

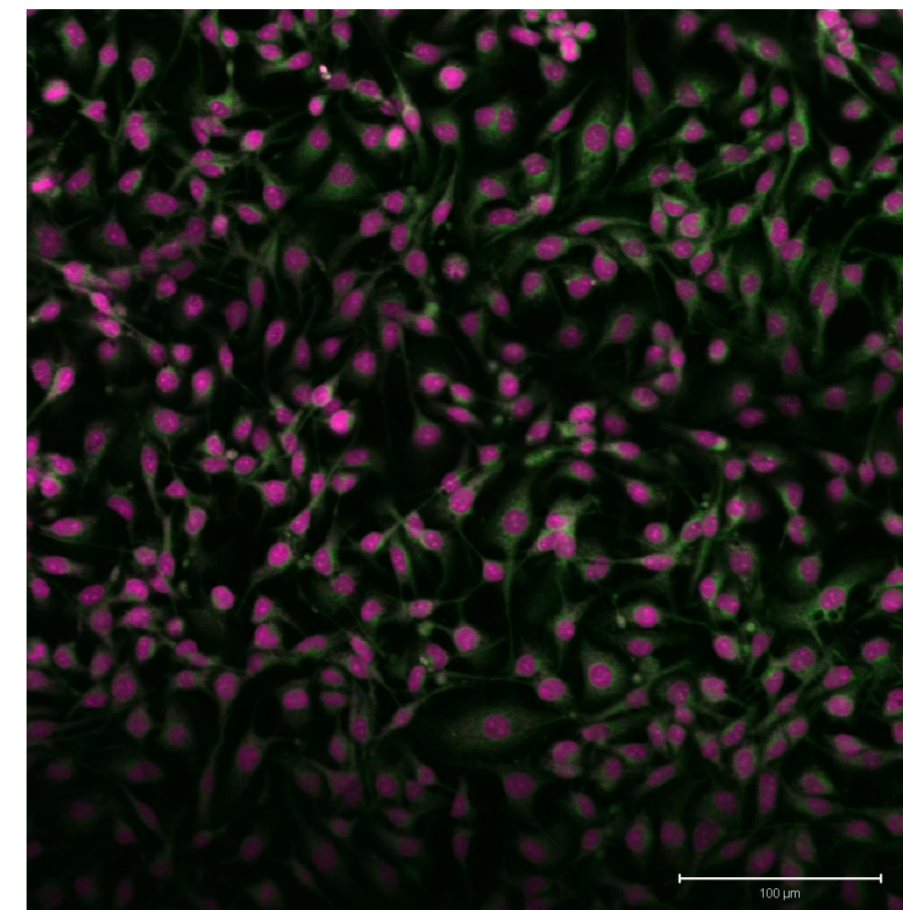
# Vliv bioaktivních látek na proliferaci a viabilitu melanocytů na nanovláknenných nosičích

Kateřina Waloszková<sup>1</sup>, Karolína Vocetková<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Gymnázium Olgy Havlové, Ostrava, <sup>2</sup>Laboratoř tkáňového inženýrství, Ústav experimentální medicíny AV ČR, v.v.i

## Úvod

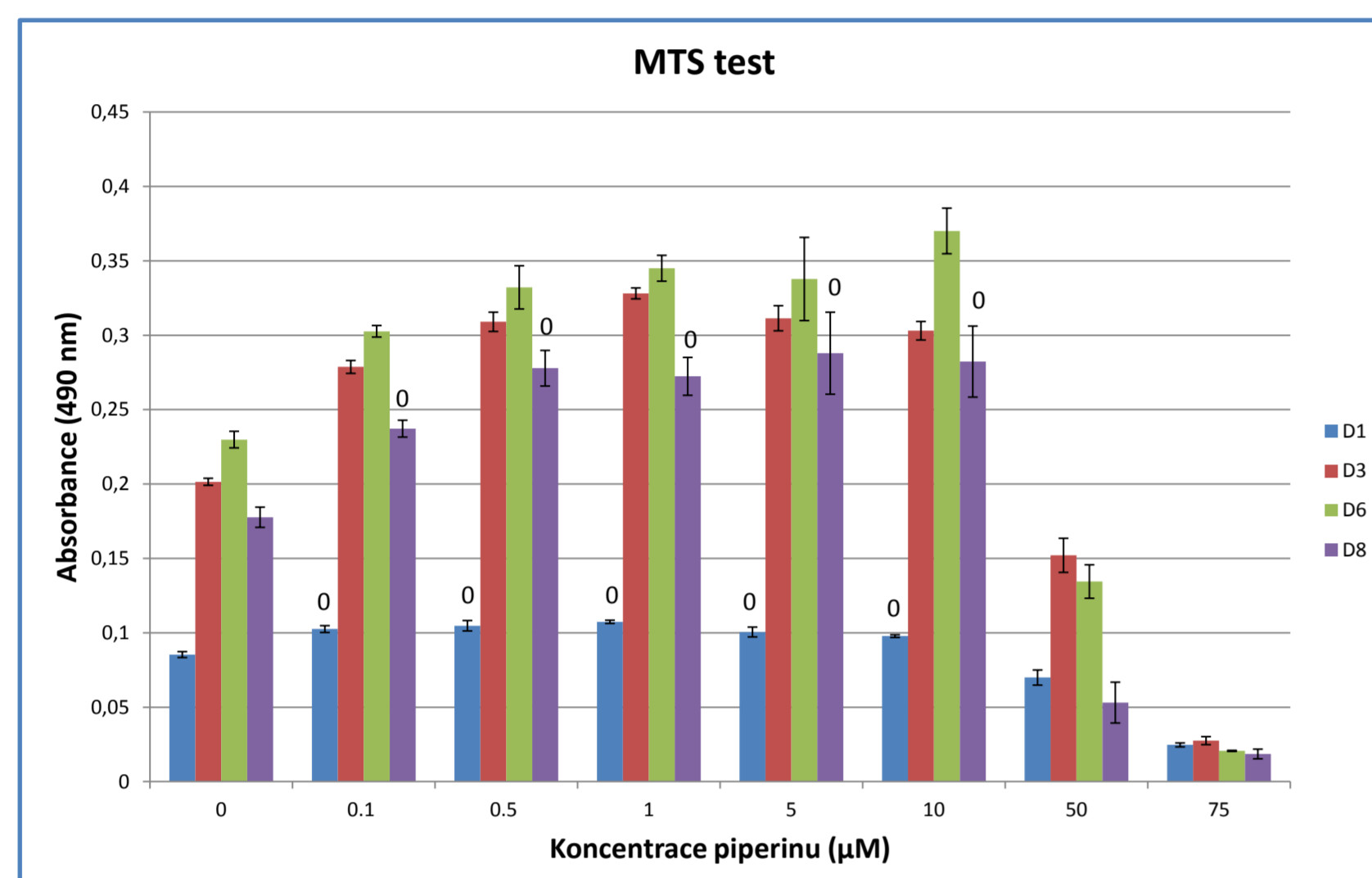
Vitiligo je nejčastější depigmentační onemocnění charakterizované změnou funkce či snížením počtu melanocytů. Jednou z možností léčby je autotransplantace melanocytů ze zdravých míst kůže [1]. Jako vhodný nosič pro transplantované melanocyty je možné využít nanovláknna. Ta svoji mikroarchitekturou připomínají extracelulární matrix a je možné je obohatit o bioaktivní látky. Melanocyty jsou obecně buňky s nízkým proliferčním potenciálem. K jejich dělení je nutné do média dodávat tumor promotor TPA. Tato látka je však kvůli své možné kancerogenní povaze nevhodná pro klinické použití. Přírodní látka piperin (výtažek z černého pepře) má schopnost melanocyty stimulovat k dělení [2]. Byl zkoumán vliv koncentrace piperinu na chování melanocytů a následně byla připravena a testována nanovláknna obohacená o piperin.



**Melanocyty vizualizované na sklíčku.**  
Buňky byly fixovány metanolem, jádra (růžová barva) barvena propidium jodidem a buněčné membrány (zelená barva) barvou DiOC6. Zvětšení 200x, měřítko 100  $\mu\text{m}$ .

## Výsledky

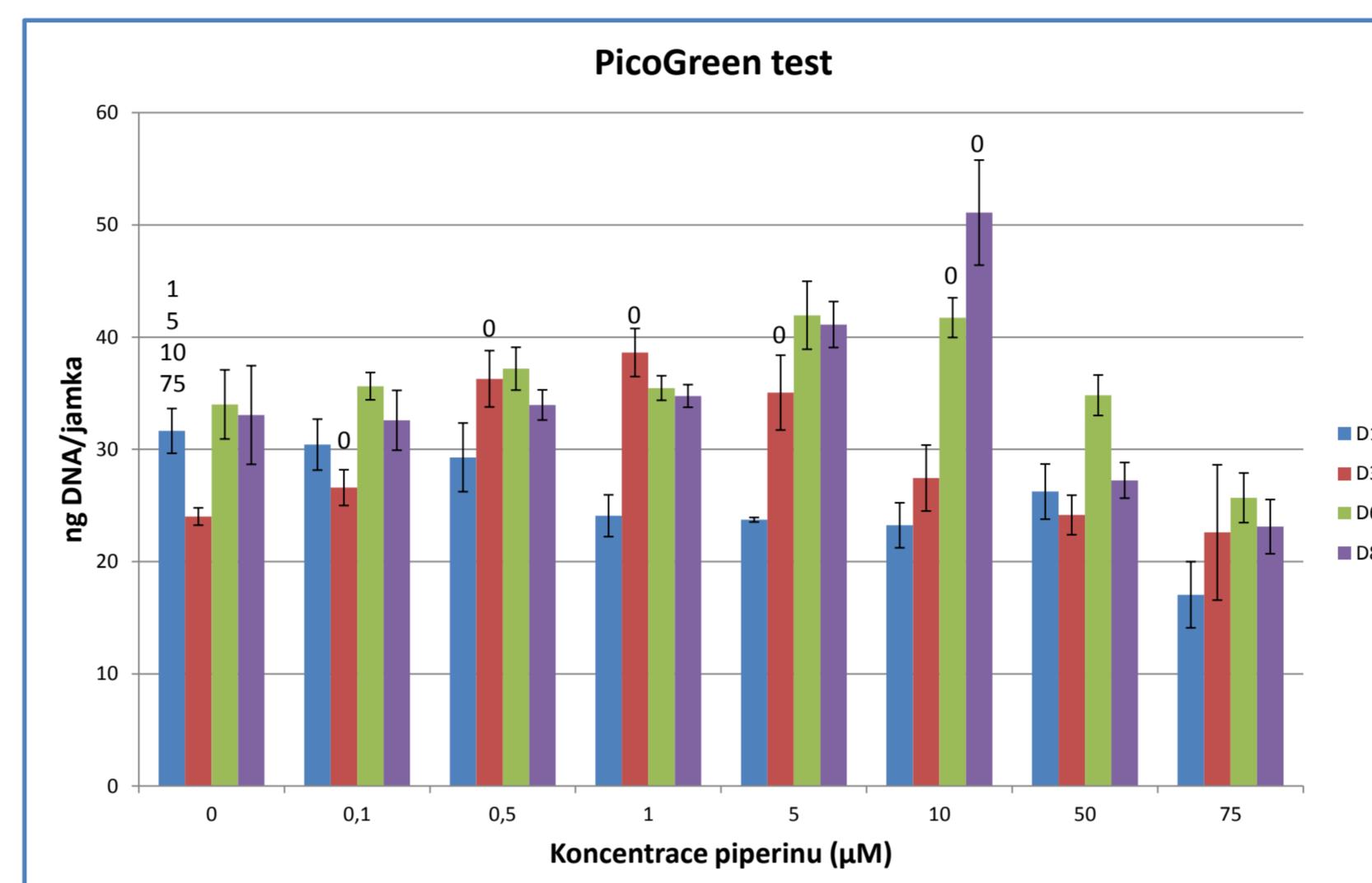
### Vliv piperinu na viabilitu melanocytů



#### Vliv piperinu na viabilitu melanocytů.

Pomocí MTS testu byla testována viabilita melanocytů na kultivačním plastiku v závislosti na koncentraci piperinu 1., 3., 6. a 8. den pokusu. První den pokusu byla viabilita melanocytů signifikantně vyšší ve vzorcích s koncentracemi nižšími než 10  $\mu\text{mol/L}$  v porovnání s kontrolním vzorkem. To bylo pozorováno i poslední den pokusu. Vyšší koncentrace (50  $\mu\text{M}$ , 75  $\mu\text{M}$ ) byly pro buňky toxické.

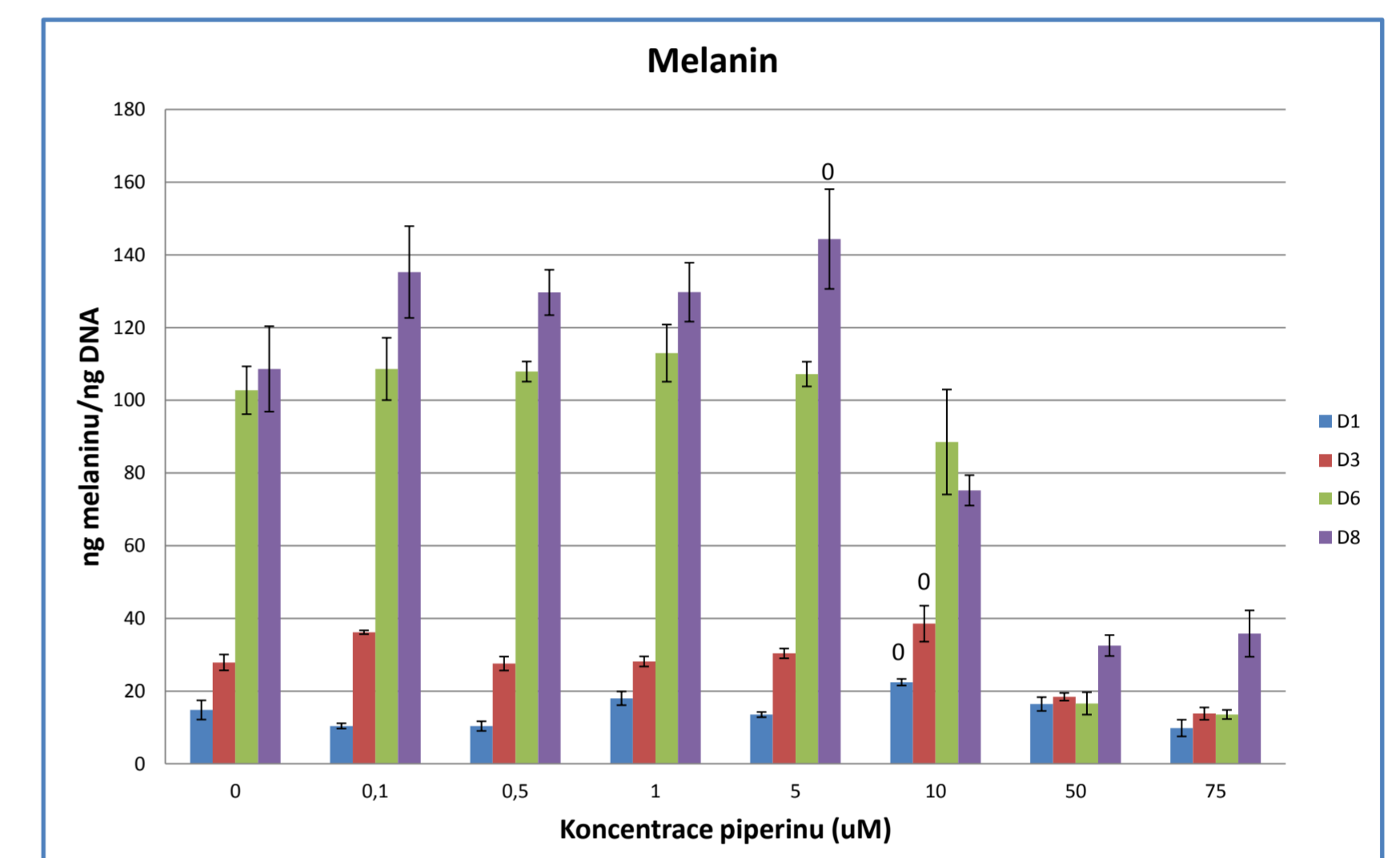
### Vliv piperinu na proliferaci melanocytů



#### Vliv piperinu na proliferaci melanocytů

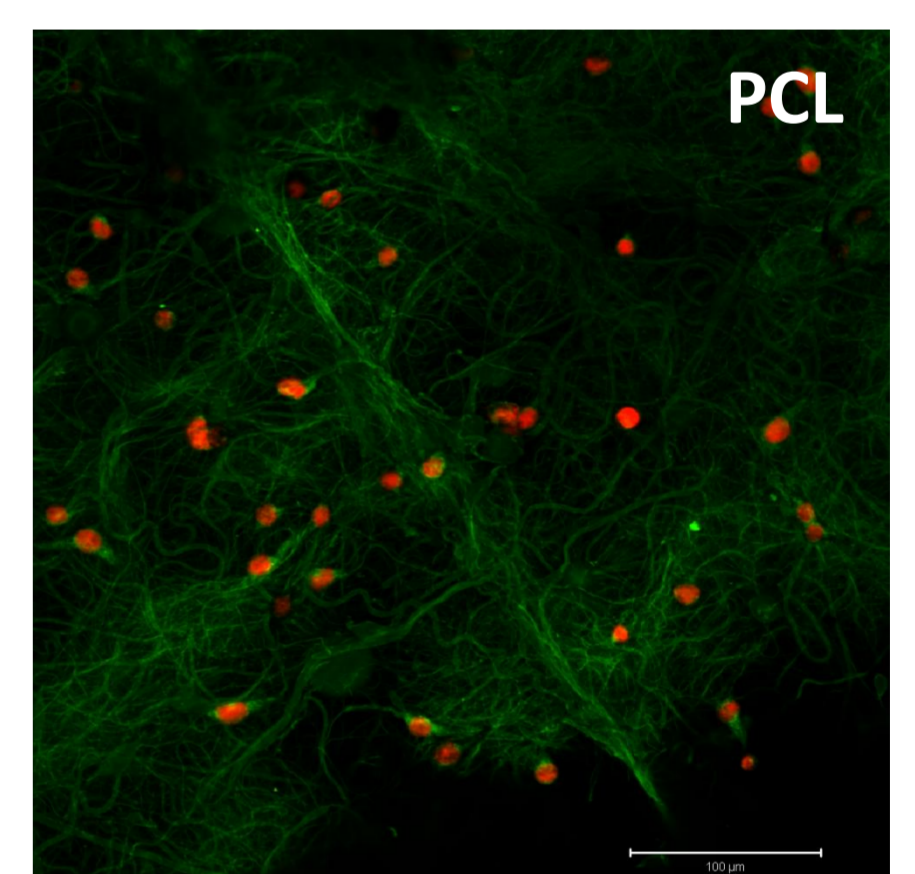
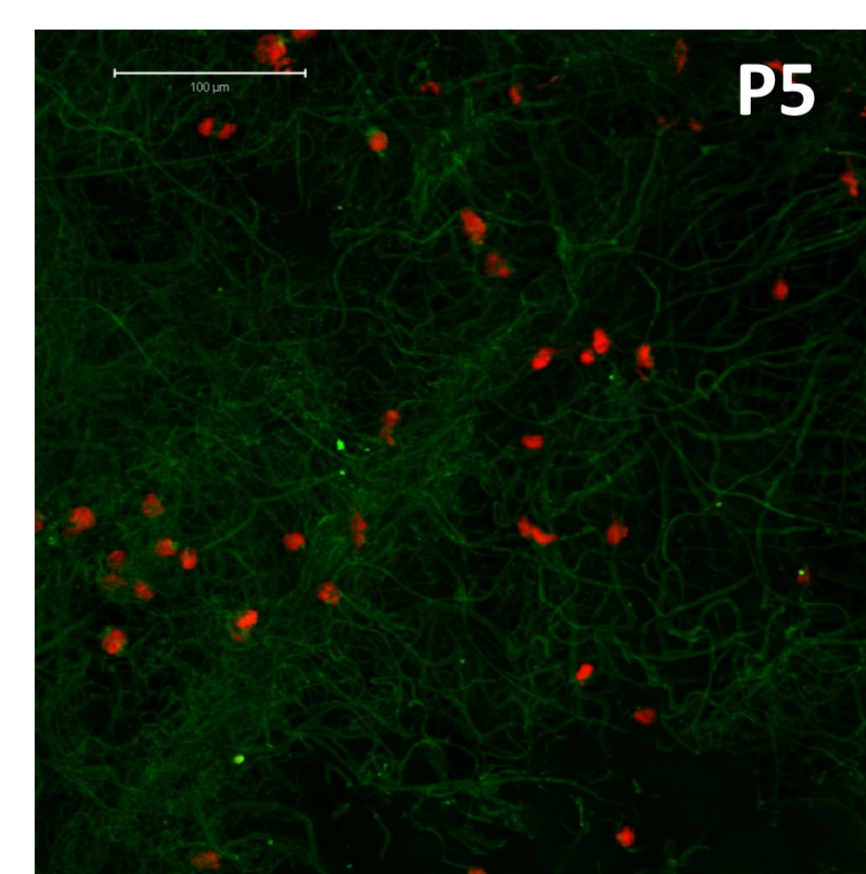
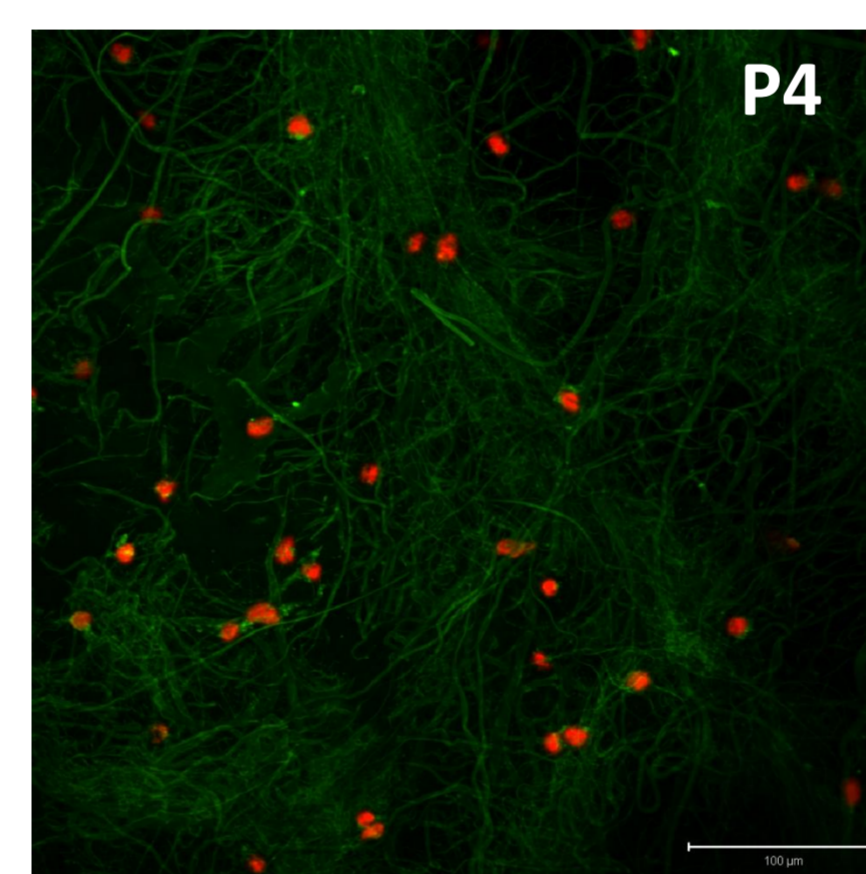
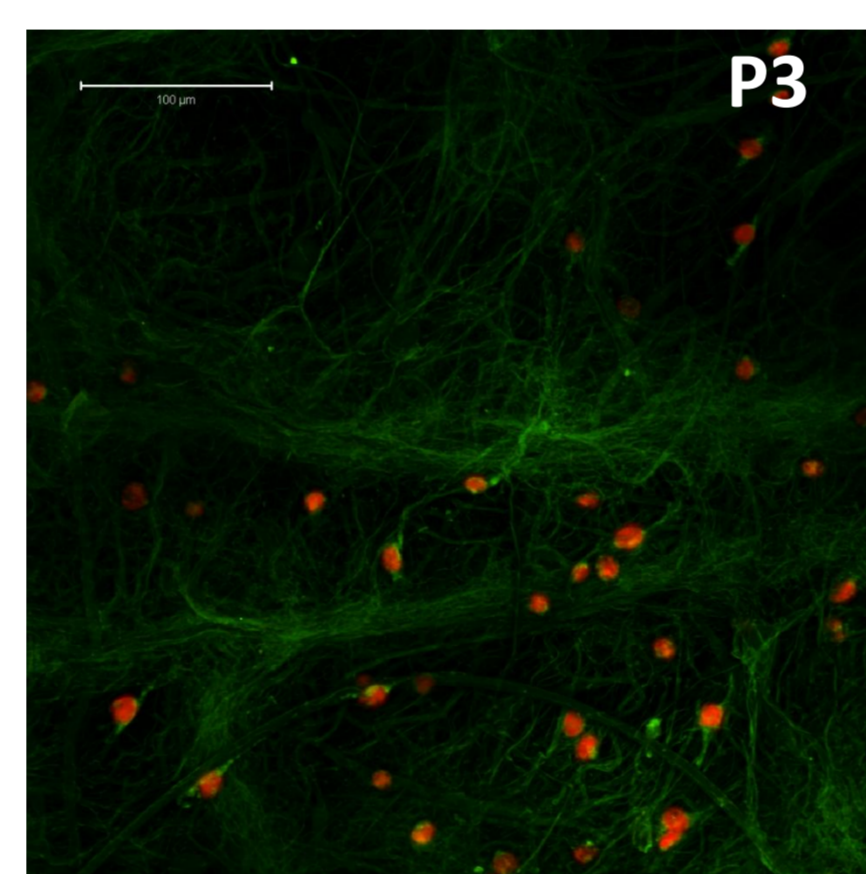
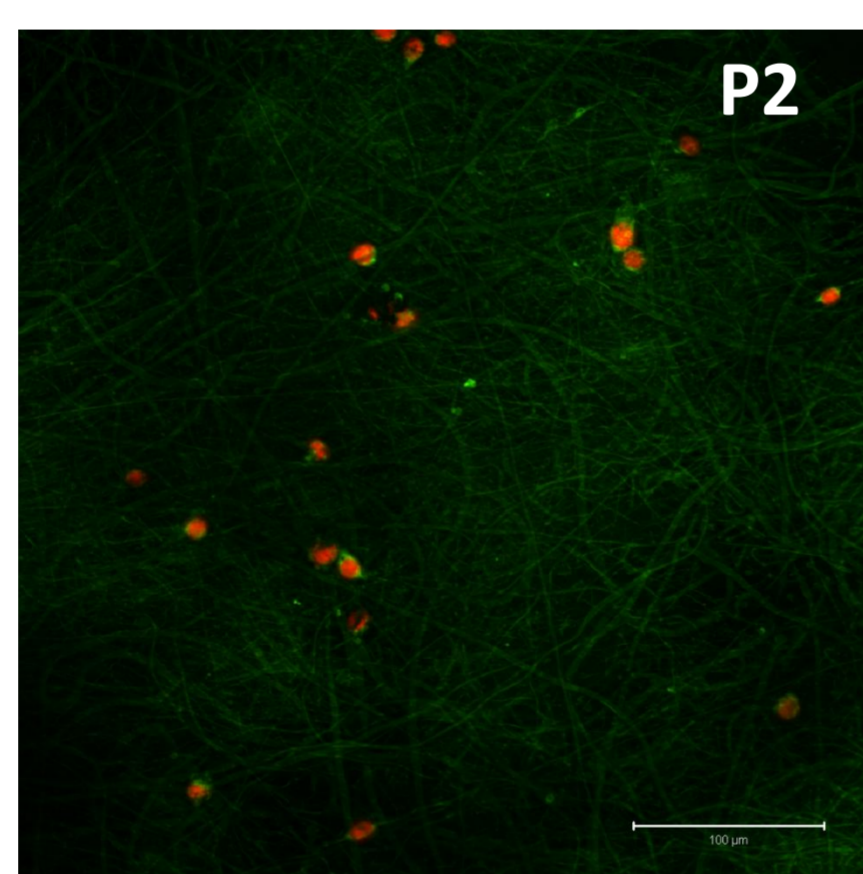
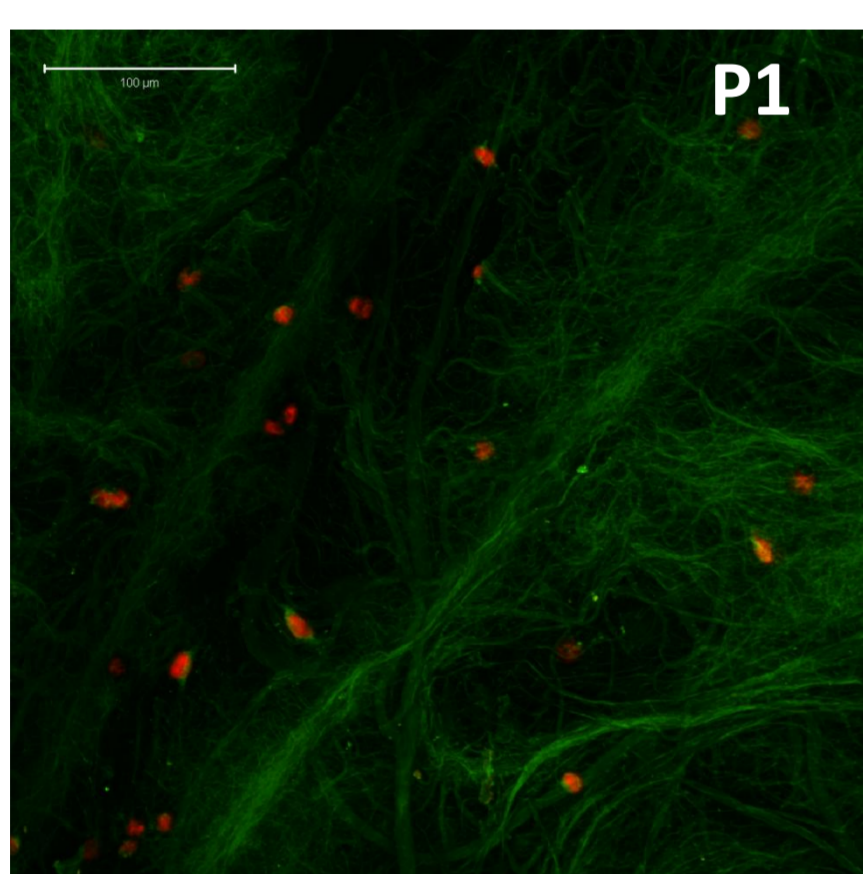
Metodou PicoGreen byl stanovován obsah DNA ve vzorcích 1., 3., 6. a 8. den pokusu. První den pokusu bylo signifikantně vyšší množství DNA v kontrolním vzorku v porovnání se vzorky s koncentracemi piperinu 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 75  $\mu\text{M}$ . Od třetího dne pokusu docházelo k signifikantně vyšší syntéze DNA ve vzorcích s koncentrací nižší než 5  $\mu\text{M}$ . V porovnání s kontrolním vzorkem bylo šestý a osmý den množství nasynthetizované DNA statisticky vyšší ve vzorku s 10  $\mu\text{M}$  koncentrací piperinu. Ve vzorcích s vysokými koncentracemi (50  $\mu\text{M}$ , 75  $\mu\text{M}$ ) nedocházelo k proliferaci buněk.

### Vliv piperinu na syntézu melaninu



#### Vliv piperinu na syntézu melaninu

Syntéza melaninu byla určena po jeho solubilizaci v NaOH. Pro porovnávání bylo množství melaninu vztaženo na ng DNA. První a třetí den pokusu bylo množství melaninu ve vzorcích s 10  $\mu\text{M}$  koncentrací piperinu signifikantně vyšší v porovnání s kontrolou. Poslední den pokusu bylo množství nasynthetizovaného melaninu signifikantně vyšší ve vzorku s 5  $\mu\text{M}$  koncentrací piperinu. Ve vzorcích s vysokými koncentracemi piperinu (50  $\mu\text{M}$ , 75  $\mu\text{M}$ ) byla syntéza melaninu minimální.



#### Vizualizace melanocytů na nanovláknenných nosičích obsahujících piperin.

Melanocyty přichycené nanovláknenným nosičům byly první den pokusu zfixovány metanolem, obarveny a pozorovány na konfokálním mikroskopu. Buněčné membrány byly barveny DiOC6 (zelená barva), jádra propidium jodidem (červená barva). P1 250  $\mu\text{M}$ , P2 125  $\mu\text{M}$ , P3 75  $\mu\text{M}$ , P4 50  $\mu\text{M}$ , P5 10  $\mu\text{M}$ , PCL 0  $\mu\text{M}$ . Zvětšení 200x, měřítko 100  $\mu\text{m}$ .

## Materiály a metody

Melanocyty byly kultivovány v médiu RPMI s přidavkem 10% FBS, 1% antibiotik (penicilin/streptomycin) a 1% L- glutamin při 37°C, 10% CO<sub>2</sub> a 70-80% relativní vlhkosti vzduchu. Do média byl přidáván piperin v koncentraci 0  $\mu\text{M}$ , 0,1  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 75  $\mu\text{M}$  a byl sledován v první, třetí, šestý a osmý den pokusu vliv piperinu na viabilitu, proliferaci a syntézu melaninu melanocytů.

Elektrostatickým zvlákněním byla připravena nanovláknna z 24% polykaprolaktonu (PCL) rozpuštěného ve směsi chloroform-ethanol 1:9 obsahující piperin o koncentracích 250  $\mu\text{M}$  (P1), 125  $\mu\text{M}$  (P2), 75  $\mu\text{M}$  (P3), 50  $\mu\text{M}$  (P4), 10  $\mu\text{M}$  (P5). Kontrolní vzorek bylo čisté PCL. Byla testována viabilita melanocytů na nanovláknenných nosičích.

Nosiče osazené melanocyty byly první den pozorovány na konfokálním mikroskopu. Buňky byly fixovány namraženým metanolem a fluoroscentně barveny. Buněčné membrány byly barveny DiOC6 (zelená barva  $\lambda_{\text{ex}} = 484 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 501 \text{ nm}$ ), buněčná jádra (červená barva  $\lambda_{\text{ex}} = 536 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 617 \text{ nm}$ ) propidium jodidem.

**Viabilita:** Viabilita melanocytů byla stanovena pomocí MTS testu. Doba inkubace s činidlem byla 3 hodiny. Byla měřena absorbance média při 490 nm. Byla provedena korekce hodnot na vlnovou délku (690 nm) a médium.

**Proliferace:** Pro určení míry proliferace melanocytů byla zvolena metoda PicoGreen (fluorescenční barvivo dsDNA). Byla měřena fluorescence ( $\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 528 \text{ nm}$ ).

**Melanin:** Nasynthetizovaný melanin byl rozpuštěn v 1 M NaOH. Absorbance roztoku byla měřena při vlnové délce 450 nm. Množství melaninu odpovídající naměřené absorbanci bylo odečteno z kalibrační křivky sestavené za pomoci syntetického melaninu.

## Závěr

V rámci studie byl sledován vliv piperinu na viabilitu a proliferaci melanocytů. Nejprve byly otestovány různé koncentrace piperinu na kultivačním plastiku, poté byl piperin enkapsulován do PCL nanovlákn.

Bylo zjištěno, že koncentrace piperinu vyšší než 50  $\mu\text{mol/L}$  je pro melanocyty toxická – buňky nebyly viabilní, nemohly se ani nasynthetizovat melanin. Naopak koncentrace piperinu v rozmezí 5 – 10  $\mu\text{mol/L}$  byla ve stimulaci melanocytů nejuspěšnější.

Na základě těchto zjištění byla připravena PCL nanovláknna obsahující piperin. Fotografie z konfokálního mikroskopu v první den pokusu ukázaly, že nosiče byly rovnoměrně osazeny melanocyty. V průběhu pokusu (14 dní) však buňky nebyly viabilní. Tento fakt naznačuje, že vybrané koncentrace piperinu v nanovláknnech byly příliš vysoké a tedy toxické pro buňky.

V budoucnosti je nutná přesnější charakterizace způsobu uvolňování piperinu z nanovlákn a optimalizace jejich složení.

## Reference

- 1 Yaghoobi, Reza et al. Vitiligo: A Review of the Published Work. *The Journal of Dermatology*. 2011, 38, 419 – 431.
- 2 Lin, Zhixiu et al. Stimulation of mouse melanocyte proliferation by Piper nigrum fruit extract and its main alkaloid, piperin. *Planta Medica*. 1999, 65 (7), 600-603.