

Г. В. Зайченко¹, О. А. Покотило¹, Н. С. Нікітіна²

Вивчення гострої токсичності крему з наночастинками церію діоксиду за різних шляхів введення

¹Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ

²Державне підприємство «Державний науковий центр лікарських засобів і медичної продукції», м. Харків

Ключові слова: наночастинки церію діоксиду, доклінічні дослідження, гостра токсичність, нашкірне нанесення, внутрішньошлункове введення

Сьогодні глобальною проблемою медицини є меланома та немеланомні злоякісні новоутворення шкіри [1]. За даними Національного канцер-реєстру України станом на 2016 рік захворюваність на дані патології становила 7,6 і 42,5 на 100 тис. населення, а смертність за рік – 2,6 і 1,4 на 100 тис. населення відповідно [2].

Одним з основних етіологічних факторів розвитку меланоми, плоскоклітинного та базальноклітинного раку є ультрафіолетове (УФ) опромінення [3]. Канцерогенному впливу даного чинника запобігає застосування фотопротекторів – засобів, здатних переважно поглинати (органічні фільтри), або розсіювати чи відбивати (неорганічні фільтри) УФ промені [4]. Перевага неорганічних фільтрів полягає в меншій взаємодії з УФ, а отже, менш інтенсивному утворенню активних форм кисню [5].

Неорганічний УФ фільтр нового покоління – наночастинки церію діоксиду (НЦД) – має подвійний механізм дії: поєднує фотопротекторну активність (відбивання та розсіювання УФ променів) з антиоксидантним ефектом (нейтралізація вільних радикалів) [6, 7]. Останній обумовлює відсутність фотокаталітичної дії, а, отже, кращий профіль безпеки НЦД порівняно з широко вживаними титану діоксидом і цинку оксидом [4].

Розширення арсеналу заходів профілактики УФ уражень, зокрема, зло-

якісних новоутворень шкіри, можна досягти шляхом впровадження в медичну практику сонцезахисних кремів з НЦД. Розробка таких засобів передбачає проведення комплексу доклінічних досліджень з фармакології безпеки. НЦД мають прийнятний профіль безпеки, підтверджений експериментами *in vitro* та *in vivo* [8], однак дана проблема вимагає подальшого вивчення, адже кожна синтезована субстанція наночастинок має власний унікальний набір характеристик, що зумовлюють фармакологічну активність і токсикологічні властивості [9].

Мета дослідження – вивчити гостру токсичність крему з НЦД.

Матеріали та методи. Стандартизовані НЦД розміром 6–15 нм синтезовані в ТОВ «НаноМедТех», лікарська форма – дермальний крем з 0,25 % НЦД – розроблена в НТК «Інститут монокристалів» НАН України.

Експеримент проводили на 30 білих щурах самках лінії Wistar масою 150–240 г, віком 2,5–3,0 міс. Тварин розподілили на 3 групи по 10 особин у кожній: 1) група одноразового нашкірного нанесення крему з НЦД, спостереження протягом 14 діб; 2) група одноразового нашкірного нанесення крему з НЦД, спостереження протягом 30 діб; 3) група одноразового внутрішньошлункового введення крему з НЦД, спостереження протягом 14 діб.

Дослідження проведено з дотриманням положень Європейської конвенції про захист тварин, які використовуються для наукових цілей (Страсбург, 1986 р.), наказу МОЗ України від 14 грудня 2009 р. № 944 «Про затвердження Порядку проведення доклініч-

ного вивчення лікарських засобів та експертизи матеріалів доклінічного вивчення лікарських засобів», Закону України від 21 лютого 2006 р. № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження».

План експерименту схвалений комісією з питань етики Національного медичного університету імені О. О. Богомольця, усі пов'язані з гуманним поводженням з тваринами процедури дотримані. Щурів виводили з експерименту під хлороформним наркозом.

Дослідження гострої токсичності (вибір доз, тварин і шляхів введення) проведене згідно з методичними рекомендаціями [10]. Внутрішньошлунковий шлях введення обраний як такий, що забезпечує системну дію досліджуваної речовини, а також враховує можливість випадкових ситуацій, які спричиняють отруєння.

Крем з 0,25 % НЦД наносили на шкіру в дозі 5,0 г/кг, після попереднього вистригання шерсті на спині й боках (площа ділянки для аплікації становила 50 % поверхні тіла) або вводили внутрішньошлунково в дозі 5,0 г/кг. Таким чином, щури отримували НЦД у дозі 12,5 мг/кг.

Токсичність оцінювали за клінічною картиною інтоксикації, виживаністю тварин, споживанням корму та води, динамікою зміни маси тіла (0, 3, 7, 14 і 30 доба), біохімічними показниками сироватки крові (уміст загального білка та альбуміну, тимолова проба), макроскопічною структурою та коефіцієнтами маси внутрішніх органів (головний мозок, серце, легені, печінка, селезінка та нирки).

Біохімічні показники визначали з застосуванням стандартних наборів для клініко-діагностичних і біохімічних лабораторій виробництва ТОВ НВП «Філісіт-Діагностика» (м. Дніпро) після відбору крові з хвостової вени на початку експерименту та через 14 і 30 діб. Оптичну густину розчинів вимірювали за допомогою фотоелектроколориметра КФК-3 (ВАТ «Загорський оптико-механічний завод», РФ) та спектрофотометра СФ-46 (ВАТ «Ломо», РФ). Уміст загального білка визначали за біуретовою реакцією, альбуміну – за реакцією

з бромкрезоловим зеленим, показник тимолової проби – за методом осадових проб [11, 12].

На 14 добу (групи 1 і 3) і 30 добу (група 2) проводили евтаназію щурів, після розтину здійснювали макроскопічний огляд внутрішніх органів (розміри, забарвлення, форма, взаємне розташування) і вилучали головний мозок, серце, легені, печінку, селезінку та нирки. Після відокремлення жирової тканини органи промивали у фізіологічному розчині натрію хлориду з подальшим прибиранням надлишкової вологи за допомогою фільтрувального паперу та зважували. На основі абсолютних значень маси органів розраховували коефіцієнти маси у відсотках.

Статистичну обробку даних здійснювали за допомогою програми IBM SPSS Statistics v.23 (IBM, США). Нормальність розподілу визначали за W-критерієм Шапіро-Уїлка. Надалі проводили однофакторний дисперсійний аналіз ANOVA з post-hoc порівняннями з застосуванням HSD-критерію Тьюкі (коефіцієнти маси внутрішніх органів) або парний двовибірковий t-тест для середніх (динаміка зміни маси тіла, біохімічні показники сироватки крові). Відмінності показників вважали статистично значущими в разі $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення. Після одноразового нашкольного нанесення крему з НЦД у щурів спостерігали звичайний характер рухів, нормальне дихання та реакцію на звукові й тактильні подразники. Відмічали легку гіперемію носа, яка зникла протягом однієї доби. До кінця експерименту зовнішній вигляд, загальний стан і поведінка щурів, споживання корму та води знаходилися в межах норми. На місці нанесення крему не відмічали ознак дермальної токсичності, що вказувало на відсутність місцевоподразнюючої дії.

Внутрішньошлункове введення крему з НЦД також не призводило до розвитку інтоксикації. Загальний стан і поведінка щурів, їхній зовнішній вигляд, споживання корму та води не змінювалися.

Загибелі тварин протягом експерименту не спостерігали.

Аналіз динаміки зміни маси тіла тварин показав, що за умов нашкірного нанесення даний показник зростає на 7 і 30 добу на 2,0 і 4,6 % відповідно, а за внутрішньошлункового введення – не змінювався протягом експерименту, що вказує на безпеку лікарської форми (табл. 1).

За одноразового нашкірного нанесення щурам крему з НЦД на 14 добу експерименту відмічали зниження вмісту альбуміну на 12,3 % та підвищення значення тимолової проби на 51,6 %, однак на 30 добу показники поверталися до вихідних значень, що вказує на нетривалість і зворотність можливого токсичного ефекту досліджуваної лікарської форми (табл. 2). На 30 добу спостерігали зниження на 5,8 % умісту загального білка, але значення не виходило за межі фізіологічної норми [13].

У групі внутрішньошлункового введення крему з НЦД щурам відмічали зниження вмісту альбуміну на 13,2 % на 14 добу, однак показник відповідав нормі для даного виду тварин [13].

Патоморфологічне дослідження, проведене через 14 діб (групи 1 і 3) і через 30 діб (група 2) після застосування крему з НЦД, включало в себе автопсію, макроскопічне дослідження внутрішніх органів щурів. За результатами зовнішнього огляду та розтину не виявлено відхилень від норми: шерсть – блискуча, охайна, лімфатичні вузли не збільшені, шкіра в місцях нанесення препарату без слідів розчісувань, виразок і лущення, видимі слизові оболонки блискучі, блідо-рожеві, гладкі. Усі макроскопічно досліджені органи (головний мозок, серце, легені, печінка, селезінка, нирки) мали звичайні розміри, колір і консистенцію.

Таблиця 1

Динаміка зміни маси тіла щурів після одноразового нашкірного нанесення або внутрішньошлункового введення крему з наночастинками церію діоксиду ($M \pm m$)

Шлях введення	Період спостереження	Маса тіла тварини, г	n
Нашкірний	вихідне значення	204,53 ± 1,57	20
	3 доба	204,01 ± 1,94	20
	7 доба	208,54 ± 1,83*	20
	14 доба	202,00 ± 2,60	20
	30 доба	214,02 ± 2,92*	10
Внутрішньошлунковий	вихідне значення	210,04 ± 4,18	10
	3 доба	213,02 ± 4,64	10
	7 доба	218,03 ± 4,64	10
	14 доба	217,02 ± 5,15	10

Примітка. Тут і в табл. 2: n – розмір вибірки; *p < 0,05 порівняно з вихідним значенням.

Таблиця 2

Біохімічні показники крові щурів після одноразового нашкірного нанесення або внутрішньошлункового введення крему з наночастинками церію діоксиду ($M \pm m$)

Шлях введення	Період спостереження	Загальний білок, г/л	Альбумін, г/л	Тимолова проба, од. S-H	n
Нашкірний або внутрішньошлунковий	вихідне значення	76,40 ± 1,66	35,79 ± 1,16	1,26 ± 0,10	30
Нашкірний	14 доба	73,53 ± 3,91	31,38 ± 0,49*	1,91 ± 0,25*	20
Нашкірний	30 доба	71,98 ± 2,05*	34,02 ± 0,90	1,72 ± 0,37	10
Внутрішньошлунковий	14 доба	78,38 ± 2,93	31,07 ± 0,60*	1,72 ± 0,35	10

Коефіцієнти маси внутрішніх органів щурів після одноразового нашкірного нанесення або внутрішньошлункового введення крему з наночастинками церію діоксиду (n = 10; M ± m)

Орган	Коефіцієнт маси органів, %		
	нашкірне нанесення, 14 доба	нашкірне нанесення, 30 доба	внутрішньошлункове введення, 14 доба
Головний мозок	0,88 ± 0,02	0,80 ± 0,01*	0,83 ± 0,05
Серце	0,38 ± 0,02	0,40 ± 0,0	0,42 ± 0,01
Легені	0,86 ± 0,07	0,78 ± 0,03	0,78 ± 0,03
Печінка	3,79 ± 0,14	3,71 ± 0,08	3,73 ± 0,06
Селезінка	0,54 ± 0,04	0,48 ± 0,03	0,53 ± 0,05
Нирки	0,37 ± 0,02	0,41 ± 0,01	0,45 ± 0,01*

Примітка. n – кількість тварин у групі, *p < 0,05 порівняно з групою одноразового нашкірного нанесення крему, спостереження протягом 14 днів.

У разі оцінки коефіцієнтів маси внутрішніх органів загалом не виявлено розбіжностей між групами (табл. 3). У групі нашкірного нанесення крему з НЦД на 30 добу відмічали зменшення відносної маси головного мозку на 9,1 % порівняно з 14 добою, а в групі внутрішньошлункового введення – збільшення відносної маси нирок на 21,6 % порівняно з щурами, яким крем наносили нашкірно. Незважаючи на виявлені зміни, значення показників знаходились у межах фізіологічної норми [14].

За даними В. А. Rzigalinski та співавт. і R. A. Yokel та співавт., НЦД різного розміру за внутрішньошлункового введення в дозах до 5 г/кг зазвичай добре переносяться щурами через погану абсорбцію в ШКТ [15, 16]. Крім цього, згідно з В. Gulson та співавт., неорганічні фільтри не потрапляють у системний кровообіг через інтактну шкіру [17]. Таким чином, отримані в даному дослідженні дані щодо безпеки крему з НЦД узгоджуються з відомостями літератури стосовно низької токсичності цих наночастинок за вказаних шляхів застосування.

Отримані результати відкривають перспективи проведення подальших доклінічних досліджень крему з НЦД як ефективного та безпечного фотопротектора.

Висновки

1. За одноразового нашкірного нанесення крему з 0,25 % НЦД у дозі 5 г/кг білим щурам лінії Wistar протягом 30 днів не відмічали випадків загибелі, змін у загальному стані та поведінці тварин, споживанні корму та 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.
2. Безпека крему з НЦД у дозі 5 г/кг за одноразового внутрішньошлункового введення щурам підтверджена відсутністю значущих змін у зовнішньому вигляді та поведінці тварин, динаміці зміни маси тіла, біохімічних показниках сироватки крові, параметрах патоморфологічного дослідження.

1. Skin cancer: epidemiology, disease burden, pathophysiology, diagnosis, and therapeutic approaches / Z. Apalla, D. Nashan, R. B. Weller [et al.] // Dermatol. Ther. (Heidelb). – 2017. – V. 7, Suppl. 1. – P. 5–19.
2. Бюлетень Національного канцер-реєстру № 19 – «Рак в Україні, 2016–2017»; під ред. О. О. Колесник / З. П. Федоренко, Ю. Й. Михайлович, Л. О. Гулак [та ін.]. – Київ : Національний інститут раку, 2018. – 136 с.

3. Photocarcinogenesis and skin cancer prevention strategies: an update / M. C. Martens, C. Seebode, J. Lehmann [et al.] // *Anticancer Res.* – 2018. – V. 38, № 2. – P. 1153–1158.
4. Stiefel C. Photoprotection in changing times – UV filter efficacy and safety, sensitization processes and regulatory aspects / C. Stiefel, W. Schwack // *Int. J. Cosmet. Sci.* – 2015. – V. 37, № 1. – P. 2–30.
5. Particulate products: tailoring properties for optimal performance; ed. H. G. Merkus, G. M. H. Meesters. – Springer International Publishing Switzerland, 2014. – 469 p.
6. Синтез и биомедицинские применения нанодисперсного диоксида церия / А. Б. Щербаков, О. С. Иванова, Н. Я. Спивак [и др.]. – Томск : Издательский дом Томского государственного университета, 2016. – 476 с.
7. Cerium oxide nanoparticles, combining antioxidant and UV shielding properties, prevent UV-induced cell damage and mutagenesis / F. Caputo, M. De Nicola, A. Sienkiewicz [et al.] // *Nanoscale.* – 2015. – V. 7, № 38. – P. 15643–15656.
8. Recent advances (2010–2015) in studies of cerium oxide nanoparticles' health effects / Y. Li, P. Li, H. Yu [et al.] // *Environ. Toxicol. Pharmacol.* – 2016. – V. 44. – P. 25–29.
9. Chen B. H. Various physicochemical and surface properties controlling the bioactivity of cerium oxide nanoparticles / B. H. Chen, B. Stephen Inbaraj // *Crit. Rev. Biotechnol.* – 2018. – V. 38, № 7. – P. 1003–1024.
10. Доклінічні дослідження лікарських засобів: методичні рекомендації; під ред. О. В. Стефанова. – Київ : Авіцена, 2001. – 528 с.
11. Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods; ed. R. A. McPherson, M. R. PinCUS. – [22-nd ed.]. – Philadelphia : Elsevier/Saunders, 2011. – 1568 p.
12. Sunheimer R. L. Clinical laboratory chemistry / R. L. Sunheimer, L. Graves. – Upper Saddle River : Pearson, 2011. – 688 p.
13. Справочник. Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных; под ред. В. Г. Макарова, М. Н. Макаровой / Т. В. Абрашова, Я. А. Гуцин, М. А. Ковалева [и др.]. – Санкт-Петербург : Издательство «Лема», 2013. – 116 с.
14. Marino D. J. Age-specific absolute and relative organ weight distributions for Fischer 344 rats / D. J. Marino // *J. Toxicol. Environ. Health A.* – 2012. – V. 75, № 24. – P. 1484–1516.
15. Rzigalinski B. A. Cerium oxide nanoparticles in neuroprotection and considerations for efficacy and safety / B. A. Rzigalinski, C. S. Carfagna, M. Ehrich // *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* – 2017. – V. 9, № 4. – P. 1–17.
16. The Yin: an adverse health perspective of nanoceria: uptake, distribution, accumulation, and mechanisms of its toxicity / R. A. Yokel, S. Hussain, S. Garantziotis [et al.] // *Environ. Sci. Nano.* – 2014. – V. 1, № 5. – P. 406–428.
17. A review of critical factors for assessing the dermal absorption of metal oxide nanoparticles from sunscreens applied to humans, and a research strategy to address current deficiencies / B. Gulson, M. J. McCall, D. M. Bowman [et al.] // *Arch. Toxicol.* – 2015. – V. 89, № 11. – P. 1909–1930.

Г. В. Зайченко, О. А. Покотило, Н. С. Нікітіна

Вивчення гострої токсичності крему з наночастинками церію діоксиду за різних шляхів введення

Мета дослідження – вивчити гостру токсичність крему з наночастинками церію діоксиду (НЦД).

Здійснювали одноразове нашкірне нанесення чи внутрішньошлункове введення крему з 0,25 % НЦД у дозі 5 г/кг щурам самкам лінії Wistar; оцінку токсичності проводили протягом 14 або 30 діб за клінічною картиною інтоксикації, виживаністю тварин, споживанням корму та води, динамікою зміни маси тіла, біохімічними показниками сироватки крові, макроскопічною структурою та коефіцієнтами маси внутрішніх органів.

За умов одноразового нашкірного нанесення крему з НЦД у дозі 5 г/кг щурам протягом 30 діб не відмічали випадків загибелі, змін у загальному стані та поведінці тварин, споживанні корму та води, негативної динаміки зміни маси тіла, значних змін біохімічних показників сироватки крові, макроскопічної структури та коефіцієнтів маси внутрішніх органів. Безпеку крему з НЦД у дозі 5 г/кг за одноразового внутрішньошлункового введення щурам підтверджено відсутністю значних змін у зовнішньому вигляді й поведінці тварин, динаміці зміни маси тіла, біохімічних показниках сироватки крові, параметрах патоморфологічного дослідження.

Таким чином, крем з 0,25 % НЦД за одноразового внутрішньошлункового введення та нашкірного нанесення білим щурам лінії Wistar у дозі 5 г/кг є безпечним, на що вказують результати аналізу таких параметрів, як виживаність тварин, споживання корму та води, динаміка зміни маси тіла, біохімічні показники сироватки крові, макроскопічна структура та коефіцієнти маси внутрішніх органів.

Отримані результати відкривають перспективи проведення подальших доклінічних досліджень крему з НЦД як ефективного та безпечного фотопротектора.

Ключові слова: наночастинки церію діоксиду, доклінічні дослідження, гостра токсичність, нашкірне нанесення, внутрішньошлункове введення

А. В. Зайченко, О. А. Покотило, Н. С. Никитина

Изучение острой токсичности крема с наночастицами диоксида церия при различных путях введения

Цель исследования – определить острую токсичность крема с наночастицами диоксида церия (НДЦ).

Проводили однократное накожное нанесение или внутривнутрижелудочное введение крема с 0,25 % НДЦ в дозе 5 г/кг крысам самкам линии Wistar; оценку токсичности осуществляли в течение 14 или 30 дней по клинической картине интоксикации, выживаемости животных, потреблению корма и воды, динамике изменения массы тела, биохимическим показателям сыворотки крови, макроскопической структуре и коэффициентам массы внутренних органов.

При однократном накожном нанесении крема с НДЦ в дозе 5 г/кг крысам в течение 30 дней не отмечали случаев гибели, изменений в общем состоянии и поведении животных, потреблении корма и воды, негативной динамики изменения массы тела, значительных изменений биохимических показателей сыворотки крови, макроскопической структуры и коэффициентов массы внутренних органов. Безопасность крема с НДЦ в дозе 5 г/кг при однократном внутривнутрижелудочном введении крысам подтверждена отсутствием значительных изменений во внешнем виде и поведении животных, динамике изменения массы тела, биохимических показателях сыворотки крови, параметрах патоморфологического исследования.

Таким образом, крем с 0,25 % НДЦ при однократном внутривнутрижелудочном введении и накожном нанесении белым крысам линии Wistar в дозе 5 г/кг является безопасным, на что указывают результаты анализа таких параметров, как выживаемость животных, потребление корма и воды, динамика изменения массы тела, биохимические показатели сыворотки крови, макроскопическая структура и коэффициенты массы внутренних органов.

Полученные результаты открывают перспективы проведения дальнейших доклинических исследований крема с НДЦ как эффективного и безопасного фотопротектора.

Ключевые слова: наночастицы диоксида церия, доклинические исследования, острая токсичность, накожное нанесение, внутривнутрижелудочное введение

G. V. Zaychenko, O. A. Pokotylo, N. S. Nikitina

Acute toxicity testing of the cream with cerium dioxide nanoparticles at various routes of administration

The aim of the study was to determine the acute toxicity of the cream with cerium dioxide nanoparticles (CDN).

A single cutaneous application or oral administration of the cream with 0,25 % CDN in the dose of 5 g/kg in female Wistar rats were performed, an evaluation of toxicity was done during 14 or 30 days based on clinical signs of intoxication, mortality, consumption of food and water, body mass dynamics, serum biochemical indices, and macroscopic structure and mass coefficients of internal organs.

The results of the study showed that there were no cases of mortality, as well as changes in overall condition and behavior of animals, consumption of food and water, negative body mass dynamics, and drastic changes in serum biochemical indices and macroscopic structure and mass coefficients of internal organs after a single cutaneous application of the cream with CDN at the dose of 5 g/kg in rats during 30 days. The safety of the cream with CDN at the dose of 5 g/kg after a single oral administration in rats was confirmed by an absence of significant changes in appearance and behavior of animals, body mass dynamics, serum biochemical indices, and results of morphological study.

Thus, the cream with 0,25 % CDN is considered safe at a single oral administration or cutaneous application in white Wistar rats at dose of 5 g/kg, which is proven by the result of an analysis of such parameters as mortality, consumption of food and water, body mass dynamics, serum biochemical indices, and macroscopic structure and mass coefficients of internal organs.

The results obtained open prospects for further preclinical studies of the cream with CDN, which appears to be an effective and safe sunscreen.

Key words: cerium dioxide nanoparticles, preclinical studies, acute toxicity, cutaneous application, oral administration

Надійшла: 30 серпня 2018 р.

Контактна особа: Покотило Оксана Анатоліївна, аспірант, кафедра фармакології, Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ, Тел.: + 38 0 63 975 72 52.
Електронна пошта: oksana.pokotulo@gmail.com