

С. С. Мальченкова, Н. С. Голяк, В. М. Царенков

РОЛЬ МОДЕЛЕЙ *IN VIVO* В ПРОГНОЗИРОВАНИИ ТРАНСДЕРМАЛЬНОЙ ПРОНИЦАЕМОСТИ**Белорусский государственный медицинский университет,
г. Минск, Республика Беларусь**

В статье перечислены основные виды лабораторных животных, которые используются для изучения трансдермальной проницаемости химических соединений. Описаны особенности строения эпидермиса, дермы и придатков кожи у человека и лабораторных животных (мелких грызунов, свиньи, обезьяны). Подчеркнуты достоинства и недостатки разных лабораторных животных как объектов для трансдермального моделирования *in vivo*. Выделен способ экстраполяции, называемый «методом параллелограмма» или «Triple Pack», для прогнозирования проницаемости кожи человека при наличии экспериментальных данных проницаемости кожных покровов животных *in vivo* и человека *in vitro*. В статье приведено общее описание дизайна экспериментов по определению трансдермальной проницаемости веществ *in vivo* (включая подготовку животных, помещений, апплицируемого вещества) согласно Руководствам Всемирной организации здравоохранения и Организации экономического сотрудничества и развития. В качестве наиболее совершенных и безопасных путей быстрого обнаружения веществ в дерме у добровольцев выделен тканевой микродиализ, в клетках рогового слоя – соскоб липкой лентой («tapestripping»).

Ключевые слова: лабораторные животные, трансдермальная проницаемость, *in vivo*, тканевой микродиализ.

ВВЕДЕНИЕ

Суть трансдермальной терапии заключается в проникновении лекарственных веществ с поверхности неповрежденной кожи в кровеносное русло. В отличие от топических трансдермальные лекарственные формы вызывают системные эффекты [1]. Поиск молекул, способных успешно преодолевать кожный барьер и создавать эффективные концентрации в крови, связан с отбором среди существующих лекарственных веществ по определенным физико-химическим критериям (молекулярная масса, липофильность, растворимость, температура плавления и др.) и приемлемым фармакокинетическим параметрам. Предположение о возможности трансдермального переноса вещества подтверждается успешным моделированием проницаемости в системах *in vitro* и *in vivo*. В условиях лабораторных исследований *in vivo* моделями выступают подопытные животные. В клинических испытаниях с участием добровольцев оцениваются перспективы трансдермальной терапии в человеческой популяции.

Цель настоящего обзора – определить,

какие модели *in vivo* используются для изучения трансдермальной проницаемости веществ и каково их значение в прогнозировании доступности лекарственных средств при трансдермальной доставке.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве материалов исследования использовали публикации в специализированных изданиях и сети Интернет. Поиск осуществляли среди оригинальных русско-, англо- и немецкоязычных статей. Применяли теоретические методы исследования – контент-анализ, синтез, сравнение.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

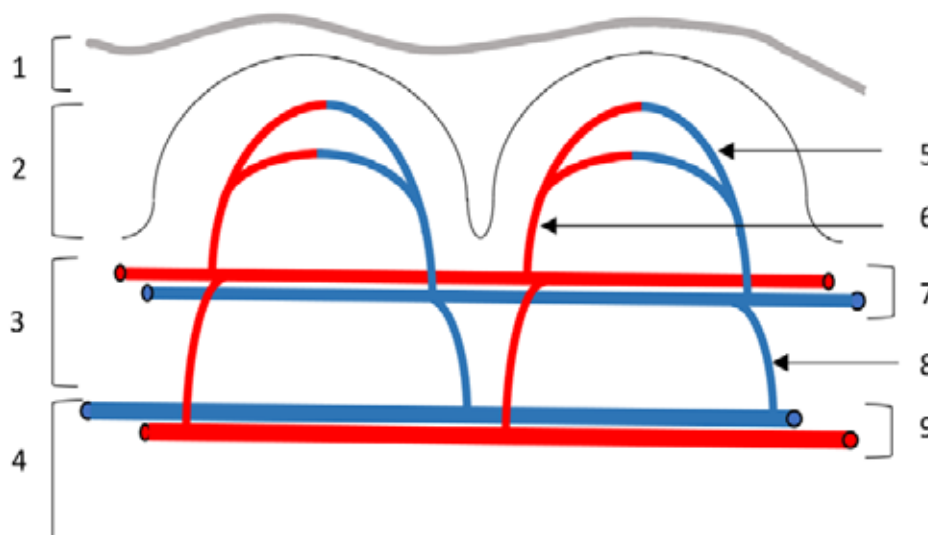
Значение эпидермального барьера и микроциркуляторного русла кожи для трансдермальной абсорбции. Кожа человека – это многослойный орган, который ограничивает внутренние среды организма от внешнего мира. Кожа состоит из неоднородных по организации и структуре слоев: эпидермиса, дермы и гиподермы. Глубокий слой гиподермы примыкает к

фасциям мышц и состоит из адипоцитов. Дерму формирует соединительная ткань и гелеобразный матрикс. Дерма и гиподерма хорошо кровоснабжаются: треть всего циркулирующего объема крови находится в этих тканях. В дерме выделяют два слоя: сосочковый и сетчатый. Тонкий сосочковый слой образует характерные бугорки, которые примыкают к базальному слою эпидермиса. В каждый сосочек дермы от поверхностного микрососудистого сплетения восходит артериола и нисходит венула, формируя таким образом капиллярную петлю. Плотность капилляризации составляет до 65 микрососудов на 1 мм² кожи. Глубокие микрососудистые сплетения находятся на границе дермы и гиподермы и связаны с поверхностными сплетениями сетью анастомозов. В отличие от дермы и подкожной жировой клетчатки эпидермис не имеет сосудов. Эпидермис состоит из нескольких слоев, в которых клетки находятся на разных стадиях созревания, и активно обновляется. Все питательные вещества и кислород многослойный эпидермис получает из прилегающего к нему микроциркуляторного русла дермы [2]. Общая схема микроциркуляторного русла кожи отображена на рисунке 1.

Основным барьером кожи, ограничивающим проникновение веществ извне, является мертвый роговой слой эпидерми-

са. Плотная упаковка клеток рогового слоя (корнеоцитов) не позволяет большинству экзогенных молекул проникнуть в нижележащие живые слои эпидермиса и дерму. Однако для разных веществ эпидермис в той или иной степени проницаем. Проницаемость эпидермиса определяется в основном его толщиной и липидным составом. Роговой слой состоит в среднем из 10–20 слоев мертвых корнеоцитов с общей толщиной около 20 мкм. Корнеоциты придают механическую прочность роговому слою. Они окружены липидными бислоями, в которые встроены молекулы керамидов и холестерина [3]. Липидный домен рогового слоя используется гидрофильными и липофильными молекулами для диффузии во внутренние слои эпидермиса. Гидрофильные же вещества преодолевают роговой пласт по белковым филаментам [4]. Проникнув через эпидермис и базальную мембрану, вещества могут абсорбироваться в микроциркуляторное русло и далее в системный кровоток. Так происходит всасывание лекарственных средств из трансдермальных форм.

Кожа лабораторных животных (крыс, мышей, кроликов, морских свинок) имеет такие же слои, как и человеческая, что дает возможность использовать их в качестве тест-систем для моделирования трансдермального переноса. Толщина, со-



- 1 – эпидермис; 2 – сосочковый слой дермы; 3 – сетчатый слой дермы; 4 – гиподерма;
 5 – венозная часть капиллярной петли; 6 – артериальная часть капиллярной петли;
 7 – поверхностное микрососудистое сплетение; 8 – нисходящая венула; 9 – глубокое микрососудистое сплетение.

Рисунок 1. – Общая схема микроциркуляции в коже

отношение липидных компонентов, плотность покрытия волосяными фолликулами обуславливают межвидовые различия профилей проницаемости. Изучение кожной проницаемости *in vivo* заключается не только в определении степени поглощения вещества слоями кожи, но и в оценке его системной абсорбции. *In vivo* моделями выступают лабораторные животные и здоровые добровольцы. В отличие от исследований *in vitro* с использованием в качестве кожного барьера иссеченной кожи трупов животных или человека, а также синтетических мембранных материалов, в экспериментах *in vivo* участвуют анатомически и физиологически целостные модели. Неспоримое преимущество *in vivo* моделей заключается в возможности оценить в живом организме не только кинетические параметры абсорбции вещества, но и его фармакодинамические эффекты [5].

Модели *in vivo* для исследования трансдермального переноса: испытания на лабораторных животных. Животные модели могут использоваться для проведения не только доклинических испытаний, но и лабораторных тестов, не связанных с производством лекарственных средств, например, для установления потенциальной токсичности химических веществ и их гигиенического нормирования на производстве и в сельском хозяйстве, для гигиенической регистрации и сертификации изделий, которые непосредственно контактируют с кожными покровами человека, для разработки норм охраны труда. В гигиенических тестах для изучения дермального воздействия химических соединений могут оцениваться не только их местное раздражающее действие, но и кожно-резорбтивные эффекты [6].

Лабораторные животные не являются идеальными *in vivo* моделями для исследования трансдермальной проницаемости по нескольким причинам. Во-первых, хотя строение и физиология кожи человека и животных в общем схожие, отдельные эпидермальные слои покрова животных могут отличаться по толщине, плотности покрытия волосами (шерстью) и потовыми железами. Эти отличия обуславливают, как правило, большую проницаемость кожи животного по сравнению с человеческой. Учитывая этот факт, исследования трансдермального переноса веществ считаются релевантными, если кожа жи-

вотной модели показывает такую же проницаемость, как и человеческая, или если значение проницаемости кожи у животного постоянно одинаково отличается от таковой у человека [7]. Во-вторых, животные имеют другую анатомию расположения внутренних органов и тканей. Кроме того, животные инстинктивно слизывают языком нанесенные вещества, поэтому особенностью схемы исследования является обязательное изолирование места кожи с нанесенной субстанцией. Для этого могут использоваться пластиковые щитки или ветеринарные воротники [8], либо животные принудительно фиксируются в специальных домиках [6].

Для подтверждения системной абсорбции субстанций с поверхности кожи в эксперименте используются различные виды животных. Чаще всего это млекопитающие из отряда Грызуны (Rodentia): крысы, мыши, хомяки, морские свинки, кролики. Гораздо реже используются более крупные животные, а именно свиньи и приматы из семейств Цепкохвостые и Мартышковые: беличьи обезьяны (саймири) и бенгальский макак (макак-резус). Последний является распространенным объектом для различного рода медицинских исследований, поскольку он филогенетически близок человеку. Кожа обезьян отличается от человеческой наличием шерстного покрова, а не волос, однако внутренние части рук, ног и туловища безволосые. В отличие от человека, по всей волосистой поверхности кожи приматов присутствуют апокриновые железы, и протоки сальных желез открываются наружу, а не в устье волосяного фолликула, как у человека. Преимущество приматов состоит в том, что это крупные животные, которые подходят для серийного забора крови [7]. Обезьяны были бы самыми подходящими моделями для изучения трансдермальной абсорбции, однако они дорогие и должны ввозиться из-за рубежа, кроме того, сотрудники лабораторий должны быть обучены особенностям обращения с этими животными [9].

Крупной животной моделью является свинья. Свиная шкура очень похожа на человеческую кожу. Она имеет волосяной покров – щетину, протоки сальных желез, как и у человека, открываются в устья волосяных фолликулов, хорошо выражен сосочковый слой дермы, схожи белковые и липидные фракции эпидермиса, а также архитектура ми-

кроциркуляторного русла. Однако роговой слой кожи свиньи (около 26 мкм) плотнее человеческого (около 20 мкм). Современные способы исследования трансдермальной проницаемости с помощью ячеек Франца отодвинули на второй план использование свиньи как полноценной животной модели. При этом для экспериментов *in vitro* более употребительны иссеченные участки шкуры спины или уха свиньи. Самой подходящей моделью с профилем проницаемости, максимально близким к человеческой коже, считается кожа свиного уха [7]. В 1970–80-ые гг. был проведен ряд сравнительных опытов с участием добровольцев и разных видов животных. Например, исследование кожной проницаемости радиоактивно меченных галопротина (противогрибковое средство), ацетилцистеина, кортизона, кофеина и тестостерона на моделях *in vivo* (человек, свинья, крыса, кролик) выявило аналогичную проницаемость у свиньи и человека. В похожем опыте с участием макак-резус, морских свинок и человека анализировалась трансдермальная проницаемость бензойной кислоты, гидрокортизона и тестостерона. Кожа обезьян продемонстрировала профиль проницаемости, аналогичный человеческому, а кожа грызунов отличалась большей проницаемостью по сравнению с человеческой и крупных животных [5].

Наиболее доступными животными для тестов *in vivo* являются грызуны. Это мелкие животные, которые быстро размножаются, неприхотливы в пище, недорогие, для своего содержания и разведения не требуют ни больших площадей, ни специальных навыков персонала по обращению и уходу за ними. Однако как модели для изучения кожной проницаемости они пригодны менее всего. Строение кожи грызунов значительно отличается от строения кожи человека (таблица 1). У грызунов все эпидермальные слои тоньше и граница между ними слабо выражена. Основной барьерный пласт клеток рогового слоя грызунов в 2–3 раза тоньше человеческого. В

коже человека отчетливо выражен рельеф сосочкового слоя дермы, а дерма грызунов (особенно мышей) этого рельефа практически не имеет. У мышей сосочковый слой рыхлый и легко отделяется от эпидермиса [10]. Кожа всех грызунов как в моделях *in vivo*, так и *in vitro* более проницаема для химических соединений, чем кожа свиней, обезьян и человека. Препарированная кожа лабораторных крыс, используемая для *in vitro* анализа кожной абсорбции, всегда более проницаема, чем кожа живой крысы, однако менее проницаема, чем человеческая кожа *in vitro* [7, 11].

Недостатком грызунов является то, что их кожа покрыта густой шерстью для сохранения тепла. Для человеческой кожи не характерна настолько высокая плотность волосных фолликулов. Альтернативными моделями могут выступать безволосые грызуны (крысы, мыши и морские свинки). Голые линии мышей, лишенные тимуса (нокаутные), были выведены в 70-ых гг. XX в. [12]. Безволосая кожа этих животных казалась идеальной для изучения трансдермальной проницаемости. Однако анализ данных, полученных в исследованиях с 1993 по 2014 г., показал, что голая кожа нокаутных мышей и крыс в несколько раз более проницаема, чем человеческая. Исключение составили безволосые морские свинки (Hairless Guinea Pigs, HGP). Их эпидермис такой же толщины, как и человеческий, с резко выраженными переходами от слоя к слою, а дерма усеяна густой сетью капилляров. В ряде опытов значения проницаемости для кожи голых морских свинок коррелируют со значениями проницаемости человеческой кожи [7].

Исследование кожной проницаемости химических веществ должно проводиться не только на оптимальной *in vivo* модели, но и учитывать внутривидовые различия животных. По некоторым данным, вариативность значений абсорбции для кожи свиньи может достигать 21% (у человека – 35%). Учет индивидуальных различий ме-

Таблица 1. – Толщина эпидермиса и дермы у грызунов [10]

	Человек	Мини-пиг	Крыса	Мышь	Кролик	Морская свинка	Хомяк	Хорек
		Область живота	Область холки					
Эпидермис, мкм	50–1000	50–60	10–18	10–15	9–15	36	10–15	24
Дерма, мкм	50–2000	100–500	300–500	350	400	500	400	600–900

таболизма животных одного вида необходим для включения статистически обоснованного количества животных в исследуемую группу [7].

Дизайн экспериментов и способы выражения трансдермальной проницаемости для *in vivo* моделей. *In vivo* модели ценны тем, что представляют собой целостную в анатомическом и физиологическом отношении систему. Животные модели более востребованы, что естественно объясняется менее жесткими, в отличие от испытаний на людях, законодательными ограничениями. Рекомендации к методам исследования кожной абсорбции химических веществ *in vivo* на лабораторных животных изложены в документах:

1) монография Всемирной организации здравоохранения [8];

2) Руководство по испытаниям химических веществ *in vivo* Организации экономического сотрудничества и развития [11].

Некоторые документы не содержат прямых указаний методологии *in vivo* опытов, а предоставляют рекомендации для интерпретации результатов исследования трансдермальной проницаемости:

1) Руководство по оценке дермальной абсорбции Организации экономического сотрудничества и развития [13];

2) Рекомендации по оценке дермальной абсорбции Агентства по охране окружающей среды США [14];

3) Руководство Европейского агентства по безопасности пищевых продуктов [15].

В соответствии с Правилами надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств, утвержденных Евразийской экономической комиссией, используемые в доклинических испытаниях животные называются тест-системами. Правила определяют требования к организации, планированию и проведению испытаний с использованием биологических тест-систем, а также требования к оформлению результатов и контролю качества исследований [16].

В инструкции [6] приведены единые подходы к токсикологической оценке химических веществ и детально описаны методики постановки опытов на животных

Для большинства трансдермальных форм (пластыри, спреи, гели) уже существуют пероральные лекарственные фор-

мы, поэтому основными задачами доклинического исследования становятся установление возможности вызвать системные эффекты после накожной аппликации вещества, выбор стартовой дозы и диапазона доз, установление токсических доз и выявление потенциальных токсических рисков. Все исследования для доказательства дермальной абсорбции на животных моделях разделяются на три группы:

1) вещество определяется в плазме крови или экскрементах животного;

2) вещество определяется в коже животного (биопсия тканей);

3) вещество определяется во всех тканях животного.

В монографии ВОЗ приведены некоторые рекомендации по методологии *in vivo* опытов и интерпретации полученных результатов [8]. В частности, кожа животного подготавливается за 24 часа до начала опыта: участок кожи выбривается машинкой для стрижки волос и моется мягким моющим средством. Чтобы избежать порезов, бритье шерсти станком не допускается. Исследуемое вещество растворяется в подходящем растворителе, состав наносится на 5–10% от общей площади поверхности кожи (для животного массой 200–250 грамм это составляет около 10 см²), апплицируемая доза выражается в мг/см². Продолжительность воздействия вещества определяется как время от начала нанесения состава до смывания с кожи. В случае, если по окончании опыта животных умерщвляют, кожная абсорбция выражается в процентах, то есть количество вещества, извлеченного из тканей тушки животного от нанесенного на кожу. К нему прибавляются количества, определенные в экскрементах, крови и в выдыхаемом воздухе. Если животных оставляют для дальнейшего метаболизма, то меру абсорбции определяют косвенно, исходя из количеств, зафиксированных в экскрементах или крови. Степень кожной абсорбции *F* может выражаться в виде значения абсолютной биодоступности. Для определения *F* используются либо значения площадей под фармакокинетическими кривыми AUC (1), либо значения количеств, выведенных в неизменном виде с мочой Au (2), после накожного (topical) и внутривенного (iv) введений:

$$F = \frac{\frac{AUC\ topical}{Dose\ topical}}{\frac{AUC\ iv}{dose\ iv}} \quad (1)$$

$$F = \frac{\frac{Au\ topical}{Dose\ topical}}{\frac{Au\ iv}{Dose\ iv}} \quad (2)$$

В Руководстве [11] изложены основные принципы проведения теста для определения кожной абсорбции веществ. Для теста используются самцы молодых крыс массой 200–250 грамм либо бесшерстные линии крыс. Крысы содержатся в отдельных клетках только при искусственном освещении (12 часов света, 12 часов темноты), температуре 22 °C (± 3 °C) и влажности не более 60%. В каждую группу животных включаются не менее четырех особей, при этом количество групп равно числу периодов воздействия испытуемого вещества. На коже животных машинкой для бритья выбривается участок площадью 10 см² и обезжиривается ацетоном. Затем наносится растворенное в подходящем растворителе вещество из расчета 1–5 мг на 1 см². Участок кожи изолируется от заливания животным. По окончании периода воздействия (равного обычно 6 и 24 часам) остатки состава смываются подходящим растворителем. Всех животных умерщвляют. Участки кожи, на которых находился испытуемый состав, изолируются для отдельного анализа. Вещество определяется в тканях и органах тушки животного, крови, собранных в ходе опыта экскрементах. Количество вещества, извлеченного из всех тканей тушки, промывных вод, экскрементов, должно быть равно 100% от нанесенного количества (massbalance). Степень абсорбции выражается в мг на 1 см² кожи [11].

Иногда участок кожи, на который было нанесено испытуемое соединение, дополнительно подвергается соскобу липкой лентой для удаления рогового слоя эпидермиса. Роговой слой является не только преградой для пенетрации веществ, но и

местом их депонирования. Липкую ленту прикладывают к коже многократно, пока она не потеряет адгезивные свойства. Собранные таким образом корнециты на ленте помещаются в контейнер, заливаются растворителем, затем анализируются с помощью подходящей методики [8].

В Республике Беларусь утверждены требования к постановке экспериментальных исследований для первичной токсикологической оценки веществ, согласно которым системные эффекты после накожного применения можно выявить «пробирочным» методом. Для этого подопытные белые лабораторные крысы фиксируются в специальных домиках, а 2/3 их хвостов окунаются в раствор испытуемого вещества, что соответствует примерно 5% площади тела животного. Гистологическая структура кожи хвостов подобна человеческой. Системные эффекты регистрируются через 1 и 16 часов после начала опыта. Фиксируются общее состояние животных, клинические симптомы интоксикации, признаки раздражения кожи, падеж, при необходимости производится патоморфологическое вскрытие. Для оценки степени острого отравления после аппликации вещества в нативном или растворенном виде (из расчета 100–2500 мг на кг веса животного) наносится на выстриженные участки кожи спин крыс. В первые 8 часов исследования состояние животных фиксируется ежедневно, а в последующие две недели – ежесуточно. Смертельной считается доза (мг/кг), которая после эпидермального применения вызвала падеж 50% испытуемых крыс [6].

Основываясь только на результатах *in vivo* исследований на крысах, можно переоценить трансдермальную проницаемость химических веществ для человека, тем более, что не существует никакого точного поправочного коэффициента для прогнозирования проницаемости кожи человека на основе данных эпидермальной проницаемости лабораторных крыс. С учетом этого факта был предложен так называемый расчетный метод параллелограмма:

$$\frac{[\% \text{ абсорбции Human in vitro}]}{[\% \text{ абсорбции Human in vivo}]} = \frac{[\% \text{ абсорбции Rat in vitro}]}{[\% \text{ абсорбции Rat in vivo}]} \quad (3)$$

Прогнозируемое значение трансдермальной проницаемости в процентном выражении приобретает вид:

$$[\% \text{ абсорбции Human in vivo}] = \frac{[\% \text{ абсорбции Rat in vivo}][\% \text{ абсорбции Human in vitro}]}{[\% \text{ абсорбции Rat in vitro}]} \quad (4)$$

Использование этого метода предполагает проведение трех серий экспериментов для определения трансдермальной абсорбции на лабораторных крысах *in vivo* и *in vitro* и на участках кожи трупов людей *in vitro* с обязательным соблюдением идентичных условий для всех серий тестов, включая концентрацию исследуемого вещества, основу, время экспозиции, площадь нанесения, температуру воздуха лаборатории и др. Желательно проводить все серии тестов в одной лаборатории [17]. Метод параллелограмма применим для любых подопытных животных, если полученные значения отношения абсорбции *in vitro* к *in vivo* постоянно остаются одинаковыми. В Руководстве [13] такой комбинированный подход к использованию трех типов данных обозначается термином «TriplePack». Метод параллелограмма оказался достаточно точным для прогнозирования значений кожной проницаемости при отсутствии данных *in vivo* для человека. Например, с помощью этого метода были теоретически рассчитаны значения кожной проницаемости для перметрина, кофеина, бензойной кислоты, инсектицида пропоксура. При этом использовались данные, полученные в *in vivo* эксперименте с крысами и *in vitro* опыте с кусками человеческой кожи. Последующее измерение проницаемости этих веществ для человека *in vivo* почти полностью совпало с рассчитанным ранее теоретически [17].

Какова бы ни была цель экспериментов с лабораторными животными (доклинические испытания лекарственных средств, тестирование косметических продуктов, бытовой химии, обоснование гигиенических нормативов на производстве и т. д.), особенностью их проведения является абсолютная беззащитность животных и полная доминанта человека. Поэтому большое внимание должно быть уделено этической стороне испытаний. Все выше обозначенные руководства по испытаниям кожной проницаемости на животных моделях обязывают проводить умерщвление животных. Страны Европейского союза в

принятой в 2010 г. «Директиве по защите животных, используемых в научных целях», закрепляют так называемое правило “трех R”, то есть уменьшение количества лабораторных животных в эксперименте (Reduction), уменьшение переживаемых ими боли и стресса (Refinement), а также всегда, если это возможно, замена животных моделей на *in vitro* или *in silico* тесты (Replacement) [18].

Модели *in vivo* для исследования трансдермального переноса: испытания на добровольцах. Предварительные испытания на лабораторных животных позволяют установить сам факт диффузии и абсорбции в кровеносное русло химических соединений. Однако количественные характеристики трансдермального потока у животных и человека могут отличаться. Поэтому золотым стандартом исследований трансдермальной проницаемости веществ являются испытания на добровольцах [8]. Такого рода исследования ограничиваются морально-этическими принципами, заложенными Хельсинкской декларацией [19], требованиями надлежащей клинической практики (Good Clinical Practice) [20] и Международной комиссией по радиологической защите в случае, если исследование трансдермальной абсорбции проводится с использованием радиоактивных меток [21]. При этом требования к стандартам проведения клинических испытаний с участием людей унифицированы силами Международного совета по гармонизации технических требований к лекарственным средствам для человека и ответственными органами здравоохранения внутри страны. Унификация способствует внедрению единых подходов в организации испытаний лекарственных средств на людях [22].

В клинических и биоэквивалентных исследованиях трансдермальных форм определяются фармакокинетические параметры: максимальная концентрация вещества в крови (C_{\max}), время достижения максимальной концентрации (t_{\max}), площадь под кривой “концентрация-время” (AUC).

Предварительная оценка трансдермальной проницаемости химического вещества может заключаться в идентификации вещества в моче или в клетках рогового слоя после нанесения состава на кожу. Существует несколько современных, эффективных и достаточно быстрых способов, которые позволяют установить сам факт диффузии вещества в кожу без забора крови у добровольцев: соскоб липкой лентой и микродиализ.

Соскоб липкой лентой (tape stripping). Этот способ позволяет определить, диффундирует ли вещество в клетки рогового слоя. Роговой слой эпидермиса легко отделяется липкой лентой. В удаленных таким образом корнеоцитах можно количественно определить исследуемое соединение. В США в 1998 г. Управлением по надзору за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств (Food and Drug Administration, FDA) было разработано руководство по определению биоэквивалентности топических лекарственных форм с помощью этого метода, а несколько лет спустя оно было отозвано. Критике подверглись как сама суть метода соскоба, так и его воспроизводимость [23].

Для удаления корнеоцитов используются специальные липкие ленты, например, марки 3М (США). Соскоб липкой лентой может оказаться полезным для анализа топических форм *in vitro*. Сообщается, что после трехчасового хранения препарированной донорской кожи соскоб липкой лентой может удалить все слои эпидермиса вплоть до базальной мембраны. Так, в одном из исследований для анализа кожного проникновения местных форм ацикловира и пенцикловира был выполнен соскоб эпидермиса липкой лентой. Затем с помощью вестерн-блоттинга с использованием моноклональных антител к кератину 5 подтверждено наличие базальных клеток на анализируемых липких лентах [24]. Хотя удаление рогового слоя сохраняет свою значимость в разного рода лабораторных исследованиях, для анализа системной абсорбции веществ, нанесенных на кожу, этот метод не пригоден. В то же время, он может оказаться полезным для доказательства депонирования химических веществ в роговом слое кожи [8].

Микродиализ. Тканевой микродиализ является малоинвазивным методом определения локальных концентраций химиче-

ских веществ в межклеточной жидкости. Впервые катетер был имплантирован в подкожную жировую клетчатку человека для измерения внеклеточной концентрации глюкозы в 1987 г. В основе метода лежит процесс пассивной диффузии веществ через полупроницаемую мембрану [25]. Тканевой микродиализ активно используется не только в медицине для мониторинга биохимических параметров, но и для изучения возможностей трансдермальной терапии и биоэквивалентных испытаний топических и трансдермальных лекарственных форм [26]. С помощью тканевого микродиализа изучают не только кинетику трансдермального всасывания, но и метаболизм веществ в коже [8].

В общем виде система микродиализа состоит из двуполостного полиуретанового катетера с полупроницаемой мембраной, который имплантируется в ткань (дерму, гиподерму или мышечную ткань), и микронасоса для непрерывной подачи перфузионной жидкости. Для перфузии используются растворы, изотоничные внеклеточной жидкости, чаще всего это раствор Рингера, изотонический раствор натрия хлорида либо специализированные жидкости [25]. Скорость потока перфузата зависит от целей микродиализа: для отслеживания тканевых концентраций пирувата, лактата, глюкозы и т.д. используется низкая скорость потока – 0,3–2,0 мкл/мин, в доклинических и клинических исследованиях – около 2 мкл/мин [26].

Внедрение катетера происходит двумя способами:

- 1) методом сквозного прокола, требующим двух точек прокола;
- 2) методом одного прокола с входом и выходом в одном месте.

Микродиализный зонд очень хрупкий, поэтому вводится с помощью канюли. Микронасос обеспечивает непрерывный поток перфузата по трубочке катетера и имитирует кровоток в сосуде. Область полупроницаемой полиуретановой мембраны находится в дерме под местом нанесения состава с тестируемым соединением. Если кожа проницаема для вещества, то в дерме ниже места нанесения формируется область с градиентом концентрации между тканью и раствором в катетере. Диализат на выходе собирается в микроампулу. Процесс диализа будет происходить, пока

существует разница концентраций между тестируемой системой на коже и собственно кожей (точнее дермой) и между дермой и перфузионной жидкостью (рисунок 2). В диализате определяется относительное извлекаемое количество вещества как часть от количества, присутствующего в ткани

[8]. Мембрана микродиализного зонда может иметь разные размеры пор, что позволяет анализировать вещества различной молекулярной массы. Устройство самих зондов также может быть различным: линейное, петлевое, параллельное, концентрическое [27].



Рисунок 2. – Схема тканевого микродиализа

Тканевой микродиализ как способ изучения трансдермального переноса лекарственных веществ был испробован как на лабораторных животных, так и на людях. Микродиализ используется для фармакокинетических тестов, например, для определения концентрации антибиотиков, противоопухолевых, противовирусных средств во внеклеточной жидкости органов-мишеней. Методом тканевого микродиализа были доказаны высокие концентрации кетопрофена в дерме и подкожной жировой клетчатке после применения в виде трансдермальных терапевтических систем. Это позволило всерьез рассматривать трансдермальный путь как альтернативный для назначения нестероидных противовоспалительных лекарственных средств. С помощью микродиализа была исследована кинетика высвобождения из трансдермальных пластырей различных веществ: эстрадиола, никотина, диклофенака, лидокаина, ибупрофена и многих других [28].

Тканевой микродиализ незаменим в области клинических биоэквивалентных исследований топических и трансдермальных лекарственных форм. С помощью этого метода можно точно определить, способно ли местное применение лекар-

ственных средств создавать эффективные концентрации в тканях. Например, в исследовании для определения относительной биологической доступности ибупрофена после местного (16 грамм 5% геля) и перорального применения (800 мг в сутки) микродиализный зонд имплантировался в глубокую медиальную мышцу бедра. Перфузионной жидкостью служил физиологический раствор натрия хлорида со скоростью потока 2 мкл/мин. В течение 5 часов каждые 20 минут производился отбор диализата. Относительная биодоступность ибупрофена составила 0,6%, что при местном применении обеспечивает достаточный обезболивающий эффект для купирования локальных мышечных болей. При этом исследователи отмечают крайне высокую вариабельность (до 50%) концентраций ибупрофена в тканях у добровольцев. Внутривидовая вариативность трансдермальной абсорбции веществ может значительно исказить результаты измерений. Разброс результатов обусловлен решающими параметрами в биоэквивалентных испытаниях трансдермальных форм, а именно толщиной рогового слоя и интенсивностью микроциркуляции, которые различны у каждого из участников испытания [29].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из всех доступных лабораторных животных только линии безволосых морских свинок (Hairless Guinea Pigs) оказались пригодными для моделирования трансдермального переноса *in vivo*. Это единственный релевантный вид, данные проницаемости кожного покрова которого могут с достаточной степенью точности служить для прогнозирования абсорбции веществ через кожу у человека. Иные виды мелких (кролики, хомяки, крысы) и крупных (свиньи, макаки-резус) лабораторных животных могут использоваться в эксперименте лишь с целью подтверждения наличия или отсутствия трансдермального потока испытуемого вещества. Если же эти животные выступают в качестве моделей для прогнозирования абсорбции через кожу человека, то необходимо проведение параллельного эксперимента с животными *in vivo* и иссеченными участками кожи трупов людей *in vitro*. При этом из-за внутривидовых различий проницаемости эпидермального слоя оценка трансдермального потока возможна только после статистически обоснованного количества серий испытаний.

Ход испытаний трансдермальной проницаемости веществ может быть различным. Исходя из принципов гуманного обращения с лабораторными животными, предпочтительным является такой дизайн эксперимента, в котором количество абсорбируемого кожным покровом вещества определяется в крови и экскрементах животных моделей, что позволяет сохранить им жизнь. Только в монографии ВОЗ упоминается, что после завершения опыта животных можно оставить для метаболизма испытанных соединений. В Рекомендациях Организации экономического сотрудничества и развития все животные модели после окончания эксперимента умерщвляются. В доклинических исследованиях такой подход обоснован целями самих испытаний: животные должны быть умерщвлены и вскрыты для определения острой, подострой, хронической токсичности, иммуно- и эмбриотоксичности.

В исследованиях трансдермальной проницаемости на добровольцах начальным этапом может стать тканевой микродиализ. С помощью этого относительно несложного и быстрого метода выявления

веществ в дерме можно предварительно оценить, какой «силы» поток формирует вещество, преодолевая эпидермальный барьер. Преимущество микродиализа заключается в том, что исключаются все манипуляции с кровью у добровольцев, при этом забор диализата можно вести непрерывно.

SUMMARY

S. S. Malchenkova, N. S. Golyak,
V. M. Tsarenkov

**THE ROLE OF *IN VIVO* MODELS
IN PREDICTING TRANSDERMAL
PERMEABILITY**

The article presents the main types of laboratory animals that are used to study the transdermal permeability of chemical compounds. We described the structural features of epidermis, derma and skin appendages in humans and laboratory animals (small rodents, pigs, monkeys). We also emphasized advantages and disadvantages of various laboratory animals as objects for *in vivo* transdermal modeling. A method of extrapolation called “The parallelogram method” or «Triple Pack» has been singled out to predict the permeability of the human skin in the presence of experimental data on the permeability of the skin of animals *in vivo* and humans *in vitro*. The article describes the experimental design (including preparation of animals, premises and the substance applied) to determine transdermal permeability of substances *in vivo* under the guidelines of the World Health Organization and the Organization for Economic Cooperation and Development. Tissue microdialysis in volunteers has been identified as the most perfect and safest ways to promptly detect substances in the derma and tape stripping has been made in the cells of the stratum corneum.

Keywords: laboratory animals, transdermal permeability, *in vivo*, tissue microdialysis.

ЛИТЕРАТУРА

1. Transdermal patches: history, development and pharmacology / M. N. Pastore [et al.] // British Journal of Pharmacology. – 2015. – Vol. 172, N 9. – P. 2179–2209.
2. Пономарева, А. А. Традиционные и современные представления о кровоснабжении кожи / А. А. Пономарева // Журн. фундаментальной медицины и биологии. – 2018. – № 2. – С. 34–44.
3. Wepf, R. Stratum corneum: Struktur und

Morphologieeinerbarriere / R. Wepf, R. Neubert // Pharmazeutischezeitung. – 2007. – N 17. – P.14–21

4. Raykar, P. V. The role of Protein and Lipid Domains in the Uptake of solutes by Human Stratum Corneum / P. V. Raykar, M. C. Fung, B. D. Anderson // Pharmaceutical Research. – 1988. – Vol. 5, N 3. – P. 140–150.

5. Godin, B. Transdermal skin delivery: predictions for humans from *in vivo*, *ex vivo* and animal models / B. Godin, E. Touitou // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2007. – Vol. 59, N 11. – P. 1152–1161.

6. Инструкция 1.1.11-12-35-2004 «Требования к постановке экспериментальных исследований для первичной токсикологической оценки и гигиенической регламентации веществ»: утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 14 дек. 2004 г. – Минск, 2004. – 43 с.

7. Jung, E. C. Animal models for percutaneous absorption / E. C. Jung, H. I. Maibach // Journal of Applied Toxicology. – 2015. – Vol. 35, N 1. – P. 1–10.

8. Environmental Health Criteria 235. Dermal absorption [Electronic resource] / World Health Organization. – Mode of access: <https://www.who.int/publications/i/item/9241572353>. – Date of access: 04.11.2020.

9. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте / И. П. Западнюк [и др.]. – 3-е изд., перераб. и доп. – Киев: Вища школа. Головное изд-во, 1983. – 383 с.

10. Гуцин, Я. А. Сравнительная морфология кожи человека и лабораторных животных (краткое сообщение) [Электронный ресурс] / Я. А. Гуцин, М. А. Ковалева // Лабораторные животные для науч. исслед. – 2019. – № 2. – Режим доступа: <http://labanimalsjournal.ru/ru/2618723x-2019-02-06>. – Дата доступа: 02.11.2020.

11. Guideline for the testing of chemicals. Skin Absorption: *in vivo* Method 427 [Electronic resource] // OECDiLibrary. – Mode of access: https://read.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-427-skin-absorption-in-vivo-method_9789264071063-en#page1. – Date of access: 02.11.2020.

12. Гайдай, Е. А. Генетическое разнообразие экспериментальных мышей и крыс: история возникновения, способы получения и контроля [Электронный ресурс] / Е. А. Гайдай, Д. С. Гайдай // Лабораторные животные для науч. исслед. – 2019. – № 4. – Режим доступа: <http://labanimalsjournal.ru/ru/2618723x-2019-04-09>. – Дата доступа: 27.10.2020.

13. Guidance notes on dermal absorption. Series on Testing and Assessment No. 156 [Electronic resource]: OECD Environment, Health and Safety Publications. – Paris, 2011. – Mode of access: – <https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/48532204.pdf>. – Date of access: 07.11.2020.

14. Dermal Exposure Assessment: A Summary of EPA Approaches [Electronic resource] / Environmental Protection Agency. – Mode of access: https://ofmpub.epa.gov/eims/eimscomm.getfile?p_download_id=469581. Date of access: 07.11.2020.

15. Guidance on Dermal Absorption [Electronic resource] / H. Buist [et al.] // EFSA J. – 2017. – Vol. 15, N 6. – Mode of access: <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/4873>. – Date of access: 05.11.2020.

16. Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств [Электронный ресурс]: решение Совета Евразийской экономической комис. от 3 нояб. 2016 № 81 / ЕЭК. – Режим доступа: http://www.eurasiancommission.org/ru/act/texnreg/deptexreg/LS1/Pages/drug_products.aspx. – Дата доступа: 20.11.2020.

17. Ross, J. H. Estimation of the percutaneous absorption of permethrin in humans using the parallelogram method / J. H. Ross, W. G. Reifennath, J. H. Driver // Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A. – 2011. – Vol. 74, N 6. – P. 351–363.

18. Directive 2010/63/EU of the European parliament and of the council of 22 september 2010 on the protection of animals used for scientific purposes [Electronic resource] // EUR-Lex. – Mode of access: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32010L0063>. – Date of access: 10.12.2020.

19. WMA Declaration of Helsinki – Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects [Electronic resource] / World Medical Association. – Mode of access: <https://web.archive.org/web/20140101202246/http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/>. – Date of access: 10.12.2020.

20. Об утверждении Правил надлежащей клинической практики Евразийского экономического союза [Электронный ресурс]: решение Совета Евразийской экономической комис. от 3 нояб. 2016 № 79 / Евразийская экономическая комис. – Режим доступа: https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/01411924/cncd_21112016_79. – Дата доступа: 22.11.2020.

21. Публикация 103 МКРЗ: [Электронный ресурс]: рекомендации 2007 года Международной комиссии по радиационной защите: пер. с англ. / под общ. ред. М. Ф. Киселёва и Н. К. Шандалы. – Москва, 2009. – Режим доступа: https://www.icrp.org/docs/P103_Russian.pdf. – Дата доступа: 10.12.2020.

22. Guideline for good clinical practice E6(R2) [Electronic resource] / European Medicines Agency. – Mode of access: <https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guide->

line/ich-e-6-r2-guideline-good-clinical-practice-step-5_en.pdf. – Date of access: 10.12.2020.

23. Au, W. L. Comparison of tape stripping with the human skin blanching assay for the bioequivalence assessment of topical clobetasol propionate formulations / W. L. Au, M. F. Skinner, I. Kanfer // J. of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. – 2010. – Vol. 13, N 1. – P. 11–20.

24. Оценка *in vitro* кожного проникновения противовирусных препаратов 1% крема пенцикловира и 5% крема ацикловира, которые используются для лечения инфекции, вызванной вирусом простого герпеса / N. Hasler-Nguyen [и др.] // Укр. журн. дерматологии, венерологии, косметологии. – 2012. – № 3. – С. 063–072.

25. Тимофеев, И. С. Тканевой микродиализ: принципы и клиническое применение метода в интенсивной терапии [Электронный ресурс] / И. С. Тимофеев // Интенсивная терапия. – 2007. – № 1. – Режим доступа: <http://icj.ru/journal/number-1-2007/104-tkanevoy-mikrodializ-principy-i-klinicheskoe-primeneniemetoda-v-intensivnoy-terapii.html>. – Дата доступа: 30.10.2020.

26. Hammarlund-Udenaes, M. Microdialysis as an Important Technique in Systems Pharmacology – a Historical and Methodological Review / M. Hammarlund-Udenaes // The AAPS Journal. – 2017. – Vol. 19, N 5. – P. 1294–1303.

27. Holmgaard, R. Microdialysis sampling for investigations of bioavailability and bioequivalence of topically administered drugs: current state and future perspectives / R. Holmgaard, J. B. Nielsen, E. Benfeldt // Skin Pharmacol. Physiol. – 2010. – Vol. 23, N 5. – P. 225–243.

28. Joukhadar, C. Microdialysis / C. Joukhadar, M. Muller // Clinical Pharmacokinetics. – 2005. – Vol. 44, N 9. – P. 895–913.

29. Application of microdialysis for the determination of muscle and subcutaneous tissue concentrations after oral and topical ibuprofen administration / I. Tegeder [et al.] // Clinical Pharmacology and Therapeutics. – 1999. – Vol. 65, N 4. – P. 357–368.

REFERENCES

1. Pastore MN, Kalia YN, Horstmann M, Roberts MS. Transdermal patches: history, development and pharmacology. Br J Pharmacol. 2015;172(9):2179–209. doi: 10.1111/13059

2. Ponomareva AA. Traditional and modern concepts of the blood supply to the skin. Zhurn fundamental'noi meditsiny i biologii. 2018;(2):34–44. (In Russ.)

3. Wepf R, Neubert R. Stratum corneum: Struktur und Morphologie einer barriere. Pharm Ztg. 2007;(17):14–21

4. Raykar PV, Fung MC, Anderson BD. The role of Protein and Lipid Domains in the

Uptake of solutes by Human Stratum Corneum. Pharm Res. 1988;5(3):140–50. doi: 10.1023/a:1015956705293

5. Godin B, Touitou E. Transdermal skin delivery: predictions for humans from *in vivo*, *ex vivo* and animal models. Adv Drug Deliv Rev. 2007;59(11):1152–61. doi: 10.1016/j.addr.2007.07.004

6. Instruction 1.1.11-12-35-2004 «Requirements for setting up experimental studies for primary toxicological assessment and hygienic regulation of substances»: utv M-vom zdravookhraneniia Resp Belarus' 14 dek 2004 g. Minsk, RB; 2004. 43 s. (In Russ.)

7. Jung EC, Maibach HI. Animal models for percutaneous absorption. J Appl Toxicol. 2015;35(1):1–10. doi: 10.1002/jat.3004

8. World Health Organization. Environmental Health Criteria 235. Dermal absorption [Electronic resource] [cited 2020 Nov 4]. Available from: URL:<https://www.who.int/publications/item/9241572353>

9. Zapadniuk IP, Zapadniuk VI, Zakhariia EA, Zapadiuk BV. Laboratory animals. Breeding, maintenance, use in the experiment. 3-e izd pererab i dop. Kiev: Vishashkola. Golovnoeizdvo; 1983. 383 s. (In Russ.)

10. Gushchin IaA, Kovaleva MA. Comparative morphology of human skin and laboratory animals (short message) [Elektronnyi resurs]. Laboratornye zhivotnye dlia nauch issled. 2019;(2). Rezhim dostupa: <http://labanimalsjournal.ru/ru/2618723x-2019-02-06>. Data dostupa: 02.11.2020. (In Russ.)

11. Guideline for the testing of chemicals. Skin Absorption: *in vivo* Method 427 [Electronic resource]. OECDiLibrary [cited 2020 Nov 2]. Available from: URL:https://read.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-427-skin-absorption-in-vivo-method_9789264071063-en#page1

12. Gaidai EA, Gaidai DS. Genetic diversity of experimental mice and rats: history of origin, methods of obtaining and control [Elektronnyi resurs]. Laboratornye zhivotnye dlia nauch issled. 2019;(4). Rezhim dostupa: <http://labanimalsjournal.ru/ru/2618723x-2019-04-09>. Data dostupa: 27.10.2020. (In Russ.)

13. Guidance notes on dermal absorption. Series on Testing and Assessment No. 156 [Electronic resource]: OECD Environment, Health and Safety Publications. Paris; 2011 [cited 2020 Nov 7]. Available from: URL:<https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/48532204.pdf>

14. Environmental Protection Agency. Dermal Exposure Assessment: A Summary of EPA Approaches [Electronic resource] [cited 2020 Nov 7]. Available from: URL: https://ofmpub.epa.gov/eims/eimscmm.getfile?p_download_id=469581

15. Buist H, Craig P, Dewhurst I, Bennekou SH, Kneuer C, Machera K et al. Guidance on Dermal Absorption [Electronic resource]. EFSA J. 2017 [cit-

ed 2020 Nov 5]; 15(6). Available from: URL:<https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/4873>

16. Evraziiskaia ekonomicheskaiia komissiia. On approval of the Rules of Good Laboratory Practice of the Eurasian Economic Union in the field of drug circulation [Elektronnyi resurs]: reshenie Soveta Evraziiskoi ekonomicheskoi komis ot 3 noiab 2016 № 81. EEK. Rezhim dostupa: http://www.eurasiancommission.org/ru/act/txnreg/deptexreg/LS1/Pages/drug_products.aspx. Data dostupa: 20.11.2020. (In Russ.)

17. Ross JH, Reifenrath WG, Driver JH. Estimation of the percutaneous absorption of perme-thrin in humans using the parallelogram method. *J Toxicol Environ Health A*. 2011;74(6):351–63. doi: 10.1080/15287394.2011.534425

18. Directive 2010/63/EU of the European parliament and of the council of 22 september 2010 on the protection of animals used for scientific purposes [Electronic resource]. EUR-Lex [cited 2020 Dec 10]. Available from: URL:<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32010L0063>

19. World Medical Association. WMA Declaration of Helsinki – Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects [Electronic resource] [cited 2020 Dec 10]. Available from: URL: <https://web.archive.org/web/20140101202246/http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/>

20. Evraziiskaia ekonomicheskaiia komissiia. On approval of the Rules of Good Clinical Practice of the Eurasian Economic Union [Elektronnyi resurs]: reshenie Soveta Evraziiskoi ekonomicheskoi komis. ot 3 noiab. 2016 № 79. Rezhim dostupa: https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/01411924/cncd_21112016_79. Data dostupa: 22.11.2020. (In Russ.)

21. Kiselev MF, Shandala NK, redaktory. ICRP Publication 103 [Elektronnyi resurs]: rekomendatsii 2007 g Mezhdunarodnoi komis po radiatsionnoi zashchite : per s angl. Moskva, RF; 2009. Rezhim dostupa: https://www.icrp.org/docs/P103_Russian.pdf. Datadostupa: 10.12.2020. (In Russ.)

22. European Medicines Agency. Guideline for good clinical practice E6(R2) [Electronic resource] [cited 2020 Dec 10]. Available from: URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-e-6-r2-guideline-good-clinical-practice-step-5_en.pdf

23. Au WL, Skinner MF, Kanfer I. Com-

parison of tape stripping with the human skin blanching assay for the bioequivalence assessment of topical clobetasol propionate formulations. *J Pharm Pharm Sci*. 2010;13(1):11–20. doi: 10.18433/j3c01r

24. Hasler-Nguyen N, Sheiton D, Ponard G, Bader M, Schaffrik M, Mallefet P. Evaluation of the in vitro skin permeation of antiviral drugs from penciclovir 1% cream and acyclovir 5% cream used to treat herpes simplex virus infection. *Ukr zhurn dermatologii, venerologii, kosmetologii*. 2012;(3):063-072. (In Russ.)

25. Timofeev IS. Tissue microdialysis: principles and clinical application of the method in intensive care [Elektronnyi resurs]. *Intensivnaia terapiia*. 2007;(1). Rezhim dostupa: <http://icj.ru/journal/number-1-2007/104-tkanevoy-mikrodializ-principy-i-klinicheskoe-primenenie-metoda-v-intensivnoy-terapii.html>. Data dostupa: 30.10.2020. (In Russ.)

26. Hammarlund-Udenaes M. Microdialysis as an Important Technique in Systems Pharmacology – a Historical and Methodological Review. *AAPS J*. 2017;19(5):1294–303. doi: 10.1208/s12248-017-0108-2

27. Holmgaard R, Nielsen JB, Benfeldt E. Microdialysis sampling for investigations of bio-availability and bioequivalence of topically administered drugs: current state and future perspectives. *Skin Pharmacol Physiol*. 2010;23(5):225–43. doi: 10.1159/000314698

28. Joukhadar C, Muller M. Microdialysis. *Clin Pharmacokinet*. 2005;44(9):895–913. doi: 10.2165/00003088-200544090-00002

29. Tegeder I, Muth-Selbach U, Lotsch J, Rusing G, Oelkers R, Brune K et al. Application of microdialysis for the determination of muscle and subcutaneous tissue concentrations after oral and topical ibuprofen administration. *Clin Pharmacol Ther*. 1999;65(4):357–68. doi:10.1016/S0009-9236(99)70128-1

Адрес для корреспонденции:

220116, Республика Беларусь,
г. Минск, пр. Дзержинского, 83,
УО «Белорусский государственный
медицинский университет»,
кафедра фармацевтической технологии,
e-mail: svetlanasavich25@gmail.com,
Мальченкова С. С.

Поступила 22.12.2020 г.