

Міністерство охорони здоров'я України
Національний фармацевтичний університет

СИМОНОВА ОКСАНА АНАТОЛІЇВНА

УДК 615.454.1:546.3-022.513.2

ФАРМАКОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ КРЕМУ
З НАНОЧАСТИНКАМИ ЦЕРІЮ ДІОКСИДУ

14.03.05 – фармакологія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата фармацевтичних наук

Харків – 2019

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Національному медичному університеті імені О. О. Богомольця МОЗ України, м. Київ.

Науковий керівник:

доктор медичних наук, професор
ЗАЙЧЕНКО Ганна Володимирівна,
Національний медичний університет
імені О. О. Богомольця МОЗ України (м. Київ),
завідувач кафедри фармакології

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук, професор
МАЛОШТАН Людмила Миколаївна,
Національний фармацевтичний
університет МОЗ України (м. Харків),
завідувач кафедри фізіології та анатомії людини

доктор медичних наук, професор
ВОЛОЩУК Наталія Іванівна,
Вінницький національний медичний університет
імені М. І. Пирогова МОЗ України (м. Вінниця),
завідувач кафедри фармакології

Захист відбудеться «18» жовтня 2019 р. о 12³⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.605.03 при Національному фармацевтичному університеті за адресою: 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Національного фармацевтичного університету (61168, м. Харків, вул. Валентинівська, 4).

Автореферат розісланий «12» вересня 2019 р.

Учений секретар спеціалізованої
вченої ради
д. фарм. н., професор

Т. С. Сахарова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Обґрунтування вибору теми дослідження. Сонячний опік – запальна реакція, що виникає після гострого переривчастого впливу на шкірні покриви інтенсивних сонячних променів – є поширеною патологією, що охоплює більше 50% населення країн Європи молодшого та середнього віку та є важливим предиктором раку шкіри (D. M. Lopes et al., 2016; S. Wu et al., 2016). Фотоканцерогенез обумовлений спричиненими ультрафіолетом (УФ) ушкодженням дезоксирибонуклеїнової кислоти, запаленням та імуносупресією, при цьому дані ефекти реалізуються напряму або опосередковано, внаслідок утворення активних форм кисню (Е. А. Шляхтунов и соавт., 2014; R. Bosch et al., 2015; M. C. Martens et al., 2018).

Злоякісні новоутворення шкіри є однією з найбільш розповсюджених форм раку, захворюваність на них зростає, як у світі загалом, так і в Україні зокрема (M. Watson et al., 2016; Z. Apalla et al., 2017; З. П. Федоренко та співавт., 2018). Меланома, базальноклітинний рак шкіри та плоскоклітинний рак шкіри характеризуються високою смертністю, призводять до значних економічних витрат для суспільства (M. C. Martens et al., 2018).

Негативному впливу сонячного опромінення на організм запобігає застосування фотопротекторних лікарських та косметичних засобів, активні фармацевтичні інгредієнти (АФІ) яких поглинають або відбивають УФ промені (С. Stiefel et al., 2015). Незважаючи на широке представлення на світовому фармацевтичному ринку та доведену ефективність, багато сонцезахисних кремів мають низку недоліків, пов'язаних з токсичністю (В. Gulson et al., 2015; J. A. Ruszkiewicz et al., 2017). Ефективність таких засобів також часто обмежується здатністю поглинати чи відбивати УФ промені лише певної ділянки спектру (Н. G. Merkus et al., 2014; M. Watson et al., 2016). Пошук нових фотопротекторів має бути спрямований на розробку засобів, здатних захищати від випромінювання широкого діапазону, включаючи УФ-А та УФ-В (Т. Nijsten et al., 2016).

Перераховані вище факти обумовлюють доцільність розробки нових ефективних та безпечних сонцезахисних засобів, в якості АФІ яких можуть виступити наночастинки церію діоксиду (НЦД), що позбавлені фотокаталітичних властивостей, мають виражену фотопротекторну та антиоксидантну дію (F. Caruto et al., 2015; А. Б. Щербаков и соавт., 2016).

Таким чином, викладена вище інформація вказує на перспективи розробки та застосування нової топікальної лікарської форми з НЦД для профілактики ураження шкіри УФ випромінюванням та злоякісних новоутворень, як наслідків такого ураження.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами.

Дисертаційна робота є фрагментом науково-дослідних робіт кафедри фармакології Національного медичного університету імені О. О. Богомольця МОЗ України «Дослідження фармакологічних та токсикологічних властивостей наночастинок металів та композитів нанодисперсного кремнезему з органічними речовинами» (номер держреєстрації 0116U004905) та «Дослідження фармакологічних властивостей крему з наночастинками церію діоксиду» (номер

держреєстрації 0118U001219). Автор є співвиконавцем даних науково-дослідних робіт.

Мета і завдання дослідження. Метою дисертаційного дослідження було теоретичне та експериментальне обґрунтування доцільності розробки нового фотопротекторного лікарського засобу з наночастинками церію діоксиду (НЦД) у формі дермального крему.

Для досягнення цієї мети поставлені такі завдання:

1. Провести скринінг фотопротекторної активності кремів з НЦД на моделі фотодинамічної травми у мурчаків з подальшим вибором крему-лідера.
2. Встановити гостру токсичність крему-лідера з НЦД при нашкірному нанесенні та внутрішньошлунковому введенні щурам.
3. Дослідити субхронічну та хронічну токсичність крему-лідера з НЦД при нашкірному нанесенні кролям і щурам, відповідно.
4. Оцінити гонадотоксичну та ембріотоксичну дію крему-лідера з НЦД при нашкірному нанесенні щурам, мутагенну дію – при нашкірному нанесенні мишам.
5. Охарактеризувати фотопротекторну активність крему-лідера з НЦД на моделі фотодинамічної травми у мурчаків.
6. Визначити фотопротекторну активність крему-лідера з НЦД на моделі посиленої аміфурином фотодинамічної травми у мурчаків.
7. Вивчити деякі параметри фармакокінетики крему-лідера з НЦД при нашкірному нанесенні щурам.

Об'єкт дослідження. Фармакокорекція фотодинамічного ураження шкіри.

Предмет дослідження. Фармакологічні властивості та безпека крему з НЦД.

Методи дослідження. Фармакологічні (дослідження фотопротекторної дії на моделях фотодинамічної травми та посиленої аміфурином фотодинамічної травми, дослідження фармакокінетики), токсикологічні (дослідження гострої, субхронічної і хронічної токсичності, гонадотоксичної, ембріотоксичної та мутагенної дії), біохімічні (визначення активності аланінамінотрансферази (АлАТ) і аспартатамінотрансферази (АсАТ), вмісту загального білку, альбуміну, креатиніну, глюкози, холестеролу, калію, натрію, фосфору, хлоридів у сироватці крові, показника тимолової проби, вмісту гістаміну в гомогенаті шкіри), гематологічні (визначення вмісту гемоглобіну, кількості лейкоцитів, еритроцитів та тромбоцитів у крові, лейкоцитарна формула), морфологічні (дослідження макроскопічної та гістологічної будови, коефіцієнтів маси внутрішніх органів, оцінка стану сперматогенезу за функціональними, макроскопічними та морфометричними показниками, дослідження маркерів ембріотоксичності та стану внутрішніх органів плодів, аналіз хромосомних аберацій у клітинній суспензії з кісткового мозку, дерматоскопічне та гістологічне дослідження зразків шкіри), імуноферментні (визначення вмісту простагландинів у гомогенаті шкіри) та методи математичної статистики.

Наукова новизна отриманих результатів. У дисертаційній роботі вперше встановлена наявність фотопротекторної дії та доведена безпека крему з НЦД. Це відкриває перспективи для подальших доклінічних та клінічних досліджень крему з

НЦД як лікарського засібу для профілактики ураження шкіри УФ випромінюванням.

На етапі скринінгових досліджень вперше встановлена залежність між концентрацією НЦД в кремах та їх фотопротекторною активністю (ФПА). За вираженістю ФПА досліджувані об'єкти можна розташувати наступним чином – крем з 0,1% НЦД < крем з 0,25% НЦД > крем з 0,5% НЦД. Більшу ефективність крему з 0,25% НЦД у порівнянні з кремом з 0,5% НЦД можна пояснити тим, що наночастинки у більшій концентрації через втрату стабільності здатні утворювати конгломерати, які виявляють меншу ФПА (I. Celardo et al., 2011).

Отримані нові дані щодо фотопротекторної активності крему з 0,25 % НЦД дозою 2 мг/см² в умовах експериментальної фотодинамічної травми та посиленої аміфурином фотодинамічної травми у мурчаків. Спостерігали у значуще зменшення ступеня вираженості еритеми (ФПА 43,2% та 30,8% відповідно), повну епітелізацію шкірних покривів за 5,86 діб та 9,14 діб відповідно, що на 46,7% та 44,8% швидше, ніж у групі контрольної патології, нормалізацією температури шкірних покривів, зменшенням деструктивних змін у шкірі та активації адаптаційних процесів за гістологічним аналізом. Крем з 0,25% НЦД за більшістю досліджуваних показників перевищував препарат порівняння – крем з титану діоксидом.

Результати експериментів свідчать про наявність протизапальної активності крему з НЦД, що підтверджено статистично значущим зниженням медіаторів запалення (PGE₂ і Pgf_{2α} на 23,1% і 24,2% відповідно) у тканинах шкіри.

Уточнені дані про особливості фармакокінетики крему з НЦД при одноразовому нашкірному нанесенні щурам дозою 2 мг/см². Доведено, що НЦД не абсорбуються крізь шкіру та не потрапляють в системний кровообіг, не накопичуються в печінці, нирках і селезінці, що вказує на мінімальні ризики системної дії. Наночастинки не виявляються в крові після впливу УФ, що свідчить на користь прийнятного профілю безпеки у даних умовах. НЦД накопичуються у шкірі протягом 24 годин з подальшим поступовим зниженням концентрації – на 42,5% на 48-му годину експерименту для інтактної шкіри та на 20,2% – при УФ опроміненні, що вказує на подовження фотопротекторного ефекту крему з НЦД при підвищеній інсоляції.

Розширені наукові уявлення про токсикологічні властивості крему з НЦД. У рамках дослідження гострої, субхронічної та хронічної токсичності виявлено, що крем з НЦД при нашкірному нанесенні та внутрішньошлунковому введенні щурам дозою 5 г/кг не викликає загибелі тварин, не впливає негативним чином на масу тіла, макроскопічну структуру та коефіцієнти маси внутрішніх органів. В результаті експериментів встановлено, що крем з 0,25 % НЦД належить до V класу токсичності (практично нетоксичні речовини) (К. К. Сидоров, 1973).

Поглиблені наукові уявлення щодо специфічних видів токсичності крему з НЦД. Експериментально доведено, що нашкірне нанесення самцям щурів крему з НЦД дозами 0,1, 0,5 і 1,0 г/кг протягом 90 днів не спричиняє гонадотоксичної дії. Час збереження рухливості сперматозоїдів на 13,5%, 9,7% та 11,0% вищий у відповідних групах нанесення крему порівняно з групою плацебо. Топікальне застосування крему у вагітних самок щурів дозами 0,1, 0,5 і 1,0 г/кг не викликає ембріолетального ефекту та не спричиняє вад розвитку плодів. Безпека крему з НЦД

підтверджена відсутністю мутагенного впливу на геном соматичних клітин савців (миші) при одноразовому нашкірному нанесенні дозами 0,1 та 1,0 г/кг та повторному – дозою 0,1 г/кг протягом 7 діб.

Практичне значення отриманих результатів. Отримані в дисертаційній роботі експериментальні дані доводять наявність фотопротекторної активності у крему з НЦД, що виступає експериментальним обґрунтуванням доцільності подальших досліджень.

За результатами дисертаційної роботи запропоновано спосіб застосування крему з НЦД для профілактики ураження УФ випромінюванням (Інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я № 303 – 2018).

Фрагменти дисертаційної роботи впроваджені у науково-педагогічний процес кафедр: фармакології Вищого державного навчального закладу України «Буковинський державний медичний університет» (протокол № 6 від 30.11.2018 р.), фармакології Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова (протокол № 4 від 23.10.2018 р.), фармакології і клінічної фармакології Державного закладу «Дніпропетровська медична академія Міністерства охорони здоров'я України» (протокол № 5 від 14.11.2018 р.), фармакології та медичної рецептури Запорізького державного медичного університету (протокол № 8 від 21.11.2018 р.), фармакології з клінічною фармакологією ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського» (протокол № 11 від 01.11.2018 р.), фармакології, патофізіології, клінічної фармакології і клінічної фармації, технології ліків ПВНЗ «Київський медичний університет» (протокол № 4 від 08.11.2018 р.).

Особистий внесок здобувача. Дисертант особисто провів патентно-інформаційний пошук за темою дисертації, опрацював наукову літературу, взяв участь в експериментальних дослідженнях, провів статистичну обробку й аналіз отриманих результатів із оформленням їх у вигляді таблиць та рисунків, сформулював основні положення та висновки. Всі розділи дисертації та автореферат написані та оформлені автором самостійно. Разом із науковим керівником сформульовано мету та завдання дослідження.

Співавторами наукових праць є науковий керівник Г. В. Зайченко та науковці, за консультативної допомоги та участі яких проведено деякі дослідження – Н. О. Горчакова, В. С. Єфанов, О. А. Качалова, Д. В. Литкін, М. О. Ляпунов, Д. В. Музичко, Н. С. Нікітіна, П. В. Сімонов. Особисту участь у кожному дослідженні наведено у списку опублікованих праць за темою дисертації.

Токсикологічні дослідження проведені за консультативної допомоги к. біол. н. Н. С. Нікітіної (ДП «Державний науковий центр лікарських засобів і медичної продукції»). Морфологічні дослідження проведені за консультативної допомоги ст. н. с. ЦНДЛ Національного фармацевтичного університету, к. біол. н. Ю. Б. Лар'яновської. Дисертант вдячний усім науковцям за консультативну допомогу.

Апробація матеріалів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи викладені та обговорені на: V національному з'їзді фармакологів України (Запоріжжя, 18–20 жовтня 2017 р.), Annual Young Medical Scientists' Conference 2017 (Київ, 27–29 жовтня 2017 р.), XXV International Scientific and Practical Conference of

Young Scientists and Students ‘Topical Issues of New Drugs Development’ (Харків, 18–20 квітня 2018 р.), XXII міжнародному медичному конгресі студентів та молодих вчених (Тернопіль, 23–25 квітня 2018 р.), XIII научно-практической конференции молодых ученых и студентов ТГМУ им. Абуали ибни Сино с международным участием, посвященной «Году развития туризма и народных ремесел», «Медицинская наука: новые возможности» (Душанбе, 27 квітня 2018 р.), X республиканской научно-практической конференции с международным участием студентов и молодых ученых «Проблемы и перспективы развития современной медицины» (Гомель, 3–4 травня 2018 р.), 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology ‘WCP2018 Kyoto’ (Кіото, 1–6 липня 2018 р.), VII науково-практичній конференції з міжнародною участю «Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів» (Тернопіль, 27–28 вересня 2018 р.), International Scientific and Practical Conference of Students, Postgraduates, and Young Scientists ‘Topical Issues of Theoretical and Clinical Medicine’ (Суми, 17–19 жовтня 2018 р.), Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих учених «Медична наука-2018» (Полтава, 16 листопада 2018 р.).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 19 наукових праць: 8 статей, серед яких 5 – у наукових профільних виданнях, рекомендованих МОН України, 2 – у зарубіжних наукових профільних виданнях, 10 тез доповідей, 1 інформаційний лист.

Обсяг і структура дисертації. Дисертаційна робота викладена на 192 сторінках комп’ютерного друку, складається з анотацій українською та англійською мовами, вступу, огляду літератури, розділу «Матеріали та методи дослідження», 4 розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів, висновків, списку використаних джерел у кількості 159 найменувань, з яких 39 – кирилицею, 120 – латиницею, і додатків. Обсяг основного тексту дисертації складає 147 сторінок друкованого тексту. Робота проілюстрована 27 таблицями та 34 рисунками.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи дослідження. У дослідженні застосовані креми з 0,1%, 0,25% і 0,5% НЦД, крем з 3% титану діоксиду (3% ТД) та гідрофільна кремова основа, розроблені у НТК «Інститут монокристалів» НАН України, а також, як референтний зразок, крем з ТД виробництва ТОВ «Медичне науково-виробниче об’єднання Біокон», Україна (Крем SPF-40 «Високий захист» для безпечного загару).

Субстанція НЦД є наноккомпозитом, у якому частинки CeO_2 іммобілізовані на поверхні алюмосилікатних нанотрубок, синтезована шляхом відновлення церію нітрату у водній суспензії алюмосилікатних нанотрубок за методикою ТОВ «НаноМедТех». За даними електронної мікроскопії наночастинки CeO_2 мають округлу форму та середній розмір 6–15 нм (рис. 1А, 1Б). Електроннограма частинки церію діоксиду показала кубічну структуру CeO_2 флюоритового типу (рис. 1В). Елементний склад НЦД визначали методом енергодисперсійного спектроскопічного хімічного аналізу. Виявлені елементи О, Al і Si відображають склад алюмосилікатних нанотрубок, О і Се – церію діоксиду (А. В. Бричка та співавт., 2013).

На першому етапі роботи проведений скринінг фотопротекторної активності кремів з 0,1%, 0,25% і 0,5% НЦД на моделі фотодинамічної травми у 70 нелінійних мурчаків обох статей масою 450–500 г, віком 3,0–4,0 місяці (А. В. Стефанов, 1998). Тварин розподілили на 7 груп (по 10 тварин у кожній): група 1 – контрольні здорові інтактні тварини – інтактний контроль, група 2 – опромінені тварини – контрольна патологія (УФ), група 3 – тварини, яким перед опроміненням наносили крем НЦД 0,1% (НЦД 0,1% + УФ), група 4 – тварини, яким перед опроміненням наносили крем НЦД 0,25% (НЦД 0,25% + УФ), група 5 – тварини, яким перед опроміненням наносили крем НЦД 0,5% (НЦД 0,5% + УФ), група 6 – тварини, яким перед опроміненням наносили крем ТД 3% – референтний зразок (ТД 3% + УФ), група 7 – тварини, яким перед опроміненням наносили кремову основу (плацебо + УФ). Гостре фотодинамічне запалення шкіри викликали УФ опромінювачем ОКН-011М (Завет, Україна) з діапазоном опромінення 220–400 нм, часом експозиції 5 МЕД (мінімальних еритемних доз). Креми наносили за 20 хв до опромінення дозою 2 мг/см² (В. Gulson et al., 2015). Крем-лідер обирали, базуючись на результатах аналізу фотопротекторної активності, у порівнянні з кремом з 3% ТД та кремовою основою, за такими параметрами: ступінь вираженості еритеми, температура шкіри, кількість лейкоцитів та вміст гістаміну в крові.

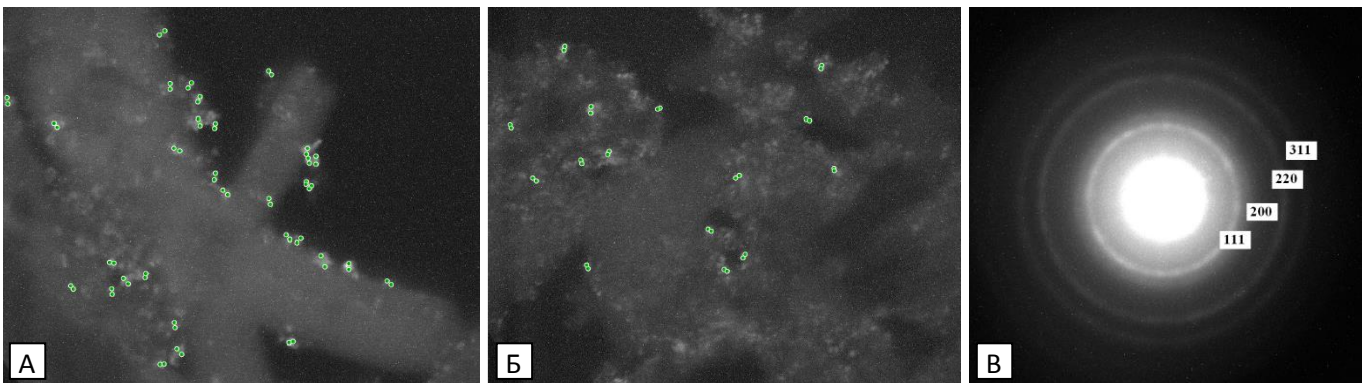


Рис. 1 Електронно-мікроскопічні зображення субстанції НЦД у процесі визначення розміру частинок CeO_2 (А, Б), електроннограма частинки CeO_2 з характерними для даної речовини дифракційними піками (В).

Ступінь вираженості еритеми оцінювали за колориметричною шкалою С. В. Суворова з обчисленням показника ФПА (S. V. Suvorov et al., 1977), температуру шкіри вимірювали термометром МТ1931 (Microlife, Швейцарія). Після забору крові кількість лейкоцитів визначали у камері Горяєва (И. А. Зупанец, 2005), вміст гістаміну в гомогенаті шкіри – за реакцією утворення забарвленого комплексу гістаміну з діазотованим *n*-нітроаніліном (Н. В. Климкина и соавт., 1973).

Подальші дослідження фармакології безпеки проведені із застосуванням крему-лідера з 0,25% НЦД за методичними рекомендаціями ДЕЦ України (О. В. Стефанов, 2001).

Визначення гострої токсичності крему з НЦД при нашкірному нанесенні та внутрішньошлунковому введенні дозою 5,0 г/кг проводили на 30 щурах самках лінії Wistar масою 150–240 г, віком 2,5–3,0 місяці. Оцінку субхронічної токсичності крему з НЦД здійснювали на 40 кролях самках породи Шиншила масою 3–4 кг,

віком 4,0–6,0 місяців, при нашкірному нанесенні дозами 0,06, 0,18 і 0,60 г/кг протягом 90 діб. Хронічна токсичність досліджена на 100 щурах самках лінії Wistar масою 150–240 г, віком 2,5–3,0 місяці. Крем з НЦД наносили нашкірно 1 раз на добу протягом 6 місяців дозами 0,1, 0,5 і 1,0 г/кг. Дози обрані з урахуванням результатів досліду з гострої токсичності. Безпеку лікарської форми оцінювали за параметрами: виживаність, клінічна картина інтоксикації, споживання корму і води, динаміка зміни маси тіла, біохімічні (вміст загального білку, альбуміну, глюкози, холестеролу, калію, натрію і хлоридів, активність АЛАТ і АсАТ, тимолова проба) та гематологічні (кількість лейкоцитів, еритроцитів, тромбоцитів, вміст гемоглобіну, лейкограма) показники крові, макроскопічна і гістологічна структура та коефіцієнти маси внутрішніх органів тварин (С. Е. Day, 2014). Визначення гематологічних показників здійснювали із застосуванням гематологічного аналізатора Mythic 22 (PZ CORMAY S.A., Польща). Для біохімічного аналізу використовували набори стандартних діагностикумів виробництва ТОВ НВП «Філісіт-Діагностика» (м. Дніпро).

Гонадотоксичну дію крему з НЦД вивчали на 50 щурах самцях лінії Wistar масою 150–240 г, віком 2,5–3,0 місяці, при нашкірному нанесенні дозами 0,1, 0,5 і 1,0 г/кг протягом 90 діб. Стан сперматогенезу оцінювали за функціональними (концентрація та характер руху сперматозоїдів, їх осмотична та кислотна резистентність, наявність патологічних форм), макроскопічними (довжина та відносна маса сім'яників, сім'яних пухирців, простати) та морфометричними (індекс сперматогенезу, кількість сперматогоніїв, відсотковий вміст каналців з 12 стадією мейозу та злущеним епітелієм) показниками (R. D. Hood, 2012).

Дослідження ембріотоксичної дії крему з НЦД проводили на 70 щурах самках лінії Wistar масою 150–240 г, віком 2,5–3,0 місяці, за умов нашкірного нанесення лікарської форми щоденно з 1 по 19 день вагітності дозами 0,1, 0,5 і 1,0 г/кг. Після евтаназії реєстрували кількість жовтих тіл у яєчниках, місць імплантації та резорбції, живих плодів, на підставі чого визначали перед- і післяімплантаційну загибель, загальну ембріональну смертність. Плоди зважували, вимірювали краніо-каудальний розмір; після зважування плаценти розраховували плодово-плацентарний коефіцієнт. Стан внутрішніх органів плодів вивчали із застосуванням модифікованої методики Вільсона (R. D. Hood, 2012).

Мутагенну активність досліджували методом обліку хромосомних аберацій у клітинах кісткового мозку на стадії метафази у 31 миші самця лінії BALB/c масою 18–22 г, віком 2,0–2,5 місяці. Крем з НЦД наносили нашкірно одноразово дозами 0,1 і 1,0 г/кг або багаторазово дозою 0,1 г/кг протягом 7 діб. За 2 години до евтаназії тваринам вводили 0,04% розчин колхіцину для збільшення кількості клітин у стадії метафази. Клітинну суспензію одержували з кісткового мозку стегнової кістки за методикою (Н. П. Бочков и соавт., 1972), мікропрепарати оцінювали під мікроскопом Magnum-TPL (Medline Scientific Limited, Великобританія), реєструючи аберації та пов'язані з пошкодженням мітотичного апарату порушення, підраховуючи мітотичний індекс.

Фотопротекторну активність крему з НЦД *in vivo* вивчали в умовах моделі фотодинамічної травми у мурчаків. Експеримент проводили за описаною вище методикою на 80 нелінійних мурчаках обох статей масою 450–500 г, віком

3,0–4,0 місяці, розподілених на 4 експериментальні групи (по 20 тварин у кожній): група 1 – контрольні умовно здорові інтактні тварини (інтактний контроль), група 2 – тварини з нелікованою фотодинамічною травмою – опромінені тварини (контрольна патологія), група 3 – тварини, яким перед опроміненням наносили крем з НЦД, група 4 – тварини, яким перед опроміненням наносили референтний зразок – крем з ТД. Фотопротекторний ефект досліджуваної лікарської форми аналізували за параметрами: ступінь вираженості еритеми, температура та гістологічна структура шкіри, час повної епітелізації шкірних покривів. З метою візуалізації ступеня ураження шкіри проводили дерматоскопічне дослідження із застосуванням приладу Eurolight Led D30 3,5V (KaWe, Німеччина). Стан загоєння шкірних покривів вимірювали у кількості діб до повного загоєння, критерієм якого вважали епітелізацію опроміненої ділянки та повну відсутність виразок, кровотеч та інших видимих порушень структури епідермісу й дерми (Т. В. Звягинцева та співавт., 2013).

Фотопротекторну дію крему з НЦД також досліджували на моделі посиленої аміфурином фотодинамічної травми у мурчаків (J. M. Herrmann, 1999). У експерименті використані 80 нелінійних мурчаків обох статей масою 450–500 г, віком 3,0–4,0 місяці, розподілених на 4 експериментальні групи (по 20 тварин у кожній): група 1 – контрольні умовно здорові інтактні тварини (інтактний контроль), група 2 – тварини з нелікованою фотодинамічною травмою – опромінені тварини (контрольна патологія), група 3 – тварини, яким перед опроміненням наносили крем з НЦД, група 4 – тварини, яким перед опроміненням наносили референтний зразок – крем з ТД. На депільовану ділянку шкіри тварин за 1 годину до опромінення наносили 1 мл 0,3% розчину фотосенсибілізатора аміфурину. Моделювання фотодинамічної травми, оцінку ступеня вираженості еритеми, вимірювання температури шкіри та часу повної епітелізації шкірних покривів проводили, як зазначено вище. Динаміку одужання також оцінювали за гістологічною структурою шкіри. Вміст PgE_2 і $PgF_{2\alpha}$ у гомогенаті опромінених ділянок шкіри мурчаків визначали з використанням стандартних наборів для імуноферментного аналізу «General Prostaglandin E2 ELISA Kit» (Wuhan EIAab Science Co., Ltd., Китай) та «Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit for Prostaglandin F2 Alpha (PGF2a)» (Cloud-Clone Corp., США).

Фармакокінетику крему з НЦД вивчали на 44 щурах самцях лінії Wistar масою 150–240 г, віком 2,5–3,0 місяці, при нашкірному нанесенні дозою 2 мг/см^2 з подальшою евтаназією через 2, 6, 12, 24 і 48 годин, відповідно до методичних рекомендацій (О. В. Стефанов, 2001). Нанесення лікарської форми здійснювали з подальшим опроміненням шкіри УФ приладом ОКН-011М (Завет, Україна) з часом експозиції 5 МЕД або без відповідного опромінення. Після виведення щурів з експерименту відбирали зразки крові, шкіри з ділянки нанесення крему, внутрішніх органів (печінка, нирки, селезінка). Концентрацію церію визначали методом атомно-емісійної спектроскопії з індуктивно-зв'язаною плазмою на спектрометрі ICPE-9000 (Shimadzu, Японія).

Використаних у досліджах тварин утримували у віваріях Національного медичного університету імені О. О. Богомольця та ДП «Державний науковий центр лікарських засобів і медичної продукції». Експерименти виконані відповідно до

принципів Європейської конвенції із захисту лабораторних тварин (Страсбург, 1986 р.), Закону України № 3447-IV від 21.02.2006 р. «Про захист тварин від жорстокого поводження», Наказу Міністерства освіти і науки, молоді та спорту України №249 від 01.03.2012 р. «Про затвердження Порядку проведення науковими установами дослідів, експериментів на тваринах». Дотримання біоетичних норм засвідчене висновком Комісії з питань біоетичної експертизи та етики наукових досліджень Національного медичного університету імені О. О. Богомольця (протокол № 110 від 10.04.2018 р.).

Статистичну обробку даних виконували за допомогою програм IBM SPSS Statistics v.23 (IBM, США) та Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft, США). Наявність промахів перевіряли за допомогою Q-тесту Діксона. Надалі за W-критерієм Шапіро-Уїлка визначали нормальність розподілу. Для незалежних вибірок у випадку розподілу, відмінного від нормального, порівняння проводили із застосуванням тесту Манна-Уїтні. Дисперсії нормально розподілених вибірок, у свою чергу, порівнювали за допомогою двовибіркового F-тесту, після чого залежно від отриманого значення F-критерію застосовували двовибірковий t-тест з однаковими або різними дисперсіями. Для порівняння залежних вибірок застосовували парний двовибірковий t-тест для середніх. В експериментах з множинними порівняннями використовували однофакторний дисперсійний аналіз ANOVA з post-hoc порівняннями із застосуванням HSD-критерію Тьюкі. За умов розподілу, відмінного від нормального, використовували H-критерій Крускала-Уолліса з post-hoc порівняннями із застосуванням критерію Данна. Відмінності показників вважали статистично значущими при $p < 0,05$ (J. Fang, 2018).

Результати та їх обговорення. У рамках скринінгового дослідження за фотопротекторною активністю крем з 0,25% НЦД при нашкірному нанесенні мурчакам дозою 2 мг/см^2 виявився найбільш ефективним (ФПА 43,6% у порівнянні з 23,1%, 35,9% і 23,1% для кремів з 0,1% НЦД, 0,5% НЦД та 3% ТД) (табл. 1). Нашкірне нанесення крему з 0,25% НЦД сприяло статистично значуще нижчому (на $0,16 \text{ }^\circ\text{C}$ ($p < 0,05$)), у порівнянні з іншими тест-зразками, підвищенню температури шкірних покривів через 1 годину після опромінення, при цьому також спостерігали найменш виражений лейкоцитоз (на 17,4% менший ($p < 0,05$), ніж у групі контрольної патології). Вміст гістаміну в крові мурчаків, яким наносили крем з 0,25% НЦД, не відрізнявся від такого у інтактних тварин. Крем НЦД 0,25% перевищив за ефективністю референтний зразок. Через 4 години після опромінення у групі тварин, яким наносили крем НЦД 0,25%, відмічали на 57,1% менший ступінь вираженості еритеми, ніж у групі застосування крему ТД 3%, площа ураження та кількість виразок були меншими. ФПА референтного зразка становила 23,1%. Через 4 години після опромінення температура шкірних покривів у групі застосування референтного зразка була на $0,26 \text{ }^\circ\text{C}$ ($p < 0,05$) вищою, ніж у групі тварин, яким наносили крем НЦД 0,25%. Крім того, у групі нанесення крему ТД 3% відмічали на 8,6% ($p < 0,05$) більш виражений, у порівнянні з групою застосування крему НЦД 0,25%, лейкоцитоз. За сукупністю досліджених показників крем з 0,25% НЦД визнаний кремом-лідером та рекомендований для розробки остаточного складу лікарської форми та подальшого поглибленого фармакологічного вивчення.

У дослідженні гострої токсичності при одноразовому нашкірному нанесенні крему з НЦД дозою 5 г/кг не відмічали випадків загибелі, змін у загальному стані та поведінці тварин, споживанні корму і води, негативної динаміки зміни маси тіла, значних змін біохімічних показників сироватки крові, макроскопічної структури та коефіцієнтів маси внутрішніх органів. На місці нанесення крему не відмічали ознак дермальної токсичності, що вказувало на відсутність місцевоподразнюючої дії.

Таблиця 1

Динаміка розвитку еритеми у мурчаків в умовах моделі фотодинамічної травми та в групах тварин, яким перед опроміненням наносили тест-зразки кремів з наночастинками церію діоксиду (n = 10; M±m)

Групи тварин	Ступінь вираженості еритеми, бали					
	1 година	2 години	4 години	8 годин	16 годин	24 години
Інтактний контроль	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
Контрольна патологія	2,30±0,26 *	2,50±0,27 *	3,10±0,18 *	3,50±0,17 *	3,80±0,13 *	3,90±0,10 *
Крем з 0,1% НЦД	0,30±0,15 ***,#	0,80±0,20 ***,#	1,80±0,20 ***,#	2,30±0,21 ***,#	2,70±0,21 ***,#	3,00±0,26 ***,#
Крем з 0,25% НЦД	0,10±0,10 **,#	0,30±0,15 ***,#†,††	0,60±0,16 ***,#†,††	1,60±0,16 ***,#†,††	2,10±0,23 ***,#†,††	2,20±0,20 ***,#†,††
Крем з 0,5% НЦД	0,30±0,15 ***,#	0,70±0,21 ***,#	1,50±0,22 ***,#	2,10±0,23 ***,#	2,20±0,29 ***,#	2,50±0,24 ***,#
Крем з 3% ТД	0,00±0,00 **,#	0,30±0,15 ***,#	1,40±0,16 ***,#	2,30±0,21 ***,#	2,89±0,31 ***,#	3,00±0,26 ***,#
Кремове основа	1,80±0,33 *	2,20±0,33 *	2,80±0,29 *	3,30±0,15 *	3,50±0,17 *	3,60±0,16 ***

Примітка. n – кількість тварин у групі; * – $p < 0,05$ у порівнянні з групою інтактного контролю; ** – $p < 0,05$ у порівнянні з групою контрольної патології; # – $p < 0,05$ у порівнянні з групою тварин, яким наносили кремове основа; ## – $p < 0,05$ у порівнянні з групою тварин, яким наносили крем з 3% ТД; † – $p < 0,05$ у порівнянні з групою тварин, яким наносили крем з 0,1% НЦД; †† – $p < 0,05$ у порівнянні з групою тварин, яким наносили крем з 0,5% НЦД.

Безпека крему з НЦД дозою 5 г/кг також продемонстрована при одноразовому внутрішньошлунковому введенні щурам, підтверджена відсутністю значних змін у зовнішньому вигляді і поведінці тварин, динаміці зміни маси тіла, біохімічних показниках сироватки крові, параметрах патоморфологічного дослідження.

У подальшому експерименті з субхронічної токсичності виявлено, що при повторному нашкірному нанесенні кролям крему з НЦД дозами 0,06, 0,18 і 0,60 г/кг протягом 90 днів не спостерігалось значних змін загального стану і поведінки тварин, споживання корму і води, динаміки зміни маси тіла, значень гематологічних та біохімічних показників крові.

Безпека крему з НЦД підтверджена у дослідженні хронічної токсичності. При нашкірному нанесенні щурам 1 раз на добу дозами 0,1, 0,5 і 1,0 г/кг протягом 6 місяців дана лікарська форма не викликала загибелі тварин, не мала впливу на загальний стан, поведінку, споживання корму і води, не сприяла негативній динаміці зміни маси тіла щурів. Крем з НЦД виявився безпечним за впливом на біохімічні показники крові у дослідженому діапазоні доз. Відмінності у порівнянні з групами контролю не мали систематичного характеру та вкладалися в межі фізіологічної норми для щурів.

Нашкірне нанесення щурам крему з НЦД дозами 0,1, 0,5 і 1,0 г/кг 1 раз на добу протягом 6 місяців не спричиняло значних змін макроскопічної і гістологічної структури та коефіцієнтів маси внутрішніх органів тварин. Відхилення у відносній масі та мікроструктурі тканини печінки у групі застосування найбільшої дози крему з НЦД (1,0 г/кг) не виходили за межі фізіологічної норми для щурів, були поодинокими та характеризувалися як такі, що зазвичай мають зворотній характер.

Нашкірне нанесення самцям щурів крему з НЦД дозами 0,1, 0,5 і 1,0 г/кг протягом 90 днів не спричиняло гонадотоксичної дії, що підтверджено відсутністю змін функціональних, макроскопічних та морфометричних показників сперматогенезу.

Згідно з результатами мікро-, макроанатомічних досліджень та аналізу маркерів ембріотоксичності нашкірне нанесення крему з НЦД самкам щурів дозами 0,1, 0,5 і 1,0 г/кг з 1 по 19 день вагітності не викликало ембріолетального ефекту та не спричиняло у плодів анатомічних і топологічних змін.

Дослідження мутагенної дії крему з НЦД показали, що при одноразовому нашкірному нанесенні дозами 0,1 та 1,0 г/кг, а також повторному нашкірному нанесенні дозою 0,1 г/кг щоденно протягом 7 діб мишам не відмічали підвищення частоти хромосомних аберацій, відхилення від норми мітотичного індексу у клітинах кісткового мозку. Таким чином, не виявлено негативного впливу НЦД на геном соматичних клітин.

Базуючись на результатах експериментів з гострої, субхронічної та хронічної токсичності крему з НЦД, оцінки гонадо-, ембріотоксичної та мутагенної дії *in vivo*, зроблений висновок про безпеку лікарської форми у широкому діапазоні доз при топікальному застосуванні. Отримані дані обумовили доцільність дослідження фармакологічної активності крему з НЦД в умовах експериментальних моделей фотодинамічної травми у мурчаків.

При визначенні фармакологічної активності на моделі фотодинамічної травми у мурчаків крем з НЦД проявив фотопротекторну дію (ФПА 43,2%), за якою перевищив референтний зразок (крем з ТД), на що вказувала підтверджена результатами дерматоскопії менша вираженість еритеми – менша кількість виразок і глибоких уражень шкірних покривів (рис. 2). На користь фотопротекторного ефекту крему з НЦД та здатності попереджати запалення свідчила нормалізація температури шкірних покривів, тоді як у групі нанесення крему з ТД протягом досліду відмічали на 0,16–0,79 °C ($p < 0,05$) вищі значення даного показника.

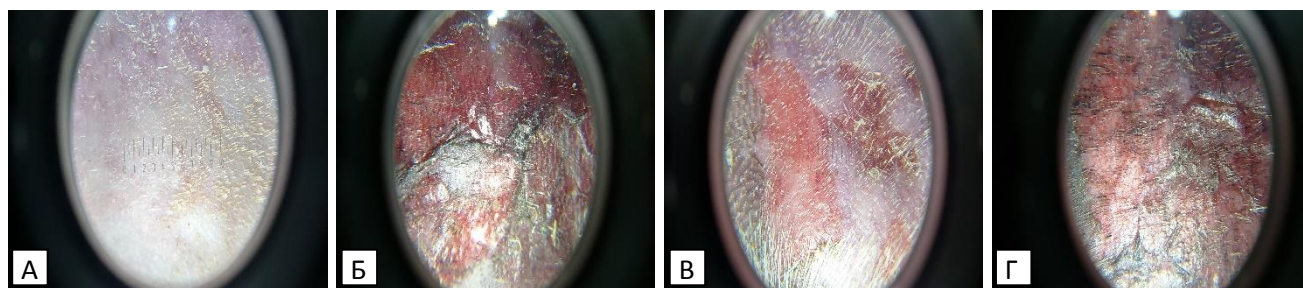


Рис. 2 Шкіра тварин за результатами дерматоскопії через 24 години після опромінення: інтактний контроль (А), контрольна патологія (Б), група тварин, яким наносили крем з НЦД (В), група тварин, яким наносили крем з ТД (Г). Збільшення 10.

Гістологічне дослідження зразків шкіри показало, що профілактичне нанесення крему з НЦД сприяло активації адаптаційних процесів у епідермісі у відповідь на УФ опромінення, а саме, збільшенню гранул меланіну у базальних та шипуватих епідермоцитах, проліферації базальних клітин. Спостерігали великі ділянки з гістологічно наближеною до норми структурою шкіри, тоді як у групі контрольної патології відмічали тотальну або осередкову деструкцію шарів епідермісу. Крем з ТД поступався за ефективністю досліджуваній лікарській формі, на що вказував більший ступінь деструкції елементів епідермісу і дерми, менш виражені адаптаційні зміни у шкірних покривах.

Крем з НЦД проявив ранозагоювальну активність – повна епітелізація шкірних покривів мурчаків відбувалася за 5,86 діб, що на 46,7% швидше, ніж у групі тварин з нелікованою фотодинамічною травмою, у якій показник становив 11,00 діб. Досліджуваний показник не мав статистично значущих відмінностей між групами застосування крему з НЦД та крему з ТД.

Для оцінки фотопротекторної дії крему з НЦД в умовах нанесення на шкіру, схильну до уражень УФ випромінюванням, лікарську форму досліджували на моделі фотодинамічної травми, посиленої аміфурином (J. M. Herrmann, 1999).

Крем з НЦД проявив фотопротекторну дію (ФПА 30,8%), перевищив ефективність крему з ТД, на що вказувала менша вираженість еритеми – менша кількість виразок і глибоких уражень шкірних покривів, відсутність капілярної кровотечі. Підтвердженням фотопротекторного ефекту крему з НЦД і здатності попереджати розвиток інтенсивного запального процесу був вплив на температуру шкірних покривів мурчаків (на 4 годину експерименту даний показник був на 0,55 °C ($p < 0,05$) нижче, ніж у групі контрольної патології) та зниження вмісту PgE_2 і $PgF_{2\alpha}$ у шкірі, відповідно, на 23,1% і 24,2% ($p < 0,05$) у порівнянні з нелікованими тваринами (табл. 2).

Таблиця 2

Вміст простагландинів у шкірі мурчаків в умовах моделі посиленої аміфурином фотодинамічної травми та в групі тварин, яким перед опроміненням наносили крем з наночастинками церію діоксиду ($n = 10$; $M \pm m$)

Групи тварин	Вміст простагландинів у гомогенаті шкіри	
	PgE_2 , пг/мг	$PgF_{2\alpha}$, пг/мг
Інтактний контроль	10,651±0,845	6,478±2,642
Контрольна патологія	17,594±0,751*	15,242±1,524*

Опромінені + крем з НЦД (2 мг/см ²)	13,537±0,226***#	11,547±1,803***
Опромінені + крем з ТД (2 мг/см ²)	14,739±0,466***	11,630±1,950***

Примітка. n – кількість тварин у групі; * – $p < 0,05$ у порівнянні з групою інтактного контролю; ** – $p < 0,05$ у порівнянні з групою контрольної патології; # – $p < 0,05$ у порівнянні з групою тварин, яким наносили крем з ТД.

Посилена аміфурином фотодинамічна травма мала характерну гістологічну картину, яка полягала в утворенні майже суцільної кірки, в якій в єдиний конгломерат спаяні некротизований епідерміс та всі відділи дерми. Це відповідало вищій стадії сонячного опіку – некротичній. Крем з НЦД певною мірою нівелював негативний вплив на шкіру фотосенсибілізатору та УФ опромінення – некротизовані фрагменти чергувалися з візуально незміненою шкірою, спостерігали ознаки активації адаптаційних процесів у епідермісі. Референтний зразок (крем з ТД) виявився не здатним попередити провокаційну дію аміфуруну (рис. 3).

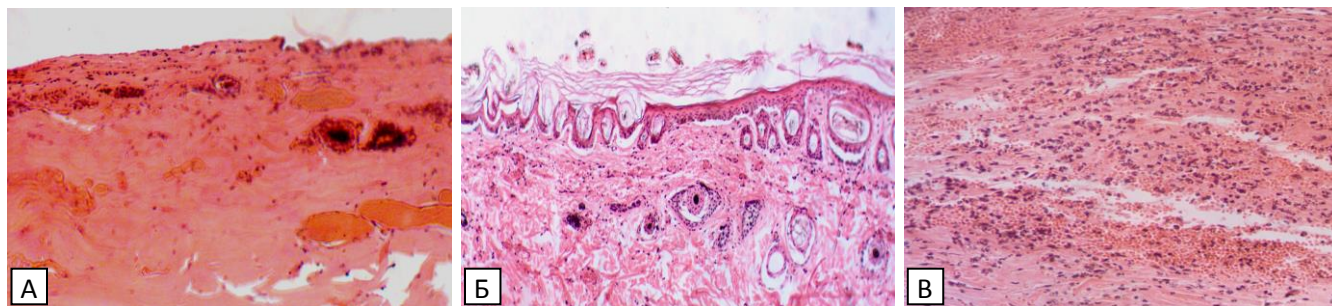


Рис. 3 Мікрофотографії шкіри мурчаків в умовах посиленої аміфурином фотодинамічної травми: А – група контрольної патології (некротизовані епідерміс і дерма); Б – група тварин, яким наносили крем з НЦД (епідерміс варіює за вираженістю проліферації базальних епідермоцитів, стан дерми не змінений); В – група тварин, яким наносили крем з ТД (масивний крововилив, інфільтрація дерми нейтрофілами). Гематоксилін-еозин, збільшення 200 (А, Б), 250 (В).

Крем з НЦД проявив ранозагоювальну активність – повна епітелізація шкірних покривів мурчаків відбувалася за 9,14 доби, що на 44,8% ($p < 0,05$) швидше, ніж у групі контрольної патології, в якій показник становив 16,57 діб. У групі нанесення досліджуваної лікарської форми загоєння проходило на 19,0% ($p < 0,05$) швидше, ніж при застосуванні референтного зразка.

Отримані результати відкрили перспективи подальшого вивчення крему з НЦД як фотопротектору з ранозагоювальними властивостями, здатного попереджати запалення в умовах підвищеної чутливості шкіри до УФ опромінення.

У дослідженні фармакокінетики при одноразовому нашкірному нанесенні щурам крему з НЦД дозою 2 мг/см² церій не всмоктувався в системний кровообіг, не накопичувався в печінці, нирках і селезінці, що свідчило про відсутність системної абсорбції наночастинок. Церій не виявлявся в крові також після впливу УФ, що вказувало на прийнятний профіль безпеки при підвищеній інсоляції – в умовах, відповідних застосуванню сонцезахисних кремів.

Після нашкірного нанесення крему з НЦД церій накопичувався у шкірі протягом 24 годин з подальшим зниженням концентрації (на 42,5% на 48 годину

експерименту), що має забезпечувати тривалий захист від УФ опромінення. Фотодинамічна травма не впливала на фармакокінетику крему протягом 24 годин експерименту. Після 48 годин спостерігали більш виражене зниження концентрації церію в неопромінених (інтактних) зразках шкіри, що може свідчити про більш інтенсивне всмоктування наночастинок у шкірні покриви і їх сповільнену елімінацію при УФ опроміненні (на 20,2% на 48 годину експерименту). Даний факт, з огляду на відсутність системної абсорбції НЦД, вказує на потенційно більш тривалу фотопротекцію в умовах підвищеної інсоляції.

Таким чином, отримані результати характеризують крем з НЦД як ефективний та безпечний фотопротекторний засіб, який за більшістю досліджуваних показників перевищує референтний препарат – крем з ТД виробництва ТОВ «Медичне науково-виробниче об'єднання Біокон», що зумовлює доцільність розробки та подальших клінічних досліджень лікарського препарату, що містить НЦД в якості АФІ.

ВИСНОВКИ

Незважаючи на широкий асортимент сонцезахисних кремів, актуальною залишається розробка лікарських форм для профілактики ураження шкіри ультрафіолетовим випромінюванням, з прийнятним профілем безпеки. Перспективними сполуками для таких засобів є наночастинок церію діоксиду, що характеризуються фотопротекторною активністю широкого діапазону, антиоксидантними властивостями та відсутністю фотокаталітичних ефектів.

У дисертації наведене теоретичне узагальнення та нове вирішення актуального наукового завдання фармакології, яке полягає у експериментальному обґрунтуванні доцільності розробки фотопротекторних засобів для профілактики ураження шкіри ультрафіолетовим випромінюванням та злоякісних новоутворень, у якості активного фармацевтичного інгредієнту таких засобів пропонується застосовувати наночастинок церію діоксиду.

1. За результатами скринінгу фармакологічної ефективності на моделі фотодинамічної травми у мурчаків крем з наночастинками церію діоксиду у концентрації 0,25% визнаний кремом-лідером, тому що для нього показник фотопротекторної активності становить 43,6% у порівнянні з 23,1% і 35,9% для кремів з концентраціями 0,1% та 0,5%, відповідно, при його нанесенні спостерігають меншу кількість виразок і глибоких уражень шкірних покривів, на 17,4% менш виражений лейкоцитоз, ніж у групі контрольної патології, найменше (на 0,16 °C), у порівнянні з іншими тест-зразками, підвищення температури шкірних покривів через 1 годину після опромінення, не виявляють підвищення вмісту гістаміну в крові.

2. У дослідженні гострої токсичності крему з наночастинками церію діоксиду при нашкірному нанесенні та внутрішньошлунковому введенні щурам дозою 5 г/кг не відмічається випадків загибелі, змін у загальному стані та поведінці тварин, споживанні корму і води, негативної динаміки зміни маси тіла, значних змін біохімічних показників сироватки крові, макроскопічної структури та коефіцієнтів маси внутрішніх органів.

3. При повторному нашкірному нанесенні крему з наночастинками церію діоксиду кролям дозами 0,06, 0,18 і 0,60 г/кг протягом 90 діб та щурам дозами

0,1, 0,5 і 1,0 г/кг протягом 6 місяців не спостерігається загибелі, значних змін у загальному стані і поведінці тварин, споживанні корму і води, динаміці зміни маси тіла, значеннях гематологічних та біохімічних показників крові, макроскопічній і гістологічній структурі та коефіцієнтах маси внутрішніх органів.

4. Нашкірне нанесення самцям щурів крему з наночастинками церію діоксиду дозами 0,1, 0,5 і 1,0 г/кг протягом 90 днів не спричиняє гонадотоксичної дії – відсутні негативні зміни функціональних, макроскопічних та морфометричних показників сперматогенезу. Час збереження рухливості сперматозоїдів на 13,5%, 9,7% та 11,0% вищий у відповідних групах нанесення крему порівняно з групою плацебо. Топікальне застосування крему у вагітних самок щурів дозами 0,1, 0,5 і 1,0 г/кг не викликає ембріолетального та тератогенного ефектів. При нашкірному нанесенні крему дозами 0,1 та 1,0 г/кг мишам крем безпечний за параметрами мутагенного впливу на геном соматичних клітин.

5. Крем з наночастинками церію діоксиду при нашкірному нанесенні дозою 2 мг/см² проявляє фотопротекторну дію на моделі фотодинамічної травми у мурчаків (показник фотопротекторної активності 43,2%), сприяє повній епітелізації шкірних покривів за 5,86 діб, що на 46,7% швидше, ніж у групі контрольної патології, активує адаптаційні процеси у епідермісі, нормалізує температуру шкірних покривів, тоді як у групі нанесення крему з титану діоксидом відмічають на 0,79 °C вищі значення даного показника.

6. На моделі посиленої аміфурином фотодинамічної травми у мурчаків показник фотопротекторної активності крему з наночастинками церію діоксиду при нашкірному нанесенні дозою 2 мг/см² становить 30,8%, що є ознакою фотопротекторного ефекту. Профілактичне нанесення крему дозволяє уникнути вираженого запального процесу, на що вказують наступні параметри: температура шкірних покривів на 0,55 °C нижче, а вміст простагландинів PGE₂ і PGE_{2α} у шкірі, відповідно, на 23,1% і 24,2% нижче, ніж у групі контрольної патології. Повне загоєння при застосуванні крему спостерігають за 9,14 діб, що на 44,8% швидше, ніж у нелікованих тварин. Порівняно з кремом з титану діоксидом досліджувана лікарська форма ефективніша, на що вказують на 8,2% менший вміст простагландину PGE₂ у шкірі та на 19,0% більш швидке загоєння опіку, а також більш виражена активація адаптаційних процесів у епідермісі.

7. При одноразовому нашкірному нанесенні щурам крему з наночастинками церію діоксиду дозою 2 мг/см² церій не всмоктується в системний кровообіг, не накопичується в печінці, нирках і селезінці, що вказує на відсутність системної абсорбції. Наночастинки не виявляються в крові після попереднього ультрафіолетового опромінення, що свідчить на користь безпечності при підвищеній інсоляції. Церій накопичується у шкірі протягом 24 годин з подальшим поступовим зниженням концентрації – на 42,5% на 48 годину експерименту для інтактної шкіри та на 20,2% – при ультрафіолетовому опроміненні.

8. Одержані експериментальні дані щодо фармакологічної активності та безпеки крему з наночастинками церію діоксиду свідчать про доцільність розробки лікарських засобів з даним активним фармацевтичним інгредієнтом для профілактики ураження шкіри ультрафіолетовим випромінюванням та злоякісних новоутворень, як наслідків такого ураження.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Зайченко Г. В., Нікітіна Н. С., Покотило О. А., Сімонов П. В. Дослідження гонадотоксичності та ембріотоксичності крему з наночастинками церію діоксиду. *Web of Scholar*. 2018. Vol. 8, № 26, Р. 1. Р. 45–50. (Особистий внесок – аналіз літератури, відбір та підготовка матеріалу, статистична обробка даних, аналіз результатів, оформлення статті).
2. Зайченко А. В., Покотило О. А. Изучение фотопротекторной активности крема с наночастицами диоксида церия на модели усиленной аммифурином фотодинамической травмы у морских свинок. *Рецепт*. 2018. Т. 21, № 5. С. 658–667. (Особистий внесок – аналіз літератури, моделювання патології, відбір та підготовка матеріалу, проведення експерименту, статистична обробка даних, аналіз результатів, оформлення статті).
3. Зайченко Г. В., Покотило О. А., Литкін Д. В. Вибір оптимального складу крему з наночастинками церію діоксиду. *Фармацевтичний часопис*. 2018. № 3 (47). С. 29–36. (Особистий внесок – аналіз літератури, моделювання патології, статистична обробка даних, аналіз результатів, оформлення статті).
4. Зайченко Г. В., Покотило О. А., Нікітіна Н. С. Вивчення гострої токсичності крему з наночастинками церію діоксиду за різних шляхів введення. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2018. № 4–5 (60). Р. 58–63. (Особистий внесок – аналіз літератури, статистична обробка даних, участь у експерименті, аналіз результатів, оформлення статті).
5. Zaychenko G. V., Pokotylo O. A. The experimental study of the cream with cerium dioxide nanoparticles on the model of the photodynamic injury in guinea pigs. *Вісник фармації*. 2018. № 4 (96). С. 57–62. (Особистий внесок – аналіз літератури, моделювання патології, відбір та підготовка матеріалу, статистична обробка даних, аналіз результатів, оформлення статті).
6. Зайченко А. В., Покотило О. А. Экспериментальное исследование фармакокинетического профиля крема с наночастицами диоксида церия. *Вестник Витебского государственного медицинского университета*. 2019. Т. 18, № 1. С. 59–64. (Особистий внесок – аналіз літератури, відбір та підготовка матеріалу, проведення експерименту, статистична обробка даних, аналіз результатів, оформлення статті).
7. Зайченко Г. В., Покотило О. А., Нікітіна Н. С. Вплив крему з наночастинками церію діоксиду на деякі життєві показники щурів при нашкірному нанесенні в умовах хронічного експерименту. *Фармацевтичний журнал*. 2019. № 2. С. 88–98. (Особистий внесок – аналіз літератури, відбір та підготовка матеріалу, статистична обробка даних, аналіз результатів, оформлення статті).
8. Zaychenko G. V., Pokotylo O. A., Nikitina N. S. The study of the subchronic toxicity of the cream with cerium dioxide nanoparticles in cutaneous application in rabbits. *Клінічна фармація*. 2019. Т. 23, № 1. С. 4–10. (Особистий внесок – аналіз літератури, участь у експерименті, статистична обробка даних, аналіз результатів, оформлення статті).
9. Єфанов В. С., Зайченко Г. В., Нікітіна Н. С., Покотило О. А. Дослідження гострої токсичності крему з наночастинками діоксиду церію. *V національний з'їзд*

фармакологів України : тези доп., м. Запоріжжя, 18–20 жовтня 2017 р., Запоріжжя, 2017. С. 43.

10. Pokotylo O. A. The experimental study on photoprotective activity of the cream with cerium dioxide nanoparticles. *Annual Young Medical Scientists' Conference 2017* : abstracts, м. Київ, 27–29 жовтня 2017 р., Київ, спец. випуск «Український науково-медичний молодіжний журнал», 2017. С. 36.

11. Pokotylo O. A., Nikitina N. S. The study of subchronic toxicity of the cream with cerium dioxide nanoparticles. *Topical Issues of New Drugs Development* : abstracts of XXV International Scientific and Practical Conference of Young Scientists and Students, м. Харків, 18–20 квітня 2018 р., Харків, «Видавництво НФаУ», 2018. С. 335–336.

12. Покотило О. А., Сімонов П. В. Оцінка фотопротекторної дії крему з наночастинками церію діоксиду за впливом на маркери фотодинамічної травми. *XXII міжнародний медичний конгрес студентів та молодих вчених* : матеріали, м. Тернопіль, 23–25 квітня 2018 р., Тернопіль, «Укрмедкнига», 2018. С. 191.

13. Покотило О. А., Сімонов П. В., Горчакова Н. А. Экспериментальное исследование хронической токсичности крема с наночастицами диоксида церия. *Медицинская наука: новые возможности* : материалы XIII научн.-практ. конф. молодых ученых и студентов ТГМУ им. Абуали ибни Сино с междунар. участием, посвященной «Году развития туризма и народных ремесел» г. Душанбе, 27 апреля 2018 г., Душанбе, 2018. С. 41–42.

14. Покотило О. А., Музычко Д. В. Оценка влияния крема с наночастицами диоксида церия на содержание простагландинов в гомогенате тканей кожи морских свинок, подвергшихся ультрафиолетовому облучению. *Проблемы и перспективы развития современной медицины* : сб. научн. статей X республиканской научн.-практ. конф. с междунар. участием студентов и молодых ученых, г. Гомель, 3–4 мая 2018 г., Гомель, «ГомГМУ», 2018. С. 956–957.

15. Zaichenko G. V., Liapunov M. O., Yefanov V. S., Pokotylo O. A., Simonov P. V. Experimental study on photoprotective activity of cerium dioxide nanoparticles cream on photosensitized skin. *WCP2018 Kyoto* : abstracts of 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology, Kyoto, 1–6 July 2018, Kyoto, 2018. – Available at: https://www.micenavi.jp/wcp2018/search/detail_program/id:867.

16. Зайченко Г. В., Покотило О. А. Фармакологічне обґрунтування складу крему з наночастинками церію діоксиду. *Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів* : матеріали VII наук.-практ. конф. з міжнар. участю, м. Тернопіль, 27–28 вересня 2018 р., Тернопіль, «ТДМУ», 2018. С. 266–267.

17. Pokotylo O. A. An experimental study on pharmacological action of the cream with cerium dioxide nanoparticles in conditions of application on photosensitized skin. *Topical Issues of Theoretical and Clinical Medicine* : abstracts of International Scientific and Practical Conference of Students, Postgraduates, and Young Scientists, м. Суми, 17–19 жовтня 2018 р., Суми, «Сумський державний університет», 2018. С. 100.

18. Зайченко Г. В., Покотило О. А. Дослідження фармакокінетики крему з наночастинками церію діоксиду. *Медицина наука-2018* : матеріали всеукраїнської

наук.-практ. конф. молодих учених, м. Полтава, 16 листопада 2018 р., Полтава, «Українська медична стоматологічна академія», 2018. С. 46–47.

19. Зайченко Г. В., Покотило О. А., Сімонов П. В., Качалова О. А. Спосіб застосування крему з наночастинками церію діоксиду для профілактики ураження ультрафіолетовим випромінюванням: *Інформаційний лист про нововведення в сфері охорони здоров'я № 303 - 2018*. Укрмедпатентінформ МОЗ України. Випуск 5 з проблеми «Фармація». К., 2018 р. 4 с.

АНОТАЦІЯ

Сімонова О. А. Фармакологічне дослідження крему з наночастинками церію діоксиду. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія. – Національний фармацевтичний університет МОЗ України, Харків, 2019.

Дисертація присвячена теоретичному та експериментальному обґрунтуванню доцільності розробки нового фотопротекторного лікарського засобу з наночастинками церію діоксиду у формі дермального крему. У скринінговому дослідженні фотопротекторної активності на моделі фотодинамічної травми у мурчаків встановлений оптимальний склад лікарської форми для поглибленого фармакологічного вивчення. Безпека крему з наночастинками церію діоксиду оцінена у дослідженнях гострої, субхронічної, хронічної токсичності, гонадотоксичності та ембріотоксичності, мутагенної дії. Доведені ефективність та безпека лікарської форми при нашкірному нанесенні мурчакам у рамках моделі фотодинамічної травми та посиленої аміфурином фотодинамічної травми. Визначені деякі показники фармакокінетики крему з наночастинками церію діоксиду при топікальному застосуванні: абсорбція у системний кровообіг, накопичення церію у шкірі, крові та внутрішніх органах. Одержані експериментальні дані свідчать про доцільність розробки лікарських засобів з даним активним фармацевтичним інгредієнтом для профілактики ураження шкіри ультрафіолетовим випромінюванням.

Ключові слова: крем з наночастинками церію діоксиду, безпека, фармакологічна активність, фармакокінетика, фотодинамічна травма.

АННОТАЦИЯ

Симонова О. А. Фармакологическое исследование крема с наночастицами диоксида церия. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание научной степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.03.05 – фармакология. – Национальный фармацевтический университет МЗ Украины, Харьков, 2019.

Диссертация посвящена экспериментальному обоснованию целесообразности разработки нового фотопротекторного лекарственного средства с наночастицами диоксида церия в форме дермального крема. В скрининговом исследовании фотопротекторной активности на модели фотодинамической травмы у морских

свинок установлен оптимальный состав лекарственной формы для углубленного фармакологического изучения. Безопасность крема с наночастицами диоксида церия оценена в исследованиях острой, субхронической, хронической токсичности, гонадотоксичности и эмбриотоксичности, мутагенного действия. Доказаны эффективность и безопасность лекарственной формы при наружном нанесении морским свинкам в рамках модели фотодинамической травмы и усиленной аммифурином фотодинамической травмы. Определены некоторые показатели фармакокинетики крема с наночастицами диоксида церия при топикальном применении: абсорбция в системный кровоток, накопление церия в коже, крови и внутренних органах. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о целесообразности разработки лекарственных средств с данным активным фармацевтическим ингредиентом для профилактики поражения кожи ультрафиолетовым излучением.

Ключевые слова: крем с наночастицами диоксида церия, безопасность, фармакологическая активность, фармакокинетика, фотодинамическая травма.

SUMMARY

Simonova O. A. Pharmacological study of the cream with cerium dioxide nanoparticles. – The manuscript.

The thesis for a Candidate of Pharmaceutical Sciences Degree (PhD) in specialty 14.03.05 – Pharmacology. – National University of Pharmacy of Ministry of Health of Ukraine, Kharkiv, 2019.

The thesis is dedicated to theoretical and experimental substantiation of an expediency of development of a new photoprotective drug with cerium dioxide nanoparticles in the dosage form of a dermal cream.

The screening of a photoprotective action of creams with cerium dioxide nanoparticles on a model of photodynamic injury in guinea pigs was carried out. The cream with 0.25% cerium dioxide nanoparticles was specified as a leader, because it had photoprotection activity index of 43.6% compared to 23.1% and 35.9% for 0.1% and 0.5% creams. In the group of its use there was a lower number of ulcers and deep skin lesions, 17.4% less pronounced leukocytosis compared to pathology control group, the smallest increase in skin temperature (0.16 °C) in comparison with other test samples after 1 hour post-exposure, and an absence of blood histamine level increase.

In an acute toxicity study it was showed that in the settings of cutaneous application and oral administration of 5 g/kg of the cream with cerium dioxide nanoparticles in rats the dosage form didn't cause mortality, didn't affect body weight, macroscopic structure and mass coefficients of internal organs. A decline in serum levels of total protein by 5.8% (cutaneous application) and albumin by 13.2% (oral administration) were observed, but the values stayed within physiological standard.

In the following subchronic toxicity study it was found that cutaneous application of 0.06, 0.18, or 0.60 g/kg of the cream with cerium dioxide nanoparticles in rabbits during 90 days didn't cause changes in condition and behavior of animals, consumption of food and water, body weight dynamics, and blood biochemical and hematological indices. The glucose level after 1 month of use of 0.60 g/kg dose of the cream was 44.5% higher compared to intact control, but after 3 months of observation the differences were gone.

It was established that the cream with cerium dioxide nanoparticles in the setting of cutaneous application in rats during 6 months in the doses of 0.1, 0.5, and 1.0 g/kg didn't cause mortality, negative body weight dynamics, was safe regarding its effect on serum biochemical indices, macroscopic and histological structure, and mass coefficients of internal organs. A decrease in leukocyte count by 15.2% and 13.3% after 1 month of an experiment was observed in the group of 0.1 and 0.5 g/kg cream application, respectively, compared to placebo group, with further normalization of this parameter by the 6th month.

Cutaneous application of the cream with cerium dioxide nanoparticles in the doses of 0.1, 0.5, and 1.0 g/kg during 90 days in male rats didn't cause gonadal toxicity. The duration of sperm motility preservation was by 13.5%, 9.7%, and 11.0% higher in respective groups compared to placebo group. The topical use of the cream in the doses of 0.1, 0.5, and 1.0 g/kg in pregnant female rats didn't cause death or anatomical changes of embryos. The cream with cerium dioxide nanoparticles didn't have mutagenic effect on somatic cell genome in the case of single cutaneous application in the doses of 0.1 and 1.0 g/kg in mice and repeated cutaneous application in the dose of 0.1 g/kg in mice.

Pharmacological action of the cream with cerium dioxide nanoparticles in the setting of 2 mg/cm² cutaneous application, on a model of photodynamic injury in guinea pigs was confirmed by 43.2% photoprotection activity index, complete skin epithelization in 5.86 days, which is 46.7% faster than in pathology control group, a normalization of skin temperature, and a decrease of destructive changes in the skin, confirmed by histology analysis. An efficacy of the cream with cerium dioxide nanoparticles in the setting of 2 mg/cm² cutaneous application, on a model of ammfurin amplified photodynamic injury in guinea pigs was confirmed by 30.8% photoprotection activity index, an activation of adaptive processes in epidermis, 23.1% and 24.2% lower prostaglandin PgE₂ and PgF_{2 α} skin levels compared to pathology control group, 0.55 °C less pronounced skin temperature increase in comparison with pathology control group, and complete wound healing in 9.14 days, which is 44.8% faster than in untreated animals.

The data regarding pharmacokinetics of the cream with cerium dioxide nanoparticles in the setting of 2 mg/cm² single cutaneous application in rats was clarified. Cerium wasn't absorbed into circulation and wasn't accumulated in liver, kidneys, and spleen, which is indicative of an absence of systemic absorption. Nanoparticles were not registered in the blood after ultraviolet exposure, which points at an acceptable safety profile in these conditions. Cerium accumulates in the skin during 24 hours with further gradual decrease in concentration – by 42.5% at the 48th hour of experiment for an intact skin and by 20.2% – for ultraviolet exposed skin, which is indicative of the prolongation of the photoprotective action of the cream with cerium dioxide nanoparticles in the setting of increased insolation.

Thus, the obtained results substantiate an expediency of further preclinical and clinical studies of the cream with cerium dioxide nanoparticles with the aim of development of effective photoprotective drug for prevention of ultraviolet skin injury and malignancies, caused by it.

Key words: cream with cerium dioxide nanoparticles, safety, pharmacological action, pharmacokinetics, photodynamic injury.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

- АлАТ – аланінамінотрансфераза;
- АсАТ – аспартатамінотрансфераза;
- АФІ – активний фармацевтичний інгредієнт;
- МЕД – мінімальна еритемна доза;
- НЦД – наночастинки церію діоксиду;
- ТД – титану діоксид;
- УФ – ультрафіолет;
- ФПА – фотопротекторна активність.