

OPEN ACCESS

DOI: 10.25040/ntsh2024.02.05

Адреса для листування: ЛНМУ імені  
Данила Галицького, вул. Пекарська 69,  
Львів, Україна, 79010

E-mail: ohodovanyi@gmail.com

Надійшла до редакції: 27.10.2024

Взята до друку: 24.11.2024

Опублікована: 27.12.2024

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>

Ростислав Горбай:

<https://orcid.org/0000-0002-5269-9103>

Марина Старикович:

<https://orcid.org/0000-0003-0200-7639>

Ростислав Стойка:

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

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

Особистий внесок авторів

Концепція: Олег Годований, Наталія Чухрай, Олеся Мартовлос, Ольга Ключівська, Ростислав Горбай, Ростислав Стойка;

Збирання й аналізування даних: Олег Годований, Марина Старикович, Ольга Ключівська

Написання статті: Олег Годований, Олеся Мартовлос, Ольга Ключівська, Ростислав Стойка

Редагування та затвердження остаточного варіанту статті: Наталія Чухрай, Олеся Мартовлос, Марина Старикович, Ольга Ключівська, Ростислав Горбай, Ростислав Стойка

**Дозвіл комісії з біоетики про проведення досліджень:** протоколи №9 від 21.12.2020 та №8 від 18.10.2021 були затверджені Комісією з біоетики наукових досліджень, експериментальних розробок та наукових робіт у ЛНМУ імені Данила Галицького.

**Фінансування:** дослідження є фрагментом науково-дослідної роботи «Стан здоров'я зубів та його корекція на основі систематичного аналізу клініко-лабораторних, рентгенологічних, морфологічних, функціональних, естетичних параметрів у людей різного віку» (номер державної реєстрації 0120U002143).



© Всі автори, 2024

**Експериментальна модель дослідження відповіді клітин на вплив пародонтальних гелевих композицій та брекетів, потенційованих електрофорезом**

Олег Годований<sup>1</sup>, Наталія Чухрай<sup>1</sup>, Олеся Мартовлос<sup>1</sup>,  
Ольга Ключівська<sup>2</sup>, Ростислав Горбай<sup>3</sup>,  
Марина Старикович<sup>2</sup>, Ростислав Стойка<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>Інститут біології клітини

Національної Академії Наук України, Львів Україна

<sup>3</sup>Науково-дослідний центр апоптозу,

Дитяча лікарня Науково-дослідного інституту

Східного Онтарію, Оттава, Онтарію, Канада

**Метою** цього дослідження було вивчення ефективності проникнення гелевої композиції на основі флавоноїдно-го комплексу та бензидаміну гідрохлориду (запатентована пародонтальна гелева композиція «Бензидафлазівердин» (ГКБ)) в імітаційне середовище, наближене до тканин пародонту, що містило у своєму складі три типи клітин ссавців і людини в напіврідкому агарі з використанням процедури електрофорезу.

**Методи дослідження.** Досліджували ефективність проникнення ГКБ і препаратів порівняння («Холісал», «Генгігель») в імітаційне середовище тканин пародонту на експериментальній моделі *in vitro*, що містила три типи тест-клітин, вирощених у середовищі з напіврідким агаром: мишачі фібробласти лінії BALB-3T3, мишачі макрофаги лінії J774.2 та псевдонормальні людські кератиноцити лінії HaCaT. Для електрофорезу використано прилад «Потік-1» (СЗМО). Для оцінки впливу металічних елементів в мікрооточенні тестованих клітин використано невживані та відпрацьовані в порожнині рота ортодонтичні брекети. Метод МТТ-тестування полягав у еквівалентному оцінюванні кількості живих клітин. Для визначення рівня продукування активних форм кисню (АФК) застосовували фарбування клітин пероксид-специфічним люмінесцентним зондом дигідроетидієм (DHE).

**Результати.** ГКБ виявляла кращу за препарати порівняння («Холісал» та «Генгігель») спроможність сприяти проліферації усіх типів досліджуваних клітин. Процедура електрофорезу

зу потенціювала цитостимулювальну і захисну дію ГКБ при нанесенні засобу на «+» електрод. Дослідження з використанням експериментальної моделі клітинних культур в імітаційному се-

## An experimental model for studying the response of cells to the effects of periodontal gel compositions and braces potentiated by electrophoresis

Oleg Hodovanyi<sup>1</sup>, Natalya Chukhray<sup>1</sup>, Olesia Martovlos<sup>1</sup>, Olha Klyuchivska<sup>2</sup>, Rostyslav Horbay<sup>3</sup>, Marina Strykovych<sup>2</sup>, Rostyslav Stoika<sup>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

<sup>3</sup>Apoptosis Research Centre, Children's Hospital of Eastern Ontario Research Institute, Ottawa, Ontario, Canada

**Aim:** investigation of the effectiveness of penetration of a dental gel composition based on a flavonoid complex and benzydamine hydrochloride (patented periodontal gel composition Benzidaflaziverdin (GCB)) into the simulated environment of periodontal tissues consisting of three types of mammalian and human cells in semi-solid agar using an electrophoresis procedure. Research methods. The penetration of GCB and comparison drugs (Cholisal, Gengigel®) into the microenvironment of periodontal tissues was explored in vitro, consisting of three types of cells grown in semi-solid agar. These are murine BALB-3T3 fibroblasts, murine J774.2 macrophages, and pseudo-normal human HaCaT keratinocytes. Electrophoresis was conducted using the Potik-1 device (SMEP). Unused and used orthodontic braces were applied in the oral cavity to assess the influence of metal elements in the cellular microenvironment. Cell viability was quantified using an MTT test. The reactive oxygen species (ROS) level was determined after cell staining with fluorescent dye dihydroethidium (DHE).

**Results.** GCB showed a higher ability to promote the proliferation of all studied cells compared with Cholisal and Gengigel® drugs. Electrophoresis potentiated cytostimulatory and protective effects of GCB when applied to + electrode. This evidences that the duration of electrophoresis conducted in clinics can be reduced from 15–20 min per jaw to 15–50 sec. In comparison, the prolongation of GCB action and local delivery of flavonoid complex and benzydamine hydrochloride into the microenvironment were maintained. Unused braces were shown to lose metal cations more intensively in the culture microenvironment, thus increasing oxidative stress. It is suggested that GCB modulates the ability of cells to withstand oxidative stress.

**Conclusions.** GCB may be recommended as a new product for periodontal dressing in clinical periodontics and orthodontics.

**Keywords:** antioxidant activity, periodontal gel composition, braces, electrophoresis, cytoprotection, biotesting, fibroblasts, macrophages, keratinocytes, biological tissue simulation medium, periodontium.

## OPEN ACCESS

DOI: 10.25040/ntsh2024.02.05

**For correspondence:** Danylo Halytsky  
Lviv National Medical University (LNMU),  
Pekarska st, 69, Lviv, Ukraine, 79010

**E-mail:** ohodovanyi@gmail.com

**Received:** 27 Oct, 2024

**Accepted:** 24 Nov, 2024

**Published:** 27 Dec, 2024

### 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>

Rostyslav Horbay:

<https://orcid.org/0000-0002-5269-9103>

Marina Strykovych:

<https://orcid.org/0000-0003-0200-7639>

Rostyslav Stoika

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

### Authors Contributions

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

**Results of study:** Oleg Hodovanyi, Marina Strykovych, Olha Klyuchivska;

**Writing:** Oleg Hodovanyi, Olesia Martovlos, Olha Klyuchivska, Rostyslav Stoika;

**Review & editing:** Natalya Chukhray, Olesia Martovlos, Marina Strykovych, Olha Klyuchivska, Rostyslav Horbay, Rostyslav Stoika.

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

**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 of LNMU.

**Funding:** The study is a fragment of scientific research work "The state of dental health and its correction based on the systematic analysis of clinical and laboratory, radiological, morphological, functional, aesthetic parameters in people of different ages" conducted at the Department of Orthodontics at LNMU (State registration number 0120U002143).



© All authors, 2024

редовищі продемонструвало значний потенціал електрофоретичної процедури для посилення проникнення компонентів ГKB углиб моделі тканин пародонту. Це є доказом того, що тривалість процедури електрофорезу в клініці може бути скорочена зі стандартних 15 – 20 хв на одну щелепу до 15-50 сек. При цьому зберігалася пролонгація дії ГKB і спрямоване локальне доставляння її активних компонентів (флавоноїдного комплексу та бензидаміну гідрохлориду) вглиб середовища. Також встановлено, що невживані брекети більш інтенсивно втрачали катіони металів в культуральному середовищі, посилюючи оксидативний стрес. Зроблено припущення, що за таких умов ГKB модулює здатність клітин протистояти оксидативному стресу.

**Висновки.** ГKB можна рекомендувати як новий стоматологічний засіб у клінічній пародонтології та ортодонтології для пародонтальних пов'язок.

**Ключові слова:** антиоксидантна активність, пародонтальна гелева композиція, брекети, електрофорез, цитопротекторність, біотестування, фібробласти, макрофаги, кератиноцити, імітаційне середовище біологічних тканин, пародонт.

### Вступ

Захворювання тканин пародонту в пацієнтів молодого та дорослого віку на тлі зубощелепних аномалій (ЗЩА) призводять до критичної втрати кісткової тканини альвеолярного відростка щелеп, що часто стає підґрунтям для виникнення зубощелепних деформацій внаслідок зміщення розташування зубів [1; 2; 3]. Тому своєчасна діагностика та ортодонтична корекція ЗЩА є вкрай важливою. Проте вплив незнімної ортодонтичної апаратури на тканини пародонту на тлі навіть незначної втрати ремісії запального або дистрофічно-запального патологічного процесу, може бути непередбачуваним [4; 5; 6]. Незнімна ортодонтична апаратура, яку застосовують в активному періоді ортодонтичного лікування патології прикусу, здатна провокувати запальну реакцію навколо зубів, які зміщуються. Вивільнення різноманітних медіаторів запального процесу (зокрема, і цитокінів) ініціює каскад реакцій у пародонтальній зв'язці, яка бере участь у ремоделюванні тканин і переміщенні зубів [7; 8]. Отже, порушення окислювально-антиоксидантного балансу, що супроводжує ці процеси, може призводити до розвитку оксидативного стресу, для якого характерне значне посилення перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), накопичення вільних радикалів і зниження активності системи антиоксидантного захисту [9; 10; 11; 12].

Однією з ключових ланок біологічної відповіді на ортодонтичне лікування незнімною ортодонтичною апаратурою є оксидативний стрес, який у пацієнтів із захворюваннями пародонта пов'язаний із різними чинниками,

зокрема, прозапальними факторами. Тому актуальним є розроблення патогенетично спрямованих засобів і методів для усунення запального процесу та зниження рівня місцевих стрес-модульованих порушень метаболізму в тканинах пародонту до і під час активного періоду ортодонтичного лікування.

Флавоноїди є поліфенольними сполуками рослинного походження, що привертають значну увагу дослідників завдяки їхній різноманітній біологічній активності. Сприятливим може бути вплив флавоноїдів на клітини пародонту, включно з епітелійними клітинами ясен, фібробластами ясен і фібробластами пародонтальних зв'язок, а також остеобластами, що підтримують альвеолярну кістку [13]. Флавоноїди є також перспективними лікарськими засобами для профілактики і зменшення ознак запальних і дистрофічно-запальних захворювань пародонту, зокрема на тлі місцевого оксидативного стресу.

Електрофорез із використанням постійного електричного струму вважають ефективним методом введення лікарських речовин у тканини організму, зокрема під час лікування захворювань тканин пародонту. За допомогою електрофорезу в тканини пародонту можна вводити лише розчинні у воді патогенетично спрямовані лікарські речовини. Після їх потрапляння в тканини утворюється іонне депо, яке поступово розсмоктується і забезпечує тривале надходження лікарської речовини у кров. Під час електрофорезу може наставати гіперемія тривалістю до 1.5 – 2 год, яка стимулює процеси обміну біологічно активних речовин і є джерелом трива-

## Introduction

Periodontal diseases are observed in young and adult patients with dentoalveolar anomalies (DA) that lead to the loss of bone tissue in the alveolar ridge of the jaws. Often, this leads to dentoalveolar deformities caused by a shift in teeth position [1; 2; 3]. Thus, it is essential to diagnose orthodontic defects promptly and correct them. However, the effect of fixed orthodontic appliances on periodontal tissues with even slight loss of remission of inflammatory or dystrophic-inflammatory pathologies may be unpredictable [4; 5; 6]. Fixed orthodontic appliances used in an active period of orthodontic treatment of malocclusion may provoke an inflammatory response around the displaced teeth. A release of specific mediators of the inflammatory process (e.g., cytokines) initiates a cascade of reactions in the periodontal ligament involved in tissue remodeling and tooth movement [7; 8]. Accordingly, the disturbance of the oxidative-antioxidant balance accompanying these processes can lead to the development of oxidative stress characterized by a significant increase in lipid peroxidation (LPO), accumulation of free radicals and a decrease in the activity of the antioxidant defense system [9; 10; 11; 12].

Various factors may cause oxidative stress observed in patients with periodontal disease, and proinflammatory factors belong to key links in the biological response to the orthodontic treatment with fixed orthodontic appliances. Thus, pathogenetically targeted agents and methods should be used to eliminate the inflammatory processes and reduce the level of local stress-modulated metabolic disorders in the periodontal tissues before and during the active period of orthodontic treatment.

Flavonoids are of great interest to researchers due to their diverse biological activities. They may benefit the periodontal cells, such as gingival epithelial cells, gingival fibroblasts, periodontal ligament fibroblasts, and osteoblasts that support the remodeling and regeneration of the alveolar bone [13]. Flavonoids may be used as promising drugs to prevent and reduce inflammation and dystrophic-inflammatory periodontal diseases, in particular, accompanied by local oxidative stress.

The use of direct electric current in electrophoresis is considered an effective method of drug administration into body tissues, particularly during the treatment of periodontal diseases. Only water-soluble drugs with pathogenetic effects can be introduced into periodontal tissues with electrophoresis. After their entry, an ionic depot is formed, which can be gradually dissolved to ensure long-term drug supply into the bloodstream. During electrophoresis, hyperemia may occur for 1.5-2 h, stimulating the metabolism of biologically active substances and prolonging nerve-reflex irritation. All this enhances tissue regeneration and the resorption of decay products [14]. Gum electrophoresis minimizes the adverse effects of drugs since only their biologically active components are injected.

In this work, a preclinical study was conducted using electrophoresis with an inclusion of the authors' developed and patented gel composition Benzidaflaziverdin (GCB), consisting of two active components – a flavonoid complex (Proteflazid® drops) and benzydamine hydrochloride (T-Sept® tablet form, which is a non-steroidal anti-inflammatory drug for topical use in the oral cavity) on a gel base (sodium alginate, nipagin and water for injections) [15]. Investigating the morphological and functional characteristics of mammalian cells, particularly the level of cellular stress in response to electric current, along with assessing the intensity of reactive oxygen species (ROS) production, is relevant. This makes it possible to observe the reactions of living cells to stressful influences in real-time.

The aim: To investigate the effectiveness of penetration of a dental gel composition based on a flavonoid complex and benzydamine hydrochloride (patented periodontal gel composition Benzidaflaziverdin (GCB)) into the simulated environment of periodontal tissues consisting of three types of mammalian and human cells in semi-solid agar using an electrophoresis procedure.

## Methods

The effectiveness of GCB penetration and comparison drugs (positive control – Cholisal gel (Elfa, Poland) and Gengigel® (hyaluronic acid (HA), (RICERFARMA s.r.l., Italy); negative control – Doxorubicin (Kyivmedpreparat,

лого нервово-рефлекторного подразнення. Усе це посилює процеси регенерації тканин і розсмоктування продуктів розпаду [14]. Наяснений електрофорез зводить до мінімуму побічну для організму дію лікарських препаратів (системні реакції організму), оскільки у тканини вводиться лише їхня біологічно активна складова.

У цій роботі виконано доклінічне дослідження із застосуванням електрофорезу з долученням розробленої авторами і запатентованої гелевої композиції «Бензидафлазівердин» (ГКБ), що містить у своєму складі два активних компоненти – флавоноїдний комплекс (краплі «Протефлазід» та бензидаміну гідрохлориду – таблетована форма «Т-Септ», що є нестероїдним протизапальним препаратом для місцевого застосування у порожнині рота) на гелевій основі (альгінат натрію, ніпагін та вода для ін'єкцій) [15]. Актуальними є дослідження морфологічних характеристик клітин ссавців, зокрема рівня клітинного стресу у відповідь на вплив електричного струму з оцінкою інтенсивності продукування активних форм кисню (АФК) (ROS). Це дає змогу спостерігати за реакціями живих клітин на стресові впливи у режимі реального часу.

Метою цієї роботи було вивчення ефективності проникнення гелевої композиції на основі флавоноїдного комплексу та бензидаміну гідрохлориду (ГКБ) в імітаційне середовище, наближене до тканин пародонту, що містить три типи клітин ссавців і людини в напіврідкому агарі з використанням процедури електрофорезу.

### **Матеріали і методи.**

Досліджували ефективність проникнення ГКБ і препаратів порівняння (позитивний контроль – «Холісал» (Ельфа, Польща) і «Генгігель» (гіалуронова кислота (ГК, НА), RICERFARMA s.r.l., Italy); негативний контроль – Доксорубіцин (Київмедпрепарат, Україна)) в імітаційне середовище біологічних тканин на експериментальній моделі *in vitro*, що містила три типи тест-клітин, вирощених у середовищі з напіврідким агаром. Об'єктом дослідження були мишачі фібробласти лінії BALB-3T3, мишачі макрофаги лінії J774.2 та псевдонормальні людські кератиноцити лінії HaCaT.

Для оцінки впливу певних металічних елементів в мікрооточенні тестованих клітин використано невживані брекетти (G&H® miniPrevail® TWIN Bracket System; на один дослід використовували 36 брекетів) та брекетти, що були забрані з порожнини рота ортодонтичних пацієнтів після 18 – 20 місяців завершеного активного ортодонтичного лікування (на один дослід використовували 36 брекетів). Для імітації щільності міжклітинного середовища біологічних тканин до культури клітин було додано 0,66 % агару (Agar-Agar, Low Melting Agar, SERVA Feinbiochemica, Heidelberg, Germany). Для електрофорезу використано прилад «Потік-1» (СЗМО).

У 12-ти лункових пластикових мулячашках нарощували клітини певної лінії та застосовували електроди з алюмінієвої фольги (Mini Bin™ aluminum foil Z691569 Heathrow Scientific HS23534A для MERK). Тестовані зразки в одній лунці наносили на електрод (+), а в іншій – на (-). Третя лунка була контролем (відсутній препарат) для дослідження проходження електричного струму. Тривалість процедури (експозиція) – від 5 до 20 сек при силі струму 0.2 – 0.4 mA. Вплив ГКБ, препаратів порівняння та різних режимів електрофорезу на життєздатність мишачих фібробластів лінії NIH-3T3, мишачих макрофагів лінії J774.2 та псевдонормальних кератиноцитів людини лінії HaCaT оцінювали за допомогою методу МТТ-тестування (Sigma, США) [16; 17; 18]. Суть методу полягала в кількісному оцінюванні перетворення МТТ-реагенту за участі мітохондріальних дегідрогеназ живих клітин. Продукування формазану вимірювали на багатоканальному мікрофотометрі BioTek 76883 (BioTek, США). Для визначення рівня продукування активних форм кисню (АФК) застосовували фарбування клітин пероксидспецифічним люмінесцентним зондом дигідроетидієм (DHE). Для візуалізації функціональної активності макрофагів лінії J774.2 перед фотографуванням зразків клітинних культур макрофагів проводили пре-інкубацію з клітинами дріжджів *Saccharomyces pastorianus* (SafLager™ S-23, Fermentis Німеччина).

Перегляд піддослідних клітинних культур та попередню / проміжну оцінку виживаності клітин виконували на інвертованому світловому мікроскопі DELTA (DELTA Optical, China). Фотографування проводили на лю-

Ukraine)) into imitation environment of biological tissues was studied in an *in vitro* model consisting of three types of cells grown in semi-solid agar medium. Murine BALB-3T3 fibroblasts, murine J774.2 macrophages and pseudo-normal human HaCaT keratinocytes were treated.

To evaluate the effect of certain metal elements in the microenvironment of tested cells, non-used braces (G&H® miniPrevail® TWIN Bracket System) were applied (36 braces per experiment) and braces that were removed from the mouths of orthodontic patients after 18–20 months of completed active orthodontic treatment (36 braces per experiment). To mimic the density of the intercellular medium of the biological tissues, 0.66% agar was added to the cell culture medium (Agar-Agar, Low Melting Agar, SERVA Feinbiochemica, Heidelberg, Germany). Electrophoresis was conducted with a Potik-1 device (SMEP).

Cells of a specific lineage were grown in a 12-well plastic multiwell, and aluminum foil electrodes were used (Mini Bin™ aluminum foil Z691569 Heathrow Scientific HS23534A for MERK) for electrophoresis. Test samples were applied onto the (+) electrode in one well and onto the (-) electrode in the other. The third well was used as a control (no drug) to study the passage of electric currents. The exposure was from 5 to 20 sec at a 0.2–0.4 mA current. The GCB was used as a comparison drug, and different electrophoresis modes on the viability of mouse NIH-3T3 fibroblasts, mouse J774.2 macrophages and pseudo-normal human HaCaT keratinocytes were evaluated using the MTT-test (Sigma, USA) [16, 17, 18]. This method quantifies the conversion of the MTT reagent with the mitochondrial dehydrogenases of living cells. Formazan production was measured with a BioTek 76883 multichannel microphotometer (BioTek, USA). The reactive oxygen species (ROS) level was estimated with a peroxide-specific fluorescent dye dihydroethidium (DHE). Functional activity of J774.2 macrophages towards *Saccharomyces pastorianus* yeast (SafLager™ S-23, Fermentis Germany) was monitored.

Cell cultures were viewed, and preliminary/intermediate cell survival was assessed under a DELTA inverted light microscope (DEL-

TA Optical, China). Photographs were taken using the Zeiss fluorescence microscope (Carl Zeiss, Germany) with the AxioImager A1 camera included in the microscope package at ~400x magnification in the corresponding excitation and emission regions. The cell nucleus was stained with DNA-specific fluorescent dye Hoechst 33342, and the accumulation of peroxide radicals was visualized with the DHE dye.

### Statistical processing of results

Experiments were conducted in triplicate in each variant. Each indicator shown in the figures (the ordinate of the columns in the diagrams) corresponds to the average value "M" calculated based on the results of three measurements in one of several similar experiments. The average error "m" of the obtained result was calculated using the root average square error "σ" value. In figures, it is represented near each indicator by a vertical line, the length of which corresponds to the value of m. A computer based on Phenom II X4 975 with Windows 7 64-bit operating system (Microsoft, USA) was used for the task. Statistical processing of the data was performed in MS Excel 2010 (Microsoft, USA).

### Results

Our patented GCB was the best to promote the proliferative activity of three types of cells- (keratinocytes, fibroblasts and macrophages – and significantly outperformed the effect of the comparison drugs Cholisal and Gengigel® (HA). Electrophoresis of cellular systems potentiated the cytostimulatory and protective effects of GCB when applied to the + electrode.

The results of studying the tested drugs individually and after electrophoretic exposure to target cells are shown in Fig. 1. At using HaCaT keratinocytes, electrophoresis, regardless of which drug was used, both in brace presence and absence, did not significantly affect cell number. At later stages (7 days of the experiment), adding GCB did not influence the intact cells (zero control) and comparison drug effect. However, when electrophoresis was combined with the effect of comparison drugs, direct electric current lowered the suppressive effect of Cholisal and Gengigel®. Additional studies are needed to

мінесцентному мікроскопі Zeiss (Carl Zeiss, Німеччина) за допомогою камери AxioImager A1, яка входить у комплектацію мікроскопа, за збільшення ~400 разів у відповідних ділянках збудження та емісії. Вміст ядра клітин фарбували ДНК-специфічним флуоресцентним барвником Hoechst 33342, візуалізацію накопичення пероксидних радикалів виконували після додавання дигідроетидію.

Правил біоетики дотримувалися відповідно до вимог основних біоетичних положень Європейської конвенції про захист прав людини (від 04.04.1997) та Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації про етичні принципи проведення медичних досліджень за участю людей (1964 – 2008 рр.). Протоколи N9 від 21.12.2020 та N8 від 18.10.2021 були затверджені Комісією з біоетики наукових досліджень, експериментальних розробок та наукових робіт у Львівському національному медичному університеті імені Данила Галицького.

Статистичне опрацювання результатів. Досліди проводили у трьох паралелях у кожному варіанті. Кожний показник, наведений на рисунках (ордината стовпчиків на діаграмах) відповідає середньому значенню «M», розрахованому за результатами трьох вимірювань в одному з декількох однотипних експериментів. Середню похибку «m» отриманого результату вираховували за величиною середньої квадратичної похибки «σ». На рисунках вона наведена біля кожного показника вертикальною лінією, довжина якої відповідає величині m. Для роботи використовували комп'ютер на основі Phenom II X4 975 з операційною системою Windows 7 64-bit (Microsoft, США). Статистичне опрацювання отриманих даних виконували в програмі MS Excel 2010 (Microsoft, США).

**Результати.** Встановлено, що запатентована нами ГKB найкраще сприяла проліферативній активності всіх трьох типів піддослідних клітин (кератиноцити, фібробласти і макрофаги) і достовірно переважала дію препаратів порівняння «Холісал» і «Генгігель» (ГК). Електрофорез клітинних систем потенціював цитостимулювальні і протекторні ефекти ГKB за нанесення цього засобу на «+» електрод.

На рис. 1 наведені результати дослідження тестованих засобів осібно та після електро-

форетичного впливу на клітини-мішені. Для кератиноцитів лінії HaCat процедура електрофорезу, незалежно від того, які лікарські препарати були застосовані, за присутності брекета, так само як і за його відсутності, вірогідно не впливала на кількість клітин в тестованій популяції. На пізніх термінах досліду

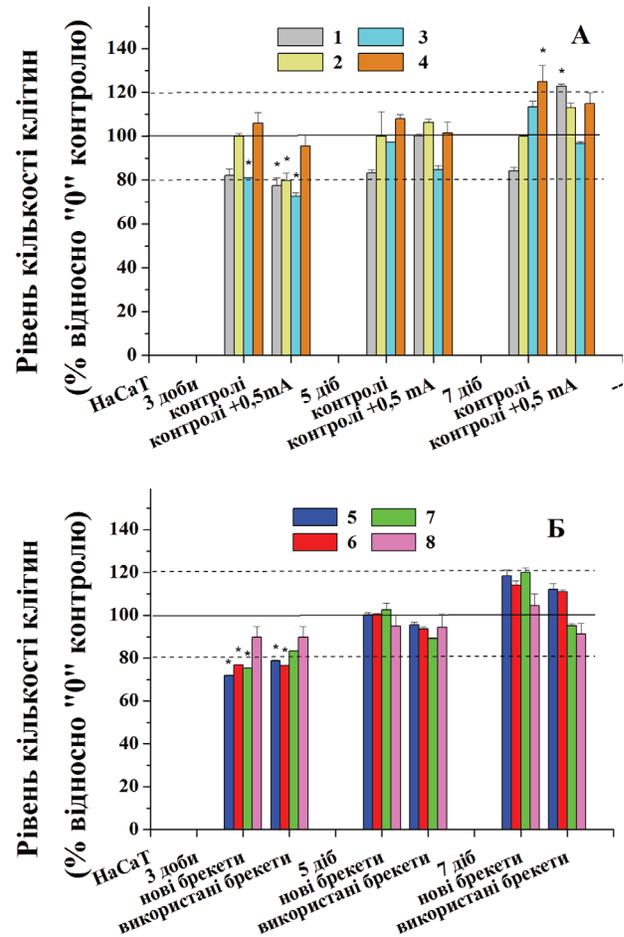


Рисунок 1. Результати дослідження біосумісності ГKB, препаратів порівняння і зразків брекетів щодо людських кератиноцитів лінії HaCat (тест МТТ)

А – наведений нульовий контроль (інтактні клітини) та результати дії ГKB і препаратів порівняння, Б – зразки невживаних брекетів і брекетів, відпрацьованих у порожнині рота впродовж 18 – 20 місяців, для оцінки впливу присутності цих елементів у мікрооточенні тестованих клітин: 1 – препарат порівняння «Холісал»; 2 – Контроль «0» – інтактна культура клітин; 3 – препарат порівняння «Gengigel»; 4 – дослідний препарат ГKB; 5 – нанесення ГKB на катод («-»); 6 – нанесення ГKB на анод («+»); 7 – брекет без нанесення ГKB під впливом електричного струму; 8 – брекет без нанесення ГKB і без впливу електричного струму.

Примітка: зразки тестованих препаратів вносили в культуральне середовище в кількості 0.5 % в об'ємних одиницях. \* P≤0,05; щодо контролю «0».

explain possible mechanisms of such cytoprotective effects.

The results of the effect of the tested agents and unused and used braces in combination with electrophoresis on NIH 3T3 fibroblasts are presented in Fig. 2. In these cells, as well as in HaCat keratinocytes, the lowering of the suppressive effect of the comparison Cholisal under a direct electric current from  $77.3 \pm 3.6\%$  to  $97.2 \pm 0.2\%$  was observed. For NIH 3T3 fibroblasts, the electrophoresis depended on how the GCB was applied (application to the + or - electrodes) on day 3 of the experiment in the presence of new braces, negatively affected the number of cells in the population:  $79.6 \pm 1.4\%$  when applying GCB "-" versus  $106.8 \pm 1.7\%$  when applying to the "+" electrode, and  $58.7 \pm 0.5\%$   $P \leq 0.01$  when applying GCB "-" versus  $85.8 \pm 3.2\%$  when applying to the "+" electrode on day 5. However, on day 7, there was no significant decrease in the cell number in the wells with unused braces. A reduction in cell number in the presence of the comparison Cholisal was noticeable on the 3rd ( $77.3 \pm 1.2\%$ ) and the 7th ( $61.9 \pm 2.8\%$ ) days. This phenomenon was especially pronounced on the 5th day (decrease to  $51.2 \pm 1.46\%$ ,  $P \leq 0.01$ ). Electrophoresis partially eliminated the adverse effect as a decrease in the cell under the influence of Cholisal regarding the comparing drug on the 3rd day ( $99.2 \pm 5.7\%$ ). However, that effect was increased on the 5th day ( $38.1 \pm 0.3\%$ ,  $P \leq 0.005$ ). It is of interest that on the 7th day, the adverse effect of Cholisal was completely compensated ( $101.8 \pm 3.8\%$ ). For unknown reasons, on the 5th day, the adverse effect was even more pronounced than without electrophoresis. Most likely, such dynamics in the cell number were due to the leaching of metal cations from the unused braces.

The study results of the effect of the investigated substances in combination with electrophoresis on macrophages are presented in Fig. 3. For these cells, electrophoresis may play a regulatory role. On the 3rd day, the stressing effect of electrophoresis remained pronounced ( $63.8 \pm 0.1\%$ ), and it was effectively eliminated in the presence of GCB ( $85.5 \pm 5.5\%$ ) and Gengigel® ( $107.2 \pm 0.9\%$ ). On the 5th day, these patterns persisted, but the deviations

were no longer significant. On the 7th day, a decrease in the cell number under the influence of electrophoresis was detected, and it was effectively lowered in the presence of GCB ( $120.4 \pm 1.0\%$  vs.  $88.5 \pm 0.9\%$  for the Gengigel®, or  $95.2 \pm 0.1\%$  in the control group). In this case, the effect of electrophoresis without using the studied drugs was monitored as a control.

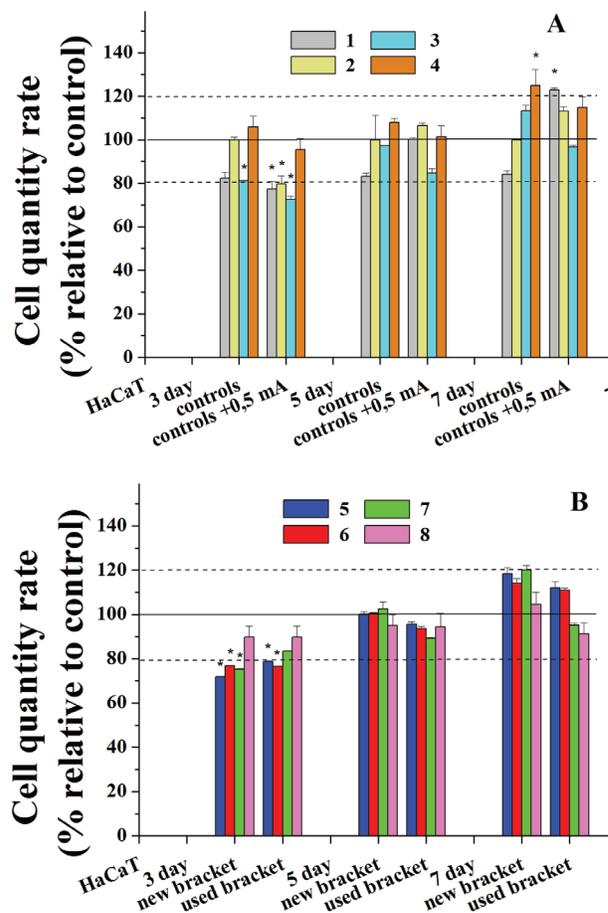


Figure 1. Results of the biocompatibility study of GCB, comparison of the products and braces samples against human keratinocytes of the HaCaT line (MTT test)

**A** – intact cell (zero control) and the results of the effect of GCB and comparison drugs (positive control), **B** – samples of unused braces and braces used in the oral cavity for 18–20 months to assess the effect of the presence of these elements in the microenvironment of the tested cells: 1. Comparison drug Cholisal; 2. Control "0" – intact cell culture; 3. Comparison drug – Gengigel®; 4. Experimental drug GCB; 5. Application of GCB to the cathode ("+" ); 6. Application of GCB to the "+" electrode; 7. Brace without applying GCB under the influence of electric current; 8. Brace without applying GCB and exposure to electric current. **Note:** Samples of test drugs were added to the culture medium in 0.5% volume units. \* -  $P \leq 0.05$ ; for the control – intact cells.

(7 діб) додавання ГКБ також не мало вірогідного впливу, порівняно з дією нульового контролю і препаратів порівняння. Водночас, за поєднання електрофорезу з дією препаратів порівняння постійний електричний струм нівелював пригнічувальну дію препаратів «Холісал» і «Генгігель». Для пояснення можливих механізмів таких цитопротекторних ефектів необхідне проведення додаткових досліджень.

На рис. 2 наведені результати дії тестованих засобів і невживаних та використаних брекетів у поєднанні з електрофорезом на фібробласти лінії NIH 3T3. При використанні цих клітин, як і при використанні кератиноцитів лінії HaCat, ми спостерігали ефект нівелювання постійним електричним струмом пригнічувальної дії препарату порівняння «Холісал» від  $77.3 \pm 3.6\%$  до  $97.2 \pm 0.2\%$ . Для фібробластів лінії NIH 3T3 процедура електрофорезу залежно від того, як була застосована ГКБ (нанесення на «+» чи «-» електроди) на третю добу дослідження за присутності нових брекетів негативно впливала на кількість клітин в популяції:  $79.6 \pm 1.4\%$  при нанесенні ГКБ «-» проти  $106.8 \pm 1.7\%$  за нанесення на «+» електрод, та  $58.7 \pm 0.5\%$ ,  $P \leq 0.01$ , при застосуванні ГКБ «-» проти  $85.8 \pm 3.2\%$  нанесення на «+» електрод на п'яту добу. Водночас на сьому добу у лунках з невживаними брекетами не було виявлено вірогідного зниження кількості клітин. Зниження кількості клітин виявлено за присутності препарату порівняння «Холісал» – ефект був помітним на третю ( $77.3 \pm 1.2\%$ ) і сьому ( $61.9 \pm 2.8\%$ ) добу. Особливо це явище було помітне на п'яту добу (зниження до  $51.2 \pm 1.46\%$ ,  $P \leq 0.01$ ). Електрофорез частково усував негативний ефект зменшення кількості клітин у популяції за дії препарату порівняння «Холісал» на третю добу ( $99.2 \pm 5.7\%$ ), причому цей ефект посилювався на п'яту добу ( $38.1 \pm 0.3\%$ ,  $P \leq 0.005$ ). Викликав зацікавлення той факт, що на сьому добу дослідження відбувалася повна компенсація негативного впливу препарату «Холісал» ( $101.8 \pm 3.8\%$ ). З невідомих причин, на п'яту добу дослідження негативний ефект був ще більш очевидний, ніж без застосування електрофорезу. Найбільш імовірною причиною такої динаміки в культурі клітин може бути вимивання катіонів металів з невживаних брекетів.

На рис. 3 наведено результати вивчення впливу досліджуваних речовин у поєднанні з елек-

трофорезом на макрофаги. Для цих клітин процедура електрофорезу має регуляторне значення. На третю добу дослідження залишався очевидним стресорний ефект від процедури електрофорезу ( $63.8 \pm 0.1\%$ ), який ефективно усувався за присутності ГКБ ( $85.5 \pm 5.5\%$ )

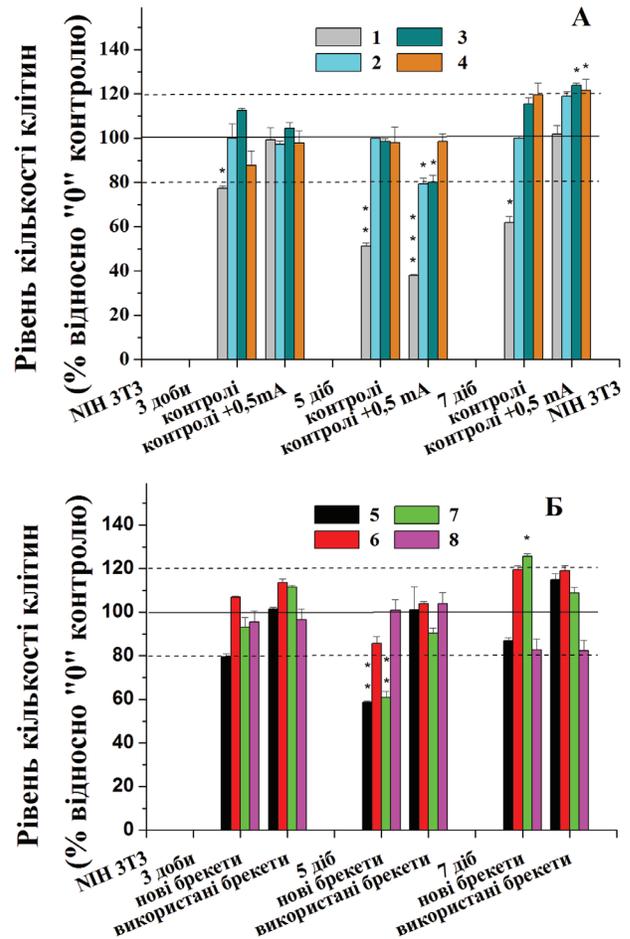


Рисунок 2. Результати дослідження біосумісності досліджуваного ГКБ, препаратів порівняння і зразків брекетів щодо фібробластів лінії NIH 3T3 *in vitro* (тест МТТ)

А – наведений нульовий контроль (інтактні клітини) та результати дії ГКБ і препаратів порівняння, Б – зразки невживаних брекетів і брекетів, відпрацьованих в порожнині рота впродовж 18 – 20 місяців, для оцінки впливу присутності цих елементів у мікрооточенні тестованих клітин: 1 – препарат порівняння «Холісал»; 2 – Контроль «0», інтактна культура клітин; 3 – препарат порівняння «Gengigel»; 4 – дослідний препарат ГКБ; 5 – нанесення ГКБ на катод «-»; 6 – нанесення ГКБ на анод «+»; 7 – брекети без нанесення ГКБ під впливом електричного струму; 8 – брекети без нанесення ГКБ і без впливу електричного струму.

Примітка: зразки тестованих препаратів вносили в культуральне середовище у кількості 0.5 % в об'ємних одиницях. \* –  $P \leq 0.05$ ; \*\* –  $P \leq 0.01$ ; \*\*\* –  $P \leq 0.001$ , відносно контролю «0»

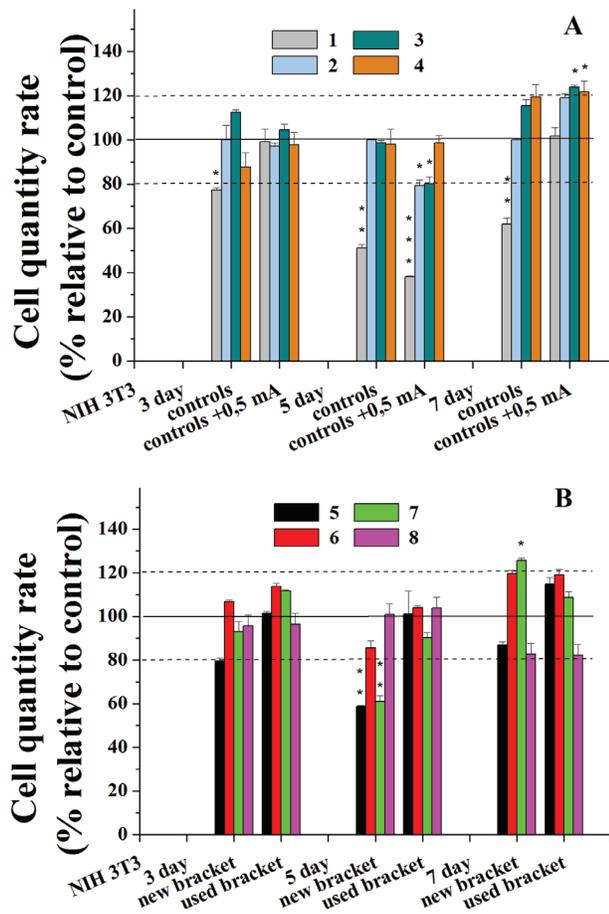


Figure 2. The results of the biocompatibility study of the investigated GCB, comparison drugs and braces samples against NIH 3T3 fibroblasts in vitro (MTT-test)

**A** – intact cell (zero control) and the results of the action of GCB and comparison drugs (positive control), **B** – samples of unused braces and braces used in the oral cavity for 18–20 months to assess the effect of the presence of these elements in the microenvironment of the tested cells: 1. Comparison drug Cholisal; 2. Control "0" – intact cell culture; 3. Comparison drug Gengigel®; 4. Experimental drug GCB; 5. Application of GCB to the cathode ("–"); 6. Application of GCB to the ("+"); 7. Brace without applying GCB under the influence of electric current; 8. Brace without applying GCB and exposure to electric current. **Note:** Tested drugs were added to the culture medium in 0.5% volume units. \* -  $P \leq 0.05$ ; \*\* -  $P \leq 0.01$ ; \*\*\* -  $P \leq 0.001$ , relative to control – intact cells.

When macrophages were studied, a different combination of electrophoresis and the effects of comparison drugs was used, and the constant electric current did not compensate for the suppressive effect of Cholisal. Explanation of the mechanisms of such cytomodulatory effects requires further investigation.

It is worth noting that under the influence of direct electric current, cells reacted more strongly to the presence of negatively charged molecules. In the presence of both unused and used braces, as well as in their absence, there was no effect on cell number at the test point in the plate well and during the first 3 days of the experiment. On the 5th day, a suppressive effect of used braces was manifested when applied to the "–" electrode during electrophoresis. On the 7th day, this effect intensified, and a negative effect with the "–" electrode began to appear in the presence of unused braces in the wells.

This effect could have occurred due to the intensification of metabolic processes due to the activation of macrophages, which was accompanied by the depletion of nutrient resources of the culture medium, particularly glucose. This assumption can be supported by insignificant (unreliable) fluctuations in the number of cells in the population (less than 20%) both in the presence of the studied drugs, the effect of electrophoresis in combination with the drugs and separately, and in the controls. It should be noted that replacing the agarized culture medium during the experiment is impossible without disturbing the cell biomass. The results presented in Fig. 3 may indicate that macrophages react more tolerantly to the unused braces.

Thus, the patented GCB showed a better ability to promote all cell types' proliferation than Cholisal and Gengigel®. Electrophoresis potentiated the cytostimulatory and protective effect of GCB when the drug was applied to the "+" electrode. The study using an experimental model of cell cultures in a simulated microenvironment demonstrated a significant potential of electrophoresis to enhance the penetration of GCB components into the periodontal tissue model. This evidences that the duration of the electrophoresis in clinics can be reduced from 15–20 min per jaw to 15–50 sec. At the same time, the prolongation of GCB action and targeted local delivery of its active components (flavonoid complex and benzydamine hydrochloride) to simulated biological tissues were maintained.

The analysis of the results of the second stage of work allowed us to obtain a detailed pic-

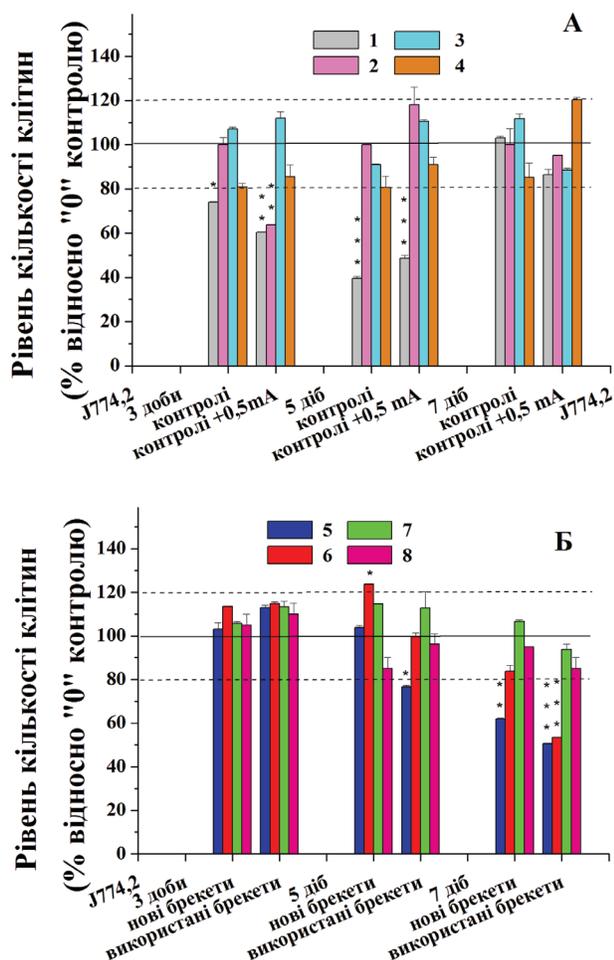


Рисунок 3. Результати дослідження біосумісності дослідної ГКБ, препаратів порівняння та зразків брекетів щодо кількості макрофагів лінії J774.2 *in vitro* (тест МТТ)

А – наведений нульовий контроль (інтактні клітини) та результати дії ГКБ і препаратів порівняння, Б – зразки неживаних брекетів і брекетів, відпрацьованих в порожнині рота впродовж 18 – 20 місяців, для оцінки впливу присутності даних елементів у мікрооточенні тестованих клітин: 1 – препарат порівняння «Холісал»; 2 – Контроль «0», інтактна культура клітин; 3 – препарат порівняння «Gengigel»; 4 – дослідний препарат ГКБ; 5 – нанесення ГКБ на катод «-»; 6 – нанесення ГКБ на анод «+»; 7 – брекет без нанесення ГКБ під впливом електричного струму; 8 – брекет без нанесення ГКБ і без впливу електричного струму.

Примітка: зразки тестованих препаратів вносили в культуральне середовище в кількості 0.5 % в об'ємних одиницях. \* –  $P \leq 0.05$ ; \*\* –  $P \leq 0.01$ ; \*\*\* –  $P \leq 0.001$ , щодо контролю «0»

та препарату «Генгігель» ( $107.2 \pm 0.9\%$ ). На п'яту добу ці закономірності зберігались, але відхилення вже не були вірогідними. На сьому добу виявлено зниження показників приросту кількості клітин в популяції за дії елек-

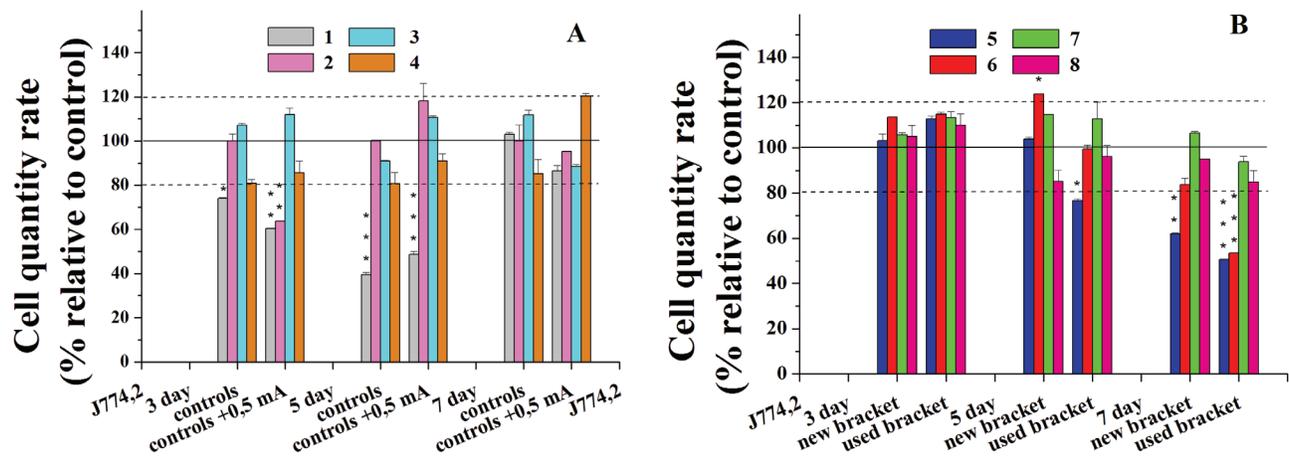
трофорезу, що ефективно нівелювалося за присутності ГКБ ( $120.4 \pm 1.0\%$  проти  $88.5 \pm 0.9\%$  – показник дії препарату «Генгігель», чи  $95.2 \pm 0.1\%$  – у контролі). У цьому випадку контролем слугував вплив електрофорезу без дії досліджуваних препаратів.

Коли досліджували макрофаги, використовували інше поєднання електрофорезу та дії препаратів порівняння і при цьому постійний електричний струм не компенсував пригнічувальну дію препарату «Холісал». Пояснення механізмів таких цитомодулюючих впливів потребує додаткового дослідження.

Варто відзначити, що під впливом постійного електричного струму клітини сильніше реагували на присутність негативно заряджених молекул. Як за наявності неживаних і використаних брекетів, так і за їх відсутності, не виявлено вірогідного впливу на кількість клітин у популяції як у тестовій точці в лунці планшета, так і протягом перших трьох діб дослідження. На п'ятудобу проявлялася супресивна дія використаних брекетів при нанесенні ГКБ на електрод «-» під час електрофорезу. А на сьому добу цей ефект посилювався і починав проявлятися негативний ефект з електродом «-» за наявності в лунках неживаних брекетів.

Такий ефект міг виникнути внаслідок інтенсифікації метаболічних процесів завдяки активації макрофагів, що супроводжувалося виснаженням поживних ресурсів культурального середовища, зокрема глюкози. На користь такого припущення можуть свідчити незначні (недостовірні) коливання кількості клітин в популяції (менше 20%) як за присутності досліджуваних препаратів, впливу електрофорезу в поєднанні з препаратами і окремо, так і в контролях. Варто відзначити, що під час експерименту немає змоги замінити агаризоване культуральне середовище, не порушуючи клітинної біомаси. Загалом результати, наведені на рис. 3, можуть свідчити про те, що макрофаги більш толерантно реагують на дію неживаних брекетів.

Отже, запатентована ГКБ виявляла кращу, ніж препарати порівняння «Холісал» та «Генгігель», спроможність сприяти проліферації усіх типів досліджуваних клітин. Процедура електрофорезу потенціювала цитости-



**Figure 3.** The results of the biocompatibility study of the investigated GCB, comparison drugs and brace samples in terms of the number of J774.2 macrophages in vitro (MTT-test).

**A** – intact cell (zero control) and the results of the effect of GCB and comparison products (positive control), **B** – samples of unused braces and braces used in the oral cavity for 18–20 months to assess the impact of the presence of these elements in the microenvironment of the tested cells: 1. Comparison drug Cholisal; 2. Control “0” – intact cell culture; 3. Comparison drug Gengigel®; 4. Experimental drug GCB; 5. Application of GCB to the “-” electrode; 6. Application of GCB to the “+” electrode; 7. Brace without applying GCB under the influence of electric current; 8. Brace without applying GCB and exposure to electric current. **Note:** Samples of the tested drugs were added to the culture medium in 0.5% volume units. \* -  $P \leq 0.05$ ; \*\* -  $P \leq 0.01$ ; \*\*\* -  $P \leq 0.001$ , relative to control – intact cells.

ture of changes in the level of cellular stress in response to the electrophoresis procedure. For this purpose, the reactive oxygen species (ROS) production level was determined using light and fluorescence microscopy and the fluorescent dye dihydroethidium (DHE). Figures 4 and 5 show the results of studying the effect of GCB, Cholisal, and Gengigel® gels, as well as unused and used braces on J774.2 macrophages compared to the control group. The content of live cell nuclei was visualized in blue (cell DNA staining was performed using the fluorescent dye Hoechst 33342, which is accumulated by live cell nuclei). The orange fluorescence indicates the concentration of free radicals, which were detected with dihydroethidium.

As one can see from the results presented in Fig. 5, in the case of macrophages, the application of unused braces in culture wells for 3 days did not affect the cells. At the same time, the application of braces used for 18–20 months in oral cavities of orthodontic patients caused a slight increase in the level of metabolic activation on the 3rd day of the experiment. On the 5th day, both in the case of unused braces and used braces, after applying the GCB onto the “-” electrode, more intense

dihydroethidium luminescence (DHE) was observed than after applying GCB to the “+” electrode or in the control group. On the 7th day of the experiment, this effect was further enhanced. In the presence of braces, the intensity of DHE luminescence was higher than in the case of unused braces in all experimental groups.

Phagocytosis is an important indicator of the functional activity of macrophages. Yeast cells can be used as an object of phagocytosis. Here, we studied the uptake of *Saccharomyces pastorianus* yeast by J774.2 macrophages in the presence of tested GCB, comparing Cholisal and Gengigel®, unused and used braces with and without electrophoresis. The results of this experiment are shown in Fig. 6. The level of ROS during phagocytosis of yeast cells by macrophages was assessed after staining macrophages with DHE fluorescent dye. As one can see, the highest level of macrophage activation, accompanied by ROS elevation, occurred on the 2nd day of the experiment.

In the presence of braces applied for 18–20 months in the oral cavities of orthodontic patients, the phagocytosis intensity was comparable to that observed when applying

мульовальну і захисну дію ГКБ при нанесенні препарату на «+» електрод. Дослідження з використанням експериментальної моделі клітинних культур в імітаційному середовищі засвідчило значний потенціал електрофоретичної процедури для посилення проникнення компонентів ГКБ вглиб моделі тканин пародонту. Це є доказом того, що тривалість процедури електрофорезу в клініці може бути скорочена зі стандартних 15 – 20 хв на одну щелепу до 15 – 50 сек. При цьому зберігалася пролонгація дії ГКБ і спрямоване локальне доставляння її активних компонентів (флавоноїдного комплексу та бензидаміну гідрохлориду) до імітованих біологічних тканин.

Аналіз результатів другого етапу роботи дав змогу отримати розгорнуту картину щодо змін рівня клітинного стресу у відповідь на процедуру електрофорезу. Для цього визначено рівень продукування активних форм кисню (АФК) з використанням світлової та люмінесцентної мікроскопії і флуоресцентного барвника дигідроетидію (ДГЕ). На рис. 4 і 5 наведені результати вивчення впливу ГКБ і гелів «Холісал» та «Генгігель», а також невживаних і використаних брекетів на

макрофаги лінії J774.2 порівняно з контролем. Синім кольором візуалізований вміст ядер живих клітин (забарвлення ДНК-клітин виконували за допомогою люмінесцентного барвника Hoechst 33342, який акумулюється ядрами живих клітин). Помаранчева флуоресценція свідчить про концентрування вільних радикалів, які детектували за допомогою дигідроетидію.

Як свідчать результати, наведені на рис. 5, при дослідженні макрофагів наявність у культуральних лунках невживаних брекетів впродовж трьох діб принципово не впливала на стан клітин. Водночас присутність у лунках відпрацьованих впродовж 18 – 20 місяців у порожнинах рота ортодонтичних пацієнтів брекетів, сприяла незначному зростанню рівня метаболічної активації на третю добу експерименту. На п'яту добу досліду, як у випадку невживаних брекетів, так і використаних брекетів, після нанесення ГКБ на «-» електрод спостерігали інтенсивнішу люмінесценцію дигідроетидію (ДГЕ), ніж після нанесення ГКБ на «+» електрод, чи в контролі. На сьому добу експерименту цей ефект ще більше посилювався. За присутності використаних бре-

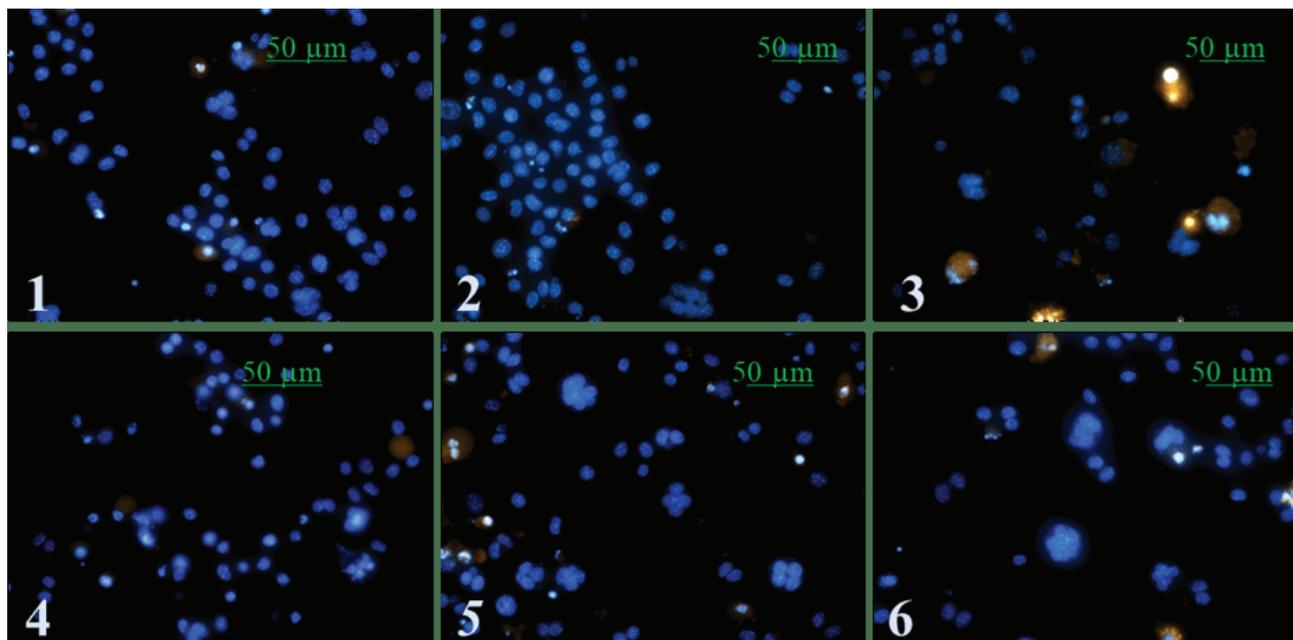


Рисунок 4. Репрезентативне зображення інтенсивності стресу в макрофагах лінії J774.2 після їх фарбування флуоресцентними барвниками Hoechst 33342 і DHE за присутності ГКБ, нових і відпрацьованих брекетів, порівняно з дією препарату «Cholisal». Синя флуоресценція за фарбування клітин барвником Hoechst 33342 – візуалізує ядра живих клітин; помаранчева флуоресценція за фарбування клітин дигідроетидієм (DHE) – візуалізує вміст вільних радикалів в клітинах: 1 – Контроль «0», інтактна культура клітин; 2 – дослідний препарат ГКБ; 3 – препарат порівняння «Холісал»; 4 – препарат порівняння «Genigel»; 5 – невживаний брекет; 6 – використаний брекет

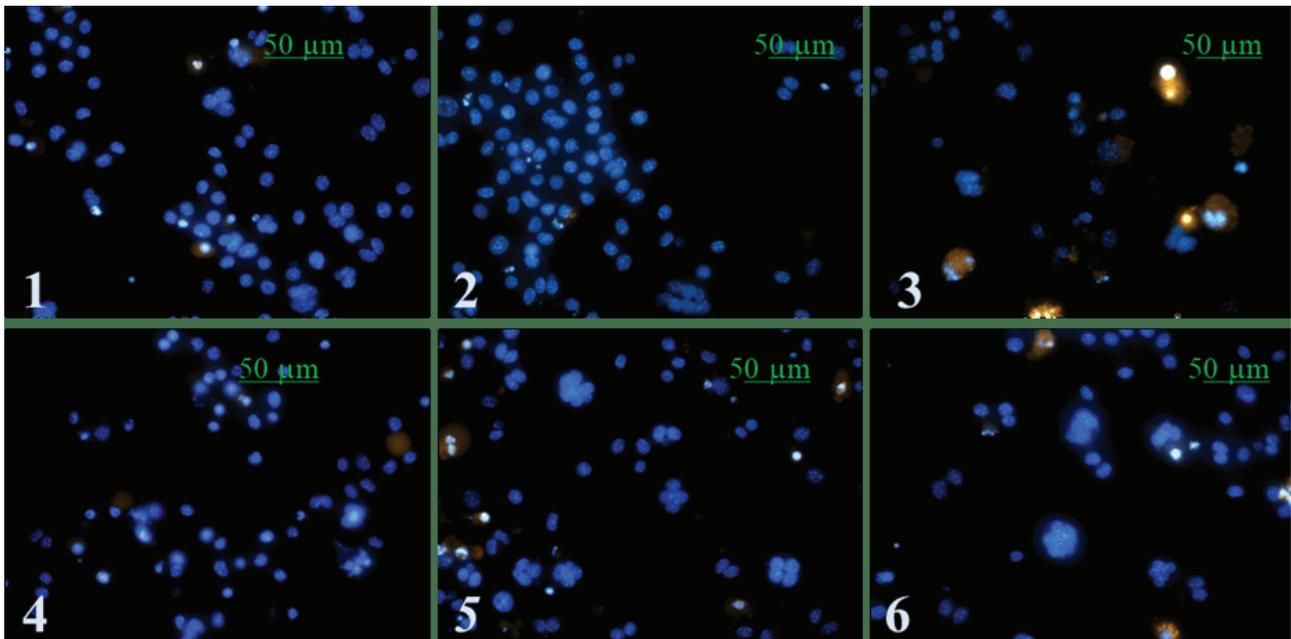
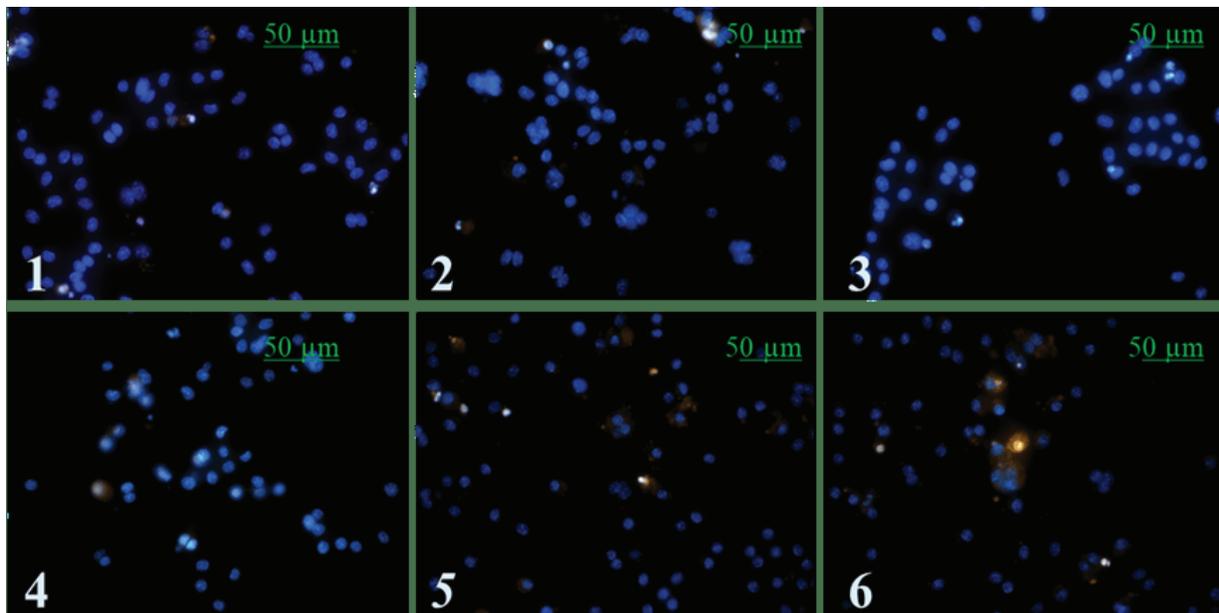


Figure 4. Representative image of stress intensity in J774.2 macrophages after staining with fluorescent dyes Hoechst 33342 and DHE in the presence of GCB, Gengigel®, new and used braces, compared to the effect of Cholisal. Blue fluorescence after staining cells with Hoechst 33342 dye – visualizes the nuclei of living cells; orange fluorescence after staining cells with dihydroethidium (DHE) – visualizes the content of free radicals in cells: 1. Control “0” – intact cell culture; 2. Experimental drug GCB; 3. Comparison drug Cholisal; 4. Comparison drug Gengigel®; 5. Unused bracket; 6. Used bracket.



**Figure. 5.** Representative image of stress intensity in J774.2 macrophages after staining with fluorescent dyes Hoechst 33342 and DHE in the presence of GCB, unused and used braces in the oral cavity. GCB is applied to the “+” or “-” electrophoretic electrode in the presence of unused and used braces in the oral cavity. Blue fluorescence after staining cells with Hoechst 33342 dye – visualizes the nuclei of living cells; orange fluorescence after staining cells with dihydroethidium (DHE) – visualizes the content of free radicals in cells: 1. An unused brace and GCB applied to the “+” electrode under the influence of electric current; 2. An unused brace and GCB applied to the “-” electrode under the influence of electric current; 3. Unused brace under the influence of electric current (without GCB); 4. A used brace and GCB applied to the “+” electrode under the influence of electric current; 5. A used brace and GCB applied to the “-” electrode under the influence of electric current; 6. The brace was used under the influence of an electric current (without GCB).

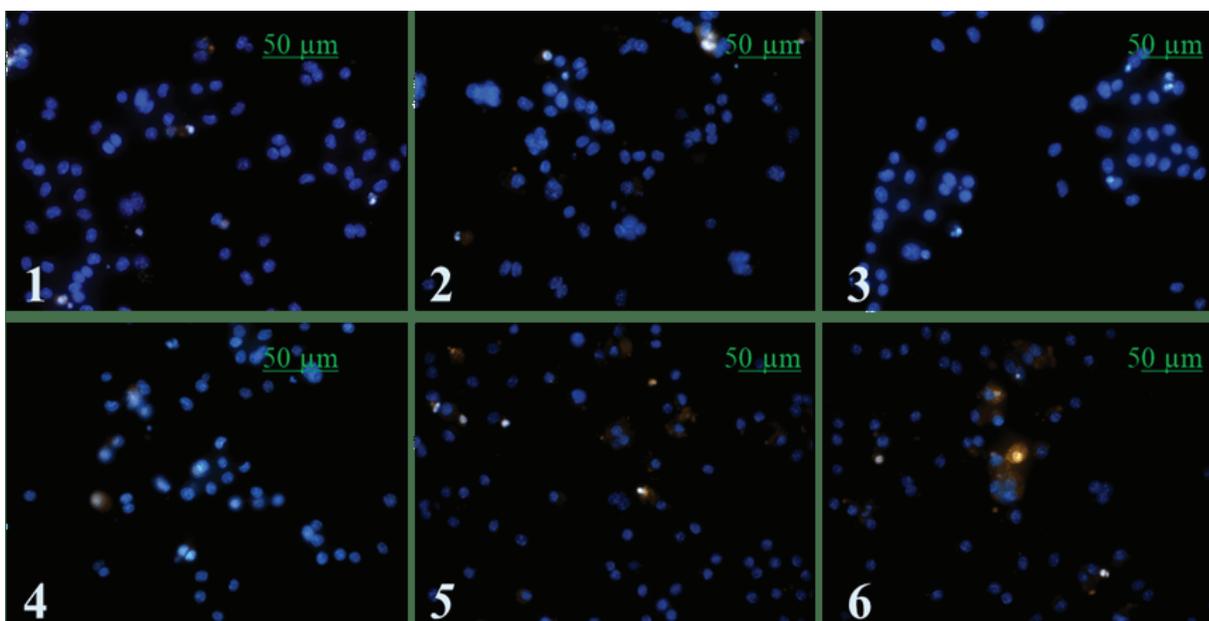


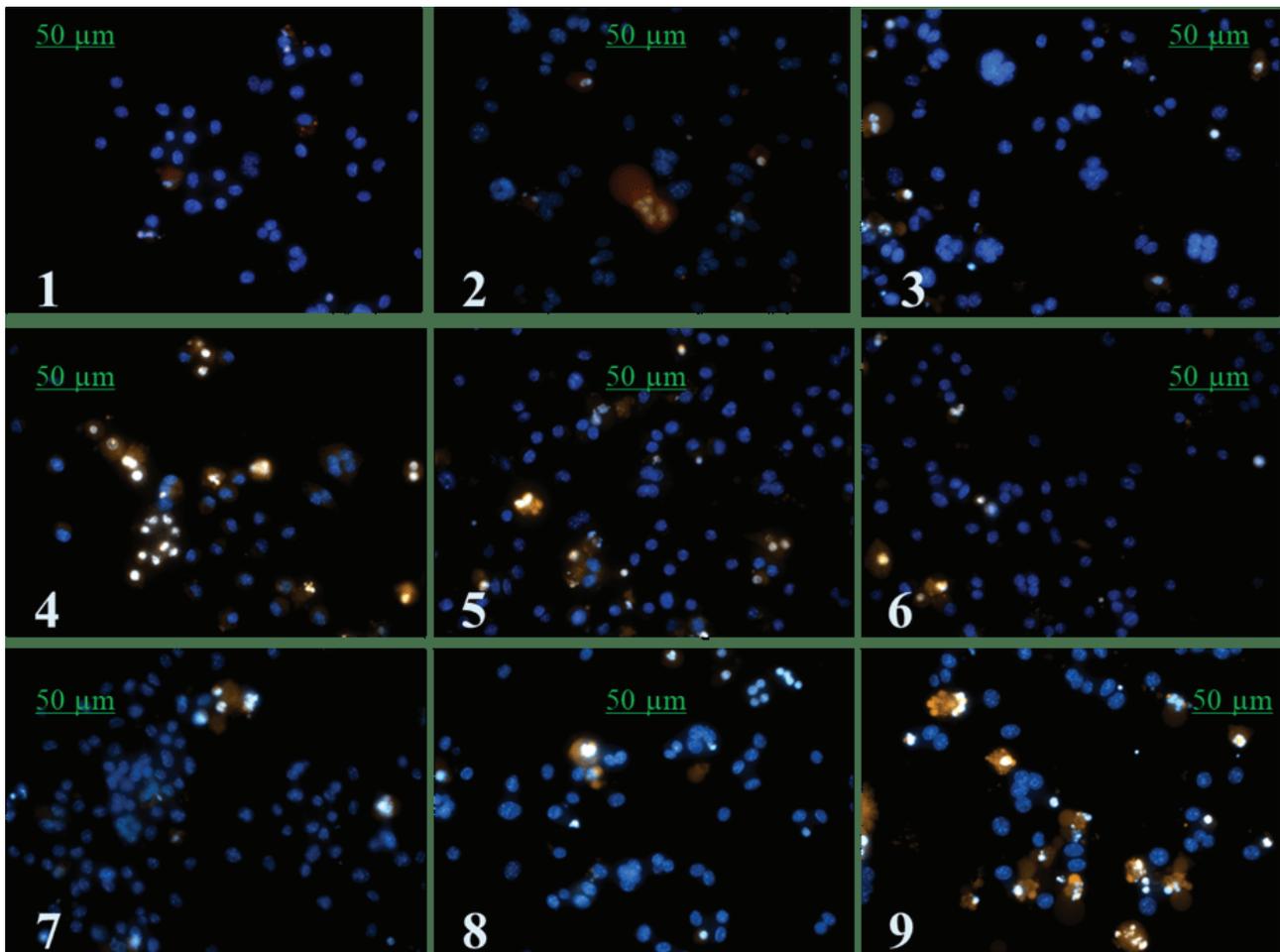
Рисунок 5. Репрезентативне зображення інтенсивності стресу в макрофагах лінії J774.2 після їх фарбування флуоресцентними барвниками Hoechst 33342 і DHE за присутності ГКБ, невживаних і відпрацьованих брекетів. ГКБ нанесена на «+» або «-» електрофоретичний електрод за наявності невживаних та використаних в порожнині рота брекетів. Синя флуоресценція за фарбування клітин барвником Hoechst 33342 – візуалізує ядра живих клітин; помаранчева флуоресценція за фарбування клітин дигідроетидієм (DHE) – візуалізує вміст вільних радикалів у клітинах: 1 – невживаний брекет і ГКБ, що нанесена на анод («+») під впливом електричного струму; 2 – невживаний брекет і ГКБ, що нанесена на катод («-») під впливом електричного струму; 3 – невживаний брекет під впливом електричного струму (без ГКБ); 4 – використаний брекет і ГКБ, що нанесена на анод («+») під впливом електричного струму; 5 – використаний брекет і ГКБ, що нанесена на катод («-») під впливом електричного струму; 6 – використаний брекет під впливом електричного струму (без ГКБ)

кетів, інтенсивність люмінесценції ДГЕ була більшою, ніж за присутності невживаних брекетів в усіх дослідних групах.

Важливим показником оцінки функціональної активності макрофагів є здійснення ними фагоцитозу. Одним із об'єктів фагоцитозу можуть бути клітини дріжджів. У роботі досліджували поглинання дріжджів *Saccharomyces pastorianus* макрофагами лінії J774.2 за присутності тестованої ГКБ, препаратів порівняння «Холісал» та «Генгігель», невживаних та використаних брекетів як з процедурою електрофорезу, так і без неї. Результати цього дослідження наведені на рис. 6. Генерацією АФК під час фагоцитозу дріжджових клітин макрофагами оцінювали після фарбування макрофагів флуоресцентним барвником дигідроетидієм. Як видно, найвищий рівень активації макрофагів, що супроводжується найбільш інтенсивною продукцією ними АФК, був виявлений на другу добу дослідження.

За присутності брекетів, відпрацьованих впродовж 18 – 20 місяців у порожнинах

рота ортодонтичних пацієнтів, процес фагоцитозу був співмірним з фагоцитозом за присутності невживаних брекетів, при тому, що вони зумовлювали вищий рівень метаболічної активації (на третю добу експерименту). Відповідно, в усіх випадках, інтенсивність люмінесценції ДГЕ була більшою, ніж за присутності невживаних брекетів. За присутності в лунках як невживаних брекетів, так і використаних брекетів, при нанесенні ГКБ на «-» електрод спостерігали інтенсивнішу люмінесценцію ДГЕ, ніж при нанесенні ГКБ на «+» електрод, чи в контролі. Найвищі рівні фагоцитарної активності та метаболічної активації були виявлені нами за присутності препарату «Холісал» та використаних брекетів після нанесення ГКБ на «-» електрод. По завершенню трьох діб, у зазначених дослідних групах детектували прогресивну деградацію (відмирання) макрофагів. В інших дослідних групах перебіг цього явища реалізовувався повільніше і завершувався на п'яту-шосту добу.



**Figure 6.** Representative image of the stress intensity of J774.2 macrophages after staining with fluorescent dyes Hoechst 33342 and DHE. The study was carried out after applying GCB, comparison and control preparations to the "+" or "-" electrode and incubation with yeast cells *Saccharomyces pastorianus*. Blue fluorescence after staining cells with Hoechst 33342 dye – visualizes the nuclei of living cells; orange fluorescence after staining cells with dihydroethidium (DHE) – visualizes the content of free radicals in cells: 1. An unused brace and GCB applied to the "-" electrode under the influence of electric current (with the addition of yeast); 2. An unused brace and GCB applied to the "+" electrode under the influence of electric current (with the addition of yeast); 3. An unused brace under the influence of electric current without GCB (with the addition of yeast); 4. A used brace and GCB applied to the "+" electrode under the influence of electric current (with the addition of yeast); 5. A used brace and GCB applied to the "-" electrode under the influence of electric current (with the addition of yeast); 6. A used bracket under the influence of electric current without GCB (with the addition of yeast); 7. Comparison product Cholisal with the addition of yeast; 8. Control "0" – intact cell culture with the addition of yeast; 9. Comparison drug Gengigel® with the addition of yeast.

unused braces, even though they caused a higher level of metabolic activation (on the 3rd day). Accordingly, in all cases, the intensity of DHE luminescence was higher than in the presence of unused braces. In the presence of both new braces and used braces in the wells, when GCB was applied to the "-" electrode, more intense luminescence of DHE was observed than when GCB was applied to the "+" electrode or in the control group. The highest levels of phagocytic activity and metabolic activation were found using Cholisal

and braces after applying the GCB to the "-" electrode. In 3 days, macrophages' progressive degradation (death) was detected in these experimental groups. While in other groups, this phenomenon was less expressed and ended on days 5–6.

### Discussion

Here, we found that electrophoresis applied to certain cell types improved the viability (MTT-test) of fibroblasts and keratinocytes in the long term (5–7 days), but it reduced the in-

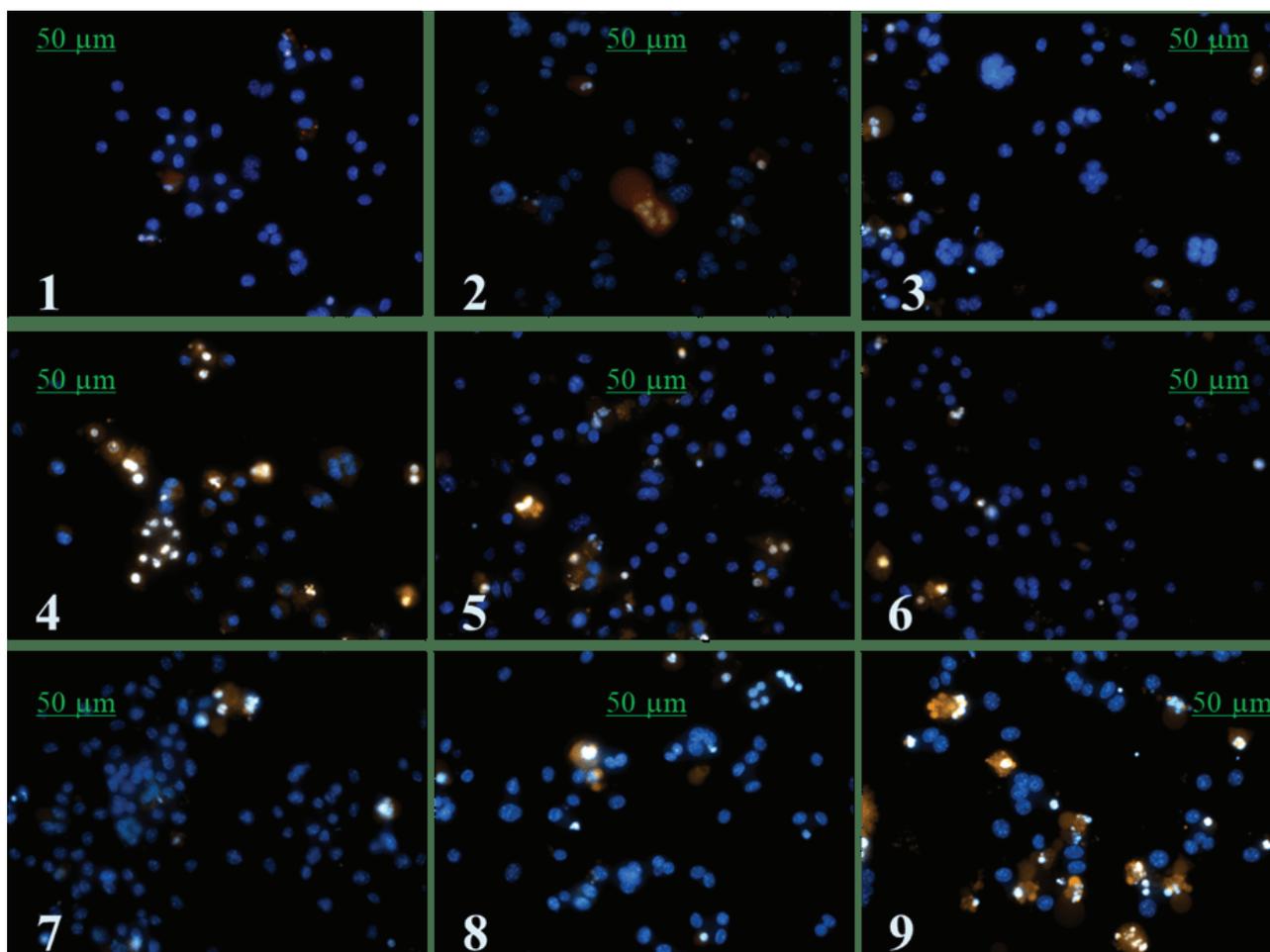


Рисунок 6. Репрезентативне зображення інтенсивності стресу макрофагів лінії J774.2 після їх фарбування флуоресцентними барвниками Hoechst 33342 і DHE. Дослідження виконували після нанесення на «+» або «-» електрод ГКБ препаратів порівняння і контролю та інкубації з дріжджовими клітинами *Saccharomyces pastorianus*. Синя флуоресценція за фарбування клітин барвником Hoechst 33342 – візуалізує ядра живих клітин; помаранчева флуоресценція за фарбування клітин дигідроетидієм (DHE) – візуалізує вміст вільних радикалів у клітинах: 1 – невживаний брекет і ГКБ, що нанесена на катод («-») під впливом електричного струму (з додаванням дріжджів); 2 – невживаний брекет і ГКБ, що нанесена на анод («+») під впливом електричного струму (з додаванням дріжджів); 3 – невживаний брекет під впливом електричного струму без ГКБ (з додаванням дріжджів); 4 – використаний брекет і ГКБ, що нанесена на анод («+») під впливом електричного струму (з додаванням дріжджів); 5 – використаний брекет і ГКБ, що нанесена на катод («-») під впливом електричного струму (з додаванням дріжджів); 6 – використаний брекет під впливом електричного струму без ГКБ (з додаванням дріжджів); 7 – препарат порівняння – «Холісал» з додаванням дріжджів; 8 – Контроль «0», інтактна культура клітин з додаванням дріжджів; 9 – препарат порівняння «Gengigel» з додаванням дріжджів

### Обговорення

В результаті проведених досліджень встановлено, що електрофорез, застосований до окремих типів клітин, стимулював життєздатність (МТТ-тест) фібробластів і кератиноцитів у віддаленому періоді (п'ять – сім діб), але знижував інтенсивність функціонування макрофагів. Це може бути пов'язане з тим, що макрофаги активніше реагують впродовж перших годин впливу на них і це призводить до зниження їхньої метаболічної та проліферативної здатності. ГКБ на основі комплексу флавоноїдів

збільшувала кількість проліферативно активних клітин й одночасно діяла як цитопротектор завдяки антиоксидантним своїм властивостям. Доречним було поєднання ГКБ з електрофорезом, що дало змогу безпосередньо впливати на клітини експериментального імітаційного середовища, наближеного до тканин пародонтального комплексу.

Впливаючи на слизову оболонку тканин ясен, електрофорез чинить рефлекторну дію та сприяє гемодинаміці. Унаслідок цього, в па-

tensity of macrophage functioning. This may be due to the more active reaction of macrophages during the first hours of exposure that decreased their metabolic and proliferative capacity. GCB, which contained a flavonoid complex, increased many proliferating cells and acted as a cytoprotector due to their antioxidant properties. Thus, it was appropriate to combine GCB with electrophoresis, which directly affected the cells of the experimental simulation environment close to the tissues of the periodontal complex.

By affecting the mucous membrane of gum tissue, electrophoresis has a reflex effect and promotes hemodynamics. As a result, blood and lymph circulation, trophism and metabolism are improved in the periodontium, the growth of granulations in periodontal pockets is suppressed, and inflammatory and congestive phenomena are reduced. Besides, there is an increase in the activity of connective tissue, phagocytic activity of leukocytes, reticuloendothelial system, and the regeneration process is accelerated [19]. An essential role of electrophoretic physiotherapy might be the stimulation of nonspecific tissue reactivity [20].

In orthodontic patients, electrophoresis should be used to treat periodontal tissue diseases in the case of their chronic course and after the elimination of acute inflammation or exacerbated generalized periodontitis. These can be chronic catarrhal gingivitis, hypertrophic gingivitis, or chronic generalized periodontitis both before the active period of orthodontic treatment and in the absence of stabilization after installing fixed orthodontic appliances.

Antioxidants and non-steroidal drugs are justified in the complex treatment of periodontal pathology in orthodontic patients. Medicines in these groups work well under oxidative stress conditions, neutralize peroxides and lipid-free radical oxidation products, and have anti-inflammatory, decongestant and analgesic effects, accelerating reparative processes [21]. In the literature, numerous confirmations revealed that herbal components are widely used in periodontal therapy [22]. Since strains of microorganisms resistant to classical antibi-

otics rapidly develop under the influence of the main periodontal pathogens, alternative ways to combat such pathogens must be introduced involving herbal preparations with anti-inflammatory, antibacterial, antioxidant and other therapeutic properties.

Another important aspect in solving the problem of treating periodontal pathology in orthodontic patients is the forced long-term presence of metal structures in the oral cavity. This causes a constant supply of metal cations that are washed out of the braces. It is known that fibroblasts and cells of other types of mammalian tissues and organs are sensitive to various metal cations [23; 24; 25; 26]. The positive effects of metal cations on fibroblasts include: 1) stimulation of proliferation by some cations (copper, zinc, and selenium), which promotes healing of wound surfaces; 2) cations of metals such as copper, zinc, and iron are necessary for collagen synthesis; 3) cations of some elements (zinc, selenium) prevent apoptosis. The negative effects of metal cations on fibroblasts include: 1). acidification of the microenvironment of fibroblasts under the influence of certain ions, which can damage cells and cause their death; 2) cations of certain metals can cause oxidative stress, which damages cellular structures; 3) excessive amounts of cations of certain metals, such as lead, cadmium and mercury, can lead to intoxication, which can be fatal.

In this study, we propose using an original methodological approach for investigating the accumulation of biologically active agents in the cellular microenvironment in vitro supplemented with agar gel. Such an approach is based on electrophoresis to facilitate penetration of those agents and might be used in periodontic patients [27].

The sensitivity of fibroblasts to metal cations depends on the type of metal, its concentration, and the duration of exposure. In general, fibroblasts are more sensitive to low metal concentrations than high ones. Mammalian fibroblasts are sensitive to chromium, nickel, cobalt, molybdenum, tungsten, manganese, and titanium cations used in iron alloys for medical and dental purposes. This sensitivity can be both positive and

родонті покращуються крово- та лімфообіг, трофіка та обмін речовин, пригнічується ріст грануляцій у пародонтальних кишнях, зменшуються запальні та застійні явища. Крім того, відбувається підвищення активності елементів сполучної тканини, фагоцитарної активності лейкоцитів і елементів ретикулоендотеліальної системи, а також прискорюється процес регенерації [19]. Важливою властивістю електрофоретичної фізіотерапії є стимуляція неспецифічної реактивності тканин і захисних сил організму [20].

Для лікування ортодонтичних пацієнтів треба застосовувати електрофорез при захворюваннях тканин пародонта в разі хронічного їх перебігу та після усунення явищ гострого запалення або загостреного перебігу генералізованого пародонтиту. Це можуть бути хронічний катаральний гінгівіт, гіпертрофічний гінгівіт, хронічний перебіг генералізованого пародонтиту як до активного періоду ортодонтичного лікування, так і у разі відсутності стабілізації після встановлення незнімної ортодонтичної апаратури.

Застосування антиоксидантів та нестероїдних препаратів у комплексному лікуванні патології пародонту ортодонтичних пацієнтів є обґрунтованим. Лікарські засоби, що належать до цих груп, добре діють за умов оксидативного стресу, знешкоджують пероксиди та продукти вільнорадикального окиснення ліпідів, а також виконують протизапальну, протинабрякову та знеболювальну дію, прискорюють репаративні процеси [21]. Аналіз літературних джерел дав змогу виявити численні підтвердження того, що саме рослинні компоненти широко використовували у пародонтальній терапії [22]. Оскільки за дії основних пародонтопатогенів стрімко розвиваються штами мікроорганізмів, що є резистентними до класичних антибіотиків, необхідно запроваджувати альтернативні методи боротьби з такими патогенами, залучаючи рослинні препарати з протизапальними, антибактерійними, антиоксидантними та іншими лікувальними властивостями.

Ще одним важливим аспектом у вирішенні проблеми лікування патології пародонту в ортодонтичних пацієнтів є вимушена тривала наявність металевих конструкцій у порожнині рота. Це зумовлює постійне надходження ка-

тійонів металів, що вимиваються з брекет-систем. Як відомо, фібробласти та клітини інших типів тканин і органів ссавців чутливі до різних катіонів металів [23; 24; 25; 26]. До позитивних ефектів катіонів металів на фібробласти належать: 1) стимуляції проліферації деякими катіонами (мідь, цинк і селен), що сприяє загоєнню ранових поверхонь; 2) катіони таких металів як мідь, цинк і залізо необхідні для синтезу колагену; 3) катіони деяких елементів (цинк, селен) запобігають апоптозу. До негативних ефектів катіонів металів на фібробласти належать: 1) закислення мікросередовища фібробластів за дії деяких іонів, що може пошкоджувати клітини і спричинити їхню загибель; 2) катіони деяких металів можуть спричинити оксидативний стрес, який пошкоджує клітинні структури; 3) надмірна кількість катіонів деяких металів, таких як свинець, кадмій і ртуть може призвести до інтоксикації, і навіть смертельної.

У нашому дослідженні запропоновано використовувати оригінальний методичний підхід до дослідження *in vitro* накопичення біологічно активних речовин у клітинному мікрооточенні, доповненому агаровим гелем. Такий підхід заснований на використанні електрофорезу для полегшення проникнення цих агентів і може бути використаний для лікування пародонтологічних пацієнтів [27].

Чутливість фібробластів до катіонів металів залежить від типу металу, його концентрації та тривалості впливу. Загалом фібробласти більш чутливі до низьких концентрацій металів, ніж до високих. Фібробласти ссавців чутливі до катіонів хрому, нікелю, кобальту, молібдену, вольфраму, марганцю та титану, які застосовують у залізних сплавах для потреб медицини і стоматології. Ця чутливість може бути як позитивною, так і негативною. Наприклад, катіони нікелю можуть як стимулювати проліферацію фібробластів, так і спричинити оксидативний стрес, призводячи до загибелі клітин при високих концентраціях. Катіони хрому і кобальту стимулюють проліферацію фібробластів і синтез колагену, захищаючи клітини від оксидативного стресу. Катіони молібдену, вольфраму і марганцю необхідні для синтезу деяких ензимів, важливих у метаболізмі клітин. Вони також можуть захищати клітини від оксидативного стресу. Треба наголосити, що катіони ти-

negative. For example, nickel cations can both stimulate fibroblast proliferation and cause oxidative stress, leading to cell death at high concentrations. Chromium and cobalt cations stimulate fibroblast proliferation and collagen synthesis, protecting cells from oxidative stress. Molybdenum, tungsten, and manganese cations are necessary for synthesizing certain enzymes important in cell metabolism. These enzymes can also protect cells from oxidative stress. It should be emphasized that titanium cations are non-toxic in low concentrations. That is why this metal is used to make implants that are not rejected by the body. However, in high concentrations, titanium corrosion products in peri-implant tissues are a risk factor for peri-implantitis [28; 29]. Studies of the effect of metal cations on fibroblasts are ongoing.

Summarizing the results of our studies, we can assume that unused braces lose metal cations more intensively in the culture medium and, accordingly, in the oral cavity, thereby increasing oxidative stress. Our proposed GCB most likely modulates the ability of cells to withstand oxidative stress caused by the above factors. Accordingly, the electrophoresis procedure in clinical conditions can intensify the penetration of GCB components through periodontal tissues, thereby reducing the level of oxidative stress in the cells of the periodontal complex tissues after installing fixed orthodontic appliances. Our experimental treatment model of periodontal tissue disease allowed us to establish that the electrophoresis procedure can have a reduced exposure time (15–50 sec) instead of the standard duration of 15–20 min per jaw. This ensures a high prolongation of the GCB agent's effect and targeted drug delivery to the tissues.

Thus, we have revealed cytostimulatory and cytoprotective properties of GCB in the stress response of experimental cells under the influence of electrophoresis and phagocytic processes accompanied by excessive metabolic activation. These properties may be due to one of the active components of the

gel composition, namely, a flavonoid complex (Proteflazid®), which provides antioxidant action. This preparation is obtained from a natural source – soddy pike (*Herba Deschampsia caespitosa* L.) and ground cinquefoil (*Herba Calamagrostis epigeios* L.) herbs.

### Conclusions

The cytoprotective effect of GCB in treating periodontal diseases in orthodontic patients was evaluated. We established that applying GCB to the "+" electrode was optimal. The effectiveness of exposure of this gel composition in the oral cavity during gingival electrophoresis for 15–50 sec (current strength – 0.2–0.4 mA) was experimentally proved, compared to the standard duration of the classical clinical procedure of 15–20 min. The patented GCB was shown to best promote the proliferation of all three types of test cells (fibroblasts, keratinocytes, macrophages) and had a significant advantage over Cholisal and Gengigel®. It was found that unused braces lost metal cations more intensively in the culture environment, thus increasing oxidative stress. Due to its antioxidant properties, the developed GCB modulates the ability of cells to withstand stress.

The GCB can be recommended as a new medicinal product in clinical periodontics and orthodontics for periodontal dressing that is used together with individually made mouthguards in orthodontic patients during the active period of the orthodontic treatment as local therapy after the SRP (Scaling and Root Planning) protocol. Besides, they can be used for other surgical interventions and electrophoresis-based physiotherapy at active periods of orthodontic treatment with fixed orthodontic appliances.

**Acknowledgements:** The authors would like to acknowledge the partial support of RS with the Simons Foundation (Award No 1030281). In addition, we are grateful to Manko Nazar, PhD, Junior Researcher of the Department of Regulation of Cell Proliferation and Apoptosis, Institute of Cell Biology, National Academy of Sciences of Ukraine, Lviv, Ukraine, for his technical assistance.

тану нетоксичні в низьких концентраціях. Саме тому цей метал використовують для виготовлення імплантів, які не спричиняють відчуження організмом. Проте у високих концентраціях корозійні продукти титану в періімплантних тканинах є фактором ризику періімплантиту [28; 29]. Дослідження впливу катіонів металів на фібробласти тривають.

Підсумовуючи результати проведених нами досліджень, можна припустити, що невживані брекети більш інтенсивно втрачають катіони металів в культуральному середовищі, а, відповідно, і в порожнині рота, посилюючи оксидативний стрес. Запропонована нами ГКБ, імовірно за все, модулює здатність клітин протистояти оксидативному стресу, зумовленому переліченими нами чинниками. Відповідно процедура електрофорезу в клінічних умовах здатна інтенсифікувати проникнення компонентів ГКБ крізь тканини пародонту, знижуючи рівень оксидативного стресу в клітинах тканин пародонтально-го комплексу після встановлення незнімної ортодонтичної апаратури. Запропонована нами експериментальна модель лікування захворювань тканин пародонту дала змогу встановити, що процедура електрофорезу може мати скорочену тривалість експозиції (15 – 50 сек) замість стандартної тривалості 15 – 20 хв на одну щелепу. При цьому забезпечується висока пролонгованість дії засобу ГКБ та спрямована доставка ліків у тканини.

Отже, нами виявлені цитостимуляційні та цитопротекторні властивості ГКБ за стресової реакції експериментальних клітин під впливом електрофорезу та фагоцитарного процесу, що супроводжується надмірною метаболічною активацією. Ці властивості можуть бути зумовлені одним із активних компонентів використаної гелевої композиції, а саме флавоноїдним комплексом (Протефлазід), що забезпечує антиоксидантну дію. Цей препарат взятий з природних джерел - трави щучки дернистої (*Herba Deschampsia caespitosa L.*) і трави війника наземного (*Herba Calamagrostis epigeios L.*).

**У висновках:** проведено оцінку цитопротекторної дії ГКБ для лікування захворювань пародонту в ортодонтичних пацієнтів. У дослідженнях *in vitro* встановлено, що оптимальною є аплікація ГКБ на аноді («+» електрод) та експериментально доведено ефективність експозиції цієї гелевої композиції в порожнині рота під час наясного електрофорезу впродовж 15 – 50 сек (сила струму 0.2- 0.4 mA), на протипагу стандартній тривалості класичної клінічної процедури впродовж 15 – 20 хв. Показано, що запатентована ГКБ найкраще сприяє проліферації всіх трьох типів піддодіслідних клітин (фібробласти, кератиноцити, макрофаги) і має вірогідну перевагу над препаратами порівняння («Холісал», «Генгігель»). Також встановлено, що невживані брекети більш інтенсивно втрачають катіони металів у культуральному середовищі, посилюючи цим оксидативний стрес. Розроблена ГКБ модулює здатність клітин протистояти стресові завдяки антиоксидантним властивостям.

Отже, ГКБ можна рекомендувати як новий стоматологічний засіб у клінічній пародонтології та ортодонтії для пародонтальних пов'язок і застосовувати разом із індивідуально виготовленими капами в ортодонтичних пацієнтів при підготовці їх до активного періоду ортодонтичного лікування – як для місцевої терапії після протоколу SRP або інших хірургічних втручань, так і для «інтенсивної» фізіотерапії з використанням електрофорезу до та в активному періоді ортодонтичного лікування з використанням незнімної ортодонтичної апаратури.

**Подяка.** Автори хотіли б подякувати за часткову підтримку Simons Foundation (Award No 1030281). Крім того, ми вдячні за технічну допомогу доктору філософії, молодшому науковому співробітнику відділу регуляції проліферації клітин і апоптозу Інституту біології клітини Національної Академії Наук України Назару Маньку.

### Список літератури

1. Fastovets OO, Shtepa VO. Prevalence and character of occlusional disorders among young people. Medical perspectives. 2020; 25(1): 204-14. DOI:10.26641/2307-0404.2020.1.20042. [in Ukrainian].
2. Drenski Balija N, Aurer B, Meštrović S, Lapter Varga M. Prevalence of Dental Anomalies in Orthodontic Patients. Acta Stomatol Croat. 2022;56(2):61-68. doi: 10.15644/asc56/1/7. PMID: 35382486; PMCID: PMC8972477

## Literature

1. Fastovets OO, Shtepa VO. Prevalence and character of occlusional disorders among young people. Medical perspectives. 2020; 25(1): 204-14. DOI:10.26641/2307-0404.2020.1.20042. [in Ukrainian].
2. Drenski Balijsa N, Aurer B, Meštrović S, Lapter Varga M. Prevalence of Dental Anomalies in Orthodontic Patients. Acta Stomatol Croat. 2022;56(2):61-68. doi: 10.15644/asc56/1/7. PMID: 35382486; PMCID: PMC8972477
3. Sara Thomas B, Alexander M. Orthodontics and the Periodontium: A Symbiotic Relationship [Internet]. Current Trends in Orthodontics. IntechOpen. 2022. Available from: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.100801>
4. Lai TT, Chiou JY, Lai TC, Chen T, Wang HY, Li CH, Chen MH. Perceived pain for orthodontic patients with conventional brackets or self-ligating brackets over 1 month period: A single-center, randomized controlled clinical trial. J. Formos. Med. Assoc. 2020;119(1).Pt 2:282-289. doi: 10.1016/j.jfma.2019.05.014. PMID: 31208826.
5. Hadzic S, Gojkov-Vukelic M, Pasic E, Jahic IM, Muharemovic A, Redzepagic-Vrazalica L, Jeleskovic A, Nakas E. Evaluation of Periodontal Changes in Patients Before, During, and After a Fixed Orthodontic Therapy. Mater Sociomed. 2022;34(2):121-125. doi: 10.5455/msm.2022.34.121-125. PMID: 36199847; PMCID: PMC9478536.
6. Vincent-Bugnas S, Borsa L, Gruss A, Lupi L. Prioritization of predisposing factors of gingival hyperplasia during orthodontic treatment: the role of amount of biofilm. BMC Oral Health. 2021;21(1):84. doi: 10.1186/s12903-021-01433-2.
7. Mester A, Onisor F, Mesaros AS. Periodontal Health in Patients with Self-Ligating Brackets: A Systematic Review of Clinical Studies. J. Clin. Med. 2022;11(9):2570. doi: 10.3390/jcm11092570. PMID: 35566696; PMCID: PMC9101337
8. Sun C, Rankovic MJ, Folwaczny M, Otto S, Wichelhaus A, Baumert U. Effect of Tension on Human Periodontal Ligament Cells: Systematic Review and Network Analysis. Front. Bioeng. Biotechnol. 2021; 9:1-22. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.695053>.
9. Sczepanik FSC, Grossi ML, Casati M, Goldberg M, Glogauer M, Fine N, Tenenbaum HC. Periodontitis is an inflammatory disease of oxidative stress: We should treat it that way. Periodontol 2000. 2020;84(1):45-68. doi: 10.1111/prd.12342. PMID: 32844417
10. Kovac V, Poljsak B, Perinetti G, Primožic J. Systemic Level of Oxidative Stress during Orthodontic Treatment with Fixed Appliances. Biomed Res Int. 2019;2019. Article ID 5063565. doi: 10.1155/2019/5063565. PMID: 31240214; PMCID: PMC6556316.
11. Primožič J, Poljšak B, Jamnik P, Kovač V, Čanadi Jurešić G, Spalj S. Risk Assessment of Oxidative Stress Induced by Metal Ions Released from Fixed Orthodontic Appliances during Treatment and Indications for Supportive Antioxidant Therapy: A Narrative Review. Antioxidants (Basel). 2021;10(9):1359. doi: 10.3390/antiox10091359. PMID: 34572993; PMCID: PMC8471328.
12. Yamar S, Daokar S. Oxidative Stress Levels in Orthodontic Patients and Efficacy of Antioxidant Supplements in Combating Its Effects- A Randomized Clinical Study. Orthodontic Journal of Nepal. 2019;9(2):29-34. <https://www.nepjol.info> > OJN > article > view
13. Tóthová L, Celec P. Oxidative stress and antioxidants in the diagnosis and therapy of periodontitis. Front. Physiol. 2017;8:1055
14. Yang Q, Miao Y, Campanello LJ, Hourwitz MJ, Abubaker-Sharif B, Bull AL, Devreotes PN, Fourkas JT, Losert W. Cortical waves mediate the cellular response to electric fields. Elife. 2022 Mar;11:e73198. doi: 10.7554/eLife.73198. PMID: 35318938; PMCID: PMC8942472.
15. Hodovanyi OV, Hodovana OI, Shandra MS, Kliuchivska OYu, Stoika RS. Zasib u formi helevoi kompozytsii «Benzylflaziverdyne» z prolonhovanou diieiu dlia likuvannia 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]
16. 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.
17. 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-(CF3-phenylamino)-1H-pyrrole-2,5-dione. Molecular and Cellular Biochemistry. 2021;476(8):3021-35. doi.org/10.1007/s11010-021-04144-y.
18. 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.
19. Chen C, Bai X, Ding Y, Lee IS. Electrical stimulation as a novel tool for regulating cell behavior in tissue

3. Sara Thomas B, Alexander M. Orthodontics and the Periodontium: A Symbiotic Relationship [Internet]. Current Trends in Orthodontics. IntechOpen. 2022. Available from: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.100801>
4. Lai TT, Chiou JY, Lai TC, Chen T, Wang HY, Li CH, Chen MH. Perceived pain for orthodontic patients with conventional brackets or self-ligating brackets over 1 month period: A single-center, randomized controlled clinical trial. *J. Formos. Med. Assoc.* 2020;119(1).Pt 2:282-289. doi: 10.1016/j.jfma.2019.05.014. PMID: 31208826.
5. Hadzic S, Gojkov-Vukelic M, Pasic E, Jahic IM, Muharemovic A, Redzepagic-Vrazalica L, Jeleskovic A, Nakas E. Evaluation of Periodontal Changes in Patients Before, During, and After a Fixed Orthodontic Therapy. *Mater Sociomed.* 2022; 34(2): 121-125. doi: 10.5455/msm.2022.34.121-125. PMID: 36199847; PMCID: PMC9478536.
6. Vincent-Bugnas S, Borsa L, Gruss A, Lupi L. Prioritization of predisposing factors of gingival hyperplasia during orthodontic treatment: the role of amount of biofilm. *BMC Oral Health.* 2021; 21(1): 84. doi: 10.1186/s12903-021-01433-2.
7. Mester A, Onisor F, Mesaros AS. Periodontal Health in Patients with Self-Ligating Brackets: A Systematic Review of Clinical Studies. *J. Clin. Med.* 2022;11(9):2570. doi: 10.3390/jcm11092570. PMID: 35566696; PMCID: PMC9101337
8. Sun C, Rankovic MJ, Folwaczny M, Otto S, Wichelhaus A, Baumert U. Effect of Tension on Human Periodontal Ligament Cells: Systematic Review and Network Analysis. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2021; 9: 1-22. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.695053>.
9. Sczepanik FSC, Grossi ML, Casati M, Goldberg M, Glogauer M, Fine N, Tenenbaum HC. Periodontitis is an inflammatory disease of oxidative stress: We should treat it that way. *Periodontol 2000.* 2020; 84(1): 45-68. doi: 10.1111/prd.12342. PMID: 32844417
10. Kovac V, Poljsak B, Perinetti G, Primozic J. Systemic Level of Oxidative Stress during Orthodontic Treatment with Fixed Appliances. *Biomed Res Int.* 2019;2019. Article ID 5063565. doi: 10.1155/2019/5063565. PMID: 31240214; PMCID: PMC6556316.
11. Primožič J, Poljšak B, Jamnik P, Kovač V, Čanadi Jurešić G, Spalj S. Risk Assessment of Oxidative Stress Induced by Metal Ions Released from Fixed Orthodontic Appliances during Treatment and Indications for Supportive Antioxidant Therapy: A Narrative Review. *Antioxidants (Basel).* 2021; 10(9): 1359. doi: 10.3390/antiox10091359. PMID: 34572993; PMCID: PMC8471328.
12. Yamar S, Daokar S. Oxidative Stress Levels in Orthodontic Patients and Efficacy of Antioxidant Supplements in Combating Its Effects- A Randomized Clinical Study. *Orthodontic Journal of Nepal.* 2019;9(2):29-34. <https://www.nepjol.info > OJN > article > view>
13. Tóthová L, Celec P. Oxidative stress and antioxidants in the diagnosis and therapy of periodontitis. *Front. Physiol.* 2017;8:1055
14. Yang Q, Miao Y, Campanello LJ, Hourwitz MJ, Abubaker-Sharif B, Bull AL, Devreotes PN, Fourkas JT, Losert W. Cortical waves mediate the cellular response to electric fields. *Elife.* 2022 Mar;11:e73198. doi: 10.7554/eLife.73198. PMID: 35318938; PMCID: PMC8942472.
15. Hodovanyi OV, Hodovana OI, Shandra MS, Kliuchivska OYu, Stoika RS. Zasib u formi helevoi kompozytsii «Benzydaflaziverdyne» z prolonhovanoiu diieiu dlia likuvannia 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]
16. Pokhodylo N, Manko N, Finiuk N, Klyuchivska O, Matiychuk 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.
17. 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-(CF3-phenylamino)-1H-pyrrole-2,5-dione. *Molecular and Cellular Biochemistry.* 2021; 476(8): 3021-35. doi.org/10.1007/s11010-021-04144-y.
18. 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.
19. Chen C, Bai X, Ding Y, Lee IS. Electrical stimulation as a novel tool for regulating cell behavior in tissue engineering. *Biomater Res.* 2019; 23: 25. doi: 10.1186/s40824-019-0176-8. PMID: 31844552; PMCID: PMC6896676.
20. Tai G, Tai M, Zhao M. Electrically stimulated cell migration and its contribution to wound healing. *Burns Trauma.* 2018; 6: 20. doi: 10.1186/s41038-018-0123-2. PMID: 30003115; PMCID: PMC6036678
21. Abou Baker DH. An ethnopharmacological review on the therapeutical properties of flavonoids and their mechanisms of actions: A comprehensive review based on up to date knowledge. *Toxicol Rep.* 2022; 9: 445-469. doi: 10.1016/j.toxrep.2022.03.011. PMID: 35340621; PMCID: PMC8943219
22. Forouzanfar A, Mohammadipour HS, Forouzanfar F. The Potential Role of Tea in Periodontal Therapy: An

- engineering. *Biomater Res.* 2019;23:25. doi: 10.1186/s40824-019-0176-8. PMID: 31844552; PMCID: PMC6896676.
20. Tai G, Tai M, Zhao M. Electrically stimulated cell migration and its contribution to wound healing. *Burns Trauma.* 2018;6:20. doi: 10.1186/s41038-018-0123-2. PMID: 30003115; PMCID: PMC6036678
  21. Abou Baker DH. An ethnopharmacological review on the therapeutical properties of flavonoids and their mechanisms of actions: A comprehensive review based on up-to-date knowledge. *Toxicol Rep.* 2022;9:445-469. doi: 10.1016/j.toxrep.2022.03.011. PMID: 35340621; PMCID: PMC8943219
  22. Forouzanfar A, Mohammadipour HS, Forouzanfar F. The Potential Role of Tea in Periodontal Therapy: An Updated Review. *Curr Drug Discov Technol.* 2021;18(1):1-7. doi: 10.2174/1389200221666200127114119. PMID: 31985382
  23. Davis KA, Wu PJ, Cahall CF, Li C, Gottipati A, Berron BJ. Coatings on mammalian cells: interfacing cells with their environment. *J Biol Eng.* 2019 Jan 17;13: 5. doi: 10.1186/s13036-018-0131-6. PMID: 30675178; PMCID: PMC6337841
  24. Okazaki Y., Gotoh E. Metal ion effects on different types of cell line, metal ion incorporation into L929 and MC3T3-E1 cells, and activation of macrophage-like J774.1 cells. *Materials Science and Engineering.* 2013; 33(4): 1993-2001. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.01.015>
  25. Stelling MP, Motta JM, Mashid M, Johnson WE., Pavlo MS., Farrell NP. Metal ions and the extracellular matrix in tumor migration. *The FEBS Journal.* 2019; 286: 2950-2964. <https://doi.org/10.1111/febs.14986>
  26. Tibau AV, Grube BD, Velez BJ, Vega VM, Mutter J. Titanium exposure and human health. *Oral Sci Int.* 2019;16:15-24. <https://doi.org/10.1002/osi2.1001>
  27. Hodovanyi OV, Chukhray NL, Martovlos OI, Klyuchivska OYu, Stoika RS. Experimental in vitro study of the penetration of gel composition into the biological environment by electrophoresis. In: II International Scientific and Theoretical Conference Modern tools and methods of scientific investigations; 2023 December 08; Antwerp. Antwerp; 2023. p. 282-284. DOI: <https://doi.org/10.36074/scientia-08.12.2023>
  28. Kim KT, Eo MY, Nguyen TTH, Kim SM. General review of titanium toxicity. *Int J Implant Dent.* 2019 Mar 11;5(1):10. doi: 10.1186/s40729-019-0162-x. PMID: 30854575; PMCID: PMC6409289.
  29. Alhamad M, Barão VAR, Sukotjo C, Cooper LF, Mathew MT. Ti-Ions and/or Particles in Saliva Potentially Aggravate Dental Implant Corrosion. *Materials.* 2021;14(19):5733. <https://doi.org/10.3390/ma14195733>

- Updated Review. *Curr Drug Discov Technol.* 2021; 18(1): 1-7. doi: 10.2174/1389200221666200127114119. PMID: 31985382
23. Davis KA, Wu PJ, Cahall CF, Li C, Gottipati A, Berron BJ. Coatings on mammalian cells: interfacing cells with their environment. *J Biol Eng.* 2019 Jan 17;13: 5. doi: 10.1186/s13036-018-0131-6. PMID: 30675178; PMCID: PMC6337841.
24. Okazaki Y, Gotoh E. Metal ion effects on different types of cell line, metal ion incorporation into L929 and MC3T3-E1 cells, and activation of macrophage-like J774.1 cells. *Materials Science and Engineering.* 2013; 33(4): 1993-2001. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.01.015>
25. Stelling MP, Motta JM, Mashid M, Johnson WE., Pavlo MS., Farrell NP. Metal ions and the extracellular matrix in tumor migration. *The FEBS Journal.* 2019; 286: 2950-2964. <https://doi.org/10.1111/febs.14986>
26. Tibau AV, Grube BD, Velez BJ, Vega VM, Mutter J. Titanium exposure and human health. *Oral Sci Int.* 2019; 16: 15-24. <https://doi.org/10.1002/osi2.1001>
27. Hodovanyi OV, Chukhray NL, Martovlos OI, Klyuchivska OYu, Stoika RS. Experimental in vitro study of the penetration of gel composition into the biological environment by electrophoresis. In: II International Scientific and Theoretical Conference Modern tools and methods of scientific investigations; 2023 Dec 08; Antwerp. Antwerp; 2023. p. 282-284. DOI: <https://doi.org/10.36074/scientia-08.12.2023>.
28. Kim KT, Eo MY, Nguyen TTH, Kim SM. General review of titanium toxicity. *Int J Implant Dent.* 2019 Mar 11; 5(1): 10. doi: 10.1186/s40729-019-0162-x. PMID: 30854575; PMCID: PMC6409289.
29. Alhamad M, Barão VAR, Sukotjo C, Cooper LF, Mathew MT. Ti-Ions and/or Particles in Saliva Potentially Aggravate Dental Implant Corrosion. *Materials.* 2021; 14(19): 5733. <https://doi.org/10.3390/ma14195733>

