

## Влияние медь-, цинксодержащего комплекса на основе пористой матрицы на пролиферацию, апоптоз, некроз фибробластов и продукцию ими оксида азота

А.П. Лыков, Л.Н. Рачковская, О.В. Повешенко, Э.Э. Рачковский, А.Ю. Летягин

НИИ клинической и экспериментальной лимфологии –  
филиал ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН  
630060, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

### Резюме

Проведено сравнительное исследование влияния матрицы на основе пористого оксида алюминия и кремний-органического полимера полидиметилсилоксана (ПДМС) ( $\text{Al}_2\text{O}_3@ \text{ПДМС}$ ) и комплекса матрицы с сорбированными на ее поверхности медью и цинком ( $\text{Cu}@ \text{Zn}-\text{Al}_2\text{O}_3@ \text{ПДМС}$ ) на функциональные свойства фибробластов. **Материал и методы.** В эксперименте *in vitro* с клеточной линией фибробластов эмбриона человека (ФЭЧ-15) оценено влияние комплекса  $\text{Cu}@ \text{Zn}-\text{Al}_2\text{O}_3@ \text{ПДМС}$  и матрицы на их пролиферативный потенциал (МТТ-тест), апоптоз, некроз и продукцию стойких метаболитов оксида азота *in vitro*. **Результаты.** Сопоставляемые образцы  $\text{Cu}@ \text{Zn}-\text{Al}_2\text{O}_3@ \text{ПДМС}$  и  $\text{Al}_2\text{O}_3@ \text{ПДМС}$  близки по своим физико-химическим свойствам. Данные исследований функционального потенциала ФЭЧ-15 свидетельствуют о более высоком уровне пролиферации клеток и их способности продуцировать оксид азота при контакте с комплексом. Существенного увеличения апоптоза и некроза ФЭЧ-15 в присутствии образцов комплекса и носителя не выявлено. **Заключение.** Отсутствие значимого негативного влияния тестируемых образцов на функциональный статус клеток линии ФЭЧ-15 (пролиферация, апоптоз, некроз и секреция оксида азота) *in vitro* позволяет использовать комплекс  $\text{Cu}@ \text{Zn}-\text{Al}_2\text{O}_3@ \text{ПДМС}$  для дальнейшего анализа его безопасности при экспериментальных моделях кожных дефектов у животных.

**Ключевые слова:** комплекс, медь, цинк, оксид алюминия, полидиметилсилоксан, пролиферация, фибробласты, безопасность, детоксикация.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Автор для переписки:** Рачковская Л.Н., e-mail: noolit@niikel.ru

**Для цитирования:** Лыков А.П., Рачковская Л.Н., Повешенко О.В., Рачковский Э.Э., Летягин А.Ю. Влияние медь-, цинксодержащего комплекса на основе пористой матрицы на пролиферацию, апоптоз, некроз фибробластов и продукцию ими оксида азота. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2021; 41 (5): 62–67. doi: 10.18699/SSMJ20210508

## Effect of Cu-, Zn-containing complex based on a porous matrix on fibroblast proliferation, apoptosis, necrosis and nitric oxide production

A.P. Lykov, L.N. Rachkovskaya, O.V. Poveshchenko, E.E. Rachkovsky, A.Yu. Letyagin

Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology –  
Branch of the Institute of Cytology and Genetics of SB RAS  
630060, Novosibirsk, Timakov str., 2

### Abstract

A comparative study of the effect of a matrix based on porous aluminum oxide and a silicon organic polymer polydimethylsiloxane (PDMS) ( $\text{Al}_2\text{O}_3@ \text{PDMS}$ ) and a matrix complex with copper and zinc sorbed on its surface ( $\text{Cu}@ \text{Zn}-\text{Al}_2\text{O}_3@ \text{PDMS}$ ) on the functional properties of fibroblasts has been carried out. **Material and methods.** The effect of the  $\text{Cu}@ \text{Zn}-\text{Al}_2\text{O}_3@ \text{PDMS}$  complex and the matrix on the cell proliferative potential (MTT test), apoptosis, necrosis and the production of stable nitric oxide (NO) metabolites were studied in an *in vitro* experiment with a human embryo fibroblast cell line (HEF-15). **Results.** The compared samples of  $\text{Cu}@ \text{Zn}-\text{Al}_2\text{O}_3@ \text{PDMS}$  and  $\text{Al}_2\text{O}_3@ \text{PDMS}$  are similar in

their physico-chemical properties. Study of HEF-15 functional potential indicates a higher level of cell proliferation and ability to produce NO after contact with the complex. There was no significant increase in apoptosis and necrosis of HEF-15 in the presence of samples of the complex and the carrier. **Conclusion.** The absence of a significant negative effect of the tested samples on the functional status of cells of the FEH-15 line (proliferation, apoptosis, necrosis, NO secretion) *in vitro* allows the use of the Cu@Zn-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@PDMS complex for further analysis of its safety in experimental models of skin defects in animals.

**Key words:** complex, copper, zinc, aluminum oxide, polydimethylsiloxane, proliferation, fibroblasts, safety, detoxification.

**Conflict of interests.** The authors declare no conflict of interest.

**Correspondence author:** Rachkovskaya L.N., e-mail: noolit@niikel.ru

**Citation:** Lykov A.P., Rachkovskaya L.N., Poveshchenko O.V., Rachkovsky E.E., Letyagin A.Yu. Effect of Cu-, Zn-containing complex based on a porous matrix on fibroblast proliferation, apoptosis, necrosis and nitric oxide production. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2021; 41 (5): 62–67. [In Russian]. doi: 10.18699/SSMJ20210508

## Введение

На фоне коронавирусной пандемии, охватившей почти все страны, становится ясно, что поиск новых, альтернативных антибиотикам, антибактериальных препаратов в настоящее время актуален. Многочисленными исследованиями показана эффективность препаратов серебра [1]. Мутации патогенов чрезвычайно быстры и разнообразны, это подтверждает необходимость разработки новых подходов в борьбе с инфекцией и ее последствиями, когда необходимо быстрое восстановление гомеостаза организма. С этой точки зрения представляет интерес использование биоцидного воздействия ионов меди и цинка в составе активных композиций [2–4]. Основой композиций могут выступать носители, характеризующиеся развитой системой пор, высокой удельной поверхностью и гидрофильно-гидрофобной химической природой поверхности [5]. Фундаментальные исследования подтвердили целесообразность использования модифицированных активными веществами сорбентов-носителей для целей детоксикации и доставки активных веществ в зону терапевтического действия [6]. Следует отметить, что одновременно с доставкой активных ингредиентов по назначению такие носители проявляют и свойства детоксикантов, сорбируя на своей поверхности при контакте с биотканями токсические агенты разной природы и выводя их естественным путем из организма. При этом используемые сорбенты-носители и композиции на их основе должны быть не токсичны и безопасны для организма. Целью данного исследования явилось изучение безопасности новой композиции медь-, цинксодержащего комплекса на основе пористого оксида алюминия и полидиметилсилоксана.

## Материал и методы

В исследовании применяли медь-, цинксодержащий комплекс на основе  $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> и полимера полидиметилсилоксана (Cu@Zn-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@ПДМС). Для этого использовали механически прочный пористый  $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> с размером частиц 0,1 мм, объемом пор 0,23 см<sup>3</sup>/г и преобладающим размером пор 10–100 нм («Катализатор», Россия) и кремнийорганический полимер ПДМС (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Si-O-(Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-O-Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> (молекулярная масса 18000–19000) («Пента», Россия). В качестве источников ионов меди и цинка использовали соответственно CuSO<sub>4</sub> («Химреактив», Россия) и ZnO («Химпоставка», Россия). Комплекс Cu@Zn-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@ПДМС получен иммобилизацией путем физической адсорбции соответствующих компонентов меди и цинка и ПДМС из водной эмульсии на поверхности  $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. После короткой низкотемпературной обработки (не выше 200 °C) – это сыпучий порошок светло-голубого цвета. Исследовали также носитель без цинка и меди – Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@ПДМС. Удельную поверхность образцов определяли методом БЭТ, а размер и объем пор – по изотермам сорбции азота [7]. Сорбционную активность комплекса по сорбции метиленового синего ( $\lambda$  = 664 нм) определяли на спектрофотометре PD-303UV (Arel, Япония).

ФЭЧ-15 (штамм диплоидных клеток из кожно-мышечной ткани 10-недельного плода, ФГУН «Вектор» (Россия)) вели на среде DMEM («Биолот», Россия) с добавлением 10 % фетальной телячьей сыворотки (Hyclone, США), 2 mM L-глутамин (Sigma-Aldrich, США) и 80 мкг/мл гентамицина сульфата («Дальхимфарм», Россия) до получения 80–90 % конфлюэнтного монослоя, среду меняли каждые 3–4 дня, пересев клеток осуществляли снятием монослоя клеток раствором трипсин/ЭДТА (1:1; «Биолот»).

**Таблица.** Физико-химические свойства образцов с размером частиц 0,1 мм**Table.** Physical and chemical properties of samples with a particle size of 0,1 mm

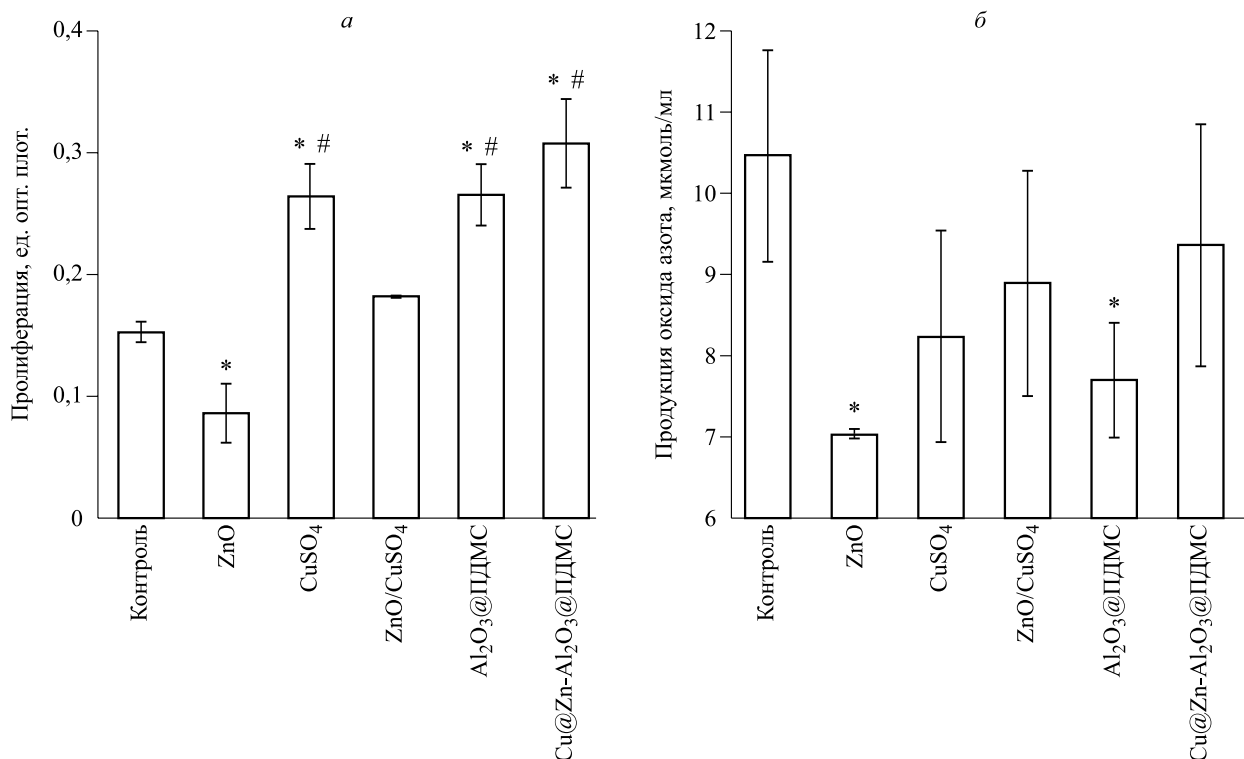
Сорбент	CuSO <sub>4</sub> , %	ZnO, %	S, удельная поверхность, м <sup>2</sup> /г	V, объем пор, см <sup>3</sup> /г	Адсорбция метиленового голубого, мг/г
Cu@Zn-Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> @ПДМС	0,2	0,8	151,8	0,23	5,7
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> @ПДМС	—	—	153,0	0,23	5,5

Для постановки МТТ-теста вносили по 80 000 клеток на лунку в 1 мл питательной среды в 24-луночные планшеты (TPP, Швейцария), в опытные лунки добавляли тестируемые образцы и инкубировали в течение 72 часов при 37 °С и 5 % CO<sub>2</sub>. За 4 часа до окончания опыта планшеты центрифугировали при 1500 оборотах в минуту в течение 5 минут (Eppendorf, Германия), из лунок удаляли надосадочную жидкость и вносили по 100 мкл среды DMEM и по 10 мкл 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолия бромида (МТТ, Merck, США), инкубировали 4 часа при 37 °С и 5 % CO<sub>2</sub>. Далее вносили по 100 мкл диметилсульфоксида (Merck) для разрушения клеточной мембраны, оптическую плотность продукта реакции в лунке оценивали при длине волны  $\lambda = 492$  нм на

планшетном фотометре Stat Fax 2100 (Awareness Technology, США).

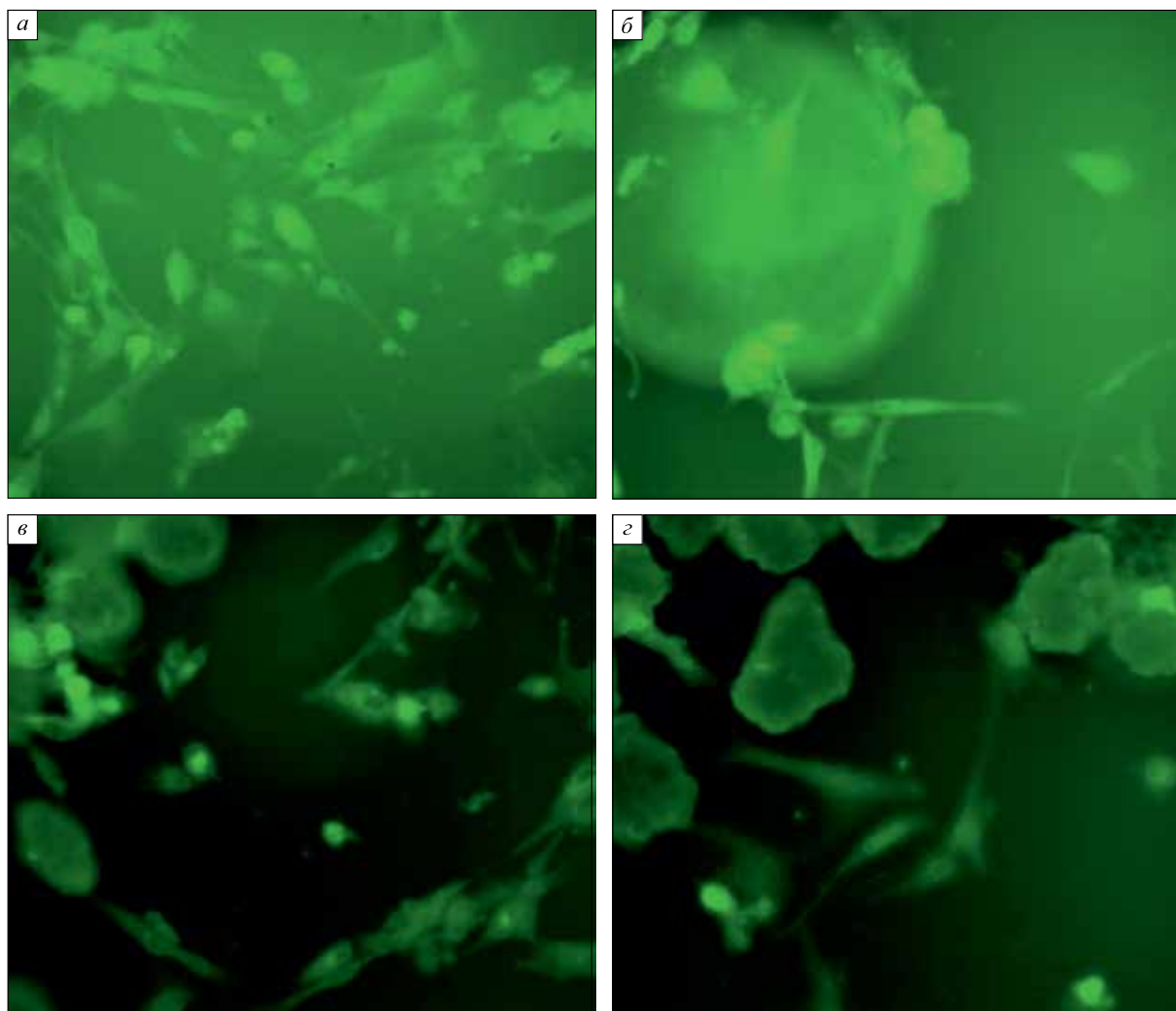
Продукцию клетками ФЭЧ-15 оксида азота определяли по содержанию в кондиционных средах нитритов, его стойких метаболитов, с использованием реактива Грисса на спектрофотометре Stat Fax 2100 ( $\lambda = 492$  нм) [7], строили калибровочную кривую с использованием 1 мМ нитрита натрия, выражали в мкмоль/мл. Для оценки апоптоза и некроза клетки ФЭЧ-15 окрашивали витальными красителями акридиновым оранжевым и этидия бромидом (1:1, 10 мкл/лунку), делали микрофотографии на инвертированном микроскопе Axio Observer (Carl Zeiss, Германия).

Нормальность распределения полученных данных оценивали с использованием w-критерия Шапиро – Уилка. Данные представлены в виде



**Рис. 1.** Пролиферативный потенциал клеток ФЭЧ-15 (а) и продукция ими стойких метаболитов оксида азота (б) в присутствии свободных и связанных ионов цинка и меди; обозначены статистически значимые ( $p < 0,05$ ) отличия от величин соответствующих показателей контроля (\*) и группы ZnO/CuSO<sub>4</sub> (#)

**Fig. 1.** Proliferative potential of HEF-15 cells (a) and production of persistent nitric oxide metabolites (б) in the presence of free and bound zinc and copper ions;  $p < 0.05$  compared to control (\*) and to ZnO/CuSO<sub>4</sub> (#)



**Рис. 2.** Выраженность апоптоза и некроза клеток ФЭЧ-15 (микрофотографии,  $\times 20$ ) в контроле (а), в присутствии  $Al_2O_3@PDMS$  (б),  $Cu@Zn-Al_2O_3@PDMS$  (в) и смеси сульфата меди и оксида цинка (г)

**Fig. 2.** Apoptosis and necrosis of HEF-15 cells (micrographs,  $\times 20$ ) in control (a), in the presence of  $Al_2O_3@PDMS$  (б),  $Cu@Zn-Al_2O_3@PDMS$  (в) and copper sulfate and zinc oxide mixture (г)

среднего арифметического и стандартного отклонения ( $M \pm SD$ ), статистическую значимость различий между образцами оценивали однофакторным дисперсионным анализом (ANOVA) с использованием поправки Бонферрони и принимали при  $p < 0,05$ .

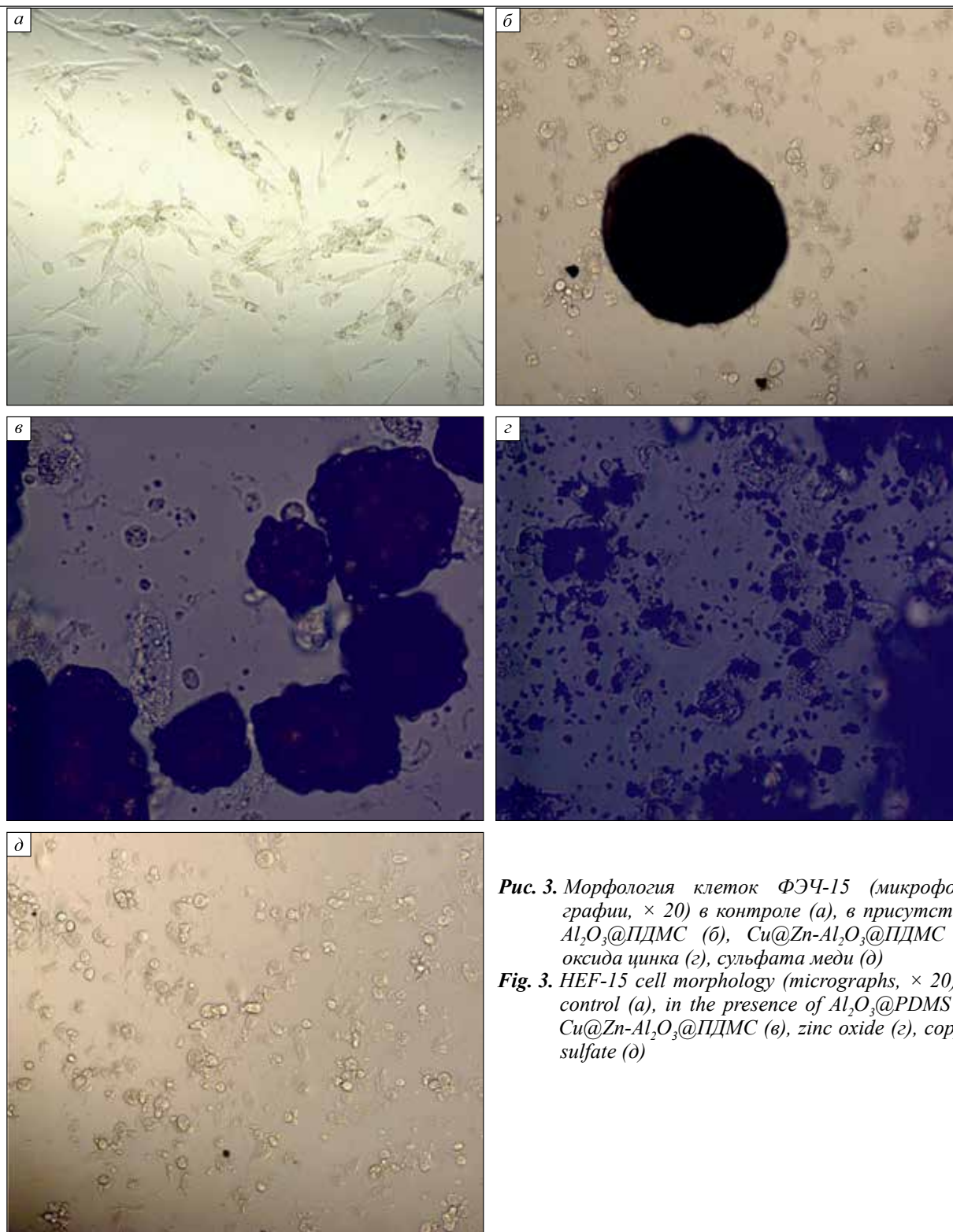
## Результаты

Как видно из таблицы, величины удельной поверхности и объема пор исследованных сорбентов с добавками и без добавок компонентов меди и цинка практически идентичны, что свидетельствует о равномерности их распределения в пористой структуре носителя.

Установлено, что комплекс  $Cu@Zn-Al_2O_3@PDMS$ , носитель без ионов цинка и меди  $Al_2O_3@PDMS$ , свободные ионы меди ( $CuSO_4$ ) значимо

увеличивают пролиферативный потенциал клеток ФЭЧ-15 (рис. 1, а); наличие свободных ионов цинка ( $ZnO$ ) в питательной среде угнетает пролиферацию клеток (см. рис. 1, а); носитель без ионов цинка и меди  $Al_2O_3@PDMS$  и наличие свободных ионов цинка ( $ZnO$ ) в питательной среде снижают продукцию фибробластами стойких метаболитов оксида азота (рис. 1, б).

Существенного увеличения апоптоза и некроза клеток ФЭЧ-15 в присутствии связанного с матрицей носителя, ионов цинка и меди не выявлено (рис. 2). Отмечены изменения морфологии (обилие округлых клеток, грануляция цитоплазмы), указывающие на ухудшение условий для распластывания клеток на поверхности пластика в присутствии как свободных, так и связанных ионов цинка и меди, а также носителя без ионов цинка и меди  $Al_2O_3@PDMS$  (рис. 3).



**Рис. 3.** Морфология клеток ФЭЧ-15 (микрофотографии,  $\times 20$ ) в контроле (а), в присутствии  $Al_2O_3@PDMS$  (б),  $Cu@Zn-Al_2O_3@PDMS$  (в), оксида цинка (г), сульфата меди (д)

**Fig. 3.** HEF-15 cell morphology (micrographs,  $\times 20$ ) in control (a), in the presence of  $Al_2O_3@PDMS$  (б),  $Cu@Zn-Al_2O_3@PDMS$  (в), zinc oxide (г), copper sulfate (д)

## Заключение

Исследование биологических свойств нового цинк-, медьсодержащего комплекса на основе  $\gamma$ -оксида алюминия и полимера полидиметилсилоксана ( $Cu@Zn-Al_2O_3@PDMS$ ) показало, что комплекс не токсичен: он значительно увеличивает пролиферацию фибробластов эмбриона человека

(линия ФЭЧ-15), не влияя на выраженность апоптоза и некроза, а также продукцию стойких метаболитов оксида азота.

## Список литературы / References

1. Бурмистров В.А., Рачковская Л.Н., Попова Т.В., Котлярова А.А., Королев М.А.,

Летягин А.Ю. Перспективы применения препаратов коллоидного серебра для активной санации организма от патогенных микробов. *Вестн. КРСУ*. 2018; 18 (9): 23–26.

Burmistrov V.A., Rachkovskaya L.N., Popova T.V., Kotlyarova A.A., Korolev M.A., Letyagin A.Yu. Prospects for the use of colloidal silver preparations for active sanitation of the body from pathogenic microbes. *Vestnik Kirgissko-Rossiyskogo slavyanskogo universiteta*=*Bulletin of the Kyrgyz-Russian Slavic University*. 2018; 18 (9): 23–26. [In Russian].

2. Гарасько Е.В., Шиляев Р.Р., Алексеева О.В., Чуловская С.А., Багровская Н.А., Парфенюк В.И. Антибактериальные свойства полимерных композитов с наноразмерными частицами меди. *Вестн. Иван. мед. акад.* 2009; 14 (2): 21–25.

Garasko E.V., Shilyaev R.R., Alekseeva O.V., Chulovskaya S.A., Bagrovskaya N.A., Parfenyuk V.I. Antibacterial properties of polymer composites with nanoscale copper particles. *Vestnik Ivanovskoy meditsinskoy akademii* = *Bulletin of the Ivanovo Medical Academy*. 2009; 14 (2): 21–25. [In Russian].

3. Хлебникова А.Н., Петрунин Д.Д. Цинк, его биологическая роль и применение в дерматологии. *Вестн. дерматол. и венерол.* 2013; (6): 100–116.

Khlebnikova A.N., Petrunin D.D. Zinc, its biological role and application in dermatology. *Vestnik dermatologii i venerologii* = *Dermatology and Venereology Bulletin*. 2013; (6): 100–116. [In Russian].

4. Djoko K.Y., Ong C.L., Walker M.J., McEwan A.G. The role of copper and zinc toxicity in innate immune

defense against bacterial pathogens. *J. Biol. Chem.* 2015; 290 (31): 18954–18961. doi: 10.1074/jbc.R115.647099

5. Madonov P.G., Rachkovskaya L.N., Michurina S.V., Robinson M.V., Rachkovsky E.E., Ishchenko I.Yu., Lykov A.P., Shurlygina A.V., Poveshchenko O.V., Popova T.V. Aluminum and silica containing porous carrier for active pharmaceutical ingredients. *2019 International MultiConference on Engineering Computer and Information Sciences (SIBIRCON)*: proc. conf., Novosibirsk, 21–27 october 2019. Novosibirsk: 2019. P. 301–304.

6. Бородин Ю.И., Коненков В.И., Пармон В.Н., Любарский М.С., Рачковская Л.Н., Бгатова Н.П., Летягин А.Ю. Биологические свойства сорбентов и перспективы их применения. *Успехи соврем. биол.* 2014; 134 (3): 236–248.

Borodin Yu.I., Konenkov V.I., Parmon V.N., Lyubarsky M.S., Rachkovskaya L.N., Bgatova N.P., Letyagin A.Yu. Biological properties of sorbents and prospects of their application. *Uspekhi sovremennoy biologii* = *Biology Bulletin Reviews*. 2014; 134 (3): 236–248. [In Russian].

7. Грег С., Синг К. Адсорбция, удельная поверхность, пористость. М.: Мир, 1984. 310 с.

Greg S., Sing K. Adsorption, specific surface area, porosity. Moscow: Mir, 1984. 310 p. [In Russian].

8. Korolenko T.A., Goncharova N.V., Karmatskiy O.L., Johnston T.P., Machova E., Nescakova Z., Bgatova N.P., Lykov A.P., Shintyapina A.B., Maiborodin I.V. Hypolipidemic effect of mannans from *C. albicans* serotype A and B in acute hyperlipidemia in mice. *Int. J. Biol. Macromol.* 2018; 107 (Pt B): 2385–2394. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.10.111

## Сведения об авторах:

Александр Петрович Лыков, к.м.н., ORCID: 0000-0003-4897-8676, e-mail: aplykov2@mail.ru

Любовь Никифоровна Рачковская, к.х.н., ORCID: 0000-0001-9622-5391, e-mail: noolit@niikel.ru

Ольга Владимировна Повешенко, д.м.н., ORCID: 0000-0001-9956-0056, e-mail: poveshchenkoov@yandex.ru

Эдмунд Эдмундович Рачковский, к.х.н., ORCID: 0000-0003-3756-4873, e-mail: reed@academ.org

Андрей Юрьевич Летягин, д.м.н., ORCID: 0000-0002-9293-4083, e-mail: letyagin-andrey@yandex.ru

## Information about the authors:

Alexander P. Lykov, candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0003-4897-8676, e-mail: aplykov2@mail.ru

Lubov N. Rachkovskaya, candidate of chemical sciences, ORCID: 0000-0001-9622-5391, e-mail: noolit@niikel.ru

Olga V. Poveshchenko, doctor of medical sciences, ORCID: 0000-0001-9956-0056, e-mail: poveshchenkoov@yandex.ru

Edmund E. Rachkovsky, candidate of chemical sciences, ORCID: 0000-0003-3756-4873, e-mail: reed@academ.org

Andrey Yu. Letyagin, doctor of medical sciences, ORCID: 0000-0002-9293-4083, e-mail: letyagin-andrey@yandex.ru

Поступила в редакцию 08.07.2021

После доработки 26.07.2021

Принята к публикации 01.09.2021

Received 08.07.2021

Revision received 26.07.2021

Accepted 01.09.2021