

ПРОЛИФЕРАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ КОНЦЕНТРАЦИИ УГЛЕРОДНЫХ ТОЧЕК

PROLIFERATIVE ACTIVITY OF DERMAL FIBROBLASTS DEPENDING ON THE CONCENTRATION OF CARBON DOTS

**A. Golderova
S. Shadrina
I. Nikolaeva
M. Egorova
Yu. Evseeva
I. Troev
A. Egorov**

Summary. The article describes an experimental study on human dermal fibroblast cells. The aim of the study was to evaluate in vitro the proliferative activity of human dermal fibroblasts depending on the concentration of carbon dots (CD). By the end of the experiment, the most "affected" was the group to which the largest volume of carbon dots solution (50 ml) was added, the group with the smallest volume (10 ml) was practically not "affected". The results obtained confirm that the toxicity of UT depends on the protocol of their manufacture and is detected only at higher concentrations.

Keywords: carbon dots, fibroblasts, cytotoxicity, cell culture, proliferation, hydrothermal method, bird cherry, positive charge, concentration, in vitro.

Гольдерова Айталина Семеновна

*Д.м.н., профессор, Северо-Восточный Федеральный
Университет им. М.К. Аммосова, г. Якутск
hoto68@mail.ru*

Шадрина Светлана Семеновна

*С.н.с., Северо-Восточный Федеральный
Университет им. М.К. Аммосова, г. Якутск
svetlana.maksimo@mail.ru*

Николаева Ирина Эдуардовна

*Н.с., Северо-Восточный Федеральный Университет
им. М.К. Аммосова, г. Якутск
ysucell@gmail.com*

Егорова Марфа Никитична

*Н.с., Северо-Восточный Федеральный Университет
им. М.К. Аммосова, г. Якутск*

Евсеева Юлия Руслановна

*Врач-лаборант, Северо-Восточный Федеральный
Университет им. М.К. Аммосова, г. Якутск*

Троев Иван Петрович

*Н.с., Северо-Восточный Федеральный Университет
им. М.К. Аммосова, г. Якутск*

Егоров Андрей Николаевич

*Лаборант, Северо-Восточный Федеральный
Университет им. М.К. Аммосова, г. Якутск*

Аннотация. В статье описывается экспериментальное исследование на клетках дермальных фибробластов человека. Цель исследования — оценить in vitro пролиферативную активность дермальных фибробластов человека в зависимости от концентрации углеродных точек (УТ). К концу эксперимента наиболее «пострадавшей» оказалась группа, в которую добавлен наибольший объем раствора углеродных точек (50 мл), практически не «пострадала» группа при наименьшем объеме (10 мл). Полученные результаты подтверждают, что токсичность УТ зависит от протокола их изготовления и обнаруживается только при более высоких концентрациях.

Ключевые слова: углеродные точки, фибробласты, цитотоксичность, культура клеток, пролиферация, гидротермальный метод, черемуха обыкновенная, положительный заряд, концентрация, in vitro.

Углеродные точки (УТ) представляют собой люминесцентный углеродный наноматериал, обладающий хорошей биосовместимостью и низкой токсичностью. Разнообразное моделирование с применением различных культур клеток человека на примере здоровых клеточных линий фибробластов, позволяет дать достоверные результаты цитотоксического

действия УТ на клетки. Многие исследования цитотоксичности продемонстрировали, что УТ обладают очень низкой токсичностью [1, с. 279–286; 2, с. 1177], на линиях клеток фибробластов 3Т3 не были цитотоксичными до 400 мкг / мл [3, № 100243], тест на цитотоксичность водорастворимых УТ против клеток фибробластов человека с использованием анализа МТТ показал выжи-

Таблица 1. Медианы количества фибробластов в контрольной и в экспериментальных группах

Дни	n	Медиана	Минимум	Максимум	25-й процентиль	75-й процентиль
Первая группа (контрольная)						
1	5	52	38	57	45	56
2	5	360	216	432	332	376
3	5	680	572	994	588	884
4	5	704	648	906	686	866
5	5	940	848	1108	896	1024
Вторая группа						
1	5	58	40	68	48	64
2	5	260	165	420	252	260
3	5	312	268	544	276	328
4	5	352	241	605	337	518
5	5	956	836	1308	886	1032
Третья группа						
1	5	57	54	68	57	62
2	5	208	184	224	188	216
3	5	344	236	392	268	348
4	5	390	341	552	363	442
5	5	819	768	852	782	824
Четвертая группа						
1	5	59	49	64	58	63
2	5	157	118	180	122	168
3	5	348	152	513	152	394
4	5	344	247	503	290	357
5	5	844	792	988	816	852
Пятая группа						
1	5	62	61	64	62	63
2	5	204	124	312	161	292
3	5	576	524	988	540	604
4	5	562	247	671	495	628
5	5	627	543	643	619	642
Шестая группа						
1	5	62	56	65	60	63
2	5	272	176	456	220	384
3	5	668	532	836	601	692
4	5	238	88	402	100	302
5	5	186	117	277	123	192

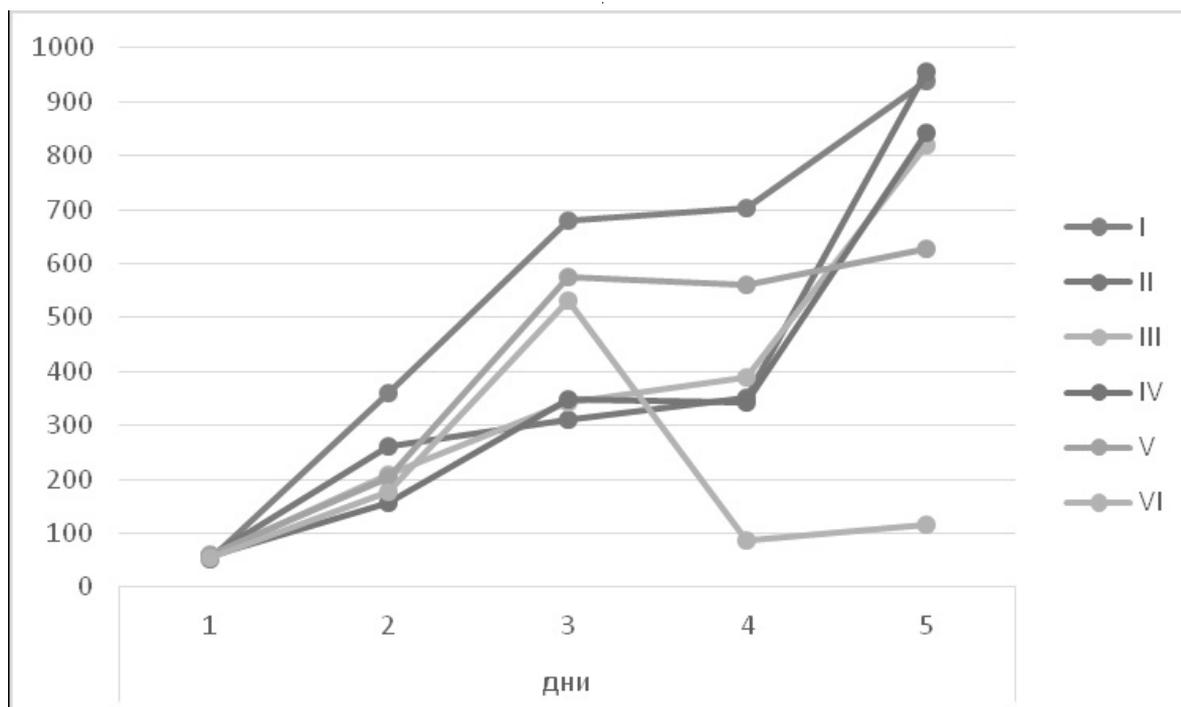
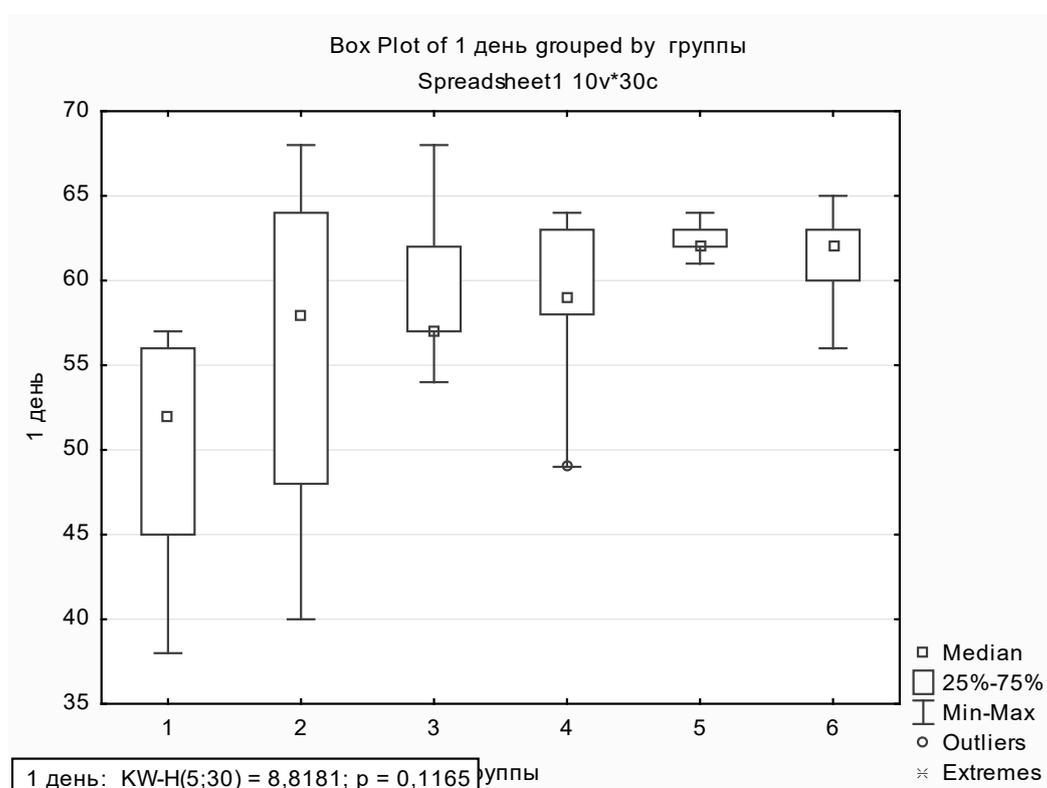
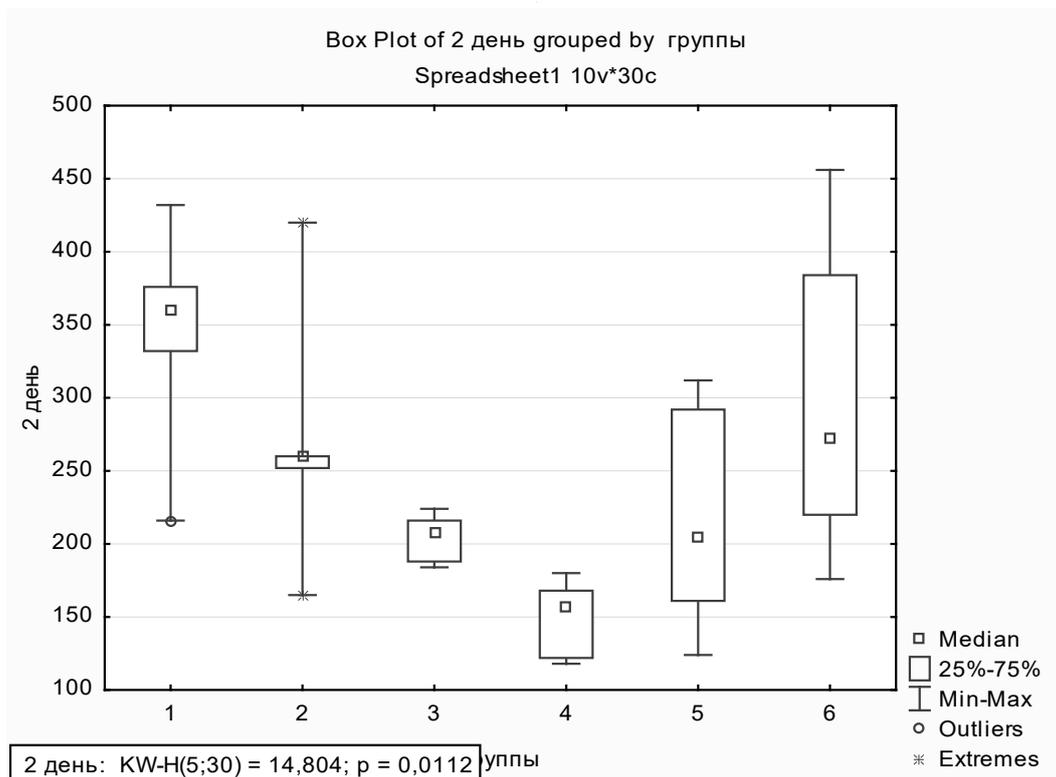


Рис. 1. Динамика пролиферации фибробластов

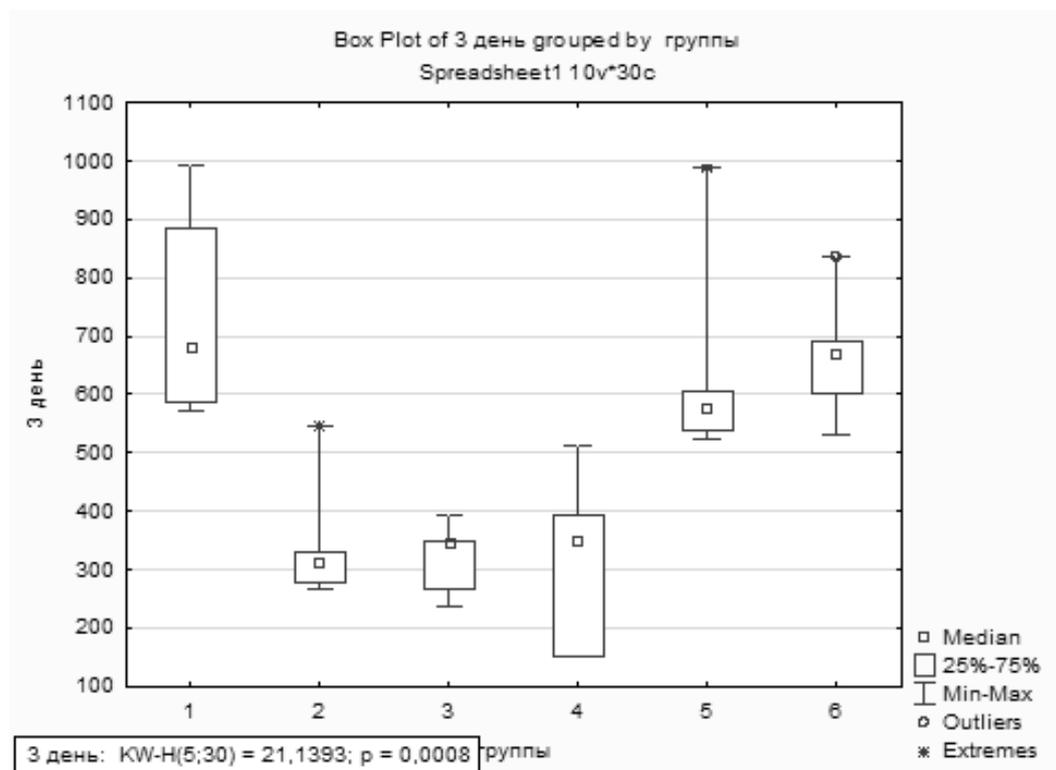


а)

Рис. 2 (продолжение на стр. 21). Медианы количества фибробластов: а) — 1-й день; б) — 2-й день; в) — 3-й день; г) — 4-й день; д) — 5-й день



б)



в)

Рис. 2 (продолжение на стр. 22). Медианы количества фибробластов: а) — 1-й день; б) — 2-й день; в) — 3-й день; г) — 4-й день; д) — 5-й день

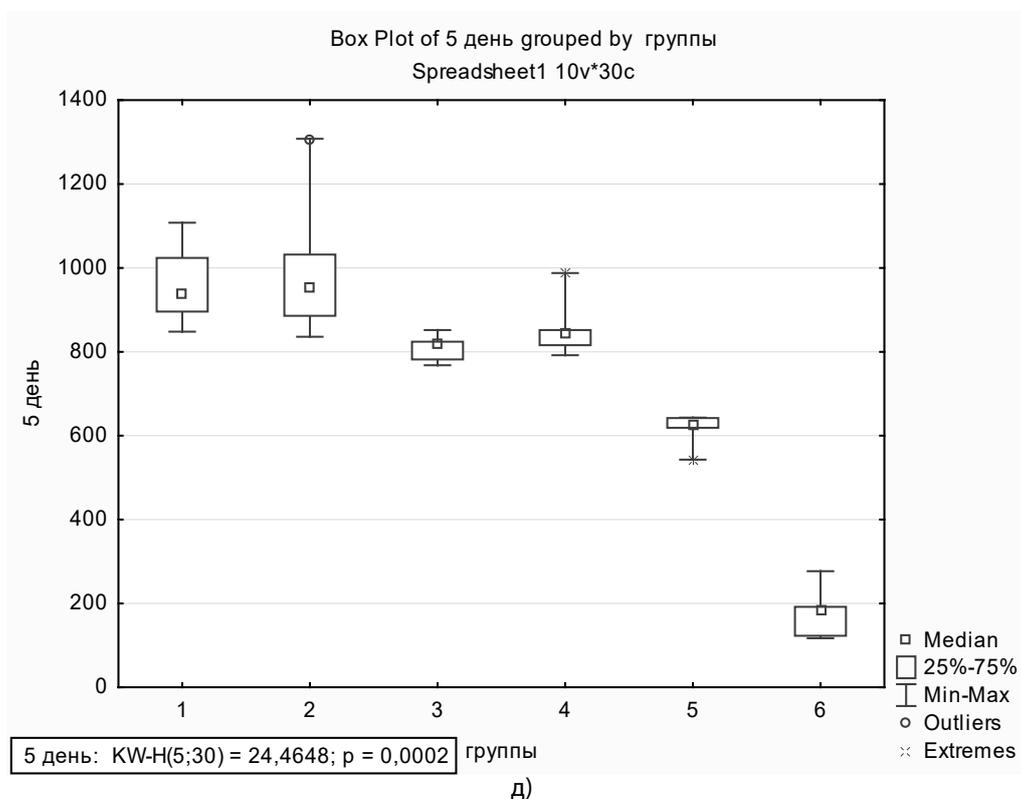
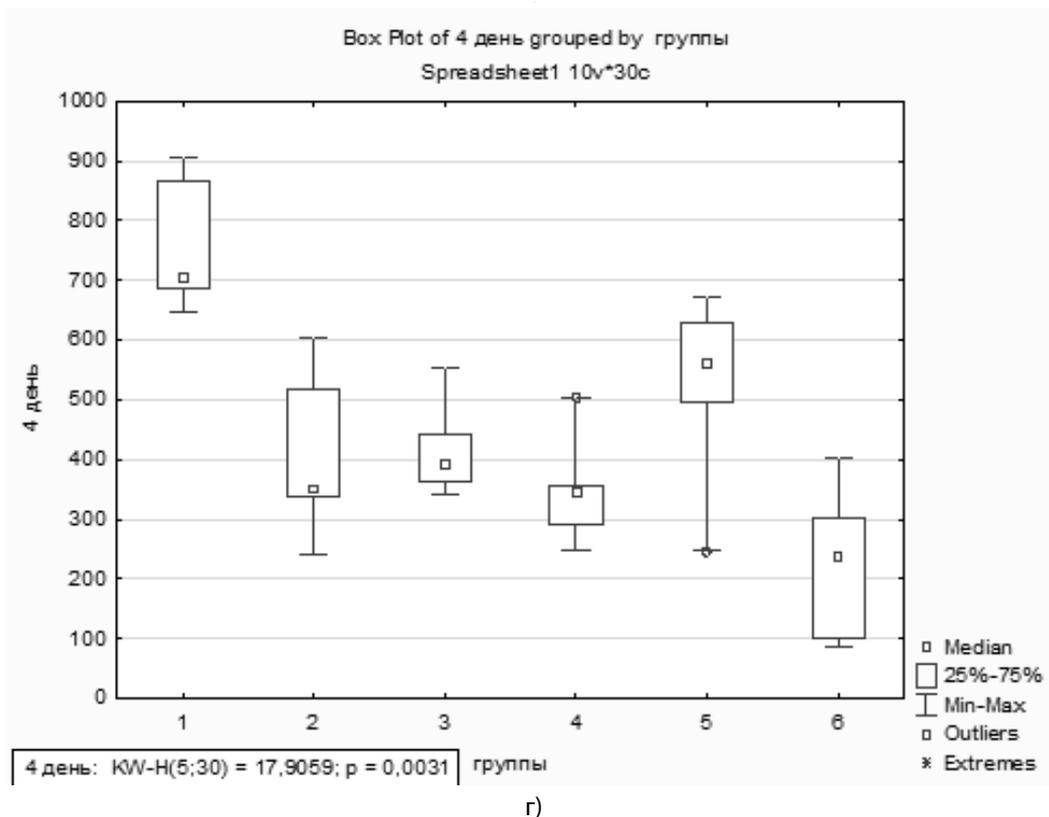


Рис. 2. Медианы количества фибробластов: а) — 1-й день; б) — 2-й день; в) — 3-й день; г) — 4-й день; д) — 5-й день

Таблица 2. Парные сравнения медиан экспериментальных групп с контрольной (тест Манна-Уитни)

Группы	I день (49,6*)	II день (343,2*)	III день (743,6*)	IV день (762,0*)	V день (963,2*)
2	0,504	0,463	0,001	0,001	0,947
3	0,106	0,037	0,000	0,001	0,079
4	0,165	0,003	0,000	0,000	0,335
5	0,026	0,069	0,738	0,026	0,000
6	0,049	0,863	0,865	0,000	0,000

* - медиана контрольной группы

ваемость клеток ~ 94% при концентрации N-CD <125 мкг / мл [4, № 109356], по сравнению со свободным доксорубицином комплексы углеродные точки-доксорубин проявляли меньшую токсичность для линии клеток фибробластов мыши (L929) [5, с. 349–359], углеродные квантовые точки для них также гораздо менее фототоксичны, чем *цис*-диамминдихлороплатина [6, № 111647].

Цель этого исследования заключалась в оценке *in vitro* пролиферативной активности дермальных фибробластов человека в зависимости от концентрации углеродных точек.

Материалы и методы

Углеродные точки были получены гидротермальным методом синтеза: 10 г черемухи обыкновенной (*Prúnus rádus*) без косточек смешивали блендером, добавляли 2 г лимонной кислоты, 0,5 г этилендиамина и 0,5 г полиэтиленimina. В полученную смесь добавляли 20 мл дистиллированной воды и помещали в политетрафторэтиленовый автоклав на 5 часов при 180°C. Полученный темно-коричневый раствор центрифугировали в течение 5 минут со скоростью 14,5 тыс. оборотов в минуту. Затем раствор фильтровали через трековую мембрану с размерами пор 0,2 мкм. Концентрация УТ определялась через массовую концентрацию. На покровное стекло (заранее взвешенное) капали 400 мкл раствора УТ из черемухи. После высыхания еще раз взвешивали стекло с раствором и затем вычитали из получившегося числа массу самого покровного стекла. Затем это число делили на 0,4 (т.к. объем раствора был 400 мкл). Затем разбавляли раствор УТ из черемухи с известной концентрацией в соотношении 1: 5,25. Концентрация рабочего раствора с УТ составила 24,15 мкг/мкл.

В исследовании были использованы фибробласты, выделенные из дермы взрослого здорового человека. Перед забором материала, от пациента получили информированное добровольное согласие на использование биологического материала в научно-исследовательских целях. Клетки были выращены в чашках Петри

60 x15мм в среде Dulbecco's Modified Eagle Medium F-12 Nutrient Mixture (Ham), [+] L-Glutamine (DMEM/F-12 (1:1) (1X)), FBS20%, anti-anti (1x100), пируват натрия (1x100). Инкубировались при 37 °C в атмосфере, обогащенной 5% CO₂ в течение 5 дней. Экспериментальная часть работы заключалась в тестировании пролиферативной активности фибробластов в зависимости от концентрации раствора с углеродными точками. Нам было проведено распределение на шесть групп по пять чашек Петри 60x15мм в каждой группе: контрольная группа и 5 экспериментальных групп. I группа — контрольная без добавления раствора с УТ (в течение 5 дней наблюдался самостоятельный рост). II группа — было добавлено 10 мкл раствора с УТ только в 1 день (всего 10 мкл), III группа — в 1 и 2 дни (20 мкл); IV группа — 1, 2 и 3 дни (30 мкл); V группа — 1, 2, 3 и 4 дни (40 мкл); VI группа — ежедневно (5 дней, всего 50 мкл).

Ежедневно под инвертированным микроскопом «ЛОМО ХС-1844» проводился подсчет количества фибробластов во флаконах.

Статистический анализ проводился с использованием программы STATISTICA версия 12.0 (разработчик — StatSoft.Inc). Накопление, корректировка, систематизация исходной информации и визуализация полученных результатов осуществлялись в электронных таблицах Microsoft Office Excel 2016. Количественные показатели оценивались на предмет соответствия нормальному распределению, для этого использовался критерий Шапиро-Уилка. Совокупности количественных показателей, распределение которых отличалось от нормального, описывались при помощи значений медианы (Me) и нижнего и верхнего квартилей (Q1-Q3). Для сравнения независимых совокупностей ввиду отсутствия признаков нормального распределения данных использовался U-критерий Манна-Уитни. При сравнении нескольких выборок количественных данных, поскольку распределение было отличным от нормального, использовался критерий Краскела-Уоллиса, являющийся непараметрической альтернативой однофакторного дисперсионного анализа. При сравнении более двух зависимых совокупностей использовался непараметрический критерий Фридмана.

Критическое значение уровня значимости (p) принималось равным 0,05.

Результаты и обсуждение

Количество фибробластов менялось в зависимости как от концентрации раствора, так и от продолжительности наблюдения. В таблице 1 приведены медианы количества фибробластов в шести экспериментальных группах, оцененные в течение пяти дней.

Далее мы проанализировали статистику роста медиан всех исследуемых групп в динамике.

В общем, следует отметить, что у первых пяти групп в динамике наблюдается рост медианы количества фибробластов, наиболее выраженной в контрольной и второй экспериментальной группах (более чем в 15 раз). Исключение составила шестая экспериментальная группа, у которой наблюдались выраженные противоположные изменения пролиферативной активности в зависимости от концентрации. В третий день медиана выросла почти в 10 раз, похожее резкое увеличение пролиферативной активности наблюдается также в пятой группе.

Переломным днем для двух экспериментальных групп с высокой концентрацией (пятая и шестая группы) явились четвертый-пятый дни. Необходимо отметить, что с третьего на четвертый день наблюдения для всех экспериментальных групп выявлено некоторая степень «торможения» роста фибробластов, а в пятой группе количество снизилось почти до первоначального уровня.

Критерий Фридмана подтвердил статистически значимую динамику количества фибробластов (16,48–19,36), коэффициент конкорданции был высоким (0,82–0,97), уровень статистической значимости (p) варьировал от 0,001 до 0,002.

Также нами проведен сравнительный анализ медиан количества фибробластов всех групп (рис 2).

Как видно из диаграмм, в первый день наблюдения количества фибробластов в группах были примерно одинаковыми ($p > 0,05$). Со второго по пятый дни

наибольшее количество фибробластов было в контрольной группе, наименьшее — во второй день в 4-й ($p=0,01$), в третий день 2–4-й ($p=0,0008$), в четвертый и пятый дни — в 6-й ($p=0,0031$ и $0,0002$ соответственно).

Далее мы попарно сравнили медиану каждой экспериментальной группы с медианой контрольной группы в зависимости от дня эксперимента с помощью теста Манна-Уитни. В первый день медиана в 5-й и 6-й группах была статистически значимо выше, чем в контрольной ($p=0,026$ и $0,049$ соответственно), в остальных — значимо не различались ($p > 0,05$). Во второй день в 3-й и 4-й — была ниже, чем в контрольной ($p=0,037$ и $0,003$ соответственно), в третий день — была ниже во 2–4-й группах ($p=0,001$ – $0,000$), в четвертый день — во всех группах ($p=0,026$ – $0,000$), а в последний (пятый) день — в 5-й и 6-й группах ($p=0,000$).

Таким образом, результаты экспериментального исследования свидетельствуют о том, что наибольший процент подавления пролиферативной активности дермальных фибробластов по сравнению с контрольной группой отмечается в шестой группе, в которую добавлен наибольший объем раствора углеродных точек (50 мл). К шестому дню сопоставимая с контрольной группой пролиферативная активность наблюдается во второй группе, с минимальным объемом углеродных точек.

Полученные результаты сопоставимы с данными зарубежных исследователей, выявившим цитотоксичность положительно заряженных УТ, которые входя в ядро клетки вызывают наибольшие изменения фазы клеточного цикла даже при концентрациях около 100 мкг/мл [7, 238–248]. Аналогичные результаты получены другими исследователями, доказавшими, что токсичность УТ сильно зависит от протокола их изготовления и обнаруживается только при более высоких концентрациях [8, 290–302].

Полученные нами результаты формируют новые задачи для постановки экспериментальных работ на культурах клеток. Разнообразное моделирование с применением различных культур клеток человека на примере здоровых клеточных линий фибробластов, позволит дать достоверные результаты цитотоксического действия углеродных точек на клетки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hola K., Bourlinos A.B., Kozak O., Berka K., Siskova K.M., Havrdova M., Tucek J., Safarova K., Otyepka M., Giannelis E.P., Zbori R. Photoluminescence effects of graphitic core size and surface functional groups in carbon dots: COO- induced red-shift emission // Carbon. — 2014. — Vol. 70. — P. 279–286.
2. Li N., Liang X., Wang L., Li Z., Zhu Y. et al. Biodistribution study of carbogenic dots in cell and in vivo for optical imaging // J. Nanopart. Res. — 2012. — Vol. 14. — P. 1177.

3. Usmana M., Zaheera Y., Younis M.R., Demirdogene R.E., Hussain S.Z., Sarwara Y., Rehmang M., Khana W.S., Ihsan A. The effect of surface charge on cellular uptake and inflammatory behavior of carbon dots // *Colloid and Interface Science Communications*. — 2020. — Vol. 35. — № 100243
4. Rahmani Z., Ghaemy M. One-step hydrothermal-assisted synthesis of highly fluorescent N-doped carbon dots from gum tragacanth: Luminescent stability and sensitive probe for Au³⁺ ions // *Optical Materials*. — 2019. — Vol. 97. — № 109356.
5. Yuan Y., Guo B., Gu B., Hao L., Liu N., Lin Y., Guo W., Li X. Doxorubicin-loaded environmentally friendly carbon dots as a novel drug delivery system for nucleus targeted cancer therapy // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. — 2017. — Vol. 159. — P. 349–359.
6. Zoran M., Marković S.P., Jovanović P.Z., Mašković M.M., Mojsin M.J., Stevanović M., Danko M., Mičušić D.J., Jovanović A., Kleinová Z., Špitalský V.B., Pavlović B.M. Todorović M. Graphene oxide size and structure pro-oxidant and antioxidant activity and photoinduced cytotoxicity relation on three cancer cell lines // *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*. — 2019. — Vol. 200. — № 111647.
7. Havrdova M., Hola K., Skopali J., Tomankova K., Petr M., Cepe K., Polakova K., Tucek J., Bourlinos A.B., Zboril R. Toxicity of carbon dots — Effect of surface functionalization on the cell viability, reactive oxygen species generation and cell cycle // *Carbon*. — 2016. — Vol. 99. — P. 238–248.
8. Pierrat P., Wang R., Kereselidze D., Lux M., Didier P., Kichler A. et al. Efficient in vitro and in vivo pulmonary delivery of nucleic acid by carbon dot-based nanocarriers // *Biomaterials*. — 2015. — Vol. 51. — P. 290–302.

© Гольдерова Айталиа Семеновна (hoto68@mail.ru), Шадрина Светлана Семеновна (svetlana.maksimo@mail.ru), Николаева Ирина Эдуардовна (ysucell@gmail.com), Егорова Марфа Никитична, Евсеева Юлия Руслановна, Троев Иван Петрович, Егоров Андрей Николаевич.
Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»



Северо-восточный федеральный университет им. М. К. Аммосова