатывали с помощью функции READ\_BLUE программного обеспечения MathCad (Parametric Technology Corporation, США) для выделения из полно-



**Рис. 1.** Цифровое изображение образца миокарда (а), синяя компонента цифрового изображения образца миокарда (б), обработанная медианным фильтром синяя компонента изображения (в), результат цифровой обработки изображения (г).

цветного изображения (рис. 1а) синей цветовой компоненты (рис. 1б). Для снижения шума, устранения бликов и т.д. использовали медианный фильтр (рис. 1в). Всем пикселям, которые не были заняты образцом, присваивалось значение 255 (рис. 1г). Число пикселей, занимаемых образцом (со значениями, отличными от 255), подсчитывали и переводили в квадратные миллиметры с помощью следующего уравнения:

$$S = \frac{F(H_S)}{\text{cols}(H_S)\text{rows}(H_S)} \frac{\text{rows}(H)z^2}{\text{cols}(H)},$$

где  $F$  – функция, рассчитывающая число пикселей, занимаемых образцом,  $\text{cols}$  и  $\text{rows}$  – соответственно количество колонок и строк изображения,  $H$  – первоначальное изображение образца,  $H_S$  – изображение образца без фона,  $z$  – ширина изображения.

В исследованиях использовали сорок образцов миокарда свиньи, двадцать из которых помещали в 40%-й раствор глюкозы, другие двадцать – в 60%-й раствор глицерина.

Полученные в процессе действия иммерсионных агентов временные зависимости толщины, веса и площади образцов миокарда нормировались на значения, измеренные в начальный момент времени (т.е. до помещения миокарда в раствор), усредняли по всем образцам. Затем экспериментальные данные аппроксимировали двухэкспоненциальным уравнением, первая часть которого описывает кинетику дегидратации ткани, а вторая – кинетику ее набухания:

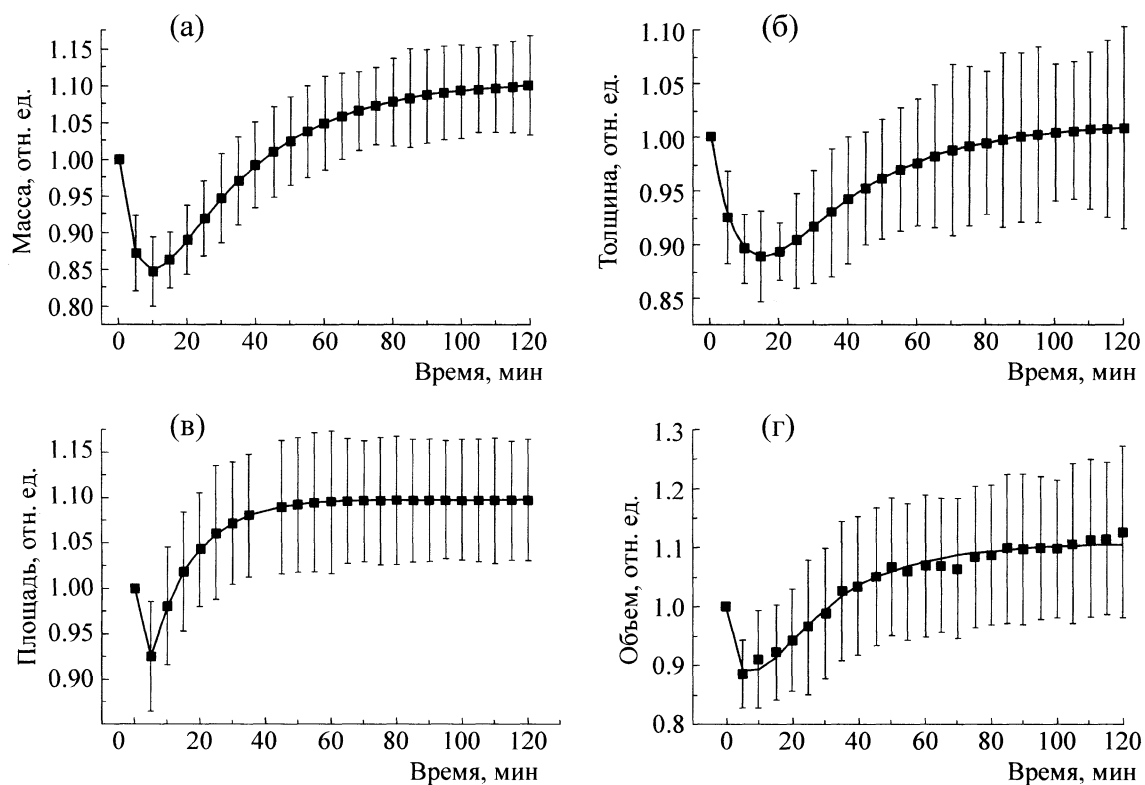
$$B_{\text{norm}}(t) = \frac{B(t)}{B(t=0)} = A_D \exp\left(-\frac{t}{\tau_w}\right) + B_S \left(1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_g}\right)\right) + y_0, \quad (1)$$

где  $B(t)$  и  $B(t=0)$  – значение измеренной величины в момент времени  $t$  и  $t=0$  соответственно,  $A_D$  и  $B_S$  – максимальная степень дегидратации/сжатия и набухания образца соответственно,  $\tau_w$  – характеристическое время дегидратации,  $\tau_g$  – характеристическое время набухания ткани,  $y_0$  – наименьшее значение величины, которое может быть достигнуто. Объем образцов определяли как произведение площади образца на его толщину.

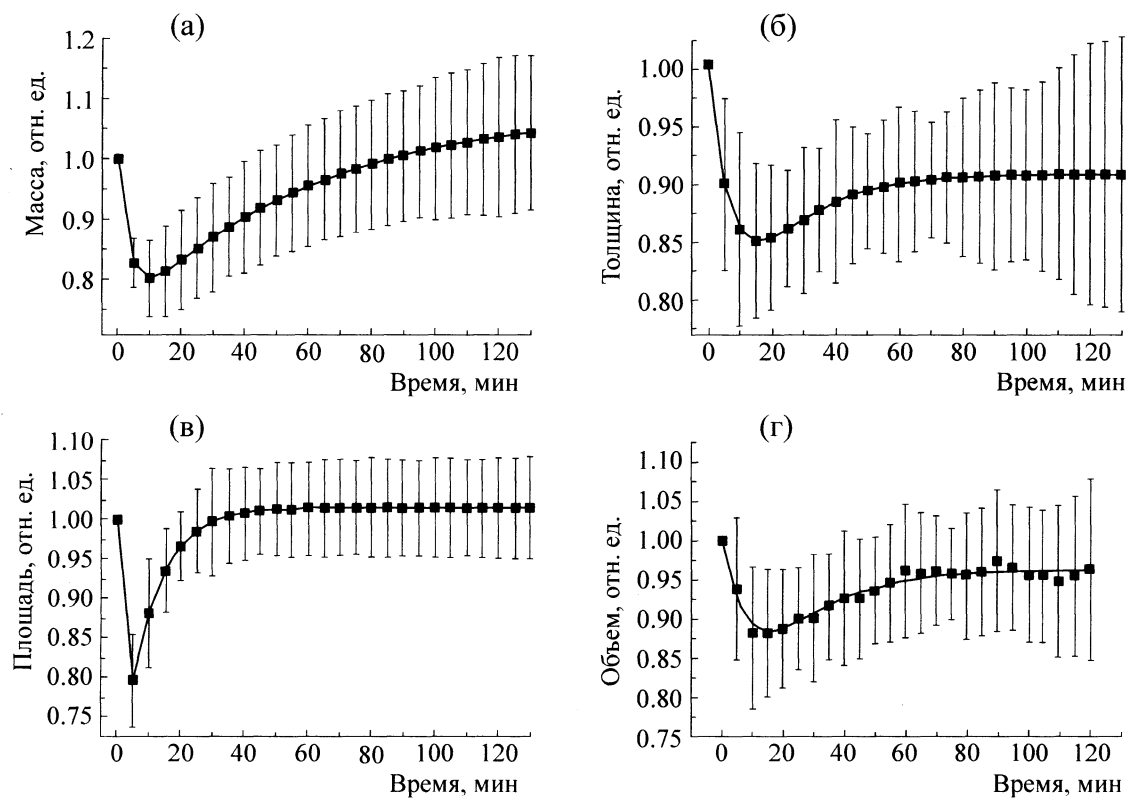
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 2 и 3 представлены зависимости веса (а), толщины (б), площади (в), объема (г) образцов миокарда свиньи от времени иммерсии в 40%-м растворе глюкозы и 60%-м растворе глицерина соответственно, нормированные на начальное значение и усредненные по всем исследуемым образцам. Из графиков видно, что значение каждой величины начинает снижаться сразу после помещения образцов в иммерсионный агент и продолжается в течение приблизительно 5–15 мин иммерсирования. Снижение веса образцов миокарда объясняется осмотической дегидратацией миокарда вследствие его взаимодействия с иммерсионным агентом.

Продольное и поперечное сжатие образцов происходит из-за изменения упаковки волокон ткани, которые сближаются при ее дегидратации. Одновременно с дегидратацией протекает и процесс набухания ткани, все измеряемые величины начинают увеличиваться, и практически во всех случаях кинетические кривые достигают насыщения. Для объяснения набухания образцов миокарда может быть использована модель полиэлектролитного геля [20–23]. Если рН ткани соответствует изоэлектрической точке, то силы притяжения, возникающие между одинаковым количеством положительных и отрицательных зарядов (циктер-ионными пара-



**Рис. 2.** Кинетика изменения веса (а), толщины (б), площади (в) и объема (г) образцов миокарда во время их иммерсии в 40%-м растворе глюкозы.



**Рис. 3.** Кинетика изменения веса (а), толщины (б), площади (в) и объема (г) образцов миокарда во время их иммерсии в 60%-м растворе глицерина.

**Таблица 2.** Параметры аппроксимации дегидратации/сжатия и набухания образцов миокарда, иммерсированных в 40%-м растворе глюкозы и 60%-м растворе глицерина

Параметры аппроксимации		Иммерсионный агент	
		40%-й раствор глюкозы	60%-й раствор глицерина
Дегидратация/набухание (масса)	$A^W$	$0,28 \pm 0,04$	$0,33 \pm 0,09$
	$\tau_w^W$ , мин	$4,66 \pm 2,32$	$3,83 \pm 2,24$
	$B^W$	$0,41 \pm 0,07$	$0,40 \pm 0,12$
	$\tau_g^W$	$42,20 \pm 11,02$	$48,59 \pm 14,54$
Поперечное сжатие/набухание (толщина)	$y_0^W$	$0,71 \pm 0,05$	$0,67 \pm 0,08$
	$A^l$	$0,24 \pm 0,10$	$0,28 \pm 0,07$
	$\tau_w^l$ , мин	$9,45 \pm 8,14$	$8,70 \pm 7,79$
	$B^l$	$0,31 \pm 0,14$	$0,26 \pm 0,12$
Продольное сжатие/набухание (площадь)	$\tau_g^l$	$63,84 \pm 58,79$	$61,75 \pm 59,76$
	$y_0^l$	$0,76 \pm 0,10$	$0,73 \pm 0,07$
	$A^s$	$0,23 \pm 0,07$	$0,34 \pm 0,05$
	$\tau_w^s$ , мин	$1,50 \pm 0,59$	$0,18 \pm 0,06$
Объемное сжатие/набухание (объем)	$B^s$	$0,36 \pm 0,14$	$0,34 \pm 0,07$
	$\tau_g^s$	$9,23 \pm 5,40$	$11,01 \pm 3,43$
	$y_0^s$	$0,76 \pm 0,07$	$0,66 \pm 0,05$
	$A^v$	$0,34 \pm 0,13$	$0,35 \pm 0,03$
	$\tau_w^v$ , мин	$5,53 \pm 4,69$	$6,30 \pm 4,36$
	$B^v$	$0,45 \pm 0,16$	$0,31 \pm 0,12$
	$\tau_g^v$	$24,73 \pm 9,87$	$15,29 \pm 12,88$
	$y_0^v$	$0,66 \pm 0,12$	$0,65 \pm 0,03$

ми) [24], удерживают ткань в наиболее плотном состоянии, степень набухания в данном случае минимальна [20]. Так, например, ранее было показано, что коллаген роговицы обладает максимальной степенью набухания при pH 4,0, а минимальной – при pH 7,0 [25]. Близкие результаты были получены для невысушенной роговицы вола [26]. Таким образом, при смещении значения pH от изоэлектрической точки гидратация ткани увеличивается за счет уменьшения количества пар цвиттер-ионов и, соответственно, увеличения результирующего статического заряда. Выше изоэлектрической точки результирующий заряд является отрицательным, ниже – положительным и может влиять на набухание ткани двумя способами. Во-первых, для поддержания электрической нейтральности в ткани статический заряд будет притягивать большее количество противоположных ионов, что приведет к накоплению во внутритканевом пространстве мелких ионов. Это вызовет избыточное внутреннее осмотическое дав-

ление и увеличит набухание. Во-вторых, уменьшение числа пар цвиттер-ионов приведет к уменьшению силы притяжения и, тем самым, ослабит плотность упаковки фибрилл, что тоже вызовет увеличение набухания [25].

Полученные временные зависимости веса, толщины и площади образцов миокарда, помещенных в иммерсионные агенты, были аппроксимированы уравнением (1) для получения количественных характеристик дегидратации/сжатия и набухания образцов. Параметры аппроксимации временных зависимостей веса, толщины, площади и объема образцов миокарда, иммерсированных в 40%-м растворе глюкозы и 60%-м растворе глицерина, усредненные по всем исследуемым образцам, представлены в табл. 2.

Оценивая полученные параметры аппроксимации, можно сказать, что более сильная (см. значения  $A^W$  и  $y_0$  в табл. 2) и быстрая ( $\tau_w$ ) дегидратация миокарда вызвана раствором гли-

церины. При этом такая тенденция наблюдается для каждой измеряемой величины – веса, толщины, площади. Более интенсивная дегидратация миокарда при применении раствора глицерина по сравнению с раствором глюкозы объясняется более высокой осмолярностью глицерина.

В работе [7] было получено более эффективное оптическое просветление миокарда при иммерсии в водном 60%-м растворе глицерина по сравнению с водным 40%-м раствором глюкозы. Этот результат можно объяснить, в том числе, более сильной и быстрой дегидратацией миокарда, помещенного в 60%-й раствор глицерина по сравнению с 40%-м раствором глюкозы.

Приблизительно одинаковая степень набухания миокарда ( $B^W$ ) достигается в обоих случаях, однако при иммерсии образцов в растворе глюкозы значение степени набухания ( $\tau_g^W$ ) достигается за меньшее время. Набухание биоткани связано с диффузией молекул иммерсионного агента в ее межфибрилярное пространство, а так как глюкоза имеет молекулярную массу, которая примерно в два раза больше молекулярной массы глицерина, то диффузия молекул глюкозы в ткань приводит к более сильному увеличению веса образца ткани за меньшее время. Более быстрое набухание миокарда в случае иммерсии в 40%-м растворе глюкозы может быть связано с тем, что на этапе дегидратации воздействие глицерина привело к более сильному сжатию образца и более сильной потере веса, в связи с этим для возврата ткани из этого состояния требуется больше времени.

Интересно отметить, что характеристические времена, описывающие процессы объемного набухания образцов миокарда ( $\tau_g^V = 24,73 \pm 9,87$  мин для 40%-го раствора глюкозы и  $\tau_g^V = 15,29 \pm 12,88$  мин для 60%-го раствора глицерина) достаточно близки к характеристическим временам скорости диффузии молекул глюкозы и глицерина ( $\tau = 20 \pm 12$  мин для молекул глюкозы и  $\tau = 12 \pm 10$  мин для молекул глицерина [7,27]), полученным из анализа кинетики коллимированного пропускания при использовании тех же самых иммерсионных агентов.

Более сильное поперечное набухание миокарда ( $B^l$ ), помещенного в раствор глюкозы, можно объяснить различной гигроскопичностью глюкозы и глицерина. К каждой молекуле глицерина может присоединиться около шести молекул воды [28], в то время как глюкоза может присоединить порядка десяти молекул воды [29]. Таким образом, если молекула глю-

козы находится в биоткани, она способна удерживать больше молекул воды, оставшихся в ткани, а это приведет к большему набуханию ткани. Также более сильное и медленное набухание было получено из кинетики изменения всего объема.

Набухание образцов миокарда также является следствием помещения образцов в раствор с рН, равным приблизительно 3,0 и 4,0 для раствора глюкозы и глицерина соответственно (табл. 1), при том что рН ткани миокарда равен примерно 5,5 [22].

Следует отметить, что набухание миокарда во время иммерсии в использованных растворах, сменяющее дегидратацию, не приводит к снижению коллимированного пропускания образцов [7]; возможно лишь сравнительно небольшое уменьшение пропускания света. Подобное поведение биоткани аналогично эффектам, наблюдавшимся при оптическом просветлении склеры глаза *in vitro* 40%-м раствором глюкозы [30]: значительное оптическое просветление образца склеры сопровождалось уменьшением его толщины. При более длительном воздействии раствора глюкозы на склеру процесс оптического просветления приходит к насыщению, а толщина склеры увеличивается. Несмотря на сложное поведение толщины образца ткани под действием 40%-го раствора глюкозы, вариации толщины образца не сильно снижали его оптическое просветление [30].

Представленные экспериментальные закономерности носят общий характер и применимы для качественного описания поведения многих фиброзных биотканей, таких как скелетная мышца, дерма кожи, склера глаза, твердая мозговая оболочка и других. Следует отметить, что помимо важности настоящих исследований для развития оптических методов диагностики и лечения сердечно-сосудистых заболеваний с точки зрения их большей оптической прозрачности представленные результаты должны найти применение при разработке новых технологий хранения органов для трансплантации в криопротекторных жидкостях, представителями которых являются глицерин и глюкоза [31–33].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе исследований были определены параметры кинетики изменения веса, толщины, площади и объема образцов миокарда свиньи во время их иммерсии в 60%-м растворе глицерина и 40%-м растворе глюкозы. Путем аппроксимации кинетики изменения измеренных величин были оценены степени дегидратации, поперечного и продольного сжатия и набухания

миокарда, а также характеристические времена дегидратации и набухания ткани миокарда. В результате была выявлена более сильная и быстрая дегидратация ткани миокарда для 60%-го раствора глицерина, в то время как 40%-й раствор глюкозы вызывал более сильное и быстрое набухание миокарда. Полученные результаты могут быть использованы для дальнейших исследований сердечной мышечной ткани и развития оптических методов лечения и диагностики сердечно-сосудистых заболеваний, а также разработки новых технологий хранения органов для трансплантации в криопротекторах, которыми являются глицерин и глюкоза.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты №№ 18-52-16025, 18-42-703012, 18-32-00587, 17-02-00358), Российского научного фонда (грант № 18-12-00328), Стипендии Президента РФ №СП-3507.2018.4.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. S. Alali, M. Ahmad, A. Kim, et al., *J. Biomed. Opt.* **17** (4), 045004 (2012).
2. T. Lindbergh, E. Haggblad, H. Ahn, et al., *J. Biophotonics* **4** (4), 268 (2011).
3. Y. Wang, K. Zhang, D. Duan, and G. Yao, *Biomed. Opt. Exp.* **8** (3), (2017).
4. Y. Xinwen, G. Yu, C. M. Charles, and P. H. Christine, *J. Biomed. Opt.* **21** (6), 061006 (2016)
5. *Handbook of Optical Biomedical Diagnostics*, 2<sup>nd</sup> edition, Ed. by V. V. Tuchin (SPIE Press, Bellingham, Washington, 2016).
6. X. Wen, Z. Mao, Z. Han, et al., *J. Biophotonics* **3** (1), 44 (2010).
7. D. K. Tuchina, A. N. Bashkatov, E. A. Genina, and V. V. Tuchin, *J. Innovat. Optic. Health Sci.* **8** (3), 1541006 (2015).
8. J. Wang, N. Ma, R. Shi, et al., *IEEE J. of Selected Topics in Quant. Electronics* **20** (2), 7101007 (2014).
9. L. M. Oliveira, M. I. Carvalho, E. Nogueira, and V. V. Tuchin, *Laser Physics* **23** (7), 075606 (2013).
10. X. Guo, Z. Guo, H. Wei, et al., *Laser Physics* **20** (9), 1849 (2010).
11. E. A. Genina, A. N. Bashkatov, A. A. Korobko, et al., *J. Biomed. Opt.* **13** (2), 021102 (2008).
12. D. K. Tuchina, R. Shi, A. N. Bashkatov, et al., *J. Biophotonics* **8** (4), 273 (2015).
13. *Glycerine Producers Association, Physical properties of glycerine and its solutions* (1963).
14. R. C. Rowe, P. J. Sheskey, and M. E. Quinn, *Handbook of Pharmaceutical Excipients* (Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, 2009).
15. L. A. Alves, J. B. A. Silva, and M. Giulietti, *J. Chem. Engineer. Data* **52** (6), 2166 (2007).
16. S. G. Schultz and A. K. Solomon, *J. Gen. Physiol.* **44**, 1189 (1961).
17. V. Amsden, *Macromolecules* **31** (23), 8382 (1998).
18. Н. Ф. Стась и Л. Д. Свинцова, *Химия растворов* (Изд-во ТПУ, Томск, 2006).
19. А. А. Рагимов и Г. Н. Щербакова, *Инфузионно-трансфузионная терапия* (ГЭОТАР-Медиа, М., 2010).
20. Y. Huang and K. M. Meek, *Biophys. J.* **77**, 1655 (1999).
21. Т. Т. Березов и Б. Ф. Коровкин, *Биологическая химия* (Медицина, М., 1998).
22. М. И. Равич-Щербо и В. В. Новиков, *Физическая и коллоидная химия* (Высш. шк., М., 1975).
23. E. M. Culav, C. H. Clark, and M. J. Merrilees, *Phys. Therapy* **79**, 308 (1999).
24. A. Katchalsky, *Prog. Biophys. Chem.* **4**, 1 (1954).
25. A. Pitie, *Biochem. J.* **41**, 185 (1947).
26. А. Пири и Р. ван Гейнинген, *Биохимия глаза* (Медицина, М., 1968).
27. Д. К. Тучина, Дис. ... канд. ф.-м. н. (СГУ имени Н.Г. Чернышевского, Саратов, 2016).
28. J. W. Wiechers, J. C. Dederen, and A. V. Rawlings, in *Skin Moisturization*, 2<sup>nd</sup> Ed., Ed. by A. V. R. Rawlings and J. Leyden (Informa Healthcare, Taylor & Francis Group, New York, 2009), pp. 309–321.
29. C. Molteni and M. Parrinello, *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 2168 (1998).
30. А. Н. Башкатов, Э. А. Генина, Ю. П. Синичкин и др., *Биофизика* **48** (2), 309 (2003).
31. S. Giwa, J. K. Lewis, L. Alvarez, et al., *Nature Biotechnol.* **35** (6), 530 (2017).
32. J. Choi and J. C. Bischof, *Cryobiology* **60**, 52 (2010).
33. M. P. Longinotti, J. A. T. Gonzalez, and H. R. Corti, *Cryobiology* **69**, 84 (2014).