

OPEN ACCESS

DOI: 10.25040/ntsh2023.01.08

Адреса для листування: вул. Пекарська 69, Львів, Україна, 79010

Е-пошта: ohodovanyi@gmail.com

Надійшла до редакції: 17.10.2022

Прийнята до друку: 17.11.2022

Опублікована: 30.06.2023

ORCID IDs

Олег Годований:

<https://orcid.org/0000-0002-3821-3365>

Наталія Чухрай:

<https://orcid.org/0000-0001-9585-2326>

Олеся Мартовлос:

<https://orcid.org/0000-0003-4833-8935>

Ольга Ключівська:

<https://orcid.org/0000-0001-8657-5945>

Ірина Івасечко:

<https://orcid.org/0000-0003-2789-0763>

Ростислав Стойка:

<https://orcid.org/0000-0001-5719-2187>

**Конфлікт інтересів:** автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

**Особистий внесок авторів:**

Створення концепції: Олег Годований, Наталія Чухрай, Олеся Мартовлос, Ольга Ключівська, Ірина Івасечко, Ростислав Стойка;

Результати дослідження: Олег Годований; Написання: Олег Годований;

Редагування та затвердження остаточного варіанту: Наталія Чухрай, Олеся Мартовлос, Ольга Ключівська, Ірина Івасечко, Ростислав Стойка.

**Дозвіл комісії з питань біоетики:** Протокол №9 від 21.12.2020 та Протокол №8 від 18.10.2021, погоджені Комітетом з біоетики наукових досліджень, експериментальних розробок та наукових робіт Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького.

**Фінансування:** дослідження є фрагментом науково-дослідної роботи «Стан стоматологічного здоров'я та його корекція на підставі системного аналізу клінічно-лабораторних, рентгенологічних, морфологічних, функціональних, естетичних параметрів у осіб різного віку», яка виконується на кафедрі ортодонції Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (номер державної реєстрації 0120U002143).



© Всі автори, 2023

**Дослідження цитосумісності різних складників у композиціях гелю для лікування захворювань пародонта в ортодонтичних пацієнтів шляхом вивчення механізмів їх цитопатичної та цитопротекторної дії в культивованих клітинах людини та миші**

Олег Годований<sup>1</sup>, Наталія Чухрай<sup>1</sup>, Олеся Мартовлос<sup>1</sup>, Ольга Ключівська<sup>2</sup>, Ірина Івасечко<sup>2</sup>, Ростислав Стойка<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, Львів, Україна

<sup>2</sup>Інститут біології клітини НАН України, Львів, Україна

**Вступ.** Триває активний пошук ефективних засобів, які беруть участь у зменшенні шкідливого навантаження брекет-систем, зокрема місцевого стресу на тканини пародонтального комплексу, в усуненні запального процесу до і в процесі активного періоду ортодонтичного лікування. На основі флавоноїдного комплексу «Протефлазид®» та препарату з бензидаміну гідрохлоридом (БГ) «Т-Септ®», розроблено і запатентовано гелеву композицію (ГК) «Бензидафлазівердин» для місцевого лікування тканин пародонта у вигляді пародонтальної пов'язки в ортодонтичних пацієнтів.

**Мета** дослідження – оцінити цитосумісність різних комбінацій складників гелевої композиції на основі флавоноїдного комплексу та бензидаміну гідрохлориду («Бензидафлазівердин») для лікування захворювань тканин пародонта в ортодонтичних пацієнтів. Для цього механізми їх цитопатичної та цитопротекторної дії досліджено на культивованих клітинах людини та миші.

**Методи дослідження.** Вивчали вплив різних варіантів ГК на життєздатність псевдонормальних людських кератиноцитів лінії HaCaT, а також мишачих фібробластів лінії BALB-3T3 і мишачих макрофагів лінії J774.2. Було застосовано різні методи оцінки виживання клітин: МТТ-тест, забарвлення клітин флуоресцентними барвниками Hoechst 33342 і Пропідію йодидом, а також тест на генотоксичний вплив на клітини (тест-аналіз ДНК-комет). Антиоксидантні властивості розроблених варіантів ГК оцінювали із застосуванням реактивів

DPPH (1,1-дифеніл-2-пікрілгідразил), Merck (Dam-stadt, Germany) і DCFDA-H2 (2',7'-дихлорфлуоресцеїн діацетат).

**Результати.** Підсумовуючи отримані результати, можна стверджувати, що зразок ГК, який містив гелеву основу та БГ у вигляді розчину («Тантум Верде®») демонстрував слабкі прооксидантні властивості. Водночас як зразок – гелева основа, БГ у формі порошку («Т-Септ®»)

## Study of cytocompatibility of different supplements in gel compositions used for the treatment of periodontal diseases in orthodontic patients via exploration of mechanisms of their cytopathic and cytoprotective effects in cultured human and mouse cells

Oleg Hodovanyi<sup>1</sup>, Natalya Chukhray<sup>1</sup>, Olesia Martovlos<sup>1</sup>,  
Olha Klyuchivska<sup>2</sup>, Iryna Ivasechko<sup>2</sup>, Rostyslav Stoika<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv,  
Ukraine

<sup>2</sup>Institute of Cell Biology, National Academy of Sciences of  
Ukraine, Lviv, Ukraine

**Introduction.** A search continues for effective means which may reduce the overload of harmful factors, eliminate the inflammatory process, and reduce stress on the periodontal tissues during the active period of orthodontic treatment. We developed and patented the gel composition (GC) Benzidaflaziverdine prepared based on Proteflazid® (flavonoids) and benzydamine hydrochloride (BH) T-Sept® for the local treatment of the periodontal tissues in the form of a periodontal dressing in the orthodontic patients.

**The aim** of this study was to evaluate the cytocompatibility of different combinations of components in gel composition based on flavonoid complex and benzydamine hydrochloride (Benzidaflaziverdine) used for the treatment of periodontal diseases in orthodontic patients. For this, mechanisms of their cytopathic and cytoprotective effects will be explored using cultured human and mouse cells.

**Methods.** We studied the effect of different supplements used in GC Benzidaflaziverdine on the viability of pseudonormal human keratinocytes of the HaCaT line and mouse fibroblasts of the BALB-3T3 line, and mouse macrophages of the J774.2 line. Various methods of cell survival assessment were used: MTT-assay, staining of cells with fluorescent dyes Hoechst 33342 and Propidium iodide (PI), as well as a test for the genotoxic effects on cells (DNA comet assay). The antioxidant properties of the developed GC variants were evaluated using DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), Merck (Dam-stadt, Germany), and DCFDA-H2 (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate).

**Results.** We demonstrated that the Sample containing gel base and BH in the form of a solution (Tantum Verde®) possessed weak prooxidant properties. While the Sample contained gel base, powdered BH (T-Sept®) and Sample containing gel base and powdered BH (T-Sept® and Proteflazid®) possessed pronounced antioxidant properties.

**Conclusions.** Tests with DPPH and DCFDA dyes were used to confirm the hypothesis regarding the cytoprotective effect of the patented gel composition Benzidaflaziverdine for local application

OPEN ACCESS

DOI: 10.25040/ntsh2023.01.08

For correspondence: 69, Pekarska Str.,  
Lviv, Ukraine, 79010

E-mail: ohodovanyi@gmail.com

Received: 17 Oct, 2022

Accepted: 17 Nov, 2022

Published: 30 June, 2023

ORCID IDs

Oleg Hodovanyi

<https://orcid.org/0000-0002-3821-3365>

Natalya Chukhray

<https://orcid.org/0000-0001-9585-2326>

Olesia Martovlos

<https://orcid.org/0000-0003-4833-8935>

Olha Klyuchivska

<https://orcid.org/0000-0001-8657-5945>

Iryna Ivasechko

<https://orcid.org/0000-0003-2789-0763>

Rostyslav Stoika

<https://orcid.org/0000-0001-5719-2187>

**Disclosures:** The authors declared no conflict of interest.

**Author contributions:**

*Conceptualization:* Oleg Hodovanyi, Natalya Chukhray, Olesia Martovlos, Iryna Ivasechko, Olha Klyuchivska, Rostyslav Stoika;

*Results of study:* Oleg Hodovanyi;

*Writing:* Oleg Hodovanyi;

*Review & editing:* Natalya Chukhray, Iryna Ivasechko, Olesia Martovlos, Olha Klyuchivska, Rostyslav Stoika.

**Ethical approval:** Protocol No. 9, dated December 21, 2020, and Protocol No. 8, dated October 18, 2021, were approved by the Committee on Bioethics of scientific research, experimental development, and scientific works at Danylo Halytsky Lviv National Medical University.

**Funding:** The study is a fragment of scientific research work, "The State of Dental Health and Its Correction On the Basis of Systematic Analysis of Clinical and Laboratory, Radiological, Morphological, Functional, Aesthetic Parameters in People of Different Ages," conducted at the Department of Orthodontics at Danylo Halytsky Lviv National Medical University (State registration number 0120U002143).



© All authors, 2023

і зразок – гелева основа, БГ у формі порошку («Т-Септ®») і «Протефлазід®» виявляли виразні антиоксидантні властивості.

**Висновки.** Використано тести з барвниками DPPH і DCFDA для підтвердження гіпотези щодо забезпечення цитопротекторної дії запатентованої гелевої композиції «Бензидафлазівердин» для місцевого застосування у вигляді пародонтальної пов'язки за рахунок антиоксидантної активності флавоноїдного комплексу, що досягає максимального рівня на 2-гу годину експозиції. Таку гелеву композицію можна рекомендувати для використання у клінічній пародонтології для медикаментозного супроводу ортодонтичних пацієнтів до та під час активної фази ортодонтичного лікування.

**Ключові слова:** флавоноїдний комплекс, «Протефлазід®», бензидаміну гідрохлорид, гелева композиція, антиоксидантна активність, клітинна культура, захворювання пародонта, ортодонтичні пацієнти.

### Вступ

Захворювання тканин пародонта в людей дорослого віку у 65-98% випадків супроводжуються втратою кісткової тканини альвеолярних відростків щелеп з формуванням зубощелепних деформацій внаслідок міграції зубів та поглибленням зубощелепних аномалій. В активному періоді ортодонтичного лікування такі фактори як розвиток запального процесу, ортодонтичні сили та оклюзійна травма можуть негативно впливати на тканинні бар'єри пародонтального комплексу. У свою чергу, в ортодонтичних пацієнтів, що мають схильність до розвитку гінгівіту і пародонтиту, дані процеси провокують виникнення рецидивуючих абсцесів та стрімкої деструкції пародонтальних тканин, що погіршує перебіг і прогноз патологічного процесу [1-4].

В патогенезі захворювань тканин пародонта важливою є роль окислювального і механічного стресу [5-8]. У процесі ортодонтичного лікування застосовані ортодонтичні сили передаються через напружений тканинний матрикс до місцевих клітин пародонтальної зв'язки та альвеолярної кістки, стимулюючи клітини, де відбувається вивільнення прозапальних, ангіогенних та остеогенних агентів [9, 10]. Негативний вплив брекет-систем проявляється, у першу чергу, на м'яких тканинах ясен – у вигляді гіперплазії сосочків і набряку. Тому продовжується пошук ефективних засобів, що беруть участь у зменшенні шкідливого навантаження, усуненні запального процесу та зниженні стресу на тканини пародонта у процесі активного періоду ортодонтичного лікування [4,11,12].

З огляду на те, що основні пародонтопатогени індують стрімкий розвиток штамів, що є резистентними до класичних антибіотиків, дослідження скеровані на пошук альтернативних варіантів боротьби з агресивною мікробіотою із використанням рослинних препаратів, які володіють протизапальними та протимікробними властивостями щодо пародонтальної зв'язки та альвеолярних щелепних кісток [13-16]. Встановлено, що деякі рослинні компоненти, зокрема флавоноїди, є активно використовуваними речовинами у пародонтальній терапії поряд з хлоргексидином. Флавоноїдам також притаманна антиоксидантна дія, оскільки їхня фенольна структура дає можливість взаємодіяти з вільними радикалами, зменшуючи інтенсивність перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), гальмуючи утворення такого негативного фактора, як малоновий діальдегід [16-18].

З огляду на загострену ситуацію стосовно COVID-19 та актуальність цієї проблеми для стоматології, ми обрали для дослідження противірусний препарат – флавоноїдний комплекс «Протефлазід®». Він володіє імунотропною дією, інгібує перебіг вільнорадикальних процесів, чим запобігає накопиченню продуктів перекисного окиснення ліпідів, зменшує інтоксикацію, сприяє відновленню організму після перенесеної інфекції та адаптації до несприятливих навколишніх умов [19,20].

Додатково, з метою посилення властивостей препарату «Протефлазід®» та забезпечення виразної знеболювальної, протиексадативної та протимікробної дії, було обрано протиза-

in the form of a periodontal bandage due to the antioxidant activity of the flavonoid complex, which reaches the maximum level at the 2nd hour of exposure. This gel composition can be recommended for use in clinical periodontology for medical support of orthodontic patients before and during the active phase of orthodontic treatment.

**Keywords:** Flavonoid complex, Proteflazid®, benzydamine hydrochloride, gel composition, antioxidant activity, cell culture, periodontal diseases, orthodontic patients.

## Introduction

In 65–98% of cases, diseases manifesting in the periodontal tissues in adults are accompanied by a loss of bone tissue of the alveolar processes of the jaws with the formation of dental-jaw deformations due to tooth migration and worsening of dental-jaw defects. In the active period of orthodontic treatment, such factors as the inflammatory process development, orthodontic forces, and occlusive trauma may negatively affect tissue barriers of the periodontal complex. In orthodontic patients with a tendency to develop gingivitis and periodontitis, these processes provoke recurrent abscesses and rapid destruction of the periodontal tissues, which worsens the course and prognosis of the pathological process [1-4].

The role of oxidative and mechanical stress is essential in the pathogenesis of periodontal tissue diseases [5-8]. During the orthodontic treatment, the applied orthodontic forces are transmitted through the tense tissue matrix to local cells of the periodontal ligament and alveolar bone. This stimulates them to release pro-inflammatory, angiogenic, and osteogenic agents [9,10]. The negative impact of bracket systems is manifested, first of all, in soft tissues of gums as the development of hyperplasia of the papillae and swelling. Therefore, a search continues for effective means which may reduce the overload of harmful factors, eliminate the inflammatory process, and reduce stress on the periodontal tissues during the active period of the orthodontic treatment [4,11,12].

It is known that the main periodontopathogens induce a rapid development of microbial strains resistant to classical antibiotics. That is why our research was directed towards a search for alternative options for combating aggressive microbiota using herbal preparations that have anti-inflammatory and antimicrobial effects for the periodontal ligament and alveolar jaw bones [13-16]. Plant compounds,

particularly flavonoids, are widely used along with chlorhexidine in periodontal therapy. Flavonoids also demonstrated an antioxidant effect, as their phenolic structure makes it possible to interact with free radicals, reducing the intensity of lipid peroxidation (LPO), measured as malondialdehyde [16-18].

In view of the aggravated situation with Covid-19 and the relevance of this problem for dentistry, we addressed an antiviral drug – the flavonoid complex Proteflazid®. It has an immunotropic effect, inhibits free radical processes, prevents the accumulation of lipid peroxidation products, reduces intoxication, and promotes body recovery after infection and adaptation to adverse environmental conditions [19,20].

To strengthen Proteflazid® properties and ensure pronounced analgesic, anti-exudative and antimicrobial effects, an anti-inflammatory non-steroidal agent for local use, which belongs to a group of indazoles – benzydamine hydrochloride (BH) – was chosen. Effective drugs based on benzydamine hydrochloride are produced as Tantum Verde® oral cavity rinsing solution and T-Sept® tablets for absorption [21,22].

BH is consumed in the form of T-Sept® tablets (1 tablet contains 3 mg of BH) and belongs to the non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) for local application in the oral cavity. In terms of intensity of the action, they are inferior to steroids but possess very low toxicity and have several advantages. Non-steroidal anti-inflammatory drugs act mainly during phases of exudation and proliferation, as they function as inhibitors of the cyclooxygenase (COX) enzyme, which affects the arachidonic acid with the formation of important mediators of inflammation and pain – prostaglandins and thromboxanes, whose concentration increases based on the disease severity. The lipoxigenase metabolism pathway of the arachidonic acid leads to

пальний нестероїдний засіб місцевого спрямування з групи індозолів – бензидаміну гідрохлорид. Ефективними препаратами на основі бензидаміну гідрохлориду є розчин для полоскання порожнини рота «Тантум Верде®» і таблетки для розсмоктування «Т-Септ®» [21,22].

Препарат «Т-Септ®» (1 таблетка містить 3 мг бензидаміну гідрохлориду) відноситься до нестероїдних протизапальних препаратів (НПЗП) для місцевого застосування в порожнині рота, які за інтенсивністю дії поступаються стероїдам, проте володіють дуже низькою токсичністю і мають численні переваги. Нестероїдні протизапальні препарати діють в основному на фази ексудації та проліферації, оскільки виступають інгібіторами ферменту циклооксигенази (ЦОГ), що впливає на арахідонову кислоту з утворенням важливих медіаторів запалення та болю – простагландинів і тромбоксанів, концентрація яких наростає відповідно до тяжкості захворювання. Ліпооксигеназний шлях метаболізму арахідонової кислоти призводить до утворення ліпооксигенази – 5-ЛОГ (ліпооксигенази). Більшість НПЗП здатні селективно інгібувати дві форми даного ферменту – ЦОГ-1 і ЦОГ-2, що, відповідно, ослаблює гіперемію, набряк і біль. НПЗП сприяють нормалізації процесу мікроциркуляції. Подавляючи синтез тромбоксанів, знижуючи активність гіалуронидази, блокуючи серотонінові рецептори судин, вони запобігають утворенню мікротромбів. НПЗП можуть роз'єднувати окисне фосфорилування, сповільнюючи утворення макроергічних зв'язків за рахунок впливу на аденозинтрифосфат у тканинах вогнища запалення. НПЗП мають незначний вплив на процес альтерації, хоча деякою мірою здатні ослаблювати утворення токсичних радикалів, які сприяють розвитку запального процесу [23,24].

На основі препаратів «Протефлазид®» та «Т-Септ®» нами розроблено і запатентовано гелеву композицію (ГК) «Бензидафлазівердин» для місцевого лікування тканин пародонта у вигляді пародонтальної пов'язки в ортодонтичних пацієнтів. Дана композиція також включала гелеву основу – альгінат натрію, ніпагін та воду для ін'єкцій [25].

Мета даного дослідження – оцінити цитосумісність різних комбінацій складників ге-

левої композиції на основі флавоноїдного комплексу та бензидаміну гідрохлориду («Бензидафлазівердин») для лікування захворювань тканин пародонта в ортодонтичних пацієнтів. Для цього механізми їх цитопатичної та цитопротекторної дії досліджено на культивованих клітинах людини та миші.

### Матеріали та методи

Вивчали вплив різних варіантів гелевої композиції (ГК) «Бензидафлазівердин» на життєздатність псевдонормальних людських кератиноцитів лінії HaCatT, а також мишачих фібробластів лінії BALB-3T3 і мишачих макрофагів лінії J774.2. Було застосовано різні методи оцінки виживаності: МТТ-тест [26-28], забарвлення клітин флуоресцентними барвниками Hoechst 33342 і Пропідію йодидом [29,30], а також тест на генотоксичний вплив на клітини (тест-аналіз ДНК-комет) [30,31]. Антиоксидантні властивості розроблених варіантів ГК оцінювалися із застосуванням реактивів DPPH (1,1-дифеніл-2-пікрілгідразил), Merck (Dam-stadt, Germany) [32-34] і DCFDA-H2 (2',7'-дихлорфлюоресцеїн діацетат), Molecular Probes™ продукція для Thermo Fisher [29,32].

Досліджено зразки ГК, які відрізнялися співвідношенням і формою компонентів (Таблиця 1). У склад зразків входили альгінат натрію, ніпагін і вода для ін'єкцій – гелева основа, бензидаміну гідрохлорид (БГ) у формі розчину («Тантум Верде®», «Angelini Francesco A.C.R.A.F» S.p.A, Італія) і таблетована його форма («Т-Септ®», ICN, Polfa, Poland), краплі «Протефлазид®» (ТОВ «НКВ «ЕКОФАРМ», Україна). Для нульового контролю було використано культуру нативних клітин. Як препарат порівняння використовували гель для місцевого лікування слизової оболонки порожнини рота «Холісал» (Jelfa S.A. Poland), діючими речовинами якого є холіну саліцилат та цеталконію хлорид. Додатково препаратами порівняння слугували Доксорубіцин (Київмедпрепарат, Україна) як прооксидант і альфа-Токоферол (Технолог ЗАО, Україна) – як антиоксидант.

Нарощування біомаси клітин проводили у середовищі Ігла, модифіковане Дульбекко (DMEM, Sigma Chem Co., США) за присутності декомплементованої сироватки крові ембріонів великої рогатої худоби (Sigma Chem Co., США) і 50 мкг/мл гентаміцину (Sigma, Chem

the lipoxygenase formation – 5-LOG (lipoxygenase). Most NSAIDs can selectively inhibit two forms of this enzyme – COX-1 and COX-2, which weakens hyperemia, swelling, and pain. NSAIDs contribute to the normalization of the microcirculation process. Via the suppression of thromboxane synthesis, reducing the hyaluronidase activity, and blocking serotonin receptors in blood vessels, they prevent the formation of microthrombi. NSAIDs uncouple oxidative phosphorylation, slowing down the formation of macroergic connections due to their effect on the adenosine triphosphate in the tissues of the inflammation focus. NSAIDs have little effect on the alteration process, although, to some extent, they can weaken the generation of toxic radicals that contribute to the development of the inflammatory process [23,24].

We developed and patented the gel composition (GC) Benzidaflaziverdine prepared based on Proteflazid® and T-Sept® for the local treatment of periodontal tissues in the form of a periodontal dressing in orthodontic patients. This composition also included a gel base – sodium alginate, nipagin, and injection water [25].

The aim of this study was to evaluate the cytocompatibility of different combinations of components in gel composition based on flavonoid complex and benzydamine hydrochloride (Benzidaflaziverdine) used for the treatment of periodontal diseases in orthodontic patients. For that, mechanisms of their cytopathic and cytoprotective effects will be explored using cultured human and mouse cells.

## Materials and Methods

We studied the effect of different variants of gel composition (GC) Benzidaflaziverdine on the viability of pseudonormal human keratinocytes of the HaCaT line, as well as mouse fibroblasts of BALB-3T3 line and mouse macrophages of J774.2 line. Various methods of cell survival assessment were used: MTT-assay [26-28], staining of cells with fluorescent dyes Hoechst 33342 and Propidium iodide (PI) [29,30], as well as a test for the genotoxic effects on cells (DNA comet assay) [30,31]. The antioxidant properties of the developed GC variants were evaluated using DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) reagent, Merck (Dam-stadt, Germany) [32-34] and DCF-DA-H2 (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate), Molecular Probes™ produced for the Thermo Fisher [29,32].

We studied GC samples that differed in the ratio and shape of the components (Table 1). The samples included sodium alginate, nipagin, and water for injections – base gel, benzydamine hydrochloride (BH) in the form of the solution (Tantum Verde®, Angelini Francesco A.C.R.A.F S.p.A., Italy) and tablet (T-Sept®, ICN, Polfa, Poland), Proteflazid® drops (LLC NKV ECOPHARM, Ukraine). Un-treated cell culture was used as a zero control. The gel used for the local treatment of the oral cavity's mucous membrane, Cholisal (Jelfa S.A. Poland), whose active substances are choline salicylate and cetalkonium chloride, was applied as a comparison drug. Doxorubicin (Kyivmedprepa-

Table 1

### Chemical components of gel compositions under study and preparations for comparison

Samples	Varieties of the gel composition Benzidaflaziverdine and other tested substances
Control	zero control – native cell culture
<b>Components of the gel composition</b> (composition was added in the final concentration = 1%)	
Sample 1	gel base (sodium alginate 5% (0.5 ml), nipagin (0.01 ml), water for injections (7.5 ml)), Tantum Verde® solution 0.15% – BH solution (2 ml)
Sample 2	gel base (sodium alginate 5% (0.5 ml), nipagin (0.01 ml), water for injections (8.7 ml)), T-Sept® tablet – powdered BH (0.73 g)
Sample 3	(patented gel composition Benzidaflaziverdine) – gel base (sodium alginate 5% (0.5 ml), nipagin (0.01 ml), water for injections (8 ml)), T-Sept® tablet – powdered BH 0.73 g), Proteflazid® drops – flavonoid complex (1.5 ml)
Cholisal	comparison drug – gel was added in a final concentration of 1%
Doxorubicin	toxicological control – used in a final concentration of 1 µg/ml

Таблиця 1

**Складники досліджуваних гелевих композицій та препаратів порівняння**

Зразки	Різновиди композиції гелю «Бензидафлазівердин» та інші тестовані речовини
Контроль	Нульовий контроль – культура нативних клітин
<b>Компоненти гелевої композиції</b> (композиція додавалась до тестованих культур клітин у кінцевій концентрації = 1%)	
Зразок 1	Гелева основа (альгінат натрію 5% (0,5 мл), ніпагін (0,01 мл), вода для ін'єкцій (7,5 мл)), «Тантум Верде®» розчин 0,15% – бензидаміну гідрохлорид (БГ) у формі розчину (2 мл)
Зразок 2	Гелева основа (альгінат натрію 5% (0,5 мл), ніпагін (0,01 мл), вода для ін'єкцій (8,7 мл)), таблетки «Т-Септ®» – БГ у формі порошку (0,73 г)
Зразок 3	Запатентована гелева композиція «Бензидафлазівердин» – гелева основа (альгінат натрію 5% (0,5 мл), ніпагін (0,01 мл), вода для ін'єкцій (8 мл)), таблетки «Т-Септ®» – БГ у формі порошку (0,73 г), краплі «Протефлазід®» – флавоноїдний комплекс (1,5 мл)
Холісал	Препарат порівняння – гель додавали у кінцевій концентрації 1%
Доксорубіцин	Токсикологічний контроль – використаний у кінцевій концентрації 1 мкг/мл

Со., США) у термостаті з 5%-им вмістом CO<sub>2</sub> при 37°C. Клітини пересівали через кожні два-три дні з розрахунку 500 тис.-1 млн. клітин на 1 мл культурального середовища [26,27]. Кількість живих клітин визначали за допомогою реактива МТТ-тест, використовуючи рекомендації виробника (Sigma, Chem Co., США) [28]. Принцип визначення полягав у тому, що мітохондріальні дегідрогенази живих клітин здатні відновлювати незабарвлені форми МТТ-реагенту (3-(4,5-диметилтіазол-2-іл) - 2,5-дифенілбромід тетразолію, Sigma-Aldrich, США) до кристалічного блакитного формаза-ну, розчинного у диметилсульфоксиді.

Цитоморфологічне дослідження клітин ссавців. Для якісного визначення життєздатності клітин у піддослідних культурах використовували подвійне забарвлювання культивованих клітин за допомогою флуоресцентного барвника Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, США, Екстинкція/Емісія: ~350-354/460-470 нм), який діє в живих клітинах, та Пропідію йодид (Sigma-Aldrich, США, Екстинкція/Емісія: ~520-538 /617-618 нм), який слугував індикатором проникливості та пошкодження плазматичної мембрани зовнішніх клітин. Барвник Hoechst 33342 додавали до клітин у кінцевій концентрації 20-50 мкг/мл за 30 хв перед додаванням розчину Пропідію йодиду (кінцева концентрація 2 мкг/мл).

DCFDA-H2 (2',7'-дихлорфлуоресцеїн діацетат, Екстинкція/Емісія: ~470-510/525-575 нм) є флуоресцентним барвником, чутливим до перекису водню (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Його використовували для вимірювання вмісту активних форм

кисню (АФК) у клітинах, на які подіяли досліджуваними зразками. Для визначення генерації H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> додавали досліджувані зразки та речовини, після чого (через 30 хв) додавали DCFDA-H2 (10 мкМ), 30 хв) та Hoechst 33342 (кінцева концентрація 30 мкг/мл). Після інкубації клітин із нанесеними препаратами люмінесценцію клітин досліджували на мікроскопі Zeiss AxioImager A1 (Carl Zeiss, Німеччина) та фотографували цифровою камерою в комплекті мікроскопа при збільшенні ~400 разів у відповідних полях збудження та випромінювання. Обробку зображень проводили за допомогою програмного забезпечення Axio-Vision (налаштованого Carl Zeiss Microscopy GmbH, Königsallee 9-21, 37081 Göttingen, Німеччина; фотографія) та Image Pro Plus 7.0 (Media Cybernetics, США; композиція зображення та кольору) [29].

Тест на генотоксичність. Використовували метод тест-аналізу ДНК-комет у лужних умовах [26,32]. Клітини (1 млн/мл) інкубували впродовж 72 год з досліджуваними зразками. Клітинну суспензію (3 × 10<sup>4</sup>) змішували при 37°C з 250 мкл 0,5% розчину легкоплавкої агарози (Sigma, США) і наносили тонким шаром на предметні скла, які попередньо покривали 1% розчином агарози (Sigma, США) і підсушували. Проводили лізис клітин та електрофорез [30,31]. Принцип визначення заснований на тому, що під час лужного електрофорезу одноланцюгові розриви ДНК перетворюються на дволанцюгові, що дозволяє оцінити генералізовані генотоксичні ефекти. ДНК-комети забарвлювали етидію бромідом (Sigma-Aldrich, США, Екстинкція/

rat, Ukraine) was used as a prooxidant, while the alpha-Tocopherol (Tehnologi ZAO, Ukraine) and the Ascorbic acid (Darnytsia, Kyiv, Ukraine) as an antioxidant, were used as comparison drugs.

Cell culturing was carried out in the Dulbecco-modified Eagle's medium (DMEM) (Sigma Chem Co., USA) in the presence of the decomplicated fetal bovine serum (Sigma Chem Co., USA) and 50 µg/ml gentamicin (Sigma, Chem Co., USA) in a thermostat with 5% CO<sub>2</sub> content at 37°C and 100% humidity. Cells were subcultured every 2–3 days at 0.5–1 million cells per 1 ml of culture medium [26, 27]. The number of living cells was determined with the MTT assay, using the manufacturer's recommendations (Sigma, Chem Co., USA) [28]. The measurement principles are based on the ability of the mitochondrial dehydrogenases of living cells to reduce colorless forms of the MTT-reagent [3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl) - 2,5 - dimethyl bromide tetrazolium, Sigma-Aldrich, USA] to blue crystalline formazan which is soluble in the dimethyl sulfoxide.

Cytomorphological study of mammalian cells. To qualitatively determine the viability of cells in vitro, double staining of cultured cells with the fluorescent dye Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, USA, Ex/Em: 350-354/460-470 nm) and Propidium iodide (Sigma-Aldrich, USA, Ex/Em: 520-538/617-618 nm) was used. The first dye stains the cell nucleus, while the second one serves as an indicator of the permeability and damage of the cell plasma membrane. Hoechst 33342 dye was added for 30 min to cells at a final concentration of 20 µg/ml before the addition of Propidium iodide solution used in a final concentration of 2 µg/ml.

DCFDA-H2 (2,7-dichlorofluorescein diacetate, Ex/Em: ~470-510/525-575 nm) is a fluorescent dye sensitive to hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). It was used to measure the reactive oxygen species (ROS) content in cells treated with studied samples. To determine the generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tested samples and substances were added, after which (in 30 min) DCFDA-H2 (10 µM, 30 min) and Hoechst 33342 (final concentration 30 µg/ml) were added. After cell incubation with the applied

drugs, cell luminescence was examined on a Zeiss AxioImager A1 microscope (Carl Zeiss, Germany) and photographed with a digital camera in the microscope kit at a magnification of ~400 times in the corresponding excitation and emission fields. Image processing was performed using AxioVision software (customized by Carl Zeiss Microscopy GmbH, Königsallee 9-21, 37081 Göttingen, Germany; photography) and Image Pro Plus 7.0 (Media Cybernetics, USA; image and color composition) [29].

Genotoxicity testing. The method of DNA comets under alkaline conditions was used [26, 32]. Cells (1 million / ml) were incubated for 72 h with test samples. The cell suspension (3 × 10<sup>4</sup>) was mixed at 37 °C with 250 µl of 0.5% fusible agarose solution (Sigma, USA) and applied in a thin layer on slides, which were pre-coated with 1% agarose solution (Sigma, USA) and dried. Cell lysis and electrophoresis were performed [30, 31]. The determination principle is based on the fact that during alkaline electrophoresis, single-strand breaks in DNA turn into double-strand breaks, which allows for the assessment of generalized genotoxic effects. DNA comets were stained with the Ethidium bromide ((Sigma-Aldrich, USA, Ex/Em: ~520-538/617-618 nm, 10 µg/ml) and examined under a Carl Zeiss fluorescence microscope (Germany) [30]. DNA damage was assessed using CASP 1.2.2 software (CASPlab, Wroclaw, Poland), comparing the average values (%) of DNA in the tail of 250 comets for each sample.

The total pro-/anti-oxidant activity was measured in solutions of tested GC samples and comparison drugs (Table 1) in the presence of the DMSO introduced into the wells of a 96-well plastic dish in the amount of 10 µl per well. The DPPH substrate (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazylradical) was prepared as a 0.01% solution in the DMSO. The substrate was introduced into wells with tested substances immediately before the solution's optical density measurement began using a multichannel microphotometer Plate Reader BioTek 76883 (BioTek, USA) at 490 nm. Optical density was measured in 20 min, 1, 2, and 3 h. The percentage of change in the solution's optical density was determined based

Емісія: ~520-538 /617-618 нм, 10 мкг/мл) і досліджували під флуоресцентним мікроскопом Carl Zeiss (Німеччина) [30]. Пошкодження ДНК оцінювали за допомогою програмного забезпечення CASP 1.2.2 (CASPlab, Вроцлав, Польща), порівнюючи середні значення (%) ДНК у хвості 250 комет для кожного зразка.

Для визначення загальної про-/антиоксидантної активності розчини тестованих зразків ГК і препаратів порівняння (Таблиця 1) в DMSO вносили в лунки 96-лункового планшета в кількості 10 мкл на лунку. Субстрат DPPH готували як 0,01% розчин у DMSO. Субстрат вносили в лунки з тестованими субстанціями безпосередньо перед початком визначень, оптичну густину розчину (екстинкцію) вимірювали на багатоканальному мікрофотометрі «Plate Reader BioТек» 76883 (BioТек, США) при 490 нм. Виміри оптичної густини проводили через 20 хв, 1, 2 і 3 год. Відсоток зміни оптичної густини розчину визначали за формулою: (%) =  $[(A_0 - A_1)] / (A_0) \times 100$ . Як нульовий контроль використовували розчинник DMSO [33,34].

Біоетичні правила дотримувались згідно з вимогами основних біоетичних положень Європейської конвенції з прав людини та біомедицини (від 04.04.1997) та Гельсінської

декларації Всесвітньої медичної асоціації про етичні принципи медичних досліджень із залученням людей (1964-2008). Протоколи № 9 від 21.12.2020 р. та № 8 від 18.10.2021 р. схвалені Комітетом з біоетики наукових досліджень, експериментальних розробок і наукових робіт ЛНМУ імені Данила Галицького.

Статистична обробка результатів. Досліди проводили в трьох паралелях у кожному варіанті. Кожен показник, наведений на малюнках (ордината стовпчиків діаграми), відповідає середньому значенню «М», розрахованому за результатами трьох вимірювань в одному з кількох однотипних дослідів. Похибку  $m$  отриманих результатів розраховували як корінь квадратної похибки значення « $\sigma$ ». Комп'ютерний аналіз проводився на основі Phenom II X4 975 на 64-розрядній операційній системі Windows 7 (Microsoft, США). Статистичну обробку отриманих даних проводили в програмі MS Excel 2010 (Microsoft, США).

### Результати

На Рис. 1 (А) представлені результати оцінювання рівня виживаності культур клітин різного гістологічного походження за впливу досліджуваних субстанцій та зразків ГК. Виявлено цитотоксичний вплив Зразка 1 (Таблиця 1) із вмістом БГ у формі розчину

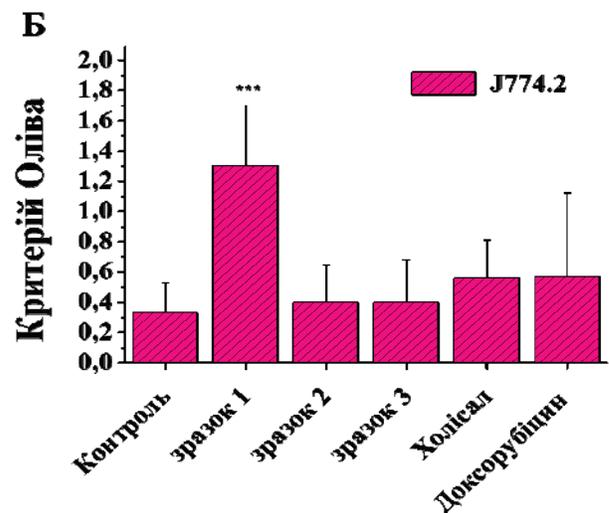
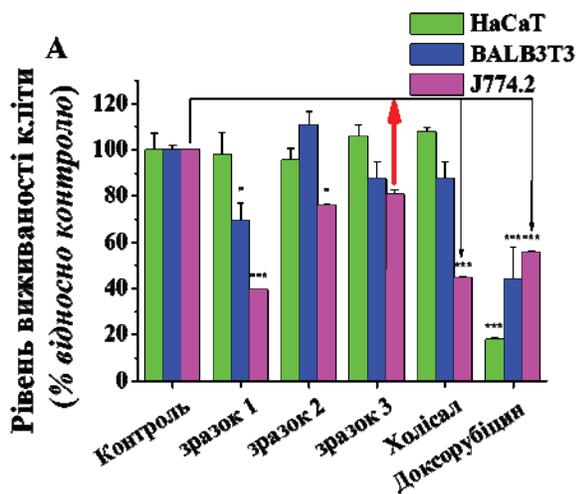


Рисунок 1. Порівняння рівнів життєздатності, виміряних за допомогою МТТ-аналізу в різних лініях псевдонормальних клітин ссавців: мишачих фібробластів лінії BALB-3Т3, людських кератиноцитів лінії HaCaT і мишачих макрофагів лінії J774.2. А – МТТ-тест, Б – тест-аналіз ДНК-комет

Примітки: Контроль 0 – інтактні нативні клітини (Таблиця 1); Препарат порівняння гель «Холісал» додавали у кінцевій концентрації 1 % (Таблиця 1); Токсикологічний (позитивний) контроль – Доксорубіцин, 1 мкг/мл (Таблиця 1) Достовірність різниці з необробленими (інтактними) контрольними клітинами: \* P<0,05; \*\*\* P<0,001

on the formula:  $(\%) = [(A_0 - A_1) / (A_0)] \times 100$ . A solvent (DMSO) was used as a zero control [33, 34].

Bioethical rules were observed following the requirements of basic bioethical provisions of the European Convention on Human Rights and Biomedicine (from 04.04.1997) and the Helsinki Declaration of the World Medical Association on the ethical principles for medical research involving human subjects (1964-2008). Protocol No. 9, dated December 21, 2020, and Protocol No. 8, dated October 18, 2021, were approved by the Committee on Bioethics of scientific research, experimental development, and scientific works at Danylo Halytsky Lviv National Medical University.

Statistical processing of results. Experiments were performed in three parallels in each variant. Each indicator shown in the figures (the ordinate of the diagram columns) corresponds to the average value of "M" calculated based on the results of three measurements in one of several experiments of the same type. The M error of the obtained results was calculated as the root square error of the "σ" value. The computer analysis was based on Phenom II X4 975 on Windows 7 64-bit operating system

(Microsoft, USA). Statistical processing of the obtained data was performed in MS Excel 2010 (Microsoft, USA).

## Results

Fig. 1 (A) presents the results of assessing the survival level of cells of different histological origins under the influence of studied substances and GC samples. The cytotoxic effect of Sample 1 (Table 1) containing the liquid form of the BH Tantum Verde® and the comparison drug Cholisal towards the macrophage culture was revealed. It was comparable to the effect of the anticancer drug Doxorubicin used in a therapeutic dose. At the same time, no cytopathic effect was observed on fibroblasts and keratinocytes.

The results of the genotoxicity assessment (see Fig. 1, B) showed the presence of a DNA-damaging effect of GC acting with the liquid form of Tantum Verde® in the absence of a pronounced suppressive effect in the case of Cholisal comparison drug and the antitumor antibiotic Doxorubicin used in a therapeutic dose. Medians of the Olive tail moment (OTL) (tail DNA% versus nucleus of comet DNA%) were used for assessing the DNA damage.

Fig. 2 presents differential interference contrast images (DIC) of cells treated with Sam-

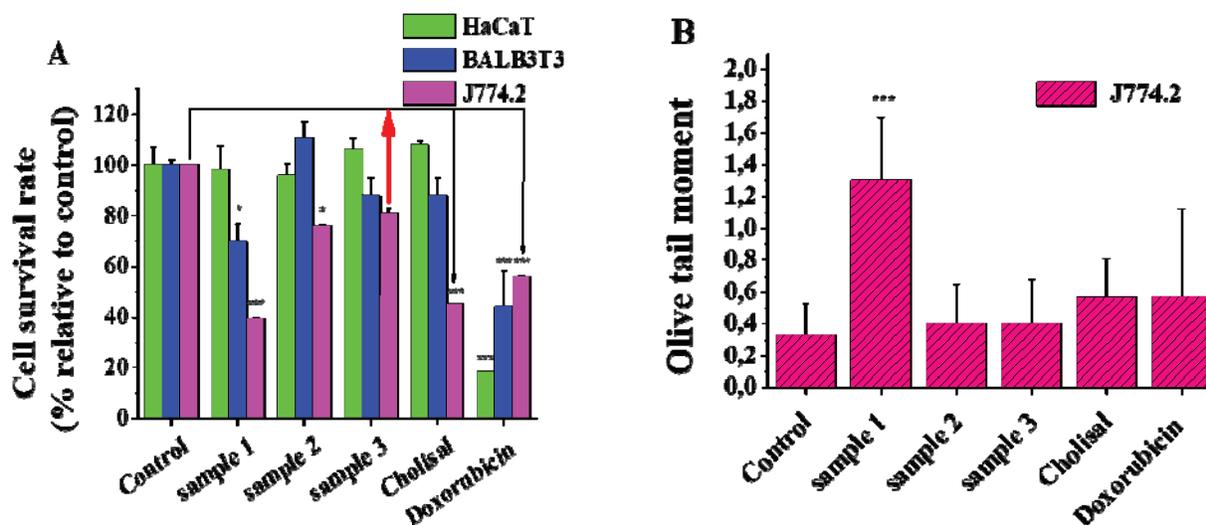


Figure 1. Comparison of viability rates measured with the MTT-assay in various lines of pseudonormal mammalian cells: murine fibroblasts of BALB-3T3 line, human keratinocytes of HaCaT line, and murine macrophages of J774.2 line. A – MTT-assay, B – DNA-comet assay

Notes: Control 0 – intact native cells (Table 1); Comparison drug Cholisal gel was added in the final concentration of 1% (Table 1); Toxicological (positive) control – Doxorubicin, 1 μg/ml (Table 1) The significance of difference with the non-treated control cells: \* P<0.05; \*\*\* P<0.001

«Тантум Верде®» та препарату порівняння «Холісал» щодо культури макрофагів, що був співмірний з дією протипухлинного антибіотика Доксорубіцину в терапевтичній дозі. При цьому не спостерігали цитопатичного впливу на фібробласти і кератиноцити.

Результати оцінки генотоксичності (див. Рис. 1, Б) засвідчили наявність ДНК-пошкоджувальної дії ГК з БГ у формі розчину («Тантум Верде®») за відсутності вираже-

ного супресивного ефекту у випадку препарату порівняння «Холісал» та протипухлинного антибіотика Доксорубіцину, що застосовувалися у терапевтичній дозі. Для оцінки пошкодження ДНК використовували медіану критерію Оліва: «хвостовий момент», що є показником міграції ДНК (співвідношення між відстанню, яку проходять фрагменти здеградованої ДНК та їх кількістю (хвіст комети) до розміру і вмісту ядра (ядро клітини як ядро комети), що отримало

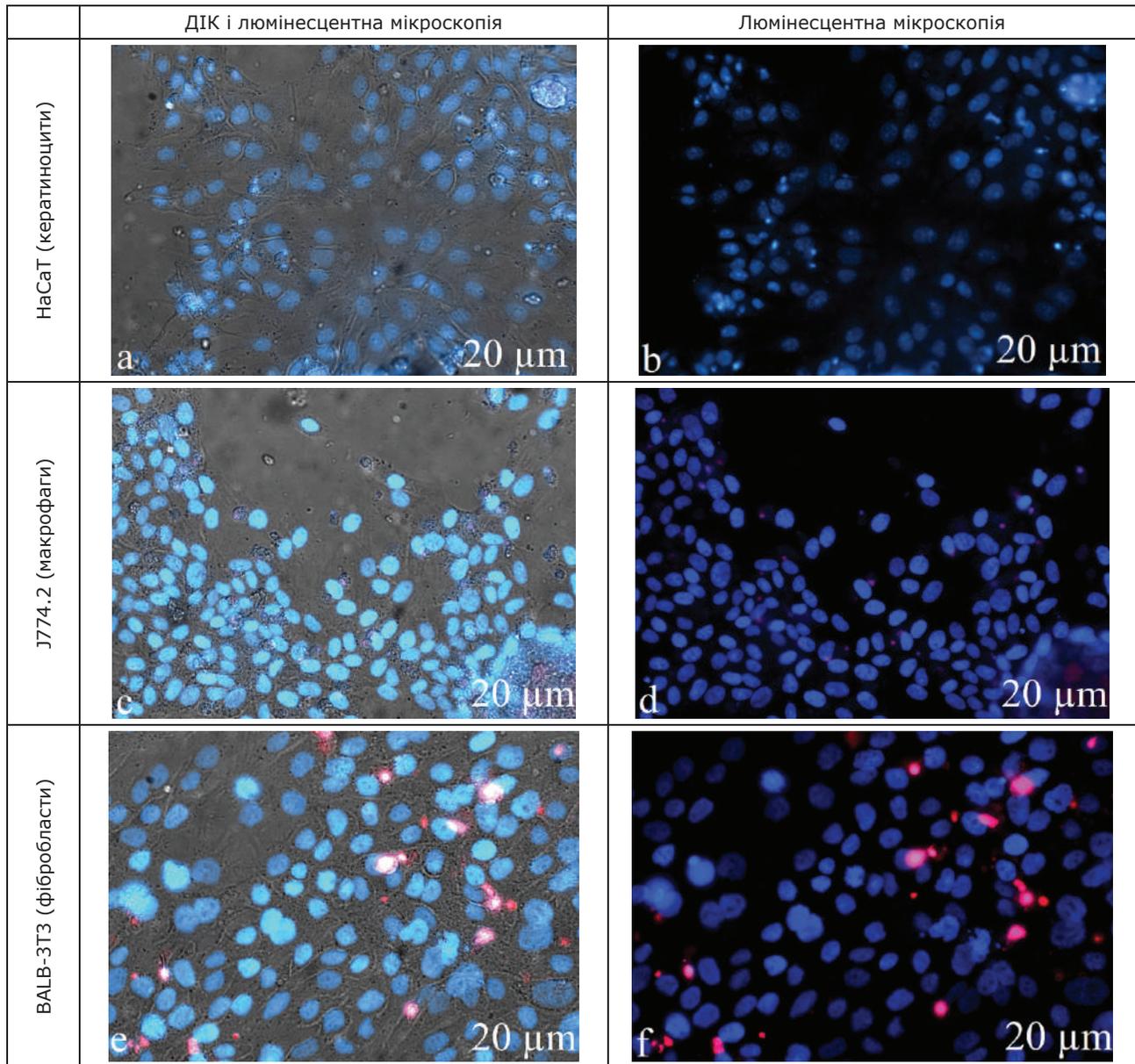


Рисунок 2. Флуоресцентні зображення клітин за присутності тестованого зразка, що демонструють ефект біотолерантності. Фарбування Hoechst 33342 та Пропідію йодидом клітин, оброблених Зразком 3 впродовж трьох днів. Блакитна флуоресценція (Hoechst 33342) – живі клітини та червона флуоресценція (Пропідію йодид) – мертві клітини

ple 3 (Table 1) and stained with fluorescent DNA-specific dye Hoechst-33342 (visualized in blue – alive cells) in combination with the fluorescent DNA/RNA-specific dye Propidium iodide (dead cells are visualized in red).

Presented images visualize GC effects – Sample 3 (patented gel composition) on three types of cells – human keratinocytes of the HaCaT line, mouse fibroblasts of the BALB3T3 line, and mouse macrophages of

the J774.2 line. The absence of red staining in treating J774.2 macrophage cells and HaCaT keratinocytes means the lack of a toxic effect. A certain amount of red staining in the BALB-3T3 fibroblast cell line may indicate the stimulation of proliferation simultaneously with increased cell death. This may be due to the phenomenon of contact inhibition of growth resident in pseudonormal cells in culture.

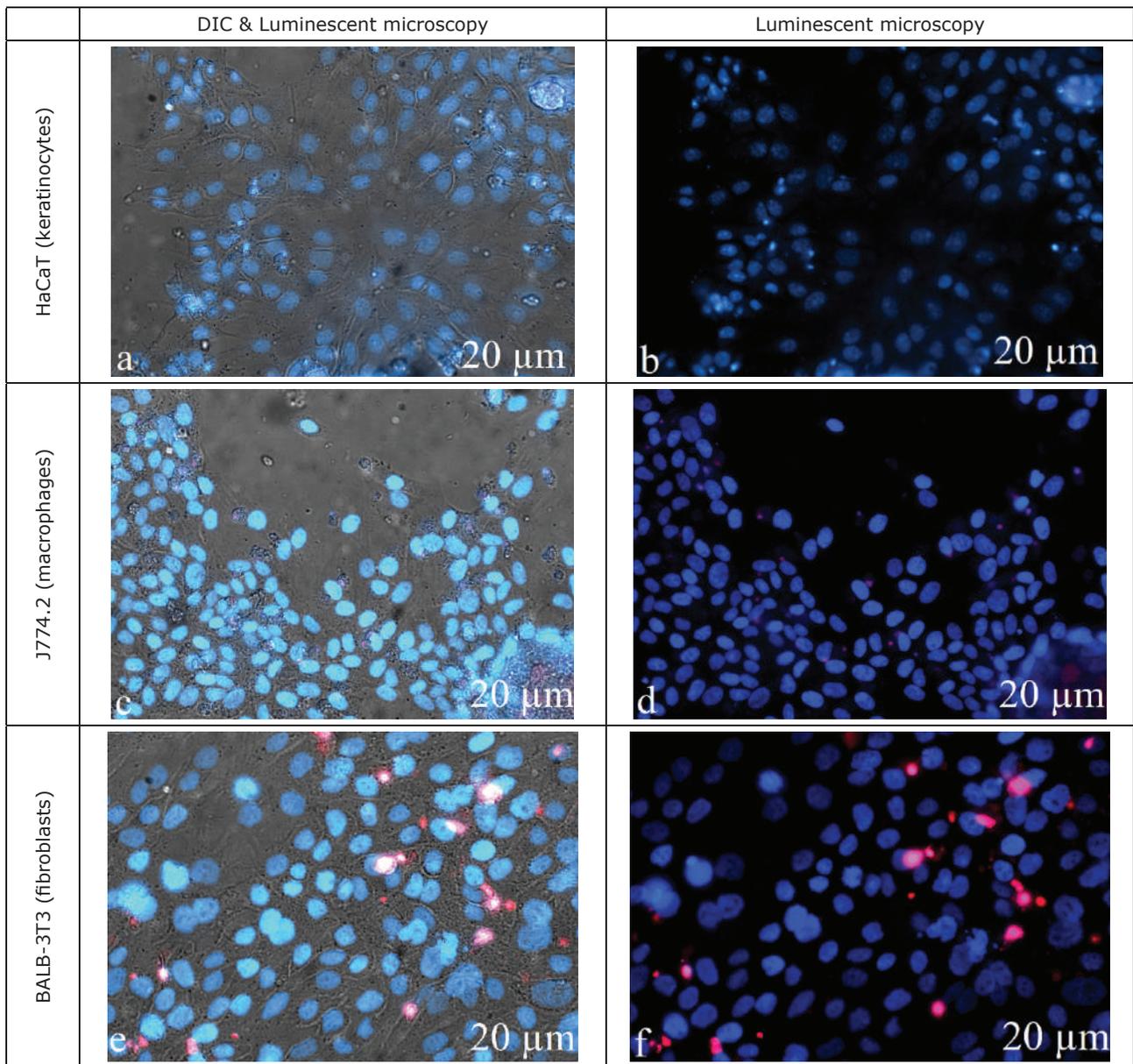


Figure 2. Fluorescence images of treated cells demonstrating the bio-tolerance effect. Hoechst 33342 & PI staining of cells treated for three days with Sample 3. Blue fluorescence (Hoechst 33342) – living cells and red fluorescence (PI) – dead cells

назву моменту Олівового хвоста (OTL) (% ДНК у хвості проти ядра ДНК комети).

На Рис. 2 представлено диференційне інтерференційне контрастне зображення (ДІК) клітин, оброблених Зразком 3 (Таблиця 1) та забарвлених флуоресцентним ДНК-специфічним барвником Hoechst-33342 (візулізо-вані блакитним кольором – живі клітини) в поєднанні з флуоресцентним ДНК/РНК-специфічним барвником Пропідію йодидом (візуалізовані червоним кольором – мертві клітини).

Представлені зображення візуалізують вплив ГК – Зразок 3 (запатентована гелева композиція) на три типи клітин – кератиноцити людини лінії HaCaT, фібробласти миші лінії BALB3T3 та макрофаги миші лінії J774.2. Відсутність червоного забарвлення у випадку клітин макрофагів J774.2 та кератиноцитів HaCaT означає відсутність токсичного ефекту. Деяка кількість червоного забарвлення в клітинній лінії фібробластів BALB-3T3 може вказувати на стимуляцію проліферації одночасно з підвищеною загибеллю клітин. Це може бути наслідком явища контактного гальмування росту резидентних псевдонормальних клітин у культурі.

На підставі результатів цитоморфологічних досліджень, МТТ-тесту та ДНК-кометного аналізу, постає питання про визначення потенційних механізмів спостережуваних явищ у дії досліджуваних зразків. Визначення про- та антиоксидантних властивостей досліджуваних варіантів ГК та інших речовин, зазначених у Таблиці 1, свідчить про здатність досліджуваних Зразків 1, 2, 3 та речовин порівняння захоплювати вільні радикали або виступати донорами Гідрогену (Рис. 3).

Згідно отриманих результатів, Зразок 1 проявив слабкі прооксидантні властивості від -1.6 УО (умовних одиниць) на 20-ту хв до 0.5 УО на 3-тню год. З огляду на даний факт, БГ у формі розчину на протипагу таблетованому препарату не рекомендований для включення у пролонговані форми ГК.

Зразки 2 і 3 – є антиоксидантами і їх властивості в часі збільшуються (для 2-го зразка – від 0,98 УО до 3,9 УО на 2-гу годину і 7,6 УО на 3-тню годину). Антиоксидантні властиво-

сті Зразка 3 досягають максимального рівня на 2-гу год. (13,3% УО), а вже на третю годину починають знижуватися (7,2 УО).

### Активність зв'язування радикалів, УО зміни активності

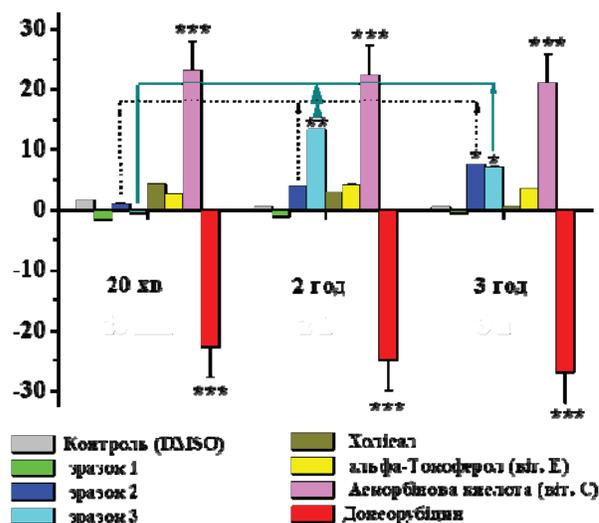


Рисунок 3. Оцінка про- та антиоксидантної дії досліджуваних Зразків 1, 2, 3 та речовин порівняння («Холісал», альфа-Токоферол, Аскорбінова кислота, Доксорубіцин)

Зразки 1, 2, 3, «Холісал» та альфа-Токоферол діяли як антиоксиданти, а Доксорубіцин – як прооксидант. Для перевірки здатності досліджуваних сполук діяти як акцептори вільних радикалів або донори водню, застосовано метод експрес-вимірювання антиоксидантної ємності зразків за допомогою реагенту Дифеніл-пікріл-гідразил. На діаграмі на рис. 3 представлені результати кількісної оцінки анти- та прооксидантних властивостей розроблених нами варіантів ГК та препаратів порівняння. Виходячи з цих даних, можна побачити, що Зразок 3 виявився найбільш вираженим антиоксидантом. Максимум його ефекту спостерігається на 2-гу годину дії. Зразок 2 є слабшим антиоксидантом, який реагує повільніше. Зразок 1 виявився прооксидантом, тоді як Доксорубіцин був сильним окислювачем. «Холісал» продемонстрував слабку антиоксидантну активність, яку можна порівняти з альфа-Токоферолом.

Як антиоксидантний контроль використано альфа-Токоферол, оскільки часова динаміка його дії є співставимою із біологічними ефектами тестованих нами зразків. Аскор-

Based on the results of cytomorphological studies and MTT and DNA comet assay, the question arises about defining the potential mechanisms of observed phenomena in the studied samples' actions. Determining the pro- and antioxidant properties of the studied variants of GC and other substances noted in Table 1 suggests the ability of studied Samples 1, 2, 3 and comparison substances to capture free radicals or serve as Hydrogen donors (Fig. 3).

### Radical scavenging activity, *CU of activity change*

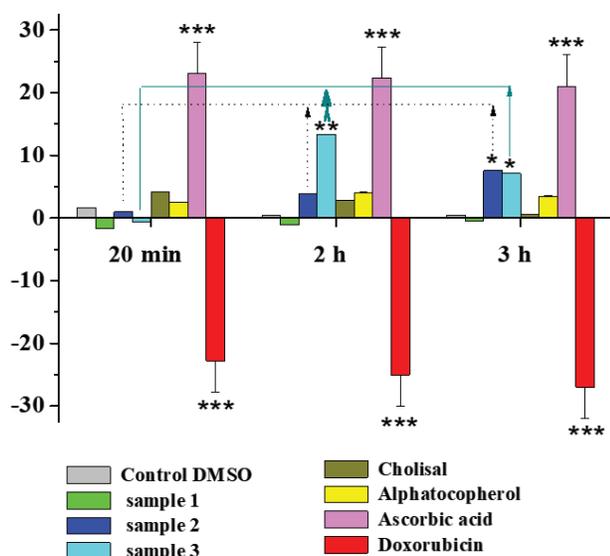


Figure 3. Evaluation of the pro- and antioxidant action of studied Samples 1, 2, 3 and the comparison substances (Cholisal, alpha-Tocopherol, Ascorbic acid, and Doxorubicin)

According to obtained results, Sample 1 showed weak prooxidant properties (-1.6 CU of the Conventional Units (CU)) to 0.5 CU). Thus, the BH in a liquid form, as opposed to the tablet preparation, should not be recommended for inclusion in case of prolonged forms of GC.

Samples 2 and 3 demonstrate antioxidant properties that increase over time (for the 2nd sample – from 0.98 CU to 3.9 CU at the 2nd hour and 7.6 CU at the 3rd hour). The antioxidant properties of Sample 3 reach their maximum level at the 2nd hour (13.3 CU), and by the 3rd hour, they start decreasing (7.2 CU).

Samples 1, 2, 3, Cholisal, and alpha-tocopherol were used as antioxidants, and Doxorubicin was used as a prooxidant. The method of rapid measurement of the antioxidant capacity of samples using the Diphenyl-picryl-hydrazyl reagent was applied to test the ability of studied compounds to act as free radical scavengers or hydrogen donors. The diagram in Fig. 3 presents the results of the quantitative evaluation of anti- and prooxidant properties of our developed variants of GC and the comparison substance. Based on these data, one can see that Sample 3 proved to be the most pronounced antioxidant. The maximum of its effect occurs at the 2nd hour of action. Sample 2 is a weaker antioxidant that reacts slower. Sample 1 proved to be a prooxidant, while Doxorubicin was a strong oxidant. Cholisal has shown a weak antioxidant activity comparable to that of alpha-Tocopherol.

Alpha-Tocopherol was used as an antioxidant control because the temporal dynamics of its effect were comparable to the biological effects of tested samples. The Ascorbic acid reacts at high speed with dynamics within a few seconds to a minute, and quercetin and rutin, respectively, react within several hours. Their maximum effect develops within a day.

To visualize the studied phenomena, the presence of peroxide radicals in target cells was detected under the influence of the studied samples. For this, the fluorescent dye dihydrochlorofluorescein diacetate (DCFDA-H2), specific for the hydrogen peroxide, was used (Fig. 4).

The images in these figures demonstrate the biological effect of three samples of our best design – Sample 1, 2, and 3 (Table 1) on macrophages treated for three days. The nucleus of living cells is visualized in blue fluorescence, while green fluorescence indicates the free radical concentration. It should be noted that in our experiments, Samples 2 and Sample 3 acted as antioxidants. The appearance of more intensive green fluorescence may suggest the activation of macrophages which observed in the case of the action of Sample 1.

бінова кислота реагує з великою швидкістю з динамікою від кількох секунд до хвилини, а, відповідно, кверцитин і рутин реагують впродовж декількох годин. Їх максимальний ефект розвивається впродовж доби, що є не співвідносним з тестованими нами зразками.

Для візуалізації досліджуваних явищ здійснювали детекцію наявності пере-

кисних радикалів у клітинах-мішенях за дії досліджуваних зразків з використанням специфічного щодо перекису водню флуоресцентного барвника 2',7'-дихлорфлуоресцеїндіацетату (DCFDA-H2) (Рис. 4).

Зображення на цих малюнках демонструють біологічну дію трьох зразків нашого найкращого дизайну – Зразків 1, 2 і 3 (Таблиця 1)

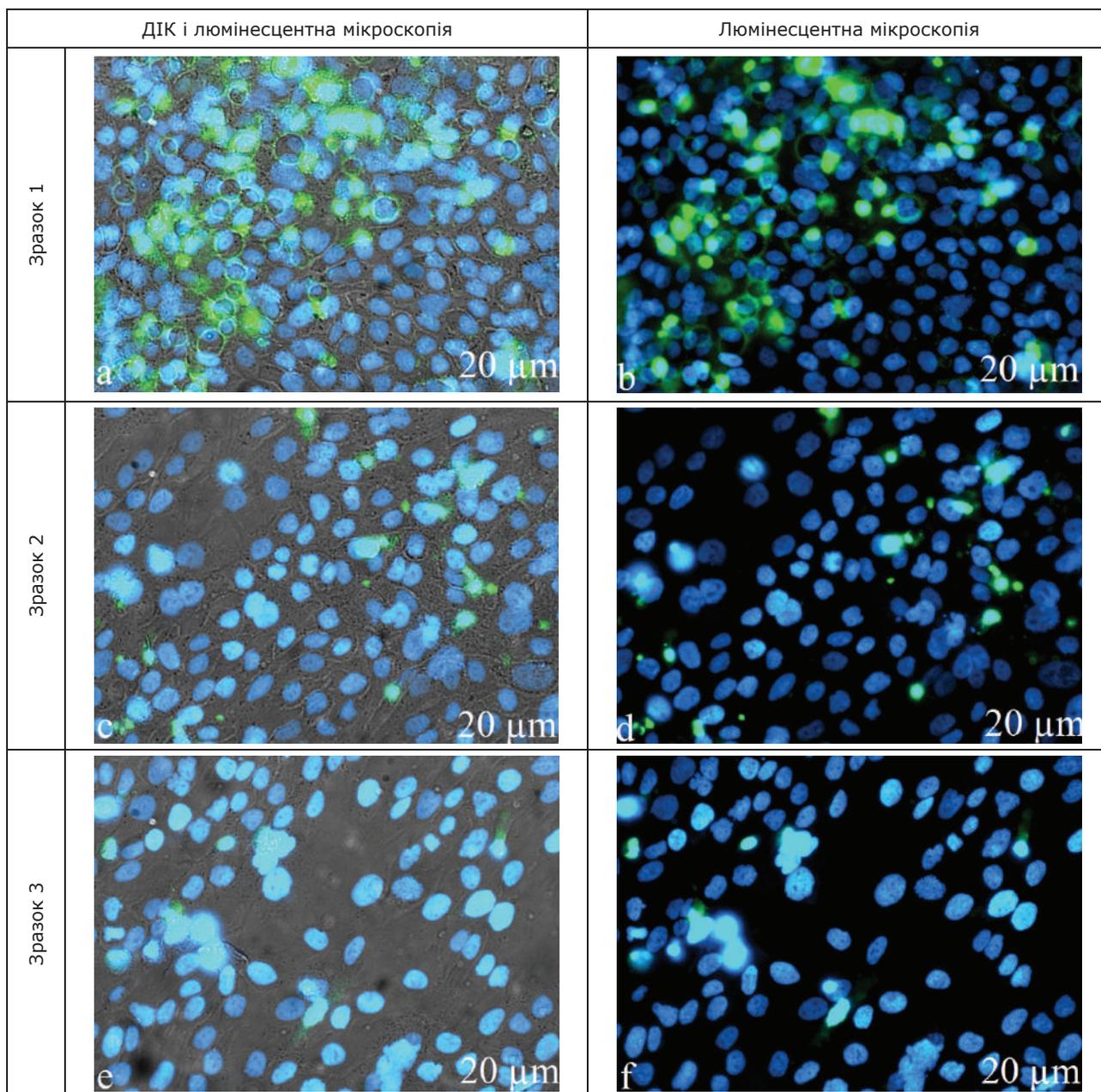


Рис. 4. Результати цитоморфологічного дослідження утворення перекису водню з використанням флуоресцентних барвників Hoechst 33342 і DCFDA-H2 у культивованих макрофагах J774.2, при дії Зразка 1, Зразка 2 і Зразка 3 на 3-й день тестування. Синя флуоресценція (Hoechst 33342) – ядро живих клітин, зелена флуоресценція (DCFDA-H2) – генерований  $H_2O_2$

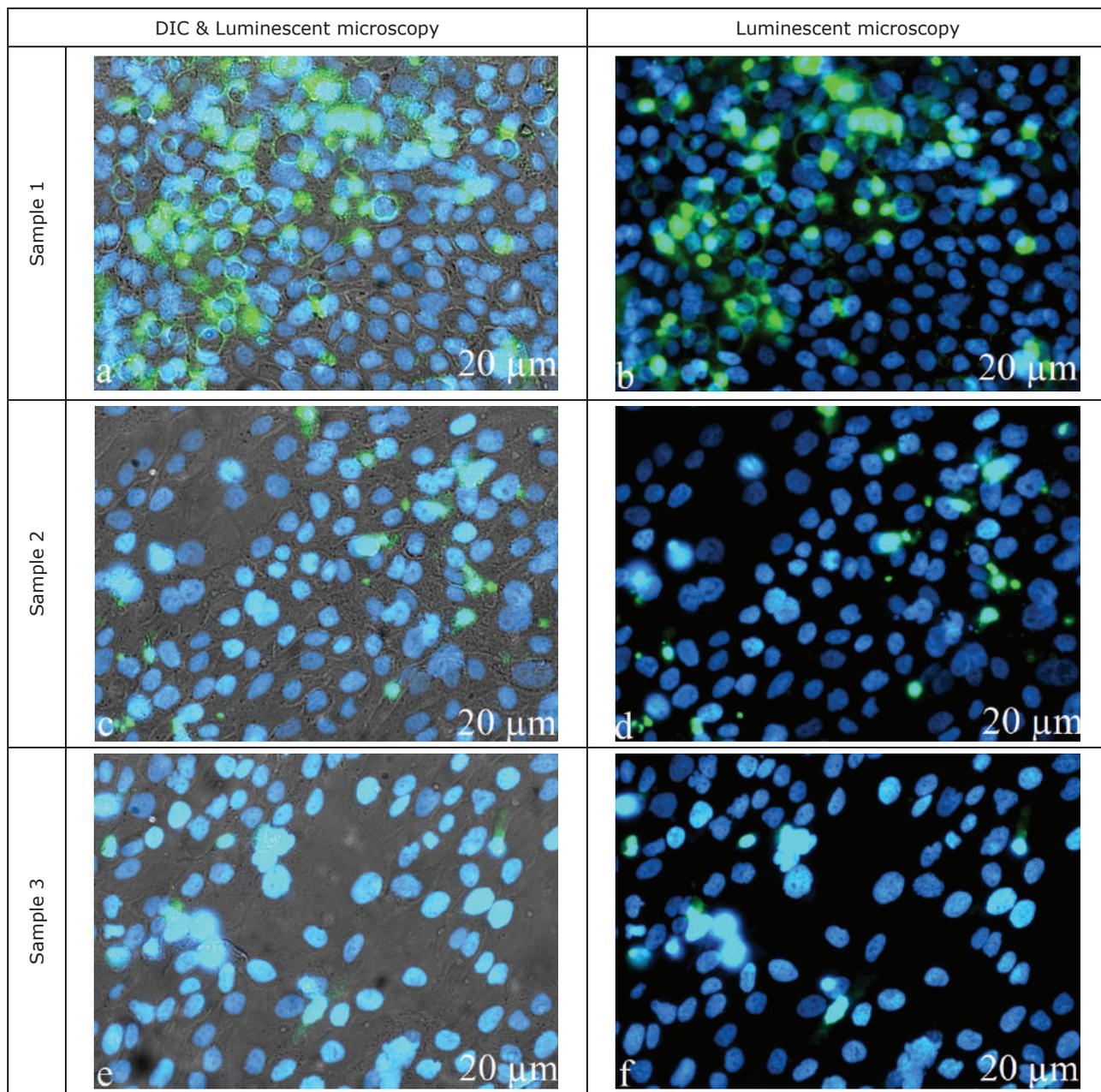


Figure 4. The cytomorphological testing results of hydrogen peroxide formation using Hoechst 33342 and DCFDA-H2 fluorescent dyes in cultured J774.2 macrophages treated with Sample 1, Sample 2 and Sample 3 on the 3rd day of treatment. Blue fluorescence (Hoechst 33342) – the nucleus of living cells, green fluorescence (DCFDA-H2) – generated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

### Discussion

Summarizing the results obtained regarding samples developed by us, as well as the comparison drug Holisal, it was found that they do not affect dense tissues represented by keratinocyte and fibroblast lines. In contrast, macrophages were sensitive to the suppressive effect of Cholisal and Samples 1 and 2. It can be assumed that Proteflazid® stops the suppressive effect of other sample compo-

nents on cells of the macrophage line. Summarizing the obtained results, it can be stated that Sample 1 (gel base, BH in the form of a solution (Tantum Verde®)) demonstrated weak prooxidant properties. While Samples 2 (gel base, powdered BH (T-Sept®)) and 3 (gel base, powdered BH (T-Sept®) and Proteflazid®) demonstrated pronounced antioxidant properties. The evaluation of pro- and antioxidant properties of various modifications

на макрофаги, за умов впливу впродовж трьох діб. Ядра живих клітин візуалізуються в блакитній флуоресценції, тоді як зелена флуоресценція вказує на концентрацію пероксидних радикалів. Слід зазначити, що в наших експериментах Зразок 2 і Зразок 3 діяли як антиоксиданти. Поява більш інтенсивної зеленої флуоресценції може свідчити про активацію макрофагів, що спостерігається у випадку дії Зразка 1.

### Обговорення

Підсумовуючи отримані результати щодо розроблених нами зразків, а також препарату порівняння «Холісал», встановлено, що вони не впливають на щільні тканини, представлені лініями кератиноцитів і фібробластів. Навпаки, макрофаги були чутливі до супресивної дії «Холісалу» та Зразків 1 і 2. Можна припустити, що «Протефлазід®» припиняє супресивну дію інших компонентів зразка на клітини лінії макрофагів. Підсумовуючи отримані результати, можна констатувати, що Зразок 1 (гелева основа, БГ у формі розчину («Тантум Верде®»)) продемонстрував слабкі прооксидантні властивості. У той час як Зразки 2 (гелева основа, БГ у формі порошку («Т-Sept®»)) і 3 (гелева основа, БГ у формі порошку («Т-Sept®»)) і «Proteflazid®» продемонстрували виражені антиоксидантні властивості. Оцінка про- та антиоксидантних властивостей різних модифікацій гелевої композиції (Зразки 1, 2, 3) з часовою розгорткою за допомогою реактиву DPPH дозволила встановити, що пролонгація ефекту пародонтальної пов'язки у ротовій порожнині на 2 години є оптимальною.

Таким чином, лікарський засіб «Т-Септ®» володіє вираженими знеболювальними та протиексадативними властивостями, чинить активну протизапальну дію. При місцевому застосуванні у вигляді пародонтальної пов'язки з пролонгованою дією відбувається кумуляція бензидаміну в запалених тканинах, де якраз і досягаються ефективні концентрації завдяки його здатності проникати крізь слизову оболонку [35,36].

Включення у розпрацьовану нами ГК «Бензидафлазівердин» флавоноїдного протівірусного препарату прямої дії «Протефлазід®», що має місцеву та загальну дію, підвищує неспецифічну резистентність ор-

ганізму до вірусної та бактерійної інфекцій, і відповідно до отриманих нами результатів, дозволяє забезпечити підвищену антиоксидантну активність пародонтальної пов'язки, зокрема інгібувати перебіг вільнорадикальних процесів, запобігаючи накопиченню продуктів перекисного окиснення ліпідів, посилюючи антиоксидантний статус клітин, зменшуючи інтоксикацію.

Згідно з літературними джерелами [19,20,37-41], «Протефлазід®» має імунотропні властивості, захищає слизові оболонки, нормалізує показники місцевого імунітету (лактоферин, секреторний імуноглобулін А, лізоцим і С<sub>3</sub> компонент комплементу). Даний лікарський засіб індукує синтез ендогенних α- та γ-інтерферонів до фізіологічно функціонального рівня, що підвищує неспецифічну резистентність організму до вірусних та бактерійних інфекцій.

Проведені різними авторами клінічні дослідження показали, що за умов добового прийому з урахуванням вікових доз і схем, застосування препарату «Протефлазід®» не чинить імуносупресивної дії [37-41]. Він також не викликає рефрактерності (гіпореактивності) імунної системи. Не спостерігалось пригнічення синтезу α- і γ-інтерферонів, що дає можливість при необхідності застосовувати препарат тривалий час. «Протефлазід®» є модулятором апоптозу, який підсилює дію апоптозіндукуючих речовин та активує каспазу 9 [38-41]. Це може сприяти елімінації пошкоджених вірусом клітин і первинній профілактиці хронічних захворювань на тлі прихованих вірусних інфекцій, запобігати рецидивам захворювань та пролонгувати період ремісії.

У висновках: дослідження з використанням тестів з барвниками DPPH і DCFDA дозволили підтвердити гіпотезу щодо забезпечення цитопротекторної дії запатентованої гелевої композиції «Бензидафлазівердин» для місцевого застосування у вигляді пародонтальної пов'язки за рахунок антиоксидантної активності флавоноїдного комплексу, яка досягає максимального рівня на 2-гу годину експозиції. Дану гелеву композицію можна рекомендувати для застосування у клінічній пародонтології для медикаментозного супроводу ортодонтичних пацієнтів до та під час активної фази ортодонтичного лікування.

of the gel composition (samples 1, 2, 3) with a time sweep using the DPPH reagent allowed for establishing that the prolongation of the periodontal dressing effect in the oral cavity for 2 hours is optimal.

Thus, T-Sept® has pronounced analgesic and anti-exudative properties, as well as an active anti-inflammatory effect. With local application in the form of periodontal dressing with a prolonged effect, benzydamine accumulates in inflamed tissues, where effective concentrations are precisely achieved due to its ability to penetrate through the mucous membrane [35,36].

Including the direct-acting flavonoid antiviral drug Proteflazid® in the GC Benzidaflaziverdine we developed has a local and general effect, increasing the non-specific body resistance to viral and bacterial infections, which allows ensuring an increased antioxidant activity of the periodontal application. This composition, in particular, inhibits a course of free radical-dependent processes, preventing the accumulation of lipid peroxidation products, strengthening the antioxidant status of cells, and, thus, reducing intoxication.

According to literary sources [19,20,37-41], Proteflazid® has immunotropic properties, protects mucous membranes, normalizes indicators of local immunity (lactoferrin, secretory immunoglobulin A, lysozyme and C<sub>3</sub> component of the complement). This drug induces

synthesis of the endogenous α- and γ-interferons to a physiologically functional level, which increases the body's non-specific resistance to viral and bacterial infections.

Conducted clinical studies showed that under the conditions of daily intake based on age-related doses and application schemes, Proteflazid® does not have an immunosuppressive effect [37-41]. It also does not cause the immune system's refractoriness (hyporeactivity). There was no suppression of synthesis of α- and γ-interferons, which makes it possible to use the drug for a long time if necessary. Proteflazid® is a modulator of apoptosis that enhances the effect of apoptosis-inducing substances and activates caspase 9 [38-41]. This may contribute to eliminating virus-damaged cells and the primary prevention of chronic diseases, latent viral infections, disease relapses, and prolonging remission.

In conclusions: Tests with DPPH and DCFDA dyes were used to confirm the hypothesis regarding the cytoprotective effect of the patented gel composition Benzidaflaziverdine for local application in the form of a periodontal bandage due to the antioxidant activity of the flavonoid complex, which reaches the maximum level at the 2nd hour of exposure. This gel composition can be recommended for use in clinical periodontology for medical support of orthodontic patients before and during the active phase of orthodontic treatment.

## References

1. Ionel A, Lucaciu OP, Flaviu T, Berce C, Toader S, Hurubeanu L, Bondor CI, Câmpian RS. Histopathological and clinical expression of periodontal disease related to the systemic inflammatory response. *Histology and histopathology*. 2017;32(4):379-384. DOI: 10.14670/HH-11-803.
2. Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN. Periodontal diseases. *Nat. Rev. Dis. Primers*. 2017;3:17038. doi: 10.1038/nrdp.2017.38.
3. Nomura Y, Morozumi T, Nakagawa T, Sugaya T, Kawanami M, Suzuki F, Takahashi K, Abe Y, Sato S, Makino-Oi A, et al. Site-level progression of periodontal disease during a follow-up period. *PLoS ONE* 2017;12(12):e0188670. doi: 10.1371/journal.pone.0188670.
4. Li Y, Zhan Q, Bao M, Yi J, Li Y. Biomechanical and biological responses of periodontium in orthodontic tooth movement: Up-date in a new decade. *Int. J. Oral Sci*. 2021;13:20. doi: 10.1038/s41368-021-00125-5.
5. Harris RBS. Chronic and acute effects of stress on energy balance: are there appropriate animal models? *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*. 2015;308(4):R250-R265. doi: 10.1152/ajpregu.00361.2014.
6. Fujita A, Morimatsu M, Nishiyama M, Takashiba S, Naruse K. Effects of mechanical stress on periodontal ligament. *Biophysical journal*, 2018;114(3S1):143A.
7. Semenoff-Segundo A, Borges AH, Bandeca MC. Effect of chronic stress on ligature-induced periodontitis in inbred and noninbred rats: a radiographic study. *The Journal of Contemporary Dental Practice*. 2014;15(5):556-560.
8. Wang Y, Andrukhov O, Rausch-Fan X. Oxidative stress and antioxidant system in periodontitis. *Front Physiol*. 2017 Nov 13;8:910. doi:10.3389/fphys.2017.00910. PMID: 29180965; PMCID: PMC5693842.
9. Hemanth M, Deoli S, Raghuvver HP, Rani MS, Hegde C, Vedavathi B. Stress-induced in the periodontal ligament under orthodontic loading (Part I): A finite element method study using linear analysis. *J Int Oral Health*. 2015 Aug;7(8):129-33. PMID: 26464555; PMCID: PMC4588778.
10. Feng LS, Zhang YM, Kou XX, Yang RL, Liu DW, Wang XD, Song Y, Cao HF, He DQ, Gan YH. Cadherin-11 modulates cell morphology and collagen synthesis in periodontal ligament cells under mechanical stress. *Angle Orthodontist*, 2017; 87(2):193-199. doi: 10.2319/020716-107.1.
11. Pinto AS, Alves LS, Zenkner JE, Zanatta FB, Maltz M. Gingival enlargement in orthodontic patients: Effect of treatment duration. *Am. J. Orthod. Dentofacial. Orthop*. 2017; 152(4):477-482. doi: 10.1016/j.ajodo.2016.10.042.
12. Vincent-Bugnas S, Borsa L, Gruss A, Lupi LL. Prioritization of predisposing factors of gingival hyperplasia during orthodontic treatment: the role of amount of biofilm. *BMC Oral Health*. 2021 Feb 24;21(1):84. doi: 10.1186/s12903-021-01433-2.
13. Giraudi M, Romano F, Aimetti M. An update on herbal anti-inflammatory agents in periodontal therapy. *Clinical Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Drugs*. 2015;2(1):27-37. DOI: 10.2174/221270380201160517185849.
14. Kozłowska A, Szostak-Wegierek D. Flavonoids--food sources and health benefits. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*. 2014;65(2):79-85. PMID: 25272572.
15. Fernández-Rojas B, Gutiérrez-Venegas G. Flavonoids exert multiple periodontic benefits, including anti-inflammatory, periodontal ligament-supporting, and alveolar bone-preserving effects. *Life Sci*. 2018. 15;209:435-454. doi: 10.1016/j.lfs.2018.08.029.
16. Gómez-Florit M, Monjo M, Ramis JM. Quercitrin for periodontal regeneration: effects on human gingival fibroblasts and mesenchymal stem cells. *Scientific Reports*. 2015;5:16593. doi:10.1038/srep16593.
17. Izzi V, Masuelli L, Tresoldi I, Sacchetti P, Modesti A, Galvano F, Bei R. The effects of dietary flavonoids on the regulation of redox inflammatory networks. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2012 Jun 1;17(7):2396-418. doi: 10.2741/4061. PMID: 22652788.
18. Dahiya P, Kamal R, Gupta R, Saini H. Evaluation of the serum antioxidant status in patients with chronic periodontitis. *Indian Journal of Multidisciplinary Dentistry*. 2016;6(1):3-6. DOI: 10.4103/2229-6360.188213.
19. Beketova G., Kuznetsova L., Grynevych O., Broun T., Momotiuk L., Motuzka O., Yashchenko L. Analysis of the clinical trial results of the flavonoid effects on some cellular immunity indicators in children and adults. *Polski Merkuriusz Lekarski*. 2021. XLIX. Issue 289. P. 44-53. : <https://www.researchgate.net/publication/350053947>.
20. Matyash V, Grynevych O, Broun T. PROTEFLAZID®: clinical studies as evidence base of its antiviral activity. *Polski Merkuriusz Lekarski : Organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego*. 2019 Jan;46(271):30-31. PMID: 30810112. <http://europepmc.org/article/med/30810112nj>.
21. Popovych Iiu, Petrushanko TO. Osoblyvosti pidtrymuiuchoi terapii khvorykh z heneralizovanyim parodontytom. *Suchasna stomatolohiia*. 2019;5:20-23. [in Ukrainian].

22. Klitynska OV. Tantum Verde® – preparat vyboru pry kompleksnii terapii stomatolohichnykh zakhvoriuvan. *Suchasna stomatolohiia*. 2017;1:40-41. [in Ukrainian].
23. Hodovanyi OV, Hodovana OI. Osoblyvosti zastosuvannya rozchynu Tantum Verde® u pidhotovtsi parodontolohichnykh khvorykh do ortodontychnoho likuvannya. *Suchasna stomatolohiia*. 2018;5:44-48. [in Ukrainian].
24. Hodovanyi OV, Hodovana OI. Zastosuvannya preparativ «Tantum Verde®» u profilaktytsi ushkodzen slyzovoi obolonky porozhnyny rota pry zastosuvanni neznimnoi ortodontychnoi tekhniki. *Suchasna stomatolohiia*. 2019;3:102-105. [in Ukrainian].
25. Hodovanyi O.V., Hodovana O.I., Shandra M.S., Kliuchivska O.Iu., Stoika R.S. Zasib u formi helevoi kompozytsii «Benzydaflaziverdyne» z prolonhovanoiu diieiu dlia likuvannya zakhvoriuvan tkanyn parodonta. Patent na vynakhid №125272, Ukraina, MPK, A61K 9/00, № a 2020 08196. - Zaiavl. 21.12.2020; Opubl. 09.02.2022. - Biul. №6. [in Ukrainian].
26. Pokhodylo N, Manko N, Finiuk N, Klyuchivska O, Matyichuk V, Obushak M, Stoika R. Primary discovery of 1-aryl-5-substituted-1H-1,2,3-triazole-4-carboxamides as promising antimicrobial agents. *J. of Mol. Struc.* 2021;1246. 131146. doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.Art. 131146.
27. Kuznietsova H., Byelinska I., Dziubenko N., Lynchak O., Milokhov D., Khilya O., Finiuk N., Klyuchivska O., Stoika R., Rybalchenko V. Suppression of systemic inflammation and signs of acute and chronic cholangitis by multi-kinase inhibitor 1-(4-Cl-benzyl)-3-chloro-4-(CF<sub>3</sub>-phenylamino)-1H-pyrrole-2,5-dione. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2021;476(8):3021-35. doi.org/10.1007/s11010-021-04144-y.
28. Berridge MV, Tan AS. Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1993; 303(2): 474-82. doi.org/10.1006/abbi.1993.1311.
29. Panchuk RR, Lehka LV, Terenzi A, Matselyukh BP, Rohr J, Jha AK, Downey T, Kril IJ, Herbacek I, Schoonhoven S, Heffeter P, Stoika RS, Berger W. Rapid generation of hydrogen peroxide contributes to the complex cell death induction by the angucycline antibiotic landomycin E. *Free Radical Biology and Medicine*. 2017; 106:134-47. doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.02.024.
30. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. Single-cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen*. 2000; 35(3): 206-21. doi:10.1002/(sici)1098-2280(2000)35:3<206::aid-em8>3.0.co;2-j.
31. Liao W, McNutt MA, Zhu W-G. The Comet assay: A sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. *Methods*. 2009; 48(1): 46-53. doi:10.1016/j.ymeth.2009.02.016.
32. Rahman MM, Islam MdB, Biswas M, Alam K. In vitro antioxidant and free radical scavenging activity of different parts of *Tabebuia pallida* growing in Bangladesh. *BMC Res Notes* 2015;8:621. https://doi.org/10.1186/s13104-015-1618-6.
33. Asatiani MD, Elisashvili VI, Wasser SP, Reznick AZ, Nevo E. Free-radical scavenging activity of submerged mycelium extracts from higher basidiomycetes mushrooms. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2007;71(12): 3090-92.
34. Kobylinska L, Klyuchivska O, Lesyk R, Stoika R. Targeting of the pro-oxidant-antioxidant balance in vitro and in vivo by 4-thiazolidinone-based chemotherapeutics with anticancer potential. *Ukr. Biochem. J.* 2019;91(2):7-17. doi: https://doi.org/10.15407/ubj91.02.007.
35. Chorny V, Georgiyants V. Development and validation of the method for simultaneous determination of benzydamine hydrochloride and methyparaben in benzydamine dosage form by GC. *Scripta Scientifica Pharmaceutica*. 2019;6(1):28-35.
36. Marushko YuV, Asonov AO. Uzahalnennia danykh zastosuvannya benzydaminu hidrokhlorydu ta tsetylpirydyunii khlorody v klinichnii praktytsi. *Suchasna Pediatriia*. 2018;7(95):83-87. [in Ukrainian].
37. Beketova G, Grynevych O, Solomakha L, Golovnia N. Proteflazid®: Clinical experience in children of young and preschool age – systematic review of postmarketing surveillance. *Polski Merkuriusz Lekarski*. 2018;Tom XLIV;260:75-81.
38. Matyash V, Grynevych O, Broun T. Proteflazid®: treatment of herpesvirus and mixed infections. Meta-analysis of clinical trials results. *Polski Merkuriusz Lekarski*. 2018. Tom X88LIV;263:236-247.
39. Grynevych OS, Kramarev S, Matyash V. PROTEFLAZID®: Specific activity in Epstein-Barr virus infection in a preclinical study; efficacy and safety in the clinic (systematic review). *Japanese Educational and Scientific Review*. 2015;1(9):113-126.
40. Ventskovsky A, Grynevych O, Mikhailov V. Proteflazid® in the treatment and prevention of human herpesvirus infection in pregnant women: a meta-analysis of clinical trials results. *American Journal of Science and Technologies*. 2016;1(21):983-1002.
41. Kramarev S, Mikhailov V, Grynevych O. Meta-Analysis of clinical trials results of efficacy and safety of the drug Proteflazid® in the treatment and prevention of human herpesvirus infection in children. *Asian Journal of Scientific and Educational Research*. 2016;1(19):766-783.