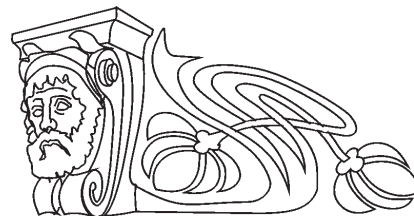




БИОФИЗИКА И МЕДИЦИНСКАЯ ФИЗИКА

УДК 535.361.22:577.3

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ЭТАНОЛА НА ТРАНСЭПИДЕРМАЛЬНЫЙ ТРАНСПОРТ ИНДОЦИАНИНОВОГО ЗЕЛЁНОГО С ПОМОЩЬЮ СПЕКТРОСКОПИИ ОБРАТНОГО РАССЕЯНИЯ



Э. А. Генина^{1,2}, А. Н. Башкатов^{1,2}, В. В. Тучин¹⁻³

¹Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

²Томский государственный университет

³Институт проблем точной механики и управления РАН, Саратов
E-mail: eagenina@yandex.ru

В работе исследовано влияние 40%-ного водного раствора этанола на трансэпидермальный транспорт фотодинамического красителя индоцианинового зелёного с помощью спектроскопии обратного рассеяния. Впервые получено значение коэффициента диффузии красителя через роговой слой *ex vivo* при использовании этанола в качестве усилителя диффузии: $(6.85 \pm 3.75) \times 10^{-7} \text{ см}^2/\text{с}$.

Ключевые слова: индоцианиновый зелёный, роговой слой эпидермиса, коэффициент диффузии, спектроскопия обратного рассеяния.

Study of Ethanol Impact on the Transepidermal Transport of Indocyanine Green with Backscattering Spectroscopy

E. A. Genina, A. N. Bashkatov, V. V. Tuchin

In the work, impact of aqueous 40%-ethanol solution on the transepidermal transport of photodynamic dye indocyanine green has been studied with backscattering spectroscopy. It has been first obtained the value of the dye diffusion coefficient through the stratum corneum *ex vivo* at the use of ethanol as a diffusion enhancer: $(6.85 \pm 3.75) \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$.

Key words: indocyanine green, epidermal stratum corneum, diffusion coefficient, backscattering spectroscopy.

DOI: 10.18500/1817-3020-2016-16-2-91-96

Введение

Трансэпидермальный молекулярный транспорт имеет долгую историю и до сих пор вызывает большой интерес в связи с развитием методов местной доставки лекарственных препаратов. Внутренние пути и механизмы проникновения воды, оптических просветляющих агентов, фотодинамических красителей и различных лекарств через эпидермальный слой кожи активно исследуются многими научными группами

[1–7]. Серьёзной проблемой является улучшение молекулярного транспорта через роговой слой эпидермиса, который является естественным барьером, препятствующим диффузии агентов в подлежащие слои кожи [8, 9]. В настоящее время предложено большое количество как химических, так и физических методов усиления проницаемости рогового слоя эпидермиса. Например, в качестве химических усилителей диффузии оптических просветляющих агентов предложены азон [10], олеиновая кислота [11], диметилсульфоксид (ДМСО) [12, 13], этанол [14, 15], пропиленгликоль [8, 16], тиазон [17], жидкий парафин [18] и некоторые другие [19, 20].

Несмотря на большое количество работ, посвящённых исследованию влияния химических усилителей диффузии на чрескожный молекулярный транспорт, проблема эффективной доставки биосовместимых красителей в кожу остаётся по-прежнему актуальной.

Одним из широко используемых красителей как в диагностике (в основном ангиографии) [21], так и фотодинамической и фототермической терапии [22, 23] является индоцианиновый зелёный (ИЗ). ИЗ (4,5-бензоиндотрикарбоцианин) представляет собой трикарбоцианиновый краситель. Химическая формула ИЗ – $\text{C}_{43}\text{H}_{47}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}_2\text{Na}_2$, молекулярный вес – 775. Краситель является водорастворимым анионным фотосенсибилизатором [24]. В красной и ближней инфракрасной областях спектра ИЗ имеет две полосы поглощения, коротковолновая (~690–730 нм) соответствует поглощению димера, а длинноволновая (~770–790 нм) – поглощению мономера красителя. Увеличение скорости диффузии красителя в кожу при его местном нанесении является важной задачей при разработке методов эффективного лечения некоторых дерматологических заболеваний, в частности акне (*acne vulgaris*).



Целью работы является исследование влияния 40%-ного раствора этилового спирта на транспорт индоцианинового зелёного через эпидермальный слой кожи.

1. Материалы и методы

Для исследований использовался ИЗ (Aldrich Chemical Co., США), растворённый в дистиллированной воде и 40%-ном водном растворе этилового спирта. Концентрация ИЗ в растворах составляла 1 мг/мл.

Материалом для исследования диффузии ИЗ в биоткани послужили 10 образцов кожи белых аутбредных лабораторных крыс, полученные посредством аутопсии. Все измерения проводились

при комнатной температуре ($\sim 20^\circ\text{C}$). Перед проведением эксперимента подкожный жировой слой и шерсть тщательно удалялись. Размер образцов составлял $\sim 3 \times 3 \text{ см}^2$, толщина – $0.87 \pm 0.04 \text{ мм}$.

Измерения коэффициента отражения проводились с помощью оптического многоканального анализатора LESA-5 («Биоспек», Россия). На отверстии цилиндрической кюветы, предварительно заполненной исследуемым раствором, закреплялся образец кожи. Кювета закреплялась в лабораторном штативе горизонтально так, чтобы раствор соприкасался с поверхностью образца, как показано на рис. 1. Волоконно-оптический датчик прибора, в свою очередь, закреплялся на противоположной поверхности исследуемого образца.

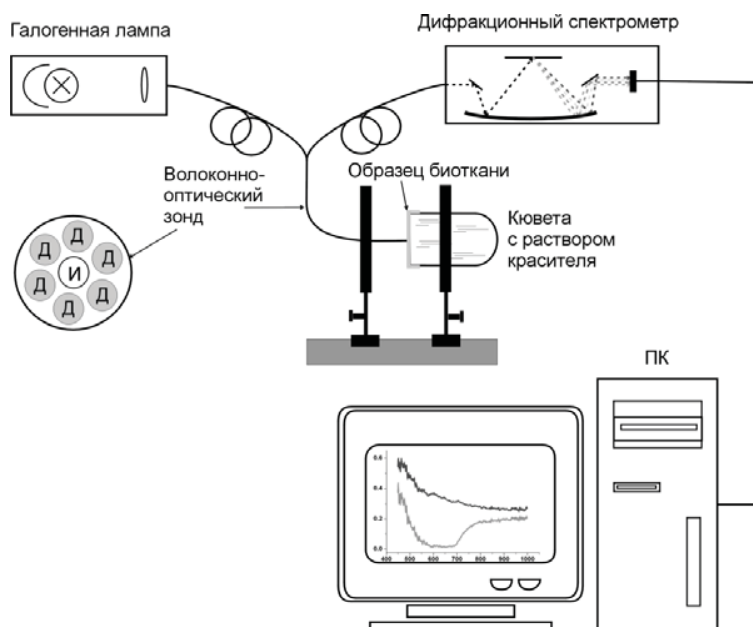


Рис. 1. Схема экспериментальной установки: Д – волокно-детектор, И – волокно-источник

Образец располагался таким образом, чтобы проникновение красителя происходило со стороны эпидермиса, а регистрация спектров обратного рассеяния осуществлялась со стороны дермы. Во избежание дегидратации образца кожи в процессе эксперимента он покрывался с внешней стороны парафиновой пленкой (Parafilm «М», American National Con, Chicago, IL, USA) за исключением участка, контактирующего с волоконно-оптическим датчиком.

Волоконно-оптический датчик («Биоспек», Россия) состоял из 7 волокон, центральное волокно (И) служило для транспорта излучения в биоткань, а шесть других, симметрично располо-

женных по окружности (Д) вокруг центрального волокна, – для сбора излучения, обратно рассеянного образцом биоткани. Диаметр каждого волокна составлял 200 мкм, расстояние между центрами излучающего и приемных волокон – 290 мкм. Источником излучения в спектральном диапазоне от 450 до 1000 нм служила галогенная лампа. Время накопления сигнала составляло 100 мс. Нормировка спектров перед началом измерений проводилась на сигнал от эталонного отражателя BaSO_4 («Ocean Optics», США).

Измерение коэффициента обратного рассеяния (диффузного отражения) кожи производилось в течение 4–8 часов до прекращения



изменения интенсивности отражённого сигнала. По измеренным спектрам диффузного отражения рассчитывались спектры эффективной оптической плотности (ЭОП) с помощью соотношения [25]:

$$A(\lambda) = \ln(R(\lambda)), \quad (1)$$

где $A(\lambda)$ – эффективная оптическая плотность (ЭОП) кожи, $R(\lambda)$ – зависящий от времени экспериментально измеренный коэффициент отражения, λ – длина волны, нм.

С учетом уравнения (1) ЭОП образца кожи, измеренная в различные моменты времени при проникновении красителя в биоткань, определялась следующим образом [26, 27]:

$$A(t, \lambda) = A(t=0, \lambda) + \Delta\mu_a(t, \lambda)L, \quad (2)$$

где t – время, λ – длина волны, $\Delta\mu_a(t, \lambda) = \varepsilon(\lambda)C(t)$ – разность между коэффициентами поглощения биоткани в каждый момент времени и в начальный момент времени (фактически определяет коэффициент поглощения красителя внутри биоткани), $\varepsilon(\lambda)$ – молярный коэффициент поглощения красителя, $C(t)$ – концентрация красителя в биоткани, $A(t=0, \lambda)$ – ЭОП образца, измеренная в начальный момент времени до его окрашивания и L – эффективная длина пути регистрируемых фотонов зависит как от поглощающих, так и от рассеивающих характеристик среды, а также от расстояния между источником и детектором. Поскольку в данной работе расстояние источник–детектор составляло 290 мкм, что соизмеримо с транспортной длиной свободного пробега фотонов, величина L определяется в основном рассеивающими свойствами слизистой оболочки [28].

Уравнение (2) можно переписать следующим образом:

$$\Delta A(t, \lambda) = A(t, \lambda) - A(t=0, \lambda) = \Delta\mu_a(t, \lambda)L. \quad (3)$$

Кинетика изменения значения $\Delta A(t, \lambda)$ позволяет определить коэффициент диффузии красителя в биоткани. Более подробно методика определения коэффициента диффузии описана в работах [26, 27].

2. Результаты и их обсуждение

На рис. 2 представлены спектры оптической плотности водного раствора ИЗ (правая ось), рассчитанной исходя из измеренного спектра коллимированного пропускания $T(\lambda)$ раствора с помощью выражения $A(\lambda) = -\ln(T(\lambda))$, и ЭОП кожи в процессе взаимодействия водного раствора ИЗ с эпидермисом (левая ось). Хорошо видно, что спектр раствора красителя в исследуемом диапазоне имеет две хорошо выраженные по-

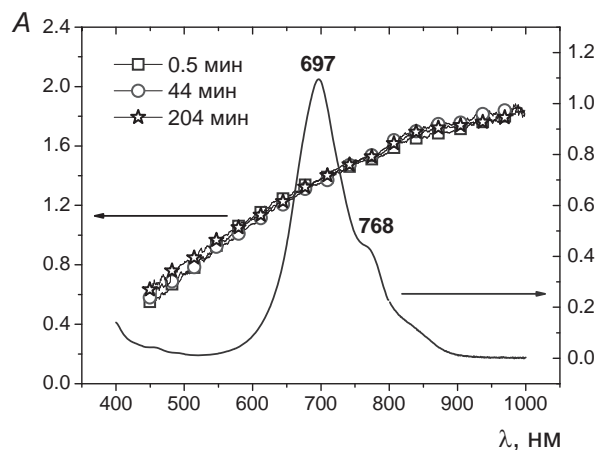


Рис. 2. Спектры оптической плотности водного раствора индоцианинового зелёного с концентрацией 1 мг/мл (правая ось) и эффективной оптической плотности кожи через различные временные интервалы после начала её взаимодействия с данным раствором со стороны эпидермиса (левая ось)

лосы, определяемые поглощением мономерной (768 нм) и димерной (697 нм) формами ИЗ. В водном растворе при данной концентрации красителя значительно преобладает димерная форма.

Диффузия красителя в ткань должна вызывать изменение формы спектра диффузного отражения ткани, выражающееся в появлении полос поглощения красителя на фоне спектра ЭОП кожи. По данным работы [29], в процессе диффузии водного раствора ИЗ в дерме кожи наблюдалось вначале преобладание мономеров, вызванное, по-видимому, малой концентрацией красителя в ткани, а затем, по мере увеличения его концентрации, – постепенный переход из мономерной формы в димерную. Однако на рис. 2 хорошо видно, что в течение почти 3.5 ч от начала воздействия форма спектра кожи практически не изменилась. Это свидетельствует о чрезвычайно низкой проницаемости рогового слоя эпидермиса для водного раствора ИЗ.

Хорошо известно, что диффузия водных растворов веществ через кожный барьер затруднена. Толщина рогового слоя составляет приблизительно 10–20 мкм. Он состоит из корнеоцитов или ороговевших плотно упакованных плоских безъядерных клеток диаметром приблизительно 40 мкм и толщиной 0.5 мкм [30]. Корнеоциты включены в липидный бислойный матрикс. Межклеточные липиды формируют непрерывную структуру и создают прочный гидрофобный барьер [30, 31].

Возможными путями проникновения водорастворимых препаратов через роговой слой



являются придатки кожи (в основном волосяные фолликулы) и поры, пронизывающие эпидермис [9, 30, 32, 33].

За счёт наличия липидного барьера длина пути для молекул воды в роговом слое в 50 раз больше толщины рогового слоя. Это предполагает извилистость пути проникновения гидрофильных веществ по межклеточному матриксу. Однако часть вещества может также проникать в корнеоциты за счёт их набухания в водной среде [30].

В работе [1] было получено, что коэффициент диффузии воды в роговом слое варьирует от 2.5×10^{-10} до 8.34×10^{-10} см²/с в зависимости от степени гидратации рогового слоя. Таким образом, структура и состав рогового слоя способствуют уменьшению значения коэффициента диффузии в 10^3 раз по сравнению с его значением в клеточных мембранах [34].

Типичные значения коэффициентов диффузии красителей в растворах находятся в диапазоне $10^{-5} - 10^{-6}$ см²/с [35, 36]. Значение коэффициента диффузии водного раствора ИЗ в дермальном слое образца кожи, полученное в работе [29], составляет $(7.7 \pm 2.5) \times 10^{-7}$ см²/с. Однако при взаимодействии водного раствора ИЗ с роговым слоем эпидермиса полного окрашивания образцов кожи в течение всего периода наблюдения не происходило, что не дало возможности в данном случае оценить коэффициент диффузии.

На рис. 3 представлены спектры оптической плотности ИЗ в 40%-ном растворе этилового спирта (правая ось) и ЭОП кожи в процессе взаимодействия этого раствора с эпидермисом (левая ось). Две полосы в спектре спиртового раствора красителя определяются поглощением мономеров (785 нм) и димеров (720 нм). В данном случае при такой же концентрации красителя в спиртовом растворе преобладает мономерная форма.

В течение первого часа изменения в спектре обратного рассеяния кожи хорошо заметны. На длине волны 806 нм наблюдается пик, соответствующий длине волны максимума поглощения мономеров ИЗ. Смещение положения максимума поглощения ИЗ в коже в длинноволновую область по сравнению со спектром ИЗ в растворе объясняется влиянием рассеяния ткани.

С течением времени амплитуда пика увеличивается, что соответствует приближению границы окрашенной ткани к детектору и увеличению концентрации красителя в зондируемом объёме. При этом положение пика поглощения мономеров остаётся вблизи длины волны 806 нм.

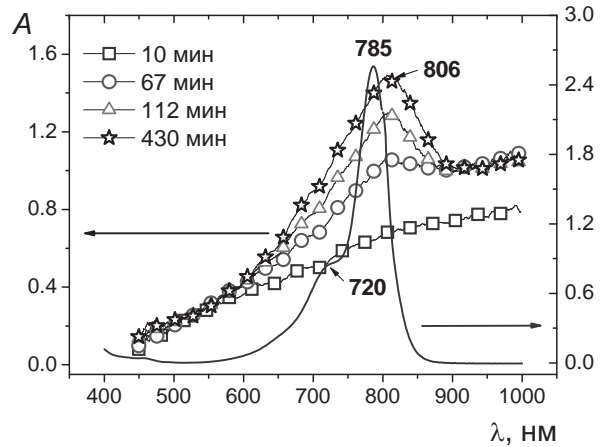


Рис. 3. Спектры оптической плотности 40%-ного спиртового раствора индоцианинового зелёного с концентрацией 1 мг/мл (правая ось) и эффективной оптической плотности кожи через различные временные интервалы после начала её взаимодействия с данным раствором со стороны эпидермиса (левая ось)

Для образца кожи, представленного на рис. 3, изменение спектров ЭОП завершалось после 400 мин взаимодействия образца с раствором красителя. На рис. 4 показана кинетика параметра $\Delta A(t, \lambda)$, характеризующего изменение поглощения биоткани с течением времени на четырёх длинах волн из области полосы поглощения раствора ИЗ. Прекращение изменения показывает, что образец в области соприкосновения с раствором прокрашен на всю толщину. Это позволило оценить коэффициент диффузии спиртового раствора ИЗ в коже через роговой слой эпидермиса. Коэффициент диффузии рассчитывался для каждого образца на 4 длинах волн, и полученные значения усреднялись. Среднее значение для 5 образцов составило $(6.85 \pm 3.75) \times 10^{-7}$ см²/с.

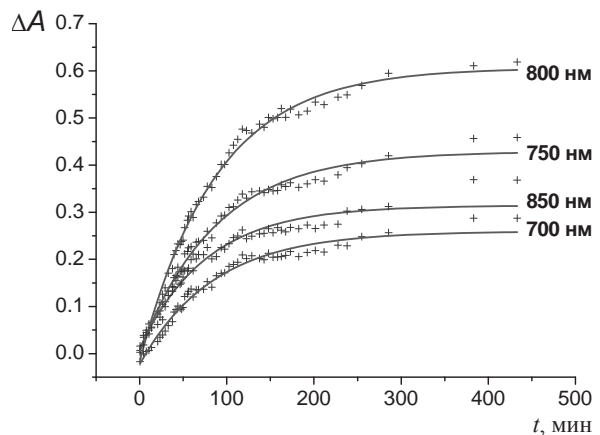


Рис. 4. Кинетика разностной эффективной оптической плотности кожи при её взаимодействии со спиртовым раствором индоцианинового зелёного на четырёх длинах волн из области полосы поглощения данного раствора



Как видно, добавление этанола в раствор красителя значительно облегчает его диффузию. Так, значение коэффициента диффузии ИЗ через роговой слой эпидермиса при использовании спиртового раствора сопоставимо с его значением в дерме при использовании водного раствора красителя, в то время как водный раствор ИЗ в течение того же периода времени практически не проникает в роговой слой.

Хорошо известно, что этанол является растворителем, модифицирующим барьерные свойства рогового слоя. Ряд работ посвящён исследованию влияния этанола различных концентраций на транспорт некоторых полярных/ионных агентов в кожу мыши *in vitro* [33, 37, 38]. Показано, что 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 [14, 37, 38]. Такие дополнительные пути проникновения являются результатом комбинации изменений конформации протеинов, реорганизации внутри участков липидных полярных головок или экстракции липидов [15, 19, 33].

Заключение

В работе представлены экспериментальные результаты исследования диффузии фотодинамического красителя индоцианинового зелёного, растворённого в дистиллированной воде и 40%-ном водном растворе этилового спирта, через роговой слой эпидермиса кожи крысы *ex vivo*. Показано, что при взаимодействии рогового слоя с водным раствором красителя проникновения красителя в кожу за время наблюдения (4–6 ч) не происходит. При использовании в качестве усилителя диффузии ИЗ водного 40%-го спиртового раствора наблюдалось полное окрашивание образца в течение 6–7 часов, в результате чего удалось оценить коэффициент диффузии ИЗ через роговой слой эпидермиса, который составил $(6.85 \pm 3.75) \times 10^{-7}$ см²/с. Результаты могут быть использованы для разработки новых и оптимизации существующих методов фототермолиза и фототерапии кожных заболеваний.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ НШ-7898.2016.2.

Список литературы

1. Blank I. H., Moloney J., Emslie A. G., Simon I., Apt C. The diffusion of water across the stratum corneum as a function of its water content // *J. Invest. Dermatol.* 1984. Vol. 82. P. 188–194.
2. Sennhenn B., Giese K., Plamann K., Harendt N., Kolmel K. *In vivo* evaluation of the penetration of topically applied drugs into human skin by spectroscopic method // *Skin Pharmacol.* 1993. Vol. 6. P. 152–160.
3. Mitragotri S. *In situ* determination of partition and diffusion coefficients in the lipid bilayers of stratum corneum // *Pharm. Res.* 2000. Vol. 17. P. 1026–1029.
4. Weigmann H.-J., Lademann J., Schanzer S., Lindemann U., von Pelchrzim R., Schaefer H., Sterry W., Shah V. Correlation of the local distribution of topically applied substances inside the stratum corneum determined by tape stripping to differences in bioavailability // *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 2001. Vol. 14. P. 93–103.
5. Star W. M., Aalders M. C. G., Sac A., Sterenborg H.J.C.M. Quantitative model calculation of the time-dependent Protoporphyrin IX concentration in normal human epidermis after delivery of ALA by passive topical application or iontophoresis // *Photochem. Photobiol.* 2002. Vol. 75, № 4. P. 424–432.
6. Genina E. A., Bashkatov A. N., Korobko A. A., Zubkova E. A., Tuchin V. V., Yaroslavsky I., 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. P. 021102.
7. Andanson J. M., Hadgraft J., Kazarian S. G. *In situ* permeation study of drug through the stratum corneum using attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopic imaging // *J. Biomed. Opt.* 2009. Vol. 14, № 3. P. 034011.
8. Williams A. C., Barry B. W. Penetration enhancers // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2004. Vol. 56. P. 603–618.
9. Cevc G., Vierl U. Nanotechnology and the transdermal route. A state of the art review and critical appraisal // *J. Controlled Release.* 2010. Vol. 141, № 3. P. 277–299.
10. Xu X., Zhu Q. Evaluation of skin optical clearing enhancement with Azone as a penetration enhancer // *Optics Communications.* 2007. Vol. 279. P. 223–228.
11. Jiang J., Wang R. K. How different molarities of oleic acid as enhancer exert its effect on optical clearing of skin tissue *in vitro* // *J. X-Ray Science and Technology.* 2005. Vol. 13. P. 149–159.
12. Jiang J., Boese M., Turner P., Wang R. K. Penetration kinetics of dimethyl sulphoxide and glycerol in dynamic optical clearing of porcine skin tissue *in vitro* studied by Fourier transform infrared spectroscopic imaging // *J. Biomed. Opt.* 2008. Vol. 13, № 2. P. 021105.
13. Bui A. K., McClure R. A., Chang J., Stoianovici C., Hirshburg J., Yeh A. T., Choi B. Revisiting optical clearing with dimethyl sulfoxide (DMSO) // *Lasers Surg. Med.* 2009. Vol. 41. P. 142–148.



14. *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.
15. *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.
16. *Zhi Z., Han Z., Luo Q., Zhu D.* Improve optical clearing of skin in vitro with propylene glycol as a penetration enhancer // *J. Innov. Opt. Health Sci.* 2009. Vol. 2, № 3. P. 269–278.
17. *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* // *Photochem. Photobiol.* 2010. Vol. 86, № 3. P. 732–737.
18. *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. P. 105001.
19. *Kai T., Mak V. H., Potts R. O., Guy R. H.* Mechanism of percutaneous penetration enhancement: effect of *n*-alkanols on the permeability barrier of hairless mouse skin // *Controlled Release.* 1990. Vol. 12. P. 103–112.
20. *Beastall J., Guy R. H., Hadgraft J., Wilding I.* The influence of urea on percutaneous absorption // *Pharmaceutical Research.* 1986. Vol. 3, № 5. P. 294–297.
21. *Alander J. T., Kaartinen I., Laakso A., Patila T., Spillmann T., Tuchin V. V., Venermo M., Valisuo P.* A review of indocyanine green fluorescent imaging in surgery // *Intern. J. Biomedical Imaging.* 2012. Vol. 2012. P. 940585.
22. *Park K. Y., Kim J. Y., Hyun M. Y., Oh W. J., Jeong S. Y., Han T. Y., Ahn J. Y., Kim B. J., Kim M. N.* 1,213 Cases of treatment of facial acne using indocyanine green and intense pulsed light in Asian skin // *BioMed Research International.* 2015. Vol. 2015. P. 596161.
23. *Khosroshahi M. E., Nourbakhsh M. S., Saremi S., Tabatabaee F.* Characterization of skin tissue soldering using diode laser and indocyanine green: *in vitro* studies // *Lasers Med. Sci.* 2010. Vol. 25, № 2. P. 207–212.
24. *Mamoon A.-M., Gamal-Eldeen A. M., Ruppel M. E., Smith R. J., Tsang T., Miller L. M.* *In vitro* efficiency and mechanistic role of indocyanine green as photodynamic therapy agent for human melanoma // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.* 2009. Vol. 6. P. 105–116.
25. *Mourant J. R., Johnson T. M., Los G., Bigio I. J.* Non-invasive measurement of chemotherapy drug concentrations in tissue : preliminary demonstrations of *in vivo* measurements // *Phys. Med. Biol.* 1999. Vol. 44. P. 1397–1417.
26. *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.
27. *Генина Э. А., Башкатов А. Н., Чикина Е. Э., Тучин В. В.* Диффузия метиленового синего в слизистой оболочке верхнечелюстной пазухи человека // *Биофизика.* 2007. Т. 52, № 6. С. 1104–1111.
28. *Mourant J. R., Bigio I. J., Jack D. A., Johnson T. M., Miller H. D.* Measuring absorption coefficients in small volumes of highly scattering media : source-detector separations for which path lengths do not depend on scattering properties // *Appl. Opt.* 1997. Vol. 36, № 22. P. 5655–5661.
29. *Генина Э. А., Башкатов А. Н., Тучин В. В.* Исследование диффузии фотодинамического красителя индоцианинового зеленого в коже с помощью спектроскопии обратного рассеяния // *Квантовая электроника.* 2014. Т. 44, № 7. С. 689–695.
30. *Schaefer H., Redelmeier T. E.* *Skin Barrier. Principles of Percutaneous Absorption.* Basel : Karger, 1996. 310 p.
31. *Barry B. W.* Action of skin penetration enhancers – the lipid protein partitioning theory // *Intern. J. Cosmetic Science.* 1988. Vol. 10. P. 281–293.
32. *Genina E. A., Bashkatov A. N., Sinichkin Yu. P., Kochubey V. I., Lakodina N. A., Altshuler G. B., Tuchin V. V.* *In vitro* and *in vivo* study of dye diffusion into the human skin and hair follicles // *J. Biomed. Opt.* 2002. Vol. 7. P. 471–477.
33. *Ghanem A. -H., Mahmoud H., Higuchi W. I., Liu P., Good W. R.* The effects of ethanol on the transport of lipophilic and polar permeants across hairless mouse skin : Methods/validation of a novel approach // *Intern. J. Pharm.* 1992. Vol. 78. P. 137–156.
34. *Mollee T. R., Bracken A. J.* A Model of solute transport through stratum corneum using solute capture and release // *Bull. of Mathematical Biology.* 2007. Vol. 69. P. 1887–1907.
35. *Физические величины : справочник / под ред. И. С. Григорьевой, Е. З. Мейлихова.* М. : Энергоатомиздат, 1991. 1232 с.
36. *Котык А., Яначек К.* *Мембранный транспорт.* М. : Мир, 1980. 341 с.
37. *Inamori T., Ghanem A.-H., Higuchi W. I., Srinivasan V.* Macromolecules transport in and effective pore size of ethanol pretreated human epidermal membrane // *Intern. J. Pharm.* 1994. Vol. 105. P. 113–123.
38. *Peck K. D., Ghanem A. -H., Higuchi W. I.* Hindered diffusion of polar molecules through and effective pore radii estimates of intact and ethanol treated human epidermal membrane // *Pharm. Res.* 1994. Vol. 11. P. 1306–1314.