

BIOSAFETY ASSESSMENT OF THE EXPERIMENTAL INNOVATIVE MEDICINAL PRODUCT “COAGULOX_N”

¹F.D. Ovcharenko Institute of Biocolloidal Chemistry, NAS of Ukraine (Kyiv Ukraine)

²State Institution “Kundiiev Institute of Occupational Health of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine” (Kyiv Ukraine)

sdybkova@gmail.com

The creation of modern, safe wound-healing medicines for both first aid and further treatment is a pressing issue today.

The aim of the study was to investigate the in vitro and in vivo biosafety of medicinal product “Coagulox_N”, a product that combines the therapeutic effects of an antimicrobial, haemostatic and wound-healing agent in a single product. The biosafety of “Coagulox_N” was determined in vitro based on the parameters of genotoxicity, cytotoxicity, and the nature of its effect on the marker enzymatic Mg²⁺-ATPase activity of the membrane fraction of eukaryotic cells. The in vivo toxicity criteria for “Coagulox_N” were determined based on the parameters of acute oral toxicity when administered into the stomach and acute dermal toxicity when applied to the skin of white rats. The dermal irritant effect of “Coagulox_N” was determined when applied to the skin of guinea pigs. The irritant effect of the drug on the mucous membrane of the eyes was tested using rabbits.

It has been shown that the experimental innovative drug “Coagulox_N” is biosafe according to in vitro indicators of genotoxicity, cytotoxicity, and biochemical marker of the effect on Mg²⁺-ATPase activity of the membrane fraction of the L929 test cell culture. The assessment of the accordance of “Coagulox_N” to the criteria of acute oral toxicity and acute dermal toxicity confirmed that the tested product belongs to hazard class 4 – substances of low hazard. The tested product “Coagulox_N” does not irritate the skin or the mucous membrane of the eyes of laboratory animals.

Key words: “Coagulox_N”, biosafety, genotoxicity, magnesium-dependent ATPase activity of membranes, cytotoxicity, median lethal dose, irritant effect.

Connection of the publication with planned research works.

The work was carried out with the financial support of the National Research Foundation of Ukraine (project No. 2023.04/0041) “Development of an innovative medicinal product “Coagulox_N” with antimicrobial, haemostatic and wound healing properties”.

Introduction.

In today's world, it is difficult to overestimate the importance of developing the means that are essential for creating a comprehensive chain of medical care, from first aid to further treatment in hospital and post-traumatic rehabilitation. There is an urgent need in Ukraine to develop new competitive wound healing and haemostatic agents for use both as individual links in this chain and in solving its complex therapeutic tasks [1-3].

The development of the complex medicinal product “Coagulox_N” is based on combining the therapeutic effects of an antimicrobial, haemostatic and wound-healing drugs in a single product. These effects are achieved by integrating mineral components, plant extracts, silver and gold nanoparticles into the composition. The “Coagulox_N” composition contains a combination of mineral components: metakaolin, silica with known haemostatic and sorption properties, plant extract (alcohol extract of unripe walnuts) with wound-healing properties, and silver and gold nanoparticles (anti-inflammatory, regenerative and antimicrobial properties) [4].

The aim of the study.

To study the *in vitro* and *in vivo* biosafety of the “Coagulox_N” medicinal product.

Object and research methods.

The experimental innovative medicinal product “Coagulox_N”, modified with gold and silver nanoparticles version of the agent “Coagulox” [5], was studied.

“Coagulox_N” is a brown paste. Its composition (per 100 g) includes: aerosil – 8-12 g, kaolin – 1-7 g, silver nanoparticles – 0.8 mg, gold nanoparticles – 19.3 µg, tincture of unripe walnuts – up to 100 ml.

The *in vitro* biosafety of “Coagulox_N” was determined by the parameters of genotoxicity, cytotoxicity, and the nature of its effect on the marker enzymatic ATPase activity of the membrane fraction of eukaryotic cells [6].

In vitro cytotoxicity and genotoxicity were assessed using a “Coagulox_N”-conditioned DMEM/F12 eukaryotic cell culture medium. For this purpose, a test agent (10 grams per 100 ml) was added to the DMEM/F12 medium and incubated for 18-24 hours at 37°C.

The cytotoxic effect of “Coagulox_N” was determined according to [7] using a vital dye test with trypan blue.

The genotoxicity of the medicinal product was performed using the Comet assay in alkaline conditions [8]. Cells were grown and incubated in a culture medium conditioned with “Coagulox_N”. Untreated test cells were used as a negative control (no genotoxic effect), and cells treated with the mutagen N-nitrosomethyl urea at a concentration of 1 mM were used as a positive control.

The tests were conducted using eukaryotic cells of mouse fibroblasts of the L929 line from the cell culture collection of the D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the National Academy of Sciences of

Ukraine. The cells were grown in a monolayer culture in plastic flasks with a bottom area of 75 cm² in DMEM/F12 nutrient medium with the addition of 10% fetal calf serum and antibiotic-antimycotic at 37°C under conditions of constant CO₂ (5%). After 24 hours exposure of the L929 cells' formed monolayer with the medium conditioned by the test sample, the possible cytotoxic and genotoxic effects were determined.

The *in vitro* biosafety of "Coagulox_N" was assessed based on its effect on the Mg²⁺-dependent ATPase activity of the membranes of the L929 test culture. The obtained membrane fraction was characterised by protein content using the Lowry method [9]. The total ATPase activity of the membrane fraction was assessed by spectrophotometry [10]. The activity was evaluated in relative units A_e/A_o , where A_o is the ATPase reaction rate of intact membranes, and A_e is the same indicator for membranes in the presence of "Coagulox_N". The negative control was the marker enzymatic activity of the membrane fraction of native cells. As a positive control (marker of toxic effect), the enzymatic activity of L929 cells under the influence of a laboratory sample extract with known cytotoxic activity [11] was used.

The study evaluated the accordance of "Coagulox_N" with *in vivo* toxicity criteria, namely: acute oral toxicity (median lethal dose – LD₅₀) when administered into the stomach and acute dermal toxicity when applied to the skin of laboratory animals; dermal irritation caused by "Coagulox_N" when applied to the skin; irritation caused by "Coagulox_N" to the mucous membrane of the eyes.

The research was conducted at the State Institution "Kundiiev Institute of Occupational Health of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", in accordance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes and Law of Ukraine No. 3447-IV 'On the Protection of Animals from Cruel Treatment' of 2006.

The assessment of acute oral and acute dermal toxicity *in vivo* was carried out in accordance with [12-15]. The acute oral and dermal toxicity of the medicinal product was studied using 24 white sexually mature male Wistar rats weighing 180-200 g, which were kept on a standard diet at the vivarium of the State Institution "Kundiiev Institute of Occupational Health of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine". The experimental groups consisted of 6 animals in both the oral and dermal acute toxicity studies. The control groups of animals that did not receive the test drug or have it applied to their skin consisted of 6 animals. For acute oral toxicity studies, the agent was administered to animals intragastrically in the form of a suspension in distilled water at a dose of 5000 mg/kg, followed by determination of the degree and nature of acute oral toxicity. Rats in the control group were administered distilled water in the same volume. For 14 days after administration of the substance, the animals were observed daily to record the presence of clinical signs of toxicity and death.

When studying the acute dermal toxicity, the product was applied to the skin in its native form at a dose of 2500 mg/kg, followed by determination of the degree and signs of acute toxicity. For 14 days after application of the substance, the animals were observed daily to record the presence of clinical signs of toxicity and death.

The acute oral and dermal toxicity of "Coagulox_N" was assessed based on the following indicators: mortality (time of death of animals in the group, daily); assessment of toxicity manifestations (daily), including the external appearance of animals; changes in body weight (after 3, 7, and 14 days). The study was conducted at a temperature of 21°C and humidity of 36%, atmospheric pressure – 744 mm Hg.

The skin irritation effect of "Coagulox_N" was assessed on guinea pigs in accordance with [12, 16]. The experimental group consisted of four light-coloured guinea pigs weighing 565-675 g, while the control group consisted of four guinea pigs kept on a standard diet and in standard vivarium conditions. The product in its native form was applied to a 2x2 cm area of skin at a rate of 20 mg/cm². The substance was applied using an open way. For 16 hours after application, the animals were observed to record the presence of clinical signs of irritation (erythema and/or oedema). The skin irritation index was determined by the degree of changes in the functional state of the skin in points (0 points – no irritation ($I_{cut}=0$); 1 point – mild irritation ($0 > I_{cut} < 1.0$); 2 points – moderate irritation ($1.0 > I_{cut} < 2.0$); 3 points – severe irritation ($2.0 > I_{cut} < 3.0$); 4 points – sharply pronounced irritant effect ($I_{cut} > 3.0$)).

The irritant effect of "Coagulox_N" on the mucous membrane of the eyes was assessed in accordance with [16]. The experiment was performed on six Chinchilla rabbits with healthy mucous membranes of the eyes, which were kept on a standard vivarium diet. Three rabbits formed the experimental group and three formed the control group. The test drug at a dose of 50 mg/ml was diluted in saline to form a suspension. The resulting suspension was administered once into the conjunctival sac of the right eye of the experimental rabbits. The animals in the control group were instilled with saline. After instilling the test agent or physiological saline solution into the eye, the lacrimal canal was pressed against the inner corner of the eye for one minute. The irritant effect of the agent on the mucous membrane of the eye was assessed visually by the degree of hyperemia and edema immediately after application and after 1 hour and 24 hours. The irritant effect index was determined by the degree of changes in the condition of the eye membrane in points (0 points – no irritant effect ($I_{ie}=0$); 1 point – weak irritant effect ($0 > I_{ie} < 1.0$); 2 points – moderate irritant effect ($1.0 > I_{ie} < 2.0$); 3 points – pronounced irritant effect ($I_{ie} > 2.0$)).

The experimental data were analysed using Student's t-test, with statistical significance set at $p < 0.05$. Statistical calculations for the experiments were performed using StatPlus Pro 5.9.8 and Statistica (version 10, Experimental Data Analysis System, StatSoft Inc. 2011).

Research results and their discussion.

In vitro biosafety studies of "Coagulox_N" medicinal product in terms of cytotoxicity when staining cells with vital dye trypan blue showed 88±3% survival of eukaryotic cells of the L929 line. Such cell survival indicates a low cytotoxic effect of the released active pharmaceutical ingredients of the studied medicinal product.

The *in vitro* genotoxicity indicators of "Coagulox_N", studied by the Comet assay in alkaline conditions, are presented in **table 1**.

The data presented in **table 1** demonstrate the absence of *in vitro* genotoxicity of the "Coagulox_N".

It is known that Mg^{2+} -dependent ATP hydrolase (Mg^{2+} -ATPase) activity of eukaryotic cell membranes maintains the physiological level of their energy metabolism through the hydrolysis of the main energy substrate ATP. This enzymatic activity is quite sensitive to the toxic effects of substances, which allows it to be considered as a biochemical marker of toxicity [6]. The results of the effect of the "Coagulox_N" medicinal product on the Mg^{2+} -ATPase activity of the membrane fraction of L929 cells are shown in **table 2**.

As can be seen from the data presented, enzymatic activity, which reflects the level of energy metabolism in L929 cells, showed high sensitivity to the toxic effects of the used positive control. So, the studied medicinal product "Coagulox_N" is not toxic *in vitro* based on the nature of its effect on the Mg^{2+} -ATPase activity of the total membrane fraction of L929 eukaryotic cells.

Thus, the *in vitro* tested "Coagulox_N" medicinal product is safe in terms of the genotoxicity, cytotoxicity and the used biochemical marker. Considering the peculiarities of the composition of such an in medicinal product, toxic effects *in vitro* could be expected due to the presence of metal nanoparticles in the "Coagulox_N". It is known that silver nanoparticles can exhibit cytotoxic properties because they induce a typical cellular response of active oxygen formation [17]. Other studies have shown that even despite the deposition of silver nanoparticles in the dermis, no toxic effects were observed and there were no systemic consequences [18]. Along with the data on *in vitro* toxicity of gold nanoparticles, there is a lot of information on the absence of cytotoxic effects in various lines of eukaryotic cells treated with gold nanoparticles [19]. Therefore, our *in vitro* results on the safety of the tested "Coagulox_N" medicinal product allow us to consider the gold and silver nanoparticles used in its composition to be biosafe, and the product itself falls under the concept of modern wound healing agents [20].

Further studies were aimed to determine the *in vivo* toxicity parameters of the "Coagulox_N" medicinal product.

The results of *in vivo* studies showed that a single administration of "Coagulox_N" to Wistar rats at a dose of 5000 mg/kg did not cause signs of toxicity: the animals were clean, active, responded to light and sound stimuli, urination and defecation processes were normal, no respiratory disorders were observed, and reflex excitability was preserved. No fatalities were observed throughout the testing period. The dynamics of the animals' body weight remained within the physiological norm (**table 3**).

At the end of the observation period, the animals were removed from the experiment. Pathological autopsy of the experimental rats did not reveal any abnormalities in the vital organs of the animals (liver, kidneys, spleen, heart, lungs, stomach).

According to the results of the studies, the median lethal dose (LD_{50}) for white Wistar rats exceeds 5000 mg/kg when administered into the stomach. In terms of acute toxicity when administered into the stomach, the "Coagulox_N"

Table 1 – *In vitro* genotoxicity evaluation of the "Coagulox_N"

Sample	Index "DNA Comets" I_{DNA}	Conclusion about genotoxicity
Negative control	0.166±0.001	Not genotoxic
Positive control	1.822±0.002	Genotoxic
"Coagulox_N"	0.218±0.001	Not genotoxic

medicinal product belongs to hazard class 4 (low-hazard substances) according to [15].

With regard to *in vivo* acute dermal toxicity studies, it was established that a single application of the "Coagulox_N" to the skin of Wistar rats at a dose of 2500 mg/

Table 2 – Assessment of Mg^{2+} -ATPase activity of the total membrane fraction of L929 cells under the influence of the "Coagulox_N"

Sample	Mg^{2+} -ATPase activity of the total membrane fraction of L929 cells under the influence of the studied preparations, A_e/A_c , %
Negative control (native membranes, A_c)	100
Positive control (laboratory sample with known cytotoxic effect)	20
"Coagulox_N"	100

kg did not cause signs of intoxication, did not lead to fatalities during the entire observation period, did not cause significant changes in the body weight dynamics of animals and any deviations from the norm in the vital organs of rats. Thus, the LD_{50} for white Wistar rats when applied to the skin is more than 2500 mg/kg. Therefore, according to the parameters of acute toxicity when applied to the skin, "Coagulox_N" belongs to hazard class 4 (low-hazard substances).

According to the results of studies on the dermal irritation effect of the "Coagulox_N" when applied to the skin, it was established that a single application of the

Table 3 – Assessment of body weight dynamics in rats after a single intragastric administration of the "Coagulox_N"

Group of animals	Initial data	third day	seventh day	fourteenth day
Control	184.5±1.9	190.5±1.8	200.2±1.6	211.5±1.2
"Coagulox_N", 5000 mg/kg	187.7±2.8	193.5±2.6	198.8±2.5	209.0±3.3

Table 4 – Assessment of the dermal irritant effect of the "Coagulox_N" when applied to the skin of guinea pigs

Group of animals	Average total score for severity of irritant effect (erythema and/or oedema)		
	Immediately after application	1 hour after application	16 hours after application
"Coagulox_N", 20 mg/cm ²	0 (Absence)	0 (Absence)	0 (Absence)

Table 5 – Assessment of the irritant effect of the "Coagulox_N" on the mucous membrane of the rabbits' eyes according to the degree of hyperemia and oedema

Group of animals	Degree of hyperemia/oedema		
	Immediately after instillation	1 hour after instillation	24 hours after instillation
"Coagulox_N", 50 mg/ml	0/0 (Absence)	0/0 (Absence)	0/0 (Absence)

medicinal product to the skin of guinea pigs at a dose of 20 mg/cm² did not cause signs of irritation, such as erythema or oedema. The data in **table 4** demonstrate the absence of irritant effects of medicinal product "Coagulox_N" when applied to the skin of guinea pigs.

The results of the studies showed that the "Coagulox_N" at a dose of 20 mg/cm² does not irritate the skin of guinea pigs moles. The skin irritation index is $I_{cut} = 0$ (no irritation).

A study of the irritant effect of the "Coagulox_N" medicinal product on the mucous membrane of rabbits' eyes showed that a single instillation of the agent at a dose of 50 mg/ml into the conjunctival sac of the right eye did not cause irritation to the mucous membrane. During 24 hours of observation, there was no hyperemia or edema of the mucous membrane of the eyes of the experimental rabbits (**table 5**).

According to the results of the assessment of the irritant effect of the "Coagulox_N" at a dose of 50 mg/ml on the mucous membrane of the eyes of rabbits, the tested product does not have an irritant effect. The irritant effect index on the mucous membrane is $I_{ie} = 0$ (no irritant effect).

Thus, a series of *in vivo* toxicity tests of the "Coagulox_N" allowed the medicinal product to be classified as a Class 4 hazardous substance in terms of acute oral and dermal toxicity, i.e. a low-hazard substance. The studied parameters of irritant effects on the skin and mucous membranes of the eyes of laboratory animals indicate that the "Coagulox_N" has no irritant effect.

In view of the composition of the "Coagulox_N" medicinal product, which contains low-hazard chemicals such as aerosil and kaolin and an extract of unripe wal-

nuts, the main toxic effect *in vivo* could be exerted by the metal nanoparticles (gold and silver) present in the product. The literature reports cases of such nanoparticles oral or transdermal entering to the body of animals and their systemic toxic effects [21-23]. From a clinical point of view, our data indicate the absence of toxicity of gold and silver nanoparticles in the tested medicinal product, and therefore these nanomaterials can be safely used without creating excessive risks to human health when introducing nanoparticles as a potential treatment in clinical practice.

Conclusions.

1. The experimental innovative medicinal product "Coagulox_N" is biosafe according to *in vitro* genotoxicity, cytotoxicity, and biochemical marker of influence on Mg²⁺-ATPase activity of the membrane fraction of the L929 cells test culture.

2. Assessment of the accordance of the "Coagulox_N" to the criteria for acute oral toxicity (LD₅₀) when administered into the stomach and acute dermal toxicity when applied to the skin of laboratory animals confirmed that the tested product belongs to hazard class 4 (low-hazard substances).

3. The tested medicinal product "Coagulox_N" does not irritate the skin and eye membranes of laboratory animals.

Prospects for further research.

The fulfilled studies open up the prospect of conducting appropriate expert examinations for the introduction of the medicinal product "Coagulox_N" into medical practice, including military medical practice, in accordance with the requirements of current regulatory documentation.

DOI 10.29254/2077-4214-2025-3-178-113- 122

УДК 661.1:615.4

¹Затовський І. В., ²Дибкова С. М., ¹Циганович О. А., ²Дмитруха Н. М., ¹Грузіна Т. Г.,
¹Резніченко Л. С., ¹Панько А. В, ¹Прокопенко В. А.

ОЦІНКА БІОБЕЗПЕЧНОСТІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ІННОВАЦІЙНОГО ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ «КОАГУЛОКС_N»

¹Інститут біоколоїдної хімії імені Ф. Д. Овчаренка НАН України (м. Київ, Україна)

²ДУ «Інститут медицини праці імені Ю.І. Кундієва Національної академії медичних наук України» (м. Київ, Україна)

sdybkova@gmail.com

Створення сучасних безпечних ранозагоювальних лікарських засобів для надання як першої невідкладної допомоги, так і для подальшого лікування, є актуальним завданням сьогодення.

Метою роботи було дослідження біобезпеки *in vitro* та *in vivo* засобу «Коагулокс_N», який поєднує у одному засобі терапевтичні ефекти антимікробного, кровоспинного і ранозагоювального препарату.

Біобезпечність засобу «Коагулокс_N» *in vitro* визначали за параметрами гено-, цитотоксичності та за характером впливу на маркерну ферментативну Mg²⁺-АТФазну активність мембранної фракції еукаріотичних клітин. Критерії токсичності *in vivo* засобу «Коагулокс_N» визначали за параметрами гострої пероральної токсичності при введенні в шлунок та гострої дермальної токсичності при нанесенні на шкіру білим щурам; шкірно-подразнюючої дії засобу «Коагулокс_N» при нанесенні на шкіру мурчаків та подразнюючої дії засобу на слизову оболонку очей кролів.

Показано, що експериментальний інноваційний лікарський засіб «Коагулокс_N» за показниками *in vitro* генотоксичності, цитотоксичності та біохімічним маркером впливу на Mg²⁺-АТФ-азну активність мембранної фракції тестової культури клітин L929 є біобезпечним. Оцінка відповідності засобу «Коагулокс_N» критеріям гострої пероральної токсичності та гострої дермальної токсичності засвідчила належність тестованого засобу до 4 класу небезпеки - малонебезпечні речовини. Тестований засіб «Коагулокс_N» не чинить подразнюючої дії на шкіру та оболонку очей лабораторних тварин.

Ключові слова: «Коагулокс_N», біобезпечність, генотоксичність, магній-залежна-АТФ-гідролазна активність мембран, цитотоксичність, середньо-смертельна доза, подразнююча дія.

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.

Робота виконана за фінансової підтримки Національного Фонду Досліджень України (проект № 2023.04/0041) «Розробка інноваційного лікарського засобу «Коагулокс_Н» з антимікробними, кровоспинними та ранозагоювальними властивостями».

Вступ.

В сучасних умовах важко переоцінити розробку засобів, вкрай необхідних для створення повноцінного ланцюга надання медичної допомоги – від першої невідкладної допомоги до подальшого лікування в стаціонарних умовах та посттравматичної реабілітації. В Україні є нагальна потреба в створенні новітніх конкурентноздатних лікувальних ранозагоювальних і кровоспинних засобів для реалізації як окремих ланок цього ланцюга, так і в рішенні його комплексних терапевтичних завдань [1-3].

У основі розробки комплексного лікарського засобу «Коагулокс_Н» лежить поєднання у одному засобі терапевтичних ефектів антимікробного, кровоспинного і ранозагоювального препарату. Зазначені ефекти досягаються шляхом інтегрування у рамках рецептури мінеральних компонентів, рослинних екстрактів та наночастинок срібла і золота. В рецептурі «Коагулокс_Н» присутня комбінація мінеральних компонентів – метаколін, кремнезем з відомою кровоспиною і сорбуючою дією, рослинних екстрактів (спиртовий екстракт незрілих плодів горіхи волоського) із ранозагоювальним ефектом та наночастинок срібла і золота (протизапальна, регенераторна і антимікробна дія) [4].

Мета дослідження.

Дослідження біобезпеки *in vitro* та *in vivo* засобу «Коагулокс_Н».

Об'єкт і методи дослідження.

У роботі досліджували експериментальний інноваційний засіб «Коагулокс_Н», який є модифікованим наночастинами золота і срібла засобом «Коагулокс» [5].

«Коагулокс_Н» є пастою коричневого кольору. До його складу входить (на 100 г): аеросил – 8-12 г, каолін – 1-7 г, наночастинок срібла – 0,8 мг, наночастинок золота – 19,3 мкг, настоянка незрілих плодів горіха волоського – до 100 мл.

Біобезпечність засобу «Коагулокс_Н» *in vitro* визначали за параметрами гено-, цитотоксичності та за характером впливу на маркерну ферментативну АТФазну активність мембранної фракції еукаріотичних клітин [6].

Цитотоксичність і генотоксичність *in vitro* оцінювали із застосуванням кондиціонованого зразком «Коагулокс_Н» середовища культивування культур еукаріотичних клітин – DMEM/F12. З цією метою вносили у середовище DMEM/F12 наважку тестованого засобу (10 грам на 100 мл) і інкубували протягом 18-24 годин при 37°C.

Цитотоксичну дію «Коагулокс_Н» *in vitro* визначали згідно [7] з використанням тесту з вітальним барвником трипановим синім.

Оцінку *in vitro* засобу «Коагулокс_Н» за показником генотоксичності проводили методом ДНК-комет в лужних умовах [8]. Клітини вирощували та інкубували в середовищі культивування, кондиціонованому зразком «Коагулокс_Н». В якості негативного контр-

олю (відсутня генотоксична дія) використовували не оброблені тестові клітини, а позитивного – клітини, оброблені мутагеном N-нітрозометил сечовиною у концентрації 1 мМ.

Тестування проводили з використанням еукаріотичних клітин фібробластів мишей лінії L929 з колекції культур клітин Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України. Клітини вирощували у моношаровій культурі в пластикових флаконах з площею дна 75см² у поживному середовищі DMEM/F12 із додаванням 10% ембріональної сироватки телят та антибіотику-антимікоту при 37°C в умовах постійного рівня CO₂ (5%). Через 24 год експозиції сформованого моношару клітин L929 з кондиціонованим досліджуваним зразком середовищем визначали можливу цитотоксичну та генотоксичну дію.

Здійснювали оцінку *in vitro* біобезпечності засобу «Коагулокс_Н» за характером впливу на маркерну Mg²⁺-залежну-АТФ-гідролазну активність мембран тестової культури L929. Отриману мембранну фракцію характеризували за вмістом білку по методу Лоурі [9]. Визначення сумарної АТФазної активності мембранної фракції оцінювали спектрофотометрично [10]. Величину активності оцінювали у відносних одиницях A_e/A_o , де A_o – швидкість АТФазної реакції інтактних плазматичних мембран, а A_e – цей же показник для мембран в присутності «Коагулокс_Н». Негативним контролем були маркерна ферментативна активність мембранної фракції нативних клітин. Як позитивний контроль (маркер токсичного впливу) використовували ферментативну активність клітин лінії L929 під впливом екстракту лабораторного зразку з встановленою цитотоксичною дією [11].

У роботі здійснювали оцінку відповідності засобу «Коагулокс_Н» критеріям токсичності *in vivo*, а саме: гострої пероральної токсичності (середньо-смертельної дози – LD₅₀) при введенні в шлунок та гострої дермальної токсичності при нанесенні на шкіру лабораторним тваринам; шкірно-подразнюючої дії засобу «Коагулокс_Н» при нанесенні на шкіру; подразнюючої дії засобу «Коагулокс_Н» на слизову оболонку очей.

Дослідження проводили у ДУ «Інститут медицини праці імені Ю.І. Кундієва Національної академії медичних наук України» згідно «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» та Закону України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» 2006 р.

Оцінку гострої пероральної та гострої дермальної токсичності *in vivo* здійснювали згідно [12-15]. Гостру пероральну та дермальну токсичність засобу досліджували із застосуванням 24 білих статевозрілих самців щурів лінії Wistar масою 180-200 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію ДУ «Інститут медицини праці імені Ю.І. Кундієва Національної академії медичних наук України». Дослідні групи склалися з 6 тварин як при дослідженні пероральної, так і дермальної гострої токсичності. Контрольні групи тварин, яким не вводили чи не наносили на шкіру досліджуваний препарат склалися з 6 тварин. Для досліджень гострої пероральної токсичності засіб вводили тваринам внутрішньошлунково у вигляді суспензії на дистильованій воді в дозі 5000 мг/кг з подальшим визначенням ступеню і характеру

гострої пероральної токсичності. Щурам контрольної групи вводили у тому ж об'ємі дистильовану воду. Протягом 14 днів після введення речовини, щоденно спостерігали за тваринами для реєстрації наявності клінічних ознак токсичності та загибелі.

Для дослідження гострої дермальної токсичності засіб наносили на шкіру у нативному вигляді в дозі 2500 мг/кг з подальшим визначенням ступеню і характеру гострої токсичності. Протягом 14 днів після нанесення речовини, щоденно спостерігали за тваринами для реєстрації наявності клінічних ознак токсичності та загибелі.

Оцінку гострої пероральної та дермальної токсичності засобу «Коагулокс_Н» здійснювали за показниками: летальність (терміни загибелі тварин у групі, щодня); оцінка проявів токсичності (щодня), включаючи зовнішній вигляд тварин; динаміку зміни маси тіла (через 3, 7, 14 днів). Дослідження проводили при температурі 21°C та вологості 36%, атмосферному тиску – 744 мм. рт. ст.

Оцінку шкірно-подразнюючої дії засобу «Коагулокс_Н» здійснювали на мурчаках згідно [12, 16]. Експериментальна група тварин була представлена 4 мурчаками світлого кольору масою 565-675 г, контрольна – 4 марчаками, яких утримували на стандартному раціоні та режимі віварію. Засіб у нативному вигляді наносили на ділянку шкіри 2*2 см згідно з нормою 20 мг/см². Нанесення речовини відбувалось відкритим способом. Протягом 16 годин після нанесення засобу спостерігали за тваринами для реєстрації наявності клінічних ознак подразнюючої дії (еритема та/чи набряк). Визначали індекс шкірно-подразнюючої дії за ступенем змін функціонального стану шкіри у балах (0 балів – відсутність подразнюючої дії ($I_{\text{cut}}=0$); 1 бал – слабка подразнююча дія ($0 < I_{\text{cut}} < 1.0$); 2 бали – помірна подразнююча дія ($1.0 > I_{\text{cut}} < 2.0$); 3 бали – виражена подразнююча дія ($2.0 > I_{\text{cut}} < 3.0$); 4 бали – різко виражена подразнююча дія ($I_{\text{cut}} > 3.0$)).

Оцінку подразнюючої дії засобу «Коагулокс_Н» на слизову оболонку очей здійснювали згідно [16]. Експеримент виконано на шести кролях породи Шиншила зі здоровою слизовою оболонкою очей, які утримувались на стандартному раціоні віварію. Три кролі складали експериментальну групу і три – контрольну. Досліджуваний препарат в дозі 50 мг/мл розводили у фізіологічному розчині до утворення суспензії. Отриману суспензію одноразово вносили в кон'юнктивальний мішок правого ока дослідних кролів. Тваринам контрольної групи закапували фізіологічний розчин. Після закапування тестованого засобу чи фізіологічного розчину в око кролям сльозно-носовий канал притискали до внутрішнього кута ока на одну хвилину. Оцінку подразнюючої дії засобу на слизову оболонку ока проводили візуально за ступенем гіперемії та набряку одразу після нанесення та через 1 годину і 24 години. Визначали індекс подразнюючої дії за ступенем змін стану оболонки очей у балах (0 балів – відсутність подразнюючої дії ($I_{\text{ir}}=0$); 1 бал – слабка подразнююча дія ($0 > I_{\text{ir}} < 1.0$); 2 бал – помірна подразнююча дія ($1.0 > I_{\text{ir}} < 2.0$); 3 бали – виражена подразнююча дія ($I_{\text{ir}} > 2.0$)).

Експериментальні дані були проаналізовані за допомогою t-критерію Стюдента, причому статистична значущість була встановлена на рівні $p < 0.05$. Статистичні розрахунки для експериментів були виконані за

допомогою StatPlus Pro 5.9.8 та Statistica (версія 10, Experimental Data Analysis System, StatSoft Inc. 2011).

Результати дослідження та їх обговорення.

Дослідження біобезпечності засобу «Коагулокс_Н» *in vitro* за параметром цитотоксичності при фарбуванні клітин вітальним барвником трипановим синім продемонстрували 88±3% виживаності еукаріотичних клітин лінії L929. Така виживаність клітин свідчить про низьку цитотоксичну дію вивільнених активних фармацевтичних інгредієнтів досліджуваного засобу.

Показники генотоксичності засобу «Коагулокс_Н» *in vitro*, досліджені методом ДНК-комет в лужних умовах, представлені у таблиці 1.

Дані, представлені у таблиці 1, демонструють відсутність генотоксичності *in vitro* засобу «Коагулокс_Н».

Таблиця 1 – Оцінка генотоксичності *in vitro* засобу «Коагулокс_Н»

Зразок	Індекс «ДНК-комет» $I_{\text{днк}}$	Висновок про генотоксичність
Негативний контроль	0.166±0.001	Not genotoxic
Позитивний контроль	1.822±0.002	Genotoxic
«Коагулокс_Н»	0.218±0.001	Not genotoxic

Відомо, що Mg^{2+} -залежна-АТФ-гідролазна (Mg^{2+} -АТФ-азна) активність мембран еукаріотичних клітин підтримує фізіологічний рівень їх енергетичного метаболізму через гідроліз основного енергетичного субстрату АТФ. Ця ферментативна активність є досить чутливою до токсичного впливу речовин, що дозволяє розглядати її як біохімічний маркер токсичності [6]. Результати впливу лікарського засобу «Коагулокс_Н» на величину Mg^{2+} -АТФазної активності мембранної фракції клітин L929 приведені у таблиці 2.

Як видно з наведених даних, ферментативна активність, яка відображає рівень енергетичного обміну клітин L929, виявила високу чутливість до токсичної дії використаного позитивного контролю. За характером впливу на величину Mg^{2+} -АТФазної активності сумарної мембранної фракції еукаріотичних клітин L929 досліджуваний засіб «Коагулокс_Н» є не токсичним *in vitro*.

Таким чином тестований *in vitro* засіб «Коагулокс_Н» за показниками генотоксичності, цитотоксичності та використаним біохімічним маркером є безпечним. Враховуючи особливості рецептури такого засобу можна було очікувати токсичних ефектів *in vitro* внаслідок наявності у «Коагулокс_Н» наночастинок металів. Відомо, що наночастинок срібла можуть проявляти цитотоксичні властивості, оскільки вони індукують типову клітинну реакцію утворення активних форм кисню [17]. В інших дослідженнях було показано, що навіть незважаючи на відкладення наночастинок срібла в дермі, прояв токсичної дії не фіксувався і не мав системних наслідків [18]. Поряд із інформацією про токсичність *in vitro* наночастинок золота є великий масив даних щодо відсутності цитотоксичних ефектів у різних лініях еукаріотичних клітин, оброблених наночастинами золота [19]. Тому отримані нами результати *in vitro* щодо безпеки тестованого засобу «Коагулокс_Н» дозволяють вважати використані у його рецептурі наночастинок золота і срібла біобезпечними, а сам засіб підпадає під

концепцію сучасних ранозагоювальних засобів [20].

Подальші дослідження були спрямовані на визначення параметрів токсичності *in vivo* засобу «Коагулокс_N».

За результатами проведених досліджень *in vivo* встановлено, що одноразове введення в шлунок засобу «Коагулокс_N» щурам Wistar в дозі 5000 мг/кг не викликало ознак інтоксикації: тварини були охайними, активними, реагували на світлові та звукові подразники, процеси сечовиділення та дефекації були в нормі, порушення дихання не спостерігалось, рефлекторна збудливість зберігалася. Летальних випадків не спостерігали упродовж всього періоду тестування. Динаміка маси тіла тварин перебувала в межах фізіологічної норми (табл. 3).

Table 3 – Assessment of body weight dynamics in rats after a single intragastric administration of the “Coagulox_N”

Група тварин	Вихідні дані	3 доба	7 доба	14 доба
Контроль	184.5±1.9	190.5±1.8	200.2±1.6	211.5±1.2
«Коагулокс_N», 5000 мг/кг	187.7±2.8	193.5±2.6	198.8±2.5	209.0±3.3

У кінці періоду спостереження тварин виводили з експерименту. При патологоанатомічному розтині дослідних щурів не відмічено будь-яких відхилень від норми у життєво-важливих органах тварин (печінка, нирки, селезінка, серце, легені, шлунок).

За результатами виконаних досліджень середньо-смертельна доза (LD_{50}) для білих щурів Wistar при введенні у шлунок перевищує 5000 мг/кг. Засіб «Коагулокс_N» за параметрами гострої токсичності при введенні у шлунок належить до 4 класу небезпеки (малонебезпечні речовини) згідно [15].

Щодо досліджень гострої дермальної токсичності *in vivo* встановлено, що одноразове нанесення на шкіру засобу «Коагулокс_N» щурам Wistar в дозі 2500 мг/кг не викликало ознак інтоксикації, не призводило до летальних випадків упродовж всього періоду спостереження, не викликало суттєвих змін динаміки маси тіла тварин та будь-яких відхилень від норми у життєво-важливих органах щурів. Таким чином, LD_{50} для білих щурів Wistar при нанесенні на шкіру становить більше 2500 мг/кг. Отже, засіб «Коагулокс_N» за параметрами гострої токсичності при нанесенні на шкіру належить до 4 класу небезпеки (малонебезпечні речовини).

За результатами проведених досліджень шкірно-подразнюючої дії засобу «Коагулокс_N» при нанесенні на шкіру встановлено, що одноразове нанесення на шкіру мурчаків засобу «Коагулокс_N» у дозі 20 мг / cm^2 не викликало ознак подразнення – еритеми чи набряку. Дані таблиці 4 демонструють відсутність прояву подразнюючої дії засобу «Коагулокс_N» при нанесенні на шкіру мурчаків.

За результатами виконаних досліджень встановлено, що засіб «Коагулокс_N» у дозі 20 мг / cm^2 не чинить

Таблиця 2 – Оцінка Mg^{2+} -АТФ-азної активності сумарної мембранної фракції клітин L929 під впливом досліджуваного засобу «Коагулокс_N»

Досліджувані препарати	Mg^{2+} -АТФ-азна активність сумарної мембранної фракції клітин L929 під впливом досліджуваних препаратів, Ae/Ao, %
Негативний контроль (нативні мембрани, Ao)	100
Позитивний контроль (лабораторний зразок з встановленою цитотоксичною дією)	20
«Коагулокс_N»	100

подразнюючої дії на шкіру мурчаків. Індекс шкірно-подразнюючої дії становить $I_{cut} = 0$ (відсутність подразнюючої дії).

Дослідження подразнюючої дії засобу «Коагулокс_N» на слизову оболонку очей кролів показало, що одноразове закапування засобу «Коагулокс_N» у дозі 50 мг/мл у кон'юнктивальний мішок правого ока не викликало подразнюючої дії на його слизову оболонку. Впродовж 24 год. спостереження гіперемія та набряк слизової ока у дослідних кролів були відсутні (табл. 5).

За результатами оцінки подразнюючої дії засобу «Коагулокс_N» у дозі 50 мг/мл на слизову оболонку очей кролів тестований засіб не чинить подразнюючої дії на слизову оболонку очей. Індекс подразнюючої дії на слизову оболонку $I_{ir} = 0$ (відсутність подразнюючої дії).

Таблиця 4 – Оцінка шкірно-подразнюючої дії засобу «Коагулокс_N» при нанесенні на шкіру мурчаків

Група тварин	Середній сумарний бал виразності подразнюючої дії (еритема та/чи набряк)		
	Відразу після нанесення	Через 1 год після нанесення	Через 16 год після нанесення
“Coagulox_N”, 20 mg/ cm^2	0 (Відсутність)	0 (Відсутність)	0 (Відсутність)

Таким чином, комплекс тестувань *in vivo* токсичності засобу «Коагулокс_N» дозволив віднести досліджений засіб до 4 класу небезпеки за параметрами гострої пероральної та дермальної токсичності – малонебезпечні речовини. Досліджені параметри подразнюючої дії на шкіру та слизові оболонки лабораторних тварин свідчать про відсутність подразнюючої дії засобу «Коагулокс_N».

Враховуючи особливості складу «Коагулокс_N», в якому наявні малонебезпечні хімічні речовини такі як аеросил і каолін та настоянка незрілих плодів горіха волоського, основний токсичний вплив *in vivo* могли б проявляти наявні у засобі наночастинки металів – золота і срібла. З даних літерати відомо про випадки потрапляння таких наночастинок в організм тварин пероральним, трансдермальним шляхом та фіксації системного токсичного впливу наночастинок металів

Таблиця 5 – Оцінка подразнюючої дії засобу «Коагулокс_N» на слизову оболонку ока кроля за ступенем гіперемії та набряку

Група тварин	Ступінь гіперемії/набряку		
	Одразу після закапування	Через 1 год після закапування	Через 24 год після закапування
«Коагулокс_N», 50 мг/мл	0/0 (Відсутність)	0/0 (Відсутність)	0/0 (Відсутність)

[21-23]. Отримані нами дані з клінічної точки зору свідчать про відсутність токсичності наночастинок золота і срібла в складі тестованого засобу, а отже ці наноматеріали можна безпечно використовувати не створюючи надмірних ризиків для здоров'я людини при впровадженні наночастинок як потенційного засобу лікування в клінічну практику.

Висновки.

1. Експериментальний інноваційний лікарський засіб «Коагулокс_Н» за показниками *in vitro* гено-токсичності, цитотоксичності та біохімічним маркером впливу на Mg^{2+} -АТФ-азну активність мембранної фракції тестової культури клітин L929 є біобезпечним.
2. Оцінка відповідності засобу «Коагулокс_Н» критеріям гострої пероральної токсичності (LD_{50}) при

введенні в шлунок та гострої дермальної токсичності при нанесенні на шкіру лабораторним тваринам засвідчила належність тестованого засобу до 4 класу небезпеки (малонебезпечні речовини) згідно «Гігієнічних регламентів допустимого вмісту хімічних і біологічних речовин у повітрі робочої зони».

3. Тестований засіб «Коагулокс_Н» не чинить подразнюючої дії на шкіру та оболонку очей лабораторних тварин.

Перспективи подальших досліджень.

Виконані дослідження відкривають перспективу проведення належних експертиз для впровадження засобу «Коагулокс_Н» в медичну, у тому числі військово-медичну практику, згідно вимог чинної нормативної-регламентуючої документації.

References / Література

1. Solomenny AN. Determination of qualitative composition of modern wound-healing drugs for the needs of the medical service of the Armed Forces of the Ukraine for the peace time and the special period. Ukrainian Journal of Military Medicine. 2021;2(3):93-102. DOI: [10.46847/ujmm.2021.3\(2\)-093](https://doi.org/10.46847/ujmm.2021.3(2)-093).
2. Richard MA, Paul C, Nijsten T, Gisondi P, Salavastru C, Taieb C, et al. EADV burden of skin diseases project team. Prevalence of most common skin diseases in Europe: a population-based study. J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. 2022;36(7):1088-1096. DOI: [10.1111/jdv.18050](https://doi.org/10.1111/jdv.18050).
3. Majumder MAA, Rahman S, Cohall D, Bharatha A, Singh K, Haque M, et al. Antimicrobial Stewardship: Fighting Antimicrobial Resistance and Protecting Global Public Health. Infect Drug Resist. 2020;13:4713-4738. DOI: [10.2147/IDR.S290835](https://doi.org/10.2147/IDR.S290835).
4. Zatovskyi IV, Dybkova SM, Rieznicenko LS, Tsyhanovych OA, Hruzina TH, Panko AV, et al. Composition of the silver and gold nanoparticles as a component of the medicinal product "Coagulox_N". Nanosistemi, Nanomateriali, Nanotehnologii. 2025;23(1):203-214. DOI: [10.15407/nnn.23.01.0203](https://doi.org/10.15407/nnn.23.01.0203).
5. Pakhovychshyn SV, Sukhovii MV, Petrenko OO, Panko AV, Averianov YeV, Semeniaka VI, et al. in, vynahidnyky; Instytut biokoloidnoi khimii im. F.D. Ovcharenka Natsionalnoi Akademii Nauk Ukrainy, patentovlasnyk. Ranozahoiuvalnyi zasib dlia likuvannia khvorykh na hemofiliiu. Patent Ukrainy № 76662. 2006 Serp 15. [in Ukrainian].
6. Naukovo-ekspertna rada Derzhavnoho ekspertnoho tsentru Ministerstva okhorony zdorovya Ukrainy. Metodichni Rekomendatsii Otsinka Bezpeky Likarskykh Nanopreparativ. Kyiv: Naukovo-ekspertna rada Derzhavnoho ekspertnoho tsentru Ministerstva okhorony zdorovya Ukrainy; 2013. 108 s. [in Ukrainian].
7. FDA. International Standard ISO 10993-1 Biological evaluation of medical devices – Part 1: Evaluation and testing within a risk management process. 4th ed. Silver Spring: FDA; 2016. 70 p.
8. Didenko VV, editor. Methods in Molecular Biology. In Situ Detection of DNA Damage. Methods and protocols. New Jersey: Humana Press; 2002. Chapter, Detection of DNA Breaks in Agarose Trapped Cells: Comet Assay and Related Techniques; p. 203-216.
9. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 1951;193:265-275.
10. Varbanets LD, Zdorovenko HM, Knyrel YuA. Metody doslidzhennia endotoksyniv. Kyiv: Naukova dumka; 2006. 237 s. [in Ukrainian].
11. Podolska VI, Rieznicenko LS, Yakubenko LM, Gruzina TG, Zholobak NM, Samchenko YM, et al. A study on the interaction of gold nanoparticles with sodium sulfacetamide. Him. Fiz. Tehnol. Poverhni. 2024;15:349-360. DOI: [10.15407/hftp15.03.349](https://doi.org/10.15407/hftp15.03.349).
12. Stefanov OV. Doklinichni doslidzhennia likarskykh zasobiv: metodichni nastanovy. Kyiv: Avitsenna; 2001. 528 s. [in Ukrainian].
13. OECD. OECD Guideline For The Testing Of Chemicals Acute Oral Toxicity № 420. Paris: OECD; 2001. 14 p. Available from: .
14. OECD. OECD Guideline For The Testing Of Chemicals. Acute Dermal Toxicity № 402. Paris: OECD; 2017. 13 p. Available from: .
15. Verkhovna Rada Ukrainy. Pro zatverdzhennia derzhavnykh medyko-sanitarnykh normatyviv dopustymoho vmistu khimichnykh i biolohichnykh rechovyn u povitri robochoi zony. Kyiv: Verkhovna Rada Ukrainy; 2024. Dostupno: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z1107-24#n9>. [in Ukrainian].
16. OECD. OECD Guideline For The Testing Of Chemicals. Acute Dermal Irritation/Corrosion № 404. Paris: OECD; 2015. 8 p. Available from: https://www.oecd.org/content/dam/oecd/en/publications/reports/2015/07/test-no-404-acute-dermal-irritation-corrosion_g1g59b23/9789264242678-en.pdf.
17. Yang W, Wang L, Mettenbrink EM, DeAngelis PL, Wilhelm S. Nanoparticle toxicology. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2021;61:269-289. DOI: [10.1146/annurev-pharmtox-032320-110338](https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-032320-110338).
18. Talarska P, Boruczkowski M, Żurawski J. Current knowledge of silver and gold nanoparticles in laboratory research – application, toxicity, cellular uptake. Nanomaterials (Basel). 2021;11(9):2454. DOI: [10.3390/nano1109_2454](https://doi.org/10.3390/nano1109_2454).
19. Goddard ZR, Marín MJ, Russell DA, Searcey M. Active targeting of gold nanoparticles as cancer therapeutics. Chem. Soc. Rev. 2020;49:8774-8789. DOI: [10.1039/D0CS01121E](https://doi.org/10.1039/D0CS01121E).
20. Yaqoob SB, Adnan R, Rameez Khan RM, Rashid M. Gold, silver, and palladium nanoparticles: a chemical tool for biomedical applications. Front. Chem. 2020;8:376. DOI: [10.3389/fchem.2020.00376](https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00376).
21. Narciso L, Coppola L, Lori G, Andreoli C, Zjino A, Bocca B, et al. Genotoxicity, biodistribution and toxic effects of silver nanoparticles after *in vivo* acute oral administration. NanolImpact. 2020;18:100221. DOI: [10.1016/j.impact.2020.100221](https://doi.org/10.1016/j.impact.2020.100221).
22. Niżnik Ł, Noga M, Kobylarz D, Frydrych A, Krośniak A, Kapka-Skrzypczak L, et al. Gold nanoparticles (AuNPs)-toxicity, safety and green synthesis: a critical review. Int J Mol Sci. 2024;25(7):4057. DOI: [10.3390/ijms25074057](https://doi.org/10.3390/ijms25074057).
23. Jakic K, Selc M, Razga F, Nemethova V, Mazancova P, Havel F, et al. Long-term accumulation, biological effects and toxicity of bsa-coated gold nanoparticles in the mouse liver, spleen, and kidneys. Int J Nanomedicine. 2024;19:4103-4120. DOI: [10.2147/IJN.S443168](https://doi.org/10.2147/IJN.S443168).

ОЦІНКА БІОБЕЗПЕЧНОСТІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ІННОВАЦІЙНОГО ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ «КОАГУЛОКС_Н»

Затовський І. В., Дибкова С. М., Циганович О. А., Дмитруха Н. М.,
Грузіна Т. Г., Резніченко Л. С., Панько А. В., Прокопенко В. А

Резюме. Створення сучасних лікарських засобів зовнішнього застосування для надання як першої невідкладної допомоги, так і для подальшого лікування, є актуальним завданням хімічної та фармацевтичної промисловості. Метою роботи було дослідження біобезпеки *in vitro* та *in vivo* засобу «Коагулокс_Н», який поєднує у одному засобі терапевтичні ефекти антимікробного, кровоспинного і ранозагоювального препарату. Біобезпечність засобу «Коагулокс_Н» *in vitro* визначали за параметрами гено-, цитотоксичності та за

характером впливу на маркерну ферментативну Mg^{2+} -залежну-АТФ-гідролазну активність мембран тестової культури фібробластів мишей L929. Цитотоксичність і генотоксичність *in vitro* оцінювали із застосуванням кондиціонованого зразком «Коагулокс_Н» середовища культивування культур еукаріотичних клітин лінії L929 – DMEM/F1. Цитотоксичну дію тестованого засобу визначали з використанням тесту з вітальним барвником трипановим синім. Оцінку *in vitro* засобу «Коагулокс_Н» за показником генотоксичності проводили методом ДНК-комет в лужних умовах. Показано, що експериментальний інноваційний лікарський засіб «Коагулокс_Н» за показниками *in vitro* генотоксичності, цитотоксичності та біохімічним маркером впливу на Mg^{2+} -АТФ-азну активність мембранної фракції тестової культури клітин L929 є біобезпечним.

Критерії токсичності *in vivo* засобу «Коагулокс_Н» визначали за параметрами гострої пероральної токсичності при введенні в шлунок та гострої дермальної токсичності при нанесенні на шкіру білим щурам; шкірно-подразнюючої дії засобу «Коагулокс_Н» при нанесенні на шкіру мурчаків та подразнюючої дії засобу на слизову оболонку очей кролів. Показано, що комплекс тестувань *in vivo* засобу «Коагулокс_Н» дозволив віднести досліджений засіб до 4 класу небезпеки за параметрами гострої пероральної та дермальної токсичності. Досліджені параметри подразнюючої дії на шкіру та слизові оболонки лабораторних тварин свідчать про відсутність подразнюючої дії засобу «Коагулокс_Н».

Виконані дослідження відкривають перспективу проведення належних експертиз для впровадження засобу «Коагулокс_Н» в медичну, у тому числі військово-медичну практику, згідно вимог чинної нормативної-регламентуючої документації.

Ключові слова: «Коагулокс_Н», біобезпечність, генотоксичність, магній-залежна-АТФ-гідролазна активність мембран, цитотоксичність, середньо-смертельна доза, подразнююча дія.

BIOSAFETY ASSESSMENT OF THE EXPERIMENTAL INNOVATIVE MEDICINAL PRODUCT “COAGULOX_N”

Zatovsky I. V., Dybkova S. M., Tsyganovich O. A., Dmytrukha N. M.,
Gruzina T. G., Rieznichenko L. S., Panko A. V., Prokopenko V. A.

Abstract. The creation of modern medicinal products for external use, both for first aid and further treatment, is a pressing task for the chemical and pharmaceutical industries. The aim of the study was to investigate the *in vitro* and *in vivo* biosafety of “Coagulox_N”, a product that combines the therapeutic effects of an antimicrobial, haemostatic and wound-healing agent in a single product. The biosafety of “Coagulox_N” was determined *in vitro* based on the parameters of genotoxicity, cytotoxicity, and the nature of the effect on the marker enzymatic Mg^{2+} -dependent ATPase activity of the membranes of the test culture of L929 mouse fibroblasts. Cytotoxicity and genotoxicity *in vitro* were assessed using a culture medium conditioned with the “Coagulox_N” sample of L929-DMEM/F1 eukaryotic cell lines. The cytotoxic effect of the tested agent was determined using a test with the vital dye trypan blue. The *in vitro* assessment of “Coagulox_N” for genotoxicity was performed using the Comet assay in alkaline conditions. It has been shown that the experimental innovative drug “Coagulox_N” is biosafe according to *in vitro* indicators of genotoxicity, cytotoxicity, and biochemical markers of the effect on Mg^{2+} -ATPase activity of the membrane fraction of the test culture of L929 cells.

The *in vivo* toxicity criteria for “Coagulox_N” were determined based on the parameters of acute oral toxicity when administered into the stomach and acute dermal toxicity when applied to the skin of white rats; the skin irritation effect of “Coagulox_N” when applied to the skin of guinea pigs and the irritation effect of the product on the mucous membrane of the eyes of rabbits. It has been shown that a series of *in vivo* tests of the “Coagulox_N” product allowed it to be classified as a Class 4 hazard based on acute oral and dermal toxicity parameters. The parameters of irritant effects on the skin and mucous membranes of laboratory animals studied indicate that “Coagulox_N” has no irritant effect.

The studies conducted open up the prospect of conducting appropriate expert examinations for the introduction of “Coagulox_N” into medical practice, including military medical practice, in accordance with the requirements of current regulatory documentation.

Key words: “Coagulox_N”, biosafety, genotoxicity, magnesium-dependent ATPase activity of membranes, cytotoxicity, median lethal dose, irritant effect.

ORCID and contributionship: / ORCID кожного автора та їх внесок до статті:

Zatovsky I. V.: <https://orcid.org/0000-0001-7062-9259> ^{ABCEDEF}
Dybkova S. M.: <https://orcid.org/0000-0002-8580-2584> ^{ABCEDEF}
Tsyganovich O. A.: <https://orcid.org/0000-0002-6181-3182> ^{ABDEF}
Dmytrukha N. M.: <https://orcid.org/0000-0001-9161-3889> ^{BCDEF}
Gruzina T. G.: <https://orcid.org/0000-0002-7613-7391> ^{BCDEF}
Rieznichenko L. S.: <https://orcid.org/0000-0002-3652-4426> ^{BCEF}
Panko A. V.: <https://orcid.org/0000-0002-3269-6327> ^{AEF}
Prokopenko V. A.: <https://orcid.org/0000-0001-8708-6502> ^{AEF}

Conflict of interest / Конфлікт інтересів:

The authors declare no conflict of interest / Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Corresponding author / Адреса для кореспонденції

Dybkova Svitlana Mykolayivna / Дибкова Світлана Миколаївна

F.D. Ovcharenko Institute of Biocolloidal Chemistry, NAS of Ukraine / Інститут біоколоїдної хімії імені Ф. Д. Овчаренка НАН України

Ukraine, 03142, Kyiv, 42 Acad. Vernadskogo Ave. / Адреса: Україна, 03142, Київ, бульв. Академіка Вернадського 42

Tel.: +380672641530, +380509772633 / Тел.: +380672641530, +380509772633

E-mail: sdybkova@gmail.com

A – Work concept and design, B – Data collection and analysis, C – Responsibility for statistical analysis, D – Writing the article, E – Critical review, F – Final approval of the article / A – концепція роботи та дизайн, B – збір та аналіз даних, C – відповідальність за статистичний аналіз, D – написання статті, E – критичний огляд, F – остаточне затвердження статті.

Received 27.04.2025 / Стаття надійшла 27.04.2025 року
Accepted 13.08.2025 / Стаття прийнята до друку 13.08.2025 року

DOI 10.29254/2077-4214-2025-3-178-122-128

UDC 577.12.084:612.592:615.21

Myrnyi V. H., Moisieieva N. M.

MODULATION OF NITROGEN METABOLISM UNDER CHRONIC COLD STRESS IN GUINEA PIGS: THE ROLE OF DALARGIN AND NALOXONE IN MEDIATING A PROTECTIVE EFFECT

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, National Academy of Sciences of Ukraine
(Kharkiv, Ukraine)

ukrainanataliy@gmail.com

Adaptation to cold stress is a critical process for maintaining viability under extreme low-temperature conditions. This process activates complex neurohumoral mechanisms that ensure thermogenesis, homeostasis, and functional stability of the organism. One of the key research areas is the study of synthetic neuropeptides, such as dalargin, which are capable of reducing cellular stress, preventing apoptosis, and promoting cell proliferation. However, the effects of this peptide on key markers of nitrogen metabolism, such as creatinine and urea, under prolonged cooling conditions remain insufficiently studied. The aim of this work was to assess the impact of dalargin on nitrogen metabolism markers (urea and creatinine) in guinea pigs under chronic cold stress (CCS) and to investigate the mechanisms underlying its protective effects. The experiment was conducted on guinea pigs, which were subjected to CCS through reduced ambient temperature. The results showed that CCS caused an increase in urea levels and a decrease in creatinine levels, indicating disturbances in nitrogen metabolism, enhanced catabolism, and impaired kidney function. Administration of dalargin led to a reduction in urea levels, but creatinine levels remained similar to those of the CCS group, indicating the selective nephroprotective effect of dalargin. To further explore the mechanisms of this action, the synthetic neuropeptide antagonist, naloxone, was used. The results demonstrated that naloxone administration partially reduced urea levels but did not restore the parameters to control levels. The data obtained confirm the role of opioid regulation in cold stress adaptation and indicate the potential of dalargin to correct nitrogen metabolism disturbances under CCS. These findings open prospects for the use of neuropeptides in the treatment of metabolic disorders under extreme temperature conditions.

Key words: adaptation, cold stress, hypothermia, homeothermic animals, protein metabolism, blood biochemical parameters, dalargin, cryobiology.

Connection of the publication with planned research works.

The study was conducted within the framework of research project "Investigation of the protective effects of synthetic neuropeptide analogs on the body of homeothermic animals and isolated cells exposed to cold stress," state registration number 2.2.6.136 (0121V100384).

Introduction.

Metabolic adaptation of the organism to low temperatures is a highly relevant topic in contemporary experimental and clinical physiology, as it ensures the maintenance of homeostasis, energy balance, and viability under cold stress conditions. Investigating the molecular mechanisms underlying this adaptation is essential for developing effective strategies to prevent and correct disorders caused by extreme temperature exposure. It is well established that cold exposure activates complex neurohumoral mechanisms that induce a

restructuring of energy metabolism to support thermogenesis and maintain internal homeostasis [1, 2, 3, 4]. In recent years, increasing attention has been directed toward the role of neuropeptides as potential modulators of these adaptive responses. Of particular interest are dalargin, a synthetic analog of Leu-enkephalin, and naloxone, a competitive opioid receptor antagonist [5, 6]. Contemporary research highlights the cytoprotective and anti-inflammatory properties of opioid peptides in various models of cellular stress. For instance, the synthetic Leu-enkephalin analog D-Ala²-Leu⁵-enkephalin (DADLE), which selectively activates delta-opioid receptors, has been shown to enhance the viability of human mesenchymal stem cells under serum deprivation through activation of the delta-opioid receptor–phosphoinositide 3-kinase–protein kinase B signaling pathway (DOR/PI3K/AKT) [7]. Moreover, DADLE has been demonstrated to reduce reactive oxygen species production, increase the expression of the anti-apoptot-