

**ТЕОРЕТИЧНЕ ТА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ
СКЛАДУ КРЕМУ З НАНОЧАСТИНКАМИ ЦЕРІУ ДІОКСИДУ**¹*Зайченко Г.В.* (<https://orcid.org/0000-0002-3506-4800>)²*Ляпунов М.О.* (<https://orcid.org/0000-0002-5036-8255>)³*Єфанов В.С.* (<https://orcid.org/0000-0001-5408-1086>)²*Безугла О.П.* (<https://orcid.org/0000-0002-3629-7059>)²*Ляпунова А.М.* (<https://orcid.org/0000-0002-8208-4812>)¹*Сімонова О.А.* (<https://orcid.org/0000-0002-7239-6193>)¹*Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, Київ, Україна*²*НТК «Інститут монокристалів» НАН України, Харків, Україна*³*ТОВ «НаноМедТех», Київ, Україна**ok.simonova.phd@gmail.com*

Актуальність. Злоякісні новоутворення шкіри є однією з найбільш розповсюджених форм раку, захворюваність на них зростає, як у світі загалом, так і в Україні зокрема. Одним з факторів ризику даної патології є негативний вплив ультрафіолетового випромінювання, чому запобігає застосування фотопротекторів. Доцільною є розробка нового ефективного та безпечного сонцезахисного засобу з наночастинками церію діоксиду, що позбавлений фотокаталітичних властивостей, має виражену фотопротекторну та антиоксидантну дію.

Мета: теоретичне та експериментальне обґрунтування складу крему з наночастинками церію діоксиду шляхом проведення скринінгу фотопротекторної активності на моделі фотодинамічної травми у мурчаків з подальшим вибором крему-лідера.

Матеріали та методи. Фотодинамічну травму у мурчаків моделювали за допомогою ультрафіолетового опромінювача з експозицією 5 мінімальних еритемних доз. За 20 хвилин до опромінювання тваринам наносили крем з 0,1%, 0,25% чи 0,5% наночастинок церію діоксиду або референтний зразок – крем з 3% титану діоксиду. Крем-лідер обирали за такими показниками, як фотопротекторна активність, температура шкірних покривів, кількість лейкоцитів та вміст гістаміну в крові.

Результати. Кремом-лідером був визнаний крем з наночастинками церію діоксиду у концентрації 0,25%, тому що для нього показник фотопротекторної активності становив 43,6% у порівнянні з 23,1% і 35,9% для кремів з концентраціями 0,1% та 0,5%, відповідно; при його нанесенні спостерігали 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 опромінювання, не виявляли підвищення вмісту гістаміну в крові.

Крем з 0,25% наночастинок церію діоксиду перевищив за ефективністю референтний зразок. Через 4 години після опромінювання у групі тварин, яким наносили крем-лідер, відмічали на 57,1% менший ступінь вираженості еритеми, ніж у групі застосування крему з 3% титану діоксиду. Фотопротекторна активність референтного зразка становила лише 23,1%. Через 4 години після опромінювання температура шкірних покривів у групі застосування референтного зразка була на 0,26°C вищою, ніж у групі тварин, яким наносили крем з 0,25% наночастинок церію діоксиду. Крім того, у групі нанесення крему з 3% титану діоксиду відмічали на 8,6% більш виражений, у порівнянні з групою застосування крему-лідера, лейкоцитоз.

Висновок. За сукупністю досліджених показників крем з наночастинками церію діоксиду 0,25% визнаний зразком-лідером та рекомендований для обрання технології і кінцевого складу лікарської форми та подальшого поглибленого фармакологічного вивчення.

Ключові слова: крем з наночастинками церію діоксиду, скринінг, фотопротекторна активність, фотодинамічна травма.

Актуальність. 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 [8]. Фотоканцерогенез обумовлений спричиненими ультрафіолетом (УФ) ушкодженням ДНК, запаленням та імуносупресією, при цьому дані ефекти реалізуються напряму або опосередковано, внаслідок утворення активних форм кисню [11].

Злоякісні новоутворення шкіри є однією з найбільш розповсюджених форм раку, захворюваність на них зростає, як у світі загалом, так і в Україні зокрема. Меланома, базальноклітинний та плоскоклітинний рак шкіри характеризуються високою смертністю, призводять до значних економічних витрат для суспільства [1, 7].

Негативному впливу сонячного опромінювання організм запобігає застосування фотопротекторних лікарських та косметичних засобів, активні фармацевтичні інгредієнти (АФІ) яких поглинають або

відбивають УФ промені. Незважаючи на широке представлення на світовому фармацевтичному ринку та доведену ефективність, багато сонцезахисних кремів мають низку недоліків, пов'язаних з токсичністю. Ефективність таких засобів також часто обмежується здатністю поглинати чи відбивати УФ промені лише певної ділянки спектру. Пошук нових фотопротекторів має бути спрямований на розробку засобів, здатних захищати від випромінювання широкого діапазону, включаючи УФ-А та УФ-В [9, 13].

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 [6].

На першому етапі доклінічного вивчення нового фотопротектору доцільно провести скринінг активності кремів з НЦД з метою визначення оптимальної дози АФІ, яка б забезпечувала належне співвідношення користь/ризик.

Мета: теоретичне та експериментальне обґрунтування складу крему з НЦД шляхом проведення скринінгу фотопротекторної активності на моделі фотодинамічної травми у мурчаків з подальшим вибором крему-лідера.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Застосована у технології виробництва досліджуваних кремів субстанція НЦД є нанокompatитом, у якому наночастинки CeO_2 іміобілізовані на поверхні алюмосилікатних нанотрубок. Синтезована шляхом відновлення церію нітрату амонію гідроксидом у водній суспензії алюмосилікатних нанотрубок (Sigma-Aldrich Corporation, США), з наступною

фільтрацією осаду, промиванням та сушкою – за оригінальною методикою, розробленою співробітниками ТОВ «НаноМедТех».

За даними трансмісійної електронної мікроскопії (ТЕМ) та скануючої електронної мікроскопії (СЕМ) (Hitachi H-800, Hitachi High-Technologies Corporation, Японія та MIRA 3 LMU, TESCAN, Чехія, відповідно), наночастинки CeO_2 мають наближену до округлої форму та рівномірно розподілені у нанокompatиті, іміобілізовані на поверхні алюмосилікатних нанотрубок; вільних частинок церію діоксиду не виявлено.

Розмір наночастинок CeO_2 вимірювали із застосуванням методу електронної дифракції у вибраній області на темнопольних ТЕМ зображеннях з використанням програми лінійних вимірювань з вибіркою більше 30 об'єктів для зразка (рис. 1).

Отримані дані щодо монодисперсності НЦД та середнього розміру 6-15 нм, аналіз проведений згідно з вимогами стандарту ISO 13322-1:2014 (Аналіз розміру частинок – Методи аналізу зображень – Частина 1: Методи аналізу статичних зображень).

Електроннограма частинки церію діоксиду показала кубічну структуру CeO_2 флюоритового типу (рентгенофазний дифрактометр ДРОН-4-07, АТ «Инновационный центр «Буревестник»», Російська Федерація) (рис. 2).

Елементний склад НЦД визначали методом енергодисперсійного спектроскопічного хімічного аналізу (приставка до СЕМ, прилад Oxford X-MAX, Oxford Instruments, Великобританія). Виявлені елементи O, Al і Si відображають склад алюмосилікатних нанотрубок, O і Ce – церію діоксиду, C – підкладки, на яку наносили зразок (рис. 3).

Порівняльний склад тест-зразків кремів з НЦД у концентраціях 0,1%, 0,25% і 0,5%, референтного

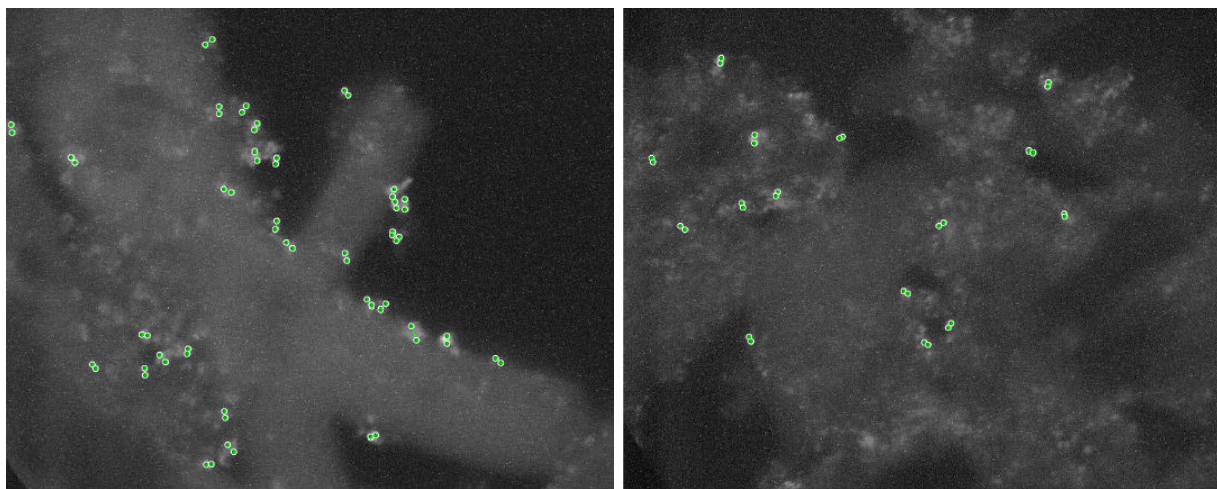


Рис. 1. Електронно-мікроскопічні зображення субстанції наночастинок церію діоксиду (нанокompatит наночастинок церію діоксиду з алюмосилікатними нанотрубками) у процесі визначення розміру частинок CeO_2

зразку – крему з титану діоксидом (ТД) у концентрації 3% та кремової основи, розроблених у НТК «Інститут монокристалів» НАН України для скринінгового дослідження фотопротекторної активності, наведений у таблиці 1. Тест-зразки кремів містили наступні допоміжні речовини: діетиламіногідроксибензоїлгексилбензоат (Uvinul A Plus), етилгексилметоксі-циннамат (Uvinul MC 80), біс-етилгексил-оксіфенолметоксіфенілтріазин (Tinosorb S), метилен біс-бензотріазолілтетраметилбутилфенол (Tinosorb M), феноксіетанол, етилгексилгліцерин, дібутиладипат, С12-15 алкілбензоат, макроголу 20 цетостеариловий ефір, цетостеариловий спирт, циклометикон, динатрію едетат, ксантанова камедь, пропіленгліколь, вода очищена.

Фотопротекторну активність кремів вивчали на моделі фотодинамічної травми у мурчаків – гострого фотодинамічного запалення шкіри (УФ еритеми), яке викликали за допомогою УФ опромінювача типу ОКН-011М (Завет, Україна). Діапазон опромінення становив 220-400 нм. Ефективність кремів з НЦД порівнювали з референтним зразком – кремом з ТД, а також з кремовою основою.

Експеримент проводили на 70 нелінійних мурчаків обох статей, розподілених 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).

Тварин утримували у стандартних умовах віварію Національного медичного університету імені О.О. Богомольця за температури повітря 16-25 °С та відносній вологості 40-70%, з вільним доступом до корму і води. Період карантину та акліматизації тривав 7 діб. Дослідні групи формували методом рандомізації [2].

Експерименти проведені із дотриманням положень Директиви Європейського парламенту та Ради ЄС 2010/63/ЄС від 22.09.2010 р. про захист тварин, які використовуються для наукових цілей, Наказу МОЗ України № 944 від 14.12.2009 р. «Про затвердження Порядку проведення доклінічного вивчення лікарських засобів та експертизи матеріалів доклінічного вивчення лікарських засобів».

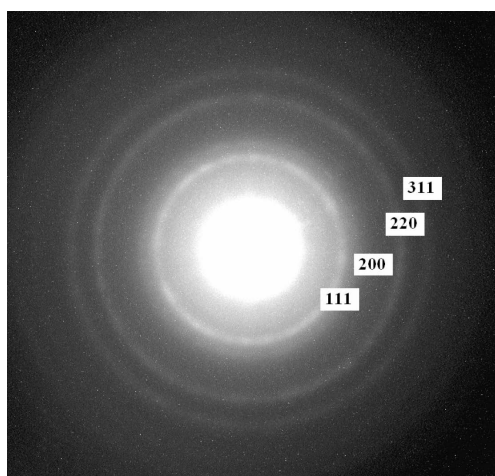


Рис. 2. Електроннограма частинки церію діоксиду з характерними для даної речовини дифракційними піками

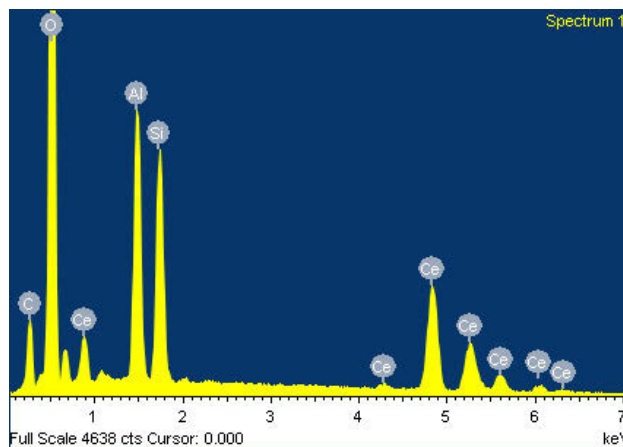


Рис. 3. Енергодисперсійний спектр субстанції наночастинок церію діоксиду за даними приладу Oxford X-MAX
Примітка. На осі абсцис – величина енергії частинок у КеВ; на осі ординат – частка кількості імпульсів за секунду (імпл/с) та енергії (еВ).

Таблиця 1
Склад тест-зразків кремів для скринінгового дослідження фотопротекторної активності (у г на 100 г)

Компоненти	Тест-зразки кремів				
	НЦД			ТД 3%	Кремова основа
	0,1%	0,25%	0,5%		
НЦД	0,1	0,25	0,5	–	–
ТД	–	–	–	3,0	–
Uvinul A Plus	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Uvinul MC 80	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Tinosorb S	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Tinosorb M	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0

Мурчаків виводили з експерименту під хлороформним наркозом через 24 години після опромінення.

Перед початком досліду всім тваринам проводили депіляцію на ділянці спини, яку умовно поділяли за допомогою трафарету на три «вікна», площа кожного з яких становила 3 см².

Джерело УФ випромінювання розміщували на відстані 10 см від поверхні шкіри тварини, тривалість опромінення становила 3 хвилини. Доза УФ опромінення відповідала 5 МЕД (мінімальним еритемним дозам).

Креми наносили в профілактичному режимі на депільовані ділянки шкіри тварин за 20 хвилин до опромінення дозою 2 мг/см². Таким чином, мурчаків з груп 3, 4 і 5 отримували на шкірну дозу НЦД 0,04, 0,1 і 0,2 мг/кг, відповідно.

Оцінку ступеня вираженості еритеми проводили через 1, 2, 4, 8, 16 та 24 години після опромінення і фіксували в балах за колориметричною шкалою С.В. Суворова: 0 – відсутність еритеми, 1 – слабка еритема (рожевий тон), 2 – помірно виражена еритема (рожево-червоний тон), 3 – виражена еритема (червоний тон), 4 – різко виражена еритема (яскраво-червоний тон). За значення показника у кожної тварини приймали середнє арифметичне ступеня вираженості еритеми, виміряного у трьох вікнах.

Фотопротекторну активність (ФПА) кремів розраховували за формулою 1:

$$\text{ФПА} = (E_{\text{ко}} - E_{\text{кр}}) \times 100 / E_{\text{ко}} \quad (1)$$

де $E_{\text{кр}}$ – ступінь вираженості еритеми (в балах) на ділянці шкіри, де було нанесено крем (групи 3–7), через 24 години після опромінення;

$E_{\text{ко}}$ – ступінь вираженості еритеми (в балах) на ділянці шкіри, яка підлягала УФ опроміненню (група 2 – контрольна патологія), через 24 години після опромінення.

Для оцінки ступеня УФ ушкодження тканин та здатності кремів попереджати розвиток запалення протягом 4 годин після опромінення визначали температуру шкірних покривів, що є інтегральним показником активності запального процесу та маркером васкулярних змін дерми при даній патології. Підвищення температури проявляється за рахунок вивільнення прозапальних і вазоактивних медіаторів, таких як гістамін, серотонін, брадикінін, простагландини та інтерлейкіни [10]. Вимірювання температури шкірної складки тварин проводили за допомогою термометра МТ1931 (Microlife, Швейцарія).

Перебіг патологічного процесу також оцінювали за наявністю лейкоцитозу як гематологічного маркера системної запальної реакції на УФ опромінення. Забір крові проводили з вušних капілярів мурчаків безпосередньо перед дослідом та через 24 години від початку експерименту. Кількість лейкоцитів підраховували у камері Горяєва.

Пошкодження тканин шкіри УФ опроміненням супроводжується дегрануляцією тучних клітин та виходом гістаміну – медіатору ранньої фази запалення [4]. Вміст даного маркера запалення у крові з вušних капілярів тварин визначали методом світлової колориметрії через 1 годину після опромінення. Принцип методу заснований на утворенні забарвленого комплексу гістаміну з діазотованим *n*-нітроаніліном.

Статистичну обробку даних проводили за допомогою програм IBM SPSS Statistics v.23 (IBM, США) та Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft, США). Результати окремих вимірювань представлені в абсолютних одиницях у вигляді середніх арифметичних значень (M) зі стандартними помилками середнього (m).

Розмір вибірок визначали згідно з методичними рекомендаціями [2].

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.

У випадку множинних порівнянь використовували однофакторний дисперсійний аналіз ANOVA з post-hoc порівняннями із застосуванням HSD-критерію Тьюкі.

Відмінності показників вважали статистично значущими при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Протягом експерименту динаміку розвитку гострого фотодинамічного запалення шкіри оцінювали за ступенем вираженості еритеми (табл. 2). У групі контрольної патології спостерігали зростання показника протягом всього періоду спостереження (24 години). У даних мурчаків виявляли ділянки особливо сильної еритеми та виразок на шкірі.

Схожу картину спостерігали у групі нанесення плацебо. Лише через 24 години після опромінення відмічали зменшення вираженості еритеми у мурчаків, ФПА крему становила 7,7%.

У всіх групах нанесення кремів з НЦД виявляли менший ступінь вираженості еритеми, ніж у групі контрольної патології. Найкращий результат спостерігали при застосуванні крему НЦД 0,25%, ФПА якого складала 43,6%, у порівнянні з ФПА 23,1% і 35,9% для кремів НЦД 0,1% та НЦД 0,5%, відповідно. У групі мурчаків, яким перед опроміненням наносили крем НЦД 0,25%, на 1 годину експерименту

ступінь вираженості еритеми не відрізнявся від такого у інтактних тварин. Еритема була менш вираженою, ніж у групі застосування крему НЦД 0,1% на 2-24 години досліді та у групі застосування крему НЦД 0,5% – на 2-8 години. Більша ефективність крему НЦД 0,25%, у порівнянні з кремом НЦД 0,5%, можливо, пояснюється тим, що наночастинки у більшій концентрації через втрату стабільності здатні утворювати конгломерати, які виявляють меншу фотопротекторну активність.

У групі тварин, яким перед опроміненням наносили референтний зразок – крем ТД 3%, фотодинамічна травма також була менш вираженою, ніж у групі контрольної патології. Через 1 годину після опромінення ступінь вираженості еритеми не відрізнявся від такого у інтактних тварин. Однак за ефективністю крем ТД 3% поступався крему НЦД 0,25%. На шкірі тварин, яким наносили референтний зразок, відмічали більшу кількість виразок, площа ураження була поширенішою. Вже 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%. ФПА референтного зразка становила 23,1%.

Таким чином, крем НЦД 0,25% виявив найбільшу фотопротекторну активність, порівняно з іншими тест-зразками кремів з НЦД, за ступенем вираженості еритеми – локальної ознаки запалення,

перевищуючи дію референтного зразка. На опроміненних ділянках шкіри мурчаків, яким профілактично наносили крем з НЦД, виявлена менша кількість виразок і глибоких уражень шкірних покривів. Площа та інтенсивність фотодинамічного запального процесу, головною складовою якого є еритема, в групі тварин, яким перед опроміненням наносили крем НЦД 0,25%, були меншими.

Для виявлення здатності тест-зразків кремів попереджати розвиток системного запального процесу після УФ опромінення визначали їх вплив на динаміку зміни температури шкірних покривів мурчаків. У групі інтактного контролю значення показника не виходили за межі фізіологічної норми [5] (табл. 3). У опроміненних мурчаків, починаючи з 1 години експерименту, спостерігали підвищення температури шкіри як порівняно з інтактними тваринами, так і у порівнянні з вихідним значенням. Через 4 години після опромінення показник зростав на 0,35 °С.

У групі тварин, яким наносили плацебо, температура шкірних покривів протягом періоду реєстрації підвищувалася на 0,26 °С, на 4 годину була на 0,16°С нижчою, ніж у тварин групи контрольної патології, що вказує на помірну здатність кремової основи попереджати запалення.

У групах тварин, яким перед опроміненням наносили креми з НЦД, через 1 годину експозиції спостерігали зростання температури шкірних покривів,

Таблиця 2

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
Патологія (УФ)	2,30±0,26*	2,50±0,27*	3,10±0,18*	3,50±0,17*	3,80±0,13*	3,90±0,10*
НЦД 0,1% + УФ	0,30±0,15**##,###	0,80±0,20**##,###	1,80±0,20**##,###	2,30±0,21**##	2,70±0,21**##	3,00±0,26**##
НЦД 0,25% + УФ	0,10±0,10**#	0,30±0,15**##,†,††	0,60±0,16**##,†,††	1,60±0,16**##,†,††	2,10±0,23**##,†,††	2,20±0,20**##,†,††
НЦД 0,5% + УФ	0,30±0,15**##,###	0,70±0,21**##,###	1,50±0,22**##,###	2,10±0,23**##,###	2,20±0,29**##,###	2,50±0,24**##,###
ТД 3% + УФ	0,00±0,00**#	0,30±0,15**##	1,40±0,16**##	2,30±0,21**##	2,89±0,31**##	3,00±0,26**##
Плацебо + УФ	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 перед опроміненням наносили плацебо, ## – p < 0,05 у порівнянні з групою тварин, яким перед опроміненням наносили крем ТД 3%, † – p < 0,05 у порівнянні з групою тварин, яким перед опроміненням наносили крем НЦД 0,1%, †† – p < 0,05 у порівнянні з групою тварин, яким перед опроміненням наносили крем НЦД 0,5%.

Таблиця 3

Динаміка зміни температури шкіри у мурчаків при фотодинамічній травмі та в групах тварин, яким перед опроміненням наносили тест-зразки кремів з наночастинками церію діоксиду

Групи тварин	Температура шкірних покривів, M±m °C			
	Вихідне значення	1 година	2 години	4 години
Інтактний контроль (n = 10)	36,93±0,05	36,90±0,05	36,93±0,05	36,85±0,05
Контрольна патологія (УФ) (n = 10)	36,97±0,03	37,82±0,05**	38,08±0,04**	37,32±0,06**
НЦД 0,1% + УФ (n = 10)	36,90±0,03	37,18±0,07**##,###	36,97±0,06**##,###	36,93±0,05**##,###
НЦД 0,25% + УФ (n = 10)	36,92±0,04	37,08±0,07**##,###,†	36,99±0,08**##,###	36,97±0,06**##,###
НЦД 0,5% + УФ (n = 10)	36,92±0,05	37,37±0,05**##,###	37,05±0,08**##,###	36,90±0,07**##,###
ТД 3% + УФ (n = 10)	36,91±0,04	37,38±0,07**##	37,53±0,06**##	37,23±0,08**
Плацебо + УФ (n = 10)	36,90±0,03	37,50±0,04**##	37,57±0,06**##	37,16±0,04**##

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 перед опроміненням наносили плацебо, ## – p < 0,05 у порівнянні з групою тварин, яким перед опроміненням наносили крем ТД 3%, † – p < 0,05 у порівнянні з групою тварин, яким перед опроміненням наносили крем НЦД 0,5%, • – p < 0,05 у порівнянні з вихідним значенням.

яке становило 0,28°C, 0,16°C і 0,45°C для кремів НЦД 0,1%, НЦД 0,25% та НЦД 0,5%, відповідно. Однак значення показника нормалізувалося на 2 і 4 години експерименту. Найбільш ефективними у попередженні запалення виявилися креми НЦД 0,1% та НЦД 0,25% – на 4 годину експерименту температура шкірних покривів у даних групах була, відповідно, на 0,39°C і 0,35°C нижчою, ніж у групі контрольної патології.

Референтний зразок поступався за ефективністю кремам з НЦД. Через 4 години після опромінення температура шкірних покривів не відрізнялася від такої у тварин групи контрольної патології та була, відповідно, на 0,30°C, 0,26°C і 0,33°C вищою, ніж у групах тварин, яким наносили креми НЦД 0,1%, НЦД 0,25% та НЦД 0,5%. Нормалізації показника протягом періоду визначення не спостерігали, температура шкірних покривів після нанесення крему ТД 3% залишалася підвищеною.

Вплив тест-зразків кремів на вираженість запального процесу також оцінювали за наявністю лейкоцитозу як гематологічного маркера реакції на УФ опромінення (табл. 4). У групах контрольної патології та нанесення плацебо спостерігали найбільш виражений лейкоцитоз – збільшення кількості лейкоцитів, відповідно, на 45,7% і 43,4% у порівнянні з інтактними тваринами.

У групах тварин, яким перед опроміненням наносили креми з НЦД, лейкоцитоз був менш вираженим. Найбільш ефективними виявилися креми НЦД 0,25% та НЦД 0,5% – кількість лейкоцитів у крові мурчаків була, відповідно, на 17,4% і 16,8% меншою, ніж у групі контрольної патології. За зазначеним показником, крем НЦД 0,1% поступився крему НЦД 0,25% на 8,0%.

Референтний препарат за здатністю попереджати запалення менш ефективний, ніж креми НЦД 0,25% та НЦД 0,5% – лейкоцитоз у групі застосування крему ТД 3% був, відповідно, на 8,6% і 7,9% більш виражений.

Гістамін є маркером ранньої фази запалення, що вивільняється з базофілів та опасистих клітин внаслідок їх деструкції, зокрема, під впливом УФ [4]. Щодо вмісту гістаміну в крові мурчаків, даний показник був найвищим у групі контрольної патології та застосування плацебо, тоді як у групі нанесення крему НЦД 0,25% – не відрізнявся від такого у інтактних тварин (табл. 5). Креми НЦД 0,1% та НЦД 0,5% дещо поступалися за ефективністю – у мурчаків спостерігали підвищений вміст гістаміну в крові, але на 38,5% і 35,4% менший, ніж у групі контрольної патології.

Крем ТД 3% за досліджуваним показником виявився не менш ефективним, ніж крем НЦД 0,25%.

Таблиця 4

Кількість лейкоцитів у крові мурчаків в умовах моделі фотодинамічної травми та в групах тварин, яким перед опроміненням наносили тест-зразки кремів з наночастинками церію діоксиду

Групи тварин	Кількість лейкоцитів у крові, $M \pm m \cdot 10^9 / л$	
	Вихідне значення	24 години
Інтактний контроль (n = 10)	11,00±0,49	11,05±0,46
Контрольна патологія (УФ) (n = 10)	11,15±0,43	16,10±0,31* [*]
НЦД 0,1% + УФ (n = 10)	11,45±0,43	14,45±0,22* ^{*,*,#,†}
НЦД 0,25% + УФ (n = 10)	11,25±0,40	13,30±0,40* ^{*,*,#,###,†}
НЦД 0,5% + УФ (n = 10)	10,85±0,37	13,40±0,33* ^{*,*,#,###,†}
ТД 3% + УФ (n = 10)	11,30±0,36	14,55±0,42* ^{*,*,#,†}
Плацебо + УФ (n = 10)	11,70±0,53	15,85±0,47* [*]

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 перед опроміненням наносили плацебо; ### – $p < 0,05$ у порівнянні з групою тварин, яким перед опроміненням наносили крем ТД 3%; † – $p < 0,05$ у порівнянні з групою тварин, яким перед опроміненням наносили крем НЦД 0,1%; • – $p < 0,05$ у порівнянні з вихідним значенням.

Таблиця 5

Вміст гістаміну в крові мурчаків в умовах моделі фотодинамічної травми та в групах тварин, яким перед опроміненням наносили тест-зразки кремів з наночастинками церію діоксиду

Групи тварин	Вміст гістаміну в крові, $M \pm m$ г/л
Інтактний контроль (n = 10)	0,050±0,002
Контрольна патологія (УФ) (n = 10)	0,096±0,003*
НЦД 0,1% + УФ (n = 10)	0,059±0,002* ^{*,*,#}
НЦД 0,25% + УФ (n = 10) (n = 10)	0,055±0,001* ^{*,#}
НЦД 0,5% + УФ (n = 10)	0,062±0,002* ^{*,*,#,###}
ТД 3% + УФ (n = 10)	0,053±0,001* ^{*,#}
Плацебо + УФ (n = 10)	0,093±0,003*

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 перед опроміненням наносили плацебо; ### – $p < 0,05$ у порівнянні з групою тварин, яким перед опроміненням наносили крем ТД 3%.

Статистично значущих відмінностей між групами тварин, яким перед опроміненням наносили дані тест-зразки, не відмічали.

Отримані результати щодо фотопротекторної та протизапальної активності НЦД узгоджуються з результатами експериментів *in vitro*, систематизованих іншими дослідниками [3, 6, 12].

Крем з НЦД проявив фотопротекторну активність у широкому діапазоні УФ випромінювання – у спектрі УФ-А (315-400 нм) та УФ-В (280-315 нм), що вказує на перевагу даного АФІ у порівнянні з багатьма органічними фільтрами [9].

Результати скринінгу дозволили визначити оптимальну концентрацію НЦД у кремні (0,25%) та обумовили доцільність подальших досліджень фармакологічної активності та безпеки даної топікальної лікарської форми як фотопротектору, призначеного для попередження ураження шкіри УФ випромінюванням.

ВИСНОВКИ

Профілактичне нанесення кремів з НЦД перед УФ опроміненням шкіри зменшувало прояви фотодинамічної травми у мурчаків. За фотопротекторною активністю крем НЦД 0,25% виявився найбільш ефективним (ФПА – 43,6% у порівнянні з ФПА 23,1% і 35,9% для кремів НЦД 0,1% та НЦД 0,5%, відповідно). У тварин з групи нанесення даного зразка спостерігали меншу вираженість еритеми – меншу кількість виразок і глибоких виразкових уражень шкірних покривів.

Застосування кремів з НЦД здатне попередити розвиток системного запального процесу у мурчаків. Нашкірне нанесення крему НЦД 0,25% сприяло найменшому (на 0,16°C), у порівнянні з іншими тест-зразками, підвищенню температури шкірних покривів через 1 годину після опромінення. Через 4 години експозиції температура нормалізувалася у всіх групах нанесення кремів з НЦД.

У групах тварин, яким перед опроміненням наносили креми НЦД 0,25% та НЦД 0,5%, спостерігали найменш виражений лейкоцитоз – кількість лейкоцитів у крові мурчаків була, відповідно, на 17,4% і 16,8% меншою, ніж у групі контрольної патології. За вмістом гістаміну в крові найкращий результат продемонстрував крем НЦД 0,25% – у мурчаків даної групи зазначений показник не відрізнявся від такого у інтактних тварин, тоді як у інших групах застосування кремів з НЦД спостерігали підвищені значення даного показника.

Крем НЦД 0,25% перевищив за ефективністю референтний зразок. Вже 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 мен-

шими. ФПА референтного зразка становила 23,1%. Через 4 години після опромінення температура шкірних покривів у групі застосування референтного зразка була на 0,26 °C вищою, ніж у групі тварин, яким наносили крем НЦД 0,25%. Крім того, у групі нанесення крему ТД 3% відмічали на 8,6% більш виражений, у порівнянні з групою застосування крему НЦД 0,25%, лейкоцитоз.

За сукупністю досліджених показників крем НЦД 0,25% визнаний зразком-лідером та рекомендований для обрання технології і кінцевого складу лікарської форми та подальшого поглибленого фармакологічного вивчення.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють, що не мають конфлікт інтересів, який може сприйматися таким, що може завдати шкоди неупередженості статті.

Джерело фінансування. Ця стаття не отримала фінансової підтримки від державної, громадської або комерційної організації.

REFERENCES

1. Bulletin of the National Cancer Registry No. 19 – Cancer in Ukraine, 2016-2017 / Ed. OO Kolesnik / Kyiv: National Cancer Institute, 2018. 136 p. [Ukrainian] http://www.ncru.inf.ua/publications/BULL_19/index.htm
2. Preclinical drug research: guidelines / ed. OV Stefanov. Kiev: Avicenna, 2001. 528 p. [Ukrainian] <https://www.twirpx.com/file/537410/>
3. Nanocrystalline cerium dioxide: properties, production, application / V.K. Ivanov et al. Tomsk: Tomsk University Publishing House, 2013. 284 p. [Russian] https://www.researchgate.net/profile/Alexander_Shcherbakov6/publication/273205483_NANOCRYSTALLINE_CERIUM_DIOXIDE_properties_synthesis_applications/links/54fbf9590cf20700c5e85dee/NANOCRYSTALLINE-CERIUM-DIOXIDE-properties-synthesis-applications.pdf
4. Pathological physiology: textbook. / NN Zaiko et al. Moscow: MEDPress-Inforn, 2007. 640 p. [Russian]
5. Directory. Physiological, biochemical and biometric parameters of experimental animals / Ed. V.G. Makarov, M.N. Makarova. St. Petersburg: Lemma, 2013. 116 p. [Russian] <http://doclinika.ru/wp-content/uploads/2016/02/SPRAVOCHNIK.-Fiziologicheskie-biohimicheskie-i-biometricheskie-pokazateli-normy-e-ksperimental-ny-h-zhivotny-h.pdf>
6. Caputo F, De Nicola M, Sienkiewicz A, Giovanetti A, Bejarano I, Licoccia S, Traversa E, Ghibelli L. Cerium oxide nanoparticles, combining antioxidant and UV shielding properties, prevent UV-induced cell damage and mutagenesis // *Nanoscale*. 2015; 7 (38): P. 15643-56. doi: 10.1039/c5nr03767k.
7. Guy G.P., Ekwueme D.U. Years of potential life lost and indirect costs of melanoma and non-melanoma skin cancer: a systematic review of the literature //

- Pharmacoeconomics. 2011; 29 (10): 863-74. doi: 10.2165/11589300-000000000-00000.
8. Wu S, Cho E, Li WQ, Weinstock MA, Han J, Qureshi AA. History of severe sunburn and risk of skin cancer among women and men in 2 prospective cohort studies // *Am. J. Epidemiol.* 2016. 183 (9): 824-33. doi: 10.1093/aje/kwv282.
 9. Ruszkiewicz JA, Pinkas A, Ferrer B, Peres TV, Tsatsakis A, Aschner M. Neurotoxic effect of active ingredients in sunscreen products, a contemporary review / J. A. Ruszkiewicz et al. // *Toxicol. Rep.* 2017; 4: 245-59. doi: 10.1016/j.toxrep.2017.05.006. eCollection 2017.
 10. Pasparakis M., Haase I., Nestle F.O. Mechanisms regulating skin immunity and inflammation // *Nat. Rev. Immunol.* 2014; 14 (5): 289-301. doi: 10.1038/nri3646.
 11. Martens MC, Seebode C, Lehmann J, Emmert S. Photocarcinogenesis and skin cancer prevention strategies: an update // *Anticancer Res.* 2018; 38 (2): 1153-8. <https://doi.org/10.21873/anticancer.12334>
 12. Li Y, Li P, Yu H, Bian Y. Recent advances (2010-2015) in studies of cerium oxide nanoparticles' health effects // *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2016; 44: 25-9. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.04.004>
 13. Stiefel C., Schwack W. Photoprotection in changing times – UV filter efficacy and safety, sensitization processes and regulatory aspects // *Int. J. Cosmet. Sci.* 2015; 37 (1): 2-30. <https://doi.org/10.1111/ics.12165>
- Отримано: 10.05.2019

ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ СОСТАВА КРЕМА С НАНОЧАСТИЦАМИ ДИОКСИДА ЦЕРИЯ

*Зайченко А.В.¹, Ляпунов Н.А.², Ефанов В.С.³, Безуглая Е.П.²,
Ляпунова А. Н.², Симонова О. А.¹*

¹Национальный медицинский университет имени А. А. Богомольца, Киев, Украина

²НТК «Институт монокристаллов» НАН Украины, Харьков, Украина

³ООО «НаноМедТех», Киев, Украина
ok.simonova.phd@gmail.com

Актуальность. Злокачественные новообразования кожи являются одной из наиболее распространенных форм рака, заболеваемость ими растет, как в мире в целом, так и в Украине в частности. Одним из факторов риска данной патологии является негативное влияние ультрафиолетового излучения, что предотвращается применением фотопротекторов. Целесообразной является разработка нового эффективного и безопасного солнцезащитного средства с наночастицами диоксида церия, которое лишено фотокаталитических свойств, обладает выраженным фотопротекторным и антиоксидантным действием.

Цель: теоретическое и экспериментальное обоснование состава крема с наночастицами диоксида церия путем проведения скрининга фотопротекторной активности на модели фотодинамической травмы на морских свинках с последующим выбором крема-лидера.

Материалы и методы. Фотодинамическую травму у морских свинок моделировали с помощью ультрафиолетового облучателя с экспозицией 5 минимальных эритемных доз. За 20 минут до облучения животным наносили крем с 0,1%, 0,25% или 0,5% наночастиц диоксида церия или референтный образец – крем с 3% диоксида титана. Крем-лидер выбирали по таким показателям, как фотопротекторная активность, температура кожных покровов, количество лейкоцитов и содержание гистамина в крови.

Результаты. Кремом-лидером был признан крем с наночастицами диоксида церия в концентрации 0,25%, так как для него показатель фотопротекторной активности составил 43,6% по сравнению с 23,1% и 35,9% для кремов с концентрациями 0,1% и 0,5%, соответственно; при его нанесении наблюдали меньшее количество язв и глубоких поражений кожных покровов, на 17,4% менее выраженный лейкоцитоз, чем в группе контрольной патологии, меньшее (на 0,16 °С), по сравнению с другими тест-образцами, повышение температуры кожных покровов через 1 час после облучения, не выявляли повышение содержания гистамина в крови.

Крем с 0,25% наночастиц диоксида церия превысил по эффективности референтный образец. Через 4 часа после облучения в группе животных, которым наносили крем-лидер, отмечали на 57,1% меньшую степень выраженности эритемы, чем в группе применения крема с 3% диоксида титана. Фотопротекторная активность референтного образца составляла лишь 23,1%. Через 4 часа после облучения температура кожных покровов в группе применения референтного образца была на 0,26 °С выше, чем в группе животных, которым наносили крем с 0,25% наночастиц диоксида церия. Кроме того, в группе нанесения крема с 3% диоксида титана отмечали на 8,6% более выраженный, по сравнению с группой применения крема-лидера, лейкоцитоз.

Выводы. По совокупности исследованных показателей крем с наночастицами диоксида церия 0,25% признан образцом-лидером и рекомендован для избрания технологии и конечного состава лекарственной формы и дальнейшего углубленного фармакологического изучения.

Ключевые слова: крем с наночастицами диоксида церия, скрининг, фотопротекторная активность, фотодинамическая травма.

**THEORETIC AND EXPERIMENTAL SUBSTANTIATION OF A COMPOSITION
OF A CREAM WITH CERIUM DIOXIDE NANOPARTICLES**

**Zaychenko G. V.¹, Liapunov M. O.², Iefanov V. S.³, Bezuhla O. P.²,
Liapunova A. M.², Simonova O. A.¹**

¹*Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine*

²*Institute of Single Crystals of NAS of Ukraine, Kharkiv, Ukraine*

³*LLC 'NanoMedTech', Kyiv, Ukraine*

ok.simonova.phd@gmail.com

Relevance. Cutaneous malignancies are one of the most widespread form of cancer with increasing prevalence and Ukraine and worldwide. A negative impact of ultraviolet radiation is one of the risk factors of this pathology, and it can be prevented by photoprotectors. It is expedient to develop a new effective and safe sunscreen with cerium dioxide nanoparticles, which is deprived of photocatalytic properties and has prominent photoprotective and antioxidant action.

Objective: theoretic and experimental substantiation of a composition of a cream with cerium dioxide nanoparticles by the means of a screening of photoprotective action on a model of a photodynamic injury in guinea pigs with further identification of a leader cream.

Material and methods. A photodynamic injury in guinea pigs was modeled with ultraviolet emitter with an exposition of 5 minimal erythema doses. Twenty minutes prior to exposure a cream with 0.1%, 0.25% or 0.5% cerium dioxide nanoparticles or a comparator cream with 3% titanium dioxide was applied topically. A leader cream was then chosen based on the following criteria: photoprotective action, skin temperature, blood leukocyte count, and serum histamine level.

Results. The cream with 0.25% cerium dioxide nanoparticles was identified as a leader cream, because its photoprotective action was 43.6%, compared to 23.1% and 35.9% for 0.1% and 0.5% creams, respectively. After an application of the cream with 0.25% cerium dioxide nanoparticles there were less ulcers and deep skin lesions and 17.4% less leukocytosis than in pathology control group; the lowest increase (0.16 °C) in skin temperature was observed in comparison with other test creams; no increase in serum histamine level was detected.

The cream with 0.25% cerium dioxide nanoparticles was more effective than a comparator. Four hours post-exposure there was 57.1% less pronounced erythema in the leader cream group than in the cream with 3% titanium dioxide group. photoprotective action of a comparator was only 23.1%. Skin temperature in a comparator group 4 hours post-exposure was 0.26 °C higher than in the cream with 0.25% cerium dioxide nanoparticles group. Moreover, 8.6% more pronounced leukocytosis was observed in the cream with 3% titanium dioxide group, compared to the leader cream group.

Conclusions. The cream with cerium dioxide nanoparticles 0.25% was recognized as the leading sample and recommended for choosing technology and final composition of the finished dosage form, for further in-depth pharmacological study by totality of studied parameters.

Key words: cream with cerium dioxide nanoparticles, screening, photoprotective action, photodynamic injury.