

Н. Є. Чемодурова¹ <https://orcid.org/0000-0002-3501-9567>

В. А. Туркіна¹ <https://orcid.org/0000-0002-0660-8485>

А. М. Філіпська¹ <https://orcid.org/0000-0002-5759-1521>

Н. І. Гудзь^{1,2} <https://orcid.org/0000-0002-2240-0852>

ДОСЛІДЖЕННЯ БЕЗПЕКИ ЛОСЬЙОНІВ З МІНОКСИДИЛОМ ТА РОЗЧИНІВ ДЛЯ ГЕМОДІАЛІЗУ: АЛЬТЕРНАТИВНІ МЕТОДИ ТЕСТУВАННЯ НА ТОКСИЧНІСТЬ (МЕТОД HET-CAM)

¹ ДНТ «Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького», Львів, Україна

² Опольський університет, Ополь, Польща

УДК 616.15-073.27:616.61:615.014.24

Н. Є. Чемодурова¹, В. А. Туркіна¹, А. М. Філіпська¹, Н. І. Гудзь^{1,2}

ДОСЛІДЖЕННЯ БЕЗПЕКИ ЛОСЬЙОНІВ З МІНОКСИДИЛОМ ТА РОЗЧИНІВ ДЛЯ ГЕМОДІАЛІЗУ: АЛЬТЕРНАТИВНІ
МЕТОДИ ТЕСТУВАННЯ НА ТОКСИЧНІСТЬ (МЕТОД HET-CAM)

¹ ДНТ «Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького», Львів, Україна

² Опольський університет, Ополь, Польща

Метою дослідження була оцінка подразнювальної дії лосьйонів, що містять 5% і 10% міноксидилу та концентратів для гемодіалізу з оцтовою і лимонною кислотами. Як тест-об'єкт використано судини хоріоалантоїсної оболонки курячих ембріонів з використанням цифрової мікрокамери. Випробування показало, що лосьйони зі вмістом 5% та 10% міноксидилу проявили виражену подразнювальну дію, концентрат для гемодіалізу з оцтовою кислотою проявив помірну подразнювальну дію, з лимонною кислотою – слабку подразнювальну дію.

Для широкого впровадження альтернативного тесту HET-CAM в Україні необхідна його імплементація на державному рівні на підставі масиву даних, отриманих для різних за складом та фізико-хімічними характеристиками засобів.

Ключові слова: подразнювальна дія, тест HET-CAM, міноксидил, концентрати для гемодіалізу.

UDC 616.15-073.27:616.61:615.014.24

N. Ye. Chemodurova¹, V. A. Turkina¹, A. M. Filipaska¹, N. I. Hudz^{1,2}

SAFETY ASSESSMENT OF MINOXIDIL LOTIONS AND HEMODIALYSIS SOLUTIONS: ALTERNATIVE
TOXICITY TESTING METHODS (HET-CAM METHOD)

¹ State Nonprofit Company "Danylo Halytsky Lviv National Medical University", Lviv, Ukraine

² University of Opole, Opole, Poland

Introduction. The HET-CAM test was developed for the assessment of the irritation potential of cosmetic, chemical and pharmaceutical products. A good correlation between the results of the HET-CAM test and the in vivo test was found in numerous experiments.

The aim of this work was to evaluate the irritant effect of 5% and 10% minoxidil lotions and acetic and citric acid hemodialysis concentrates on chicken embryo chorioallantoic membrane using a digital microcamera to objectify the research results.

Materials and research methods. Incubated eggs were used. Vessel lysis, hemorrhage, and coagulation were monitored at the chorioallantoic membrane. According to the degree and time of vascular damage the irritation caused by the substance under study was evaluated. The resulting irritation index is used as a criterion for the classification of the irritant activity of the tested substance. Data were described using the median (Me) and interquartile range.

Results and their discussion. After exposure to a lotion containing 5% minoxidil, vessel lysis began at 120 seconds, spot hemorrhages – at 30 seconds in all observations; coagulation – at 120 seconds in one observation. Exposure to a lotion containing 10% minoxidil caused vascular bleeding at 30 seconds in one observation, at 120 seconds in two observations, coagulation at 30 seconds and the lysis – at 120 seconds in all observations. Hemodialysis concentrates with acetic acid had a moderate irritating effect, and citric acid had a mild irritating effect.

Conclusions. The implementation of modern digital technologies of test visualization in the HET-CAM test allows for highly detailed photo-fixation and accurate interpretation of the results. It proves its effectiveness, expediency and informative value, which contributes to the improvement of alternative research methods.

Keywords: irritant effect, HET-CAM test, minoxidil, hemodialysis concentrates.

Вступ

Упровадження у всі сфери життєдіяльності людства інноваційних технологій обумовлює створення нової

парадигми вивчення безпеки хімічних речовин. Це передбачає організацію системи тестування хімічних речовин із залученням моделей як *in vitro*, так і *in silico*, що вирішує етичні проблеми, пов'язані з використанням класичних тестів на лабораторних тваринах. Розробка й застосування альтернативних методів у медико-біологічних дослідженнях сприяє якісно новому рівню розвитку у сфері доклінічних випробувань, зокрема і в Україні.

© Н. Є. Чемодурова, В. А. Туркіна, А. М. Філіпська та ін., 2026

Стаття поширюється на умовах ліцензії



Тест HET-CAM (Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane) – альтернативний метод оцінки подразнювального потенціалу косметичної, хімічної, фармацевтичної продукції (речовин і рецептур) [1; 2; 3], який донедавна не застосовувався в Україні. Водночас у численних експериментах було виявлено хорошу кореляцію між результатами тесту HET-CAM і класичним тестом Draize на очах кролів [4; 5]. Хоріоалантоїсна оболонка курячого ембріона (ХАО) – це складна високосудинна ембріональна мембрана, подібна до васкуляризованих тканин слизової оболонки людини, упродовж випробування хімічної речовини перебувають з нею у прямому контакті і зміни пошкодження судин є ознаками подразнювального потенціалу [6; 7].

Введення на ринок фармацевтичних та косметичних засобів передбачає оцінку їх подразнювальної активності на слизові оболонки для уникнення небажаних ризиків виникнення побічних ефектів.

Для корекції різних форм алопецій на косметичному ринку України реалізуються засоби у вигляді лосьйонів зі вмістом від 2 до 15% міноксидилу, який є фармацевтичним інгредієнтом – периферичним вазодилататором, забороненим для використання в косметичній продукції [8]. Проявами поширених побічних ефектів є: підвищена чутливість, гіперемія, сухість, подразнення шкіри, свербіж, лущення, контактний дерматит, висип у місці нанесення, подразнення та свербіж очей, алергічні шкірні реакції [9].

Головною функцією діалізного розчину є корекція основних показників хімічного складу крові хворого з уремією до нормальних фізіологічних величин. На кафедрі технології ліків та біофармації Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького були розроблені концентрати для гемодіалізу з аліфатичними карбоновими кислотами (оцтовою і лимонною), які загальновідомі своєю подразнювальною активністю [10].

Метою роботи була оцінка подразнювальної дії лосьйонів, що містять 5% і 10% міноксидилу та концентратів для гемодіалізу з оцтовою і лимонною кислотами на судинах хоріоалантоїсної оболонки курячих ембріонів.

Матеріали та методи дослідження

Тестування проводили відповідно до протоколів ICCVAM [11] та методичних вказівок «Оцінка подразнювальної дії хімічних речовин на хоріоалантоїсній оболонці курячого ембріона (test HET-CAM)» [12].

Тест на ХАО розглядається як етично прийнятний, оскільки на 9–10-й день ембріогенезу, коли проводиться тестування, нервова тканина курячого ембріона ще не

сформована і робота з ним не суперечить правовим та біоетичним нормам [13]. Роботу виконано відповідно до плану проблемної комісії «Фармація» Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького й затверджено на засіданні Вченої ради фармацевтичного факультету Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (протокол № 10 від 24 червня 2014 року). Це дослідження є фрагментом комплексної науково-дослідної роботи (номер державної реєстрації 0116U004500).

Для дослідження кожної випробувальної речовини та негативного і позитивного контролів проводили по три спостереження. Лосьйони зі вмістом 5% та 10% міноксидилу оцінювали в нативному стані. Концентрати для гемодіалізу придатні до застосування лише в розведенні й після нейтралізації, тому для випробувань їх попередньо розводили водою для ін'єкцій та додавали 8,4%-й розчин натрію гідрокарбонату у співвідношенні 1 : 32,775 : 1,225. Для отримання мінімальних і максимальних рівнів подразнення проводили випробування стерильного 0,9%-го розчину хлориду натрію як негативного контролю та 1%-го розчину додецилсульфату натрію як позитивного контролю.

За реакціями на ХАО спостерігали упродовж 300 секунд. Для точної і об'єктивної інтерпретації результатів дослідження судин хоріоалантоїсної оболонки курячого ембріона, що піддавалася впливу випробувальної речовини, у динаміці використовувалася цифрова мікрокамера, яка дає можливість здійснювати фотофіксацію з високим ступенем деталізації. Цифрова мікрокамера з кратністю оптики до 200х обладнана мегапіксельною камерою з роздільною здатністю 1,3 МП і комплектується програмою DinoCapture 2.0 – Windows.

Відслідковувалися такі реакції та зміни на ХАО: лізис судин, геморагії, коагуляція. Подразнення, викликане досліджуваною речовиною, оцінювали відповідно до ступеня судинних пошкоджень і часу, необхідного для виникнення змін у балах (табл. 1).

Отриманий індекс подразнення є критерієм для класифікації подразнювальної активності випробовуваної речовини (табл. 2).

Експериментальні дані описані за допомогою медіани (Me) і міжквартильного розмаху.

Результати дослідження та їх обговорення

Тестування 0,9%-го розчину хлориду натрію як негативного контролю показало лізис судин в одному спостереженні на 300-й секунді експерименту. Тестування 1%-го розчину додецилсульфату натрію як позитивного контролю показало лізис судин на 30-й секунді в усіх спостереженнях експерименту; точкові крово-

Таблиця 1

Критерії оцінки результатів випробування

Ефект	Бал		
	30 секунд	120 секунд	300 секунд
Лізис	5	3	1
Геморагії	7	5	3
Коагуляція	9	7	5

Таблиця 2

Класифікація подразнювальної дії хімічної речовини за значенням індексу подразнення

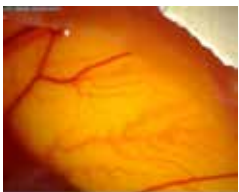
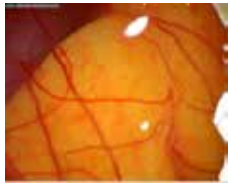
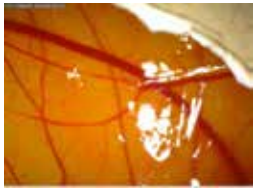
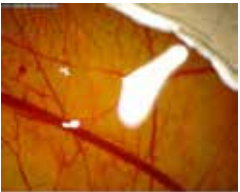
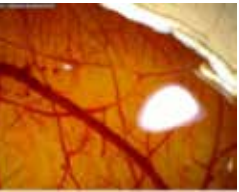
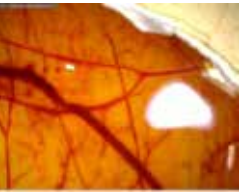
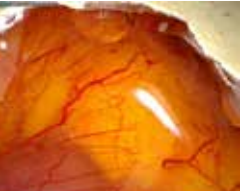
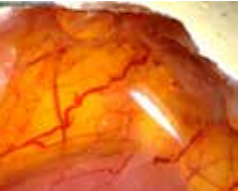
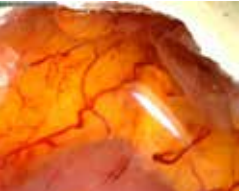
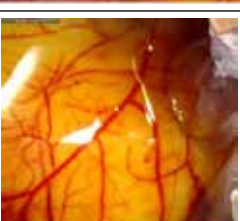
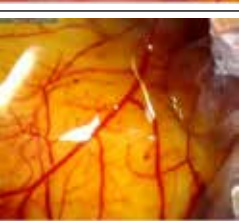
Індекс подразнення (у балах)	Категорія розвитку подразнювальної дії
0–0,9	Не викликає подразнювальної дії
1–4,9	Слабка подразнювальна дія
5–8,9	Помірна подразнювальна дія
9–21	Виразна подразнювальна дія

виливи й утворення геморагій у двох спостереженнях на 30-й секунд і та в одному на 120-й секунд експерименту (табл. 3).

За результатами досліджень судин ХАО після впливу лосьйону, що містить 5% міноксидилу, в усіх спостереженнях на 30-й секунд почалися точкові кро-

Таблиця 3

Фотофіксація реакцій та змін на ХАО негативного і позитивного контролю

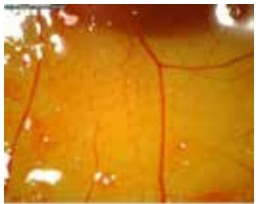
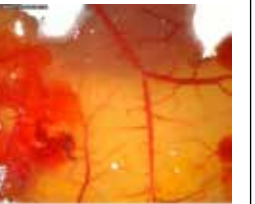
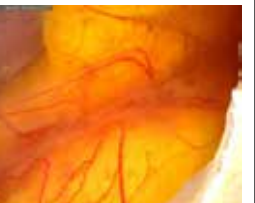
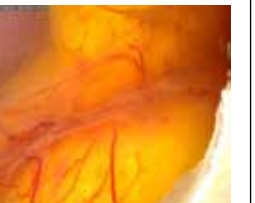
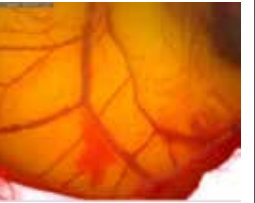
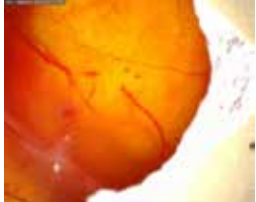
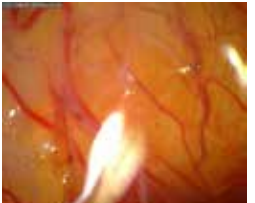
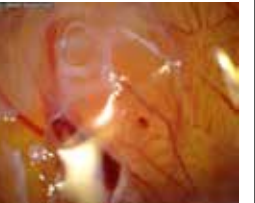
№ з/п тесту	Час експозиції			
	0 секунд	30 секунд	120 секунд	300 секунд
0,9%-й розчин хлориду натрію – негативний контроль				
ХАО № 1				
ХАО № 2				
ХАО № 3				
1%-й розчин додецилсульфату натрію – позитивний контроль				
ХАО № 1				
ХАО № 2				
ХАО № 3				

вовиливи судин із подальшим утворенням геморагій та на 120-й секунді експозиції почався лізис судин. В одному спостереженні лосьйон викликав коагуляцію на 120-й секунді експерименту. Вплив на судини ХАО лосьйону, що містить 10% міноксидилу, в усіх спостереженнях на 30-й секунді експозиції проявився початком коагуляції і лізисом судин. В одному спостереженні на 30-й секунді лосьйон викликав точкові крововиливи, та у двох спостереженнях відбувся крововилив судин на 120-й секунді експерименту (табл. 4).

Аналіз судин ХАО після впливу розведеного концентрату для гемодіалізу з оцтовою кислотою показав зростання кровонаповнення судин та точкові крововиливи в одному спостереженні на 30-й секунді, в другому – на 120-й секунді і в третьому – на 300-й секунді експерименту. Під час спостереження судин ХАО після впливу розведеного концентрату для гемодіалізу з лимонною кислотою точкові крововиливи зафіксовані на 120-й секунді в одному спостереженні та у двох на 300-й секунді; в одному спостереженні

Таблиця 4

Фотофіксація реакцій та змін на ХАО лосьйонів зі вмістом 5% та 10% міноксидилу

№ з/п тесту	Час експозиції			
	0 секунд	30 секунд	120 секунд	300 секунд
Лосьйон зі вмістом 5% міноксидилу				
ХАО № 1				
ХАО № 2				
ХАО № 3				
Лосьйон зі вмістом 10% міноксидилу				
ХАО № 1				
ХАО № 2				
ХАО № 3				

почався лізис судин на 300-й секундї експерименту (табл. 5).

Результати фіксації негативних змін на ХАО за конкретний часовий проміжок оцінювали згідно з таблицями 1–2.

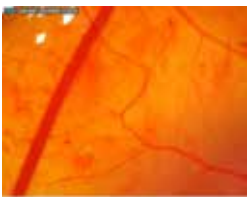
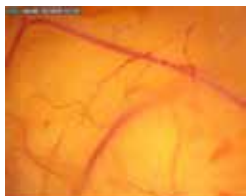
Нанесення 0,9%-го розчину хлориду натрію як негативного контролю викликало мінімальні зміни на судинах ХАО, індекс подразнення становив 0 ($0 \div 0,5$) балів; 1%-й розчин додецилсульфату натрію (позитивний контроль) показав виражений подразнювальний потенціал інтенсивністю 12 ($11 \div 12$) балів. Дослідження

лосьйонів зі вмістом міноксидилу показало залежність інтенсивності проявів подразнення від концентрації: вміст міноксидилу 5% викликав подразнення інтенсивністю 10 ($10 \div 13,5$) балів; вплив вмісту міноксидилу 10% викликав лізис, геморагії та коагуляцію, індекс становив 17 ($17 \div 18$) балів, що відповідає за класифікацією вираженій подразнювальній дії. Отримані результати свідчать про ризики та недоцільність використання міноксидилу в косметичних засобах.

Випробування розведених розчинів для гемодіалізу з оцтовою і лимонною кислотами продемонстру-

Таблиця 5

Фотофіксація реакцій та змін на ХАО концентратів для гемодіалізу з оцтовою та лимонною кислотами

№ з/п тесту	Час експозиції			
	0 секунд	30 секунд	120 секунд	300 секунд
Розведений концентрат для гемодіалізу з оцтовою кислотою				
ХАО № 1				
ХАО № 2				
ХАО № 3				
Розведений концентрат для гемодіалізу з лимонною кислотою				
ХАО № 1				
ХАО № 2				
ХАО № 3				

вало помірну та слабку подразнювальну дію, індекси подразнення становили 5 (4÷6) балів та 3 (3÷4,5) бали відповідно, що свідчить про безпечність розроблених рецептур.

Потрібно зазначити, що одним із важливих переваг методу HET-CAM є те, що тест Draize – метод, який ніколи не був офіційно валідований на противагу згаданому альтернативному тесту. В дослідженні P'eter Budai із співавт. [14] підтверджено відносно високу точність (76%), чутливість (92%), специфічність (84%) тесту HET-CAM порівняно з тестом Draize. Окрім того, порівняння результатів, отриманих у тестах *in vivo* і *in vitro* часто показує, що тваринні системи працюють гірше, ніж їх альтернативні аналоги, причинами цього є властива лабораторним тваринам складність та індивідуальна чутливість. Усе вищезазначене є гарантією надійності отриманих нами результатів.

На сучасному етапі тест HET-CAM вважається дійсним валідованим альтернативним методом і застосовується для випробування різних типів речовин, у тому числі нерозчинних або твердих [11]. Отже, з позиції економичності та методичних аспектів він є ефективним, високочутливим із значною прогностичною цінністю.

На жаль, в Україні практично немає законодавчо закріплених методик, які стосуються альтернативних

методів випробування косметичної і фармацевтичної продукції. Існує нагальна потреба в уніфікації з процедурами в Європейському Союзі, що дасть змогу забезпечити підвищення якості та безпеки фармацевтичної та косметичної продукції.

Висновки

1. Встановлено, що лосьйони зі вмістом 5% та 10% міноксиду проявили виражену подразнювальну дію, концентрат для гемодіалізу з оцтовою кислотою проявив помірну подразнювальну дію, концентрат для гемодіалізу з лимонною кислотою проявив слабку подразнювальну дію.

2. Упровадження сучасних цифрових технологій візуалізації в тесті на судинах хоріоалантоїсної оболонки курячого ембріона дає можливість провести фотофіксацію з високим ступенем деталізації та точну інтерпретацію результатів, що сприяє удосконаленню альтернативних методів.

3. Проведені випробування показали перспективність цього методу для застосування в доклінічних дослідженнях фармацевтичних та косметичних засобів в Україні як одного з елементів гармонізації регуляторних документів України з європейським законодавством.

REFERENCES

1. Anand Babu K, Ram Narayanan R. Determination of ocular irritancy potential of ophthalmic products using HET-CAM method. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 2021;14(6):3063–3066. <https://doi.org/10.52711/0974-360X.2021.00535>.
2. Smail SS. Ex vivo irritation evaluation of a novel brimonidine nanoemulsion using the Hen's egg test on chorioallantoic membrane (HET-CAM). *Cureus*. 2024;16(8):e68280. <https://doi.org/10.7759/cureus.68280>.
3. Nicolás R, Lenze MM, Izaguirre M, Perez Damonte S, Aguilar A, Wikinski S, et al. Comparison between HET-CAM protocols and a product use clinical study for eye irritation evaluation of personal care products including cosmetics according to their surfactant composition. *Food and Chemical Toxicology*. 2021;153:112229. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112229>.
4. Schrage A, Gamer AO, van Ravenzwaay B, Landsiedel R. Experience with the HET-CAM method in the routine testing of a broad variety of chemicals and formulations. *Alternatives to Laboratory Animals*. 2010;38(1):39–52. <https://doi.org/10.1177/026119291003800109>.
5. Batista-Duarte A, Jorge Murillo G, Pérez UM, Tur EN, Portuondo DF, Martínez BT, et al. The Hen's egg test on chorioallantoic membrane. *International Journal of Toxicology*. 2016;35(6):627–633. <https://doi.org/10.1177/1091581816672187>.
6. Szuhaneck CA, Watz CG, Avram Ş, Moacă EA, Mihali CV, Popa A, et al. Comparative toxicological in vitro and in ovo screening of different orthodontic implants currently used in dentistry. *Materials*. 2020;13(24):5690. <https://doi.org/10.3390/ma13245690>.
7. Kennedy DC, Coen B, Wheatley AM, McCullagh KJ. Microvascular experimentation in the chick chorioallantoic membrane as a model for screening angiogenic agents including from gene-modified cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;23(1):452. <https://doi.org/10.3390/ijms23010452>.
8. Kabinet Ministriv Ukrainy. Postanova №65-2021-p. Ofitsiyni visnyk Ukrainy. 2021. Available from: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/65-2021-%D0%BF#Text> (In Ukrainian).
9. BinJadeed H, Almudimeegh AM, Alomran SA, Alshathry AH. A case of contact allergic dermatitis to topical minoxidil. *Cureus*. 2021;13(1):e12510. <https://doi.org/10.7759/cureus.12510>.
10. Hudz N, Kobylinska L, Dmytrukha N, Korytniuk R, Wiczorek PP. Biological and analytical studies of peritoneal dialysis solutions. *The Ukrainian Biochemical Journal*. 2018;90(2):34–44. <https://doi.org/10.15407/ubj90.02.034>.
11. National Toxicology Program. ICCVAM-recommended test method protocols [Internet]. Research Triangle Park (NC): National Institute of Environmental Health Sciences; 2023. Available from: <https://ntp.niehs.nih.gov/whatwestudy/niceatm/resources-for-test-method-developers/protocols>.
12. Kuzminov BP, Turkina VA, Chemodurova NYe. Otsinka khimichnykh rehovyn na khorioalantoisnii membrani embriona kurky (test HET-CAM) [Methodological guidelines. Evaluation of irritation action of substances on the chorioallantoic membrane of the chick embryo (HET-CAM test)]. Lviv; 2023. 20 p. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.32544.56322> (In Ukrainian).

13. Winter G, Koch AB, Löffler J, Lindén M, Solbach C, Abaei A, et al. Multi-modal PET and MR imaging in the Hen's egg test-chorioallantoic membrane (HET-CAM) model for initial in vivo testing of target-specific radioligands. *Cancers*. 2020;12(5):1248. <https://doi.org/10.3390/cancers12051248>.
14. Budai P, Kormos É, Buda I, Somody G, Lehel J. Comparative evaluation of HET-CAM and ICE methods for objective assessment of ocular irritation caused by selected pesticide products. *Toxicology in Vitro*. 2021;74:105150. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2021.105150>.

Дата надходження статті до редакції: 07.06.2025.

Прийнята до друку: 07.05.2026.

Електронна адреса для листування ver.apachi85@gmail.com