

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

**Výrazný účinek fenylpropanoidů ze zázvorníku
lékařského proti buňkám akutní T-lymfoblastické
leukémie**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:

Bc. Marek Handl

Studijní program:

N1501 Biologie

Studijní obor:

Experimentální biologie

Forma studia:

Prezenční

Vedoucí práce:

Mgr. Ermin Schadich, Ph.D.

Termín odevzdání práce:

2015

Touto cestou bych rád poděkoval vedoucímu své diplomové práce Mgr. Erminu Schadichovi, Ph.D. za jeho odbornou pomoc a cenné rady. Rád bych poděkoval i Mgr. Petru Konečnému za provedení FACS analýzy buněk CCRF-CEM a Mgr. Ivo Frydrychovi, Ph.D. za poskytnutí transfektovaných buněk C6. Dále bych rád poděkoval vedení a pracovníkům Ústavu molekulární a translační medicíny Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci za vytvoření vhodných pracovních podmínek při vypracování praktické části této práce. V neposlední řadě děkuji své rodině a přátelům za jejich neutuchající podporu.

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou prací vypracoval samostatně a za použití citované literatury.

V Olomouci dne 24. 7. 2015

Podpis.....

OBSAH

| | |
|--|----|
| BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE..... | 6 |
| BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION..... | 7 |
| 1. ÚVOD..... | 8 |
| 1.1 Akutní T-lymfoblastická leukémie..... | 8 |
| 1.1.1 Molekulární podstata..... | 9 |
| 1.1.2 Diagnostické znaky..... | 10 |
| 1.1.3 Léčba..... | 10 |
| 1.2 Oxidační stres..... | 11 |
| 1.2.1 NF- κ B a oxidační stres..... | 12 |
| 1.2.2 Oxidační stres v nádorových buňkách..... | 12 |
| 1.2.3 Prooxidační přírodní léčiva..... | 13 |
| 1.3 Zázvorník lékařský..... | 14 |
| 1.3.1 Charakteristika zázvorníku..... | 15 |
| 1.3.2 Fenylpropanoidy v zázvorníku..... | 16 |
| 1.3.3 Protinádorové účinky zázvorníku..... | 17 |
| 2. CÍLE PRÁCE..... | 19 |
| 3. MATERIÁL A METODY..... | 20 |
| 3.1 Biologický materiál..... | 20 |
| 3.2 Kultivace buněk..... | 20 |
| 3.3 Sklizení buněk..... | 21 |
| 3.4 MTT test..... | 21 |
| 3.5 FACS analýza linie CCRF-CEM..... | 23 |
| 3.6 Stanovení exprese NF- κ B v linii C6..... | 24 |
| 3.7 Nepárový t-test..... | 25 |
| 4. VÝSLEDKY..... | 27 |

| | |
|--|----|
| 4.1 MTT test..... | 27 |
| 4.2 FACS analýza linie CCRF-CEM..... | 32 |
| 4.3 Stanovení exprese NF- κ B v linii C6..... | 34 |
| 5. DISKUZE..... | 35 |
| ZÁVĚR..... | 38 |
| SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY..... | 39 |
| SEZNAM ZKRATEK..... | 51 |
| PŘÍLOHA 1..... | 53 |
| PŘÍLOHA 2..... | 55 |

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

| | |
|---------------------------|--|
| Autor | Bc. Marek Handl |
| Název práce | Výrazný účinek fenylypropanoidů ze zázvorníku lékařského proti buňkám akutní T-lymfoblastické leukémie |
| Typ práce | Diplomová |
| Pracoviště | Ústav molekulární a translační medicíny, Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci |
| Vedoucí práce | Mgr. Ermin Schadich, Ph.D. |
| Rok obhajoby práce | 2015 |

Abstrakt

Akutní T-lymfoblastická leukémie (T-ALL) je agresivní typ nádorového onemocnění vyznačující se rychlou maligní a klonální proliferací buněk lymfoidních prekurzorů (lymfoblastů). Cílem této práce bylo stanovit účinky fenylypropanoidů z oddenků zázvorníku lékařského (*Zingiber officinale*) na buňky lidské akutní T-lymfoblastické leukémie CCRF-CEM. Zázvorníkový extrakt byl testován na cytotoxicitu proti buňkám CCRF-CEM, buňkám lidského hepatokarcinomu HepG2, buňkám lidského maligního gliomu U87 MG, embryonálním buňkám ledvin HEK293, fibroblastům CRL-252 z lidské předkožky a imortalizovaným keratinocytům HaCaT. Zázvorníkový extrakt vykazoval výraznou cytotoxickou aktivitu proti CCRF-CEM, zatímco jiné buněčné linie byly rezistentní. Další analýza ukázala, že fenylypropanoidy indukovaly v těchto buňkách apoptózu, zatímco jejich působení nebylo ovlivněno koncentrací růstových faktorů, což poukazuje na jejich možné prooxidační účinky. Tato práce naznačuje potenciální využití fenylypropanoidů ze zázvorníku lékařského ve vývoji léčiv proti T-ALL.

| | |
|----------------------|--|
| Klíčová slova | Akutní T-lymfoblastická leukémie, zázvorník lékařský, fenylypropanoidy, oxidační stres, apoptóza |
| Počet stran | 55 |
| Počet příloh | 2 |
| Jazyk | Český |

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

| | |
|---------------------------------|---|
| Author | Bc. Marek Handl |
| Title of thesis | Distinctive effect of phenylpropanoids in ginger plant against acute T-lymphoblastic leukemia cells |
| Type of thesis | Diploma |
| Department | Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University in Olomouc |
| Supervisor | Mgr. Ermin Schadich, Ph.D. |
| The year of presentation | 2015 |

Abstract

Acute T-lymphoblastic leukemia (T-ALL) is an aggressive type of cancer with the rapid malignant and clonal proliferation of precursor lymphoid cells (lymphoblasts). The aim of this thesis was to determine the effects of ginger phenylpropanoids from rhizome of ginger plant (*Zingiber officinale*) on acute T-lymphoblastic leukemia cells CCRF-CEM. The ginger extract was tested for cytotoxic activity against CCRF-CEM, the human hepatocarcinoma cells HepG2, human malignant glioma cells U87 MG, embryonic kidney cells HEK293, foreskin fibroblasts CRL-252, immortalized keratinocytes HaCaT. The ginger extract had distinct cytotoxic activity against CCRF-CEM while the other cell lines were resistant. Further analyses showed that they induced apoptosis in these cells while their effects were not affected by concentration of growth factors, showing that their effects could be due to prooxidant effects. This thesis indicates the potential of ginger phenylpropanoids in development of drugs against T-ALL.

| | |
|-----------------------------|--|
| Keywords | Acute T-lymphoblastic leukemia, <i>Zingiber officinale</i> , phenylpropanoids, oxidative stress, apoptosis |
| Number of pages | 55 |
| Number of appendices | 2 |
| Language | Czech |

1. ÚVOD

1.1 Akutní T-lymfoblastická leukémie

Akutní T-lymfoblastická leukémie (T-ALL) je agresivní nádorové onemocnění, které se vyznačuje patologickou krvetvorbou. T-ALL má rychlý průběh a vzniká v důsledku maligní transformace progenitorových buněk T-lymfocytů (T-LC). Tyto buňky bývají označovány také jako T-lymfoblasty (T-LB). Za fyziologického stavu vznikají T-LB v kostní dřeni odkud migrují do brzlíku, ve kterém dozrávají v T-LC (Rothenberg a Taghon 2005). Maligní transformací ztrácejí T-LB schopnost diferenciaci, nadměrně se dělí a neodpovídají na regulační podněty (Inaba et al. 2013). Výsledkem jejich nadměrné produkce je útlak normální krvetvorby s projevy anemických syndromů a zvýšenou náchylností k infekcím (Pui et al. 2008). Při T-ALL je kostní dřeň infiltrována nezralými transformovanými buňkami, které se ve velké míře nacházejí také v periferní krvi a prostupují i do mezihrudí (Neely 1989). Častým příznakem je infiltrace centrální nervové soustavy spojená s neurologickými komplikacemi. V případě neléčené T-ALL umírají pacienti v rozmezí několika měsíců (Neely 1989).

T-ALL tvoří přibližně 10-15 % případů akutních leukémií (ALL) u dětí a více než 25 % případů u dospělých osob (Ferrando 2002). T-ALL trpí častěji muži než ženy a vyšší míra výskytu byla zaznamenána v hospodářsky vyspělejších zemích (Siegel et al. 2012). Prognóza tohoto onemocnění je úzce spojena se stářím jedince a úspěšnost léčby výrazně klesá s rostoucím věkem (Pui et al. 2008). Zavedením intenzivnější chemoterapie a moderních léčebných metod došlo v posledních 25 letech k výraznému poklesu úmrtnosti a vyléčeno je více než 80 % dětí (Bhojwani a Pui 2013). V případě dospělých jedinců je však prognóza T-ALL stále špatná a úspěšnou léčbou končí pouze 30-40 % případů. U lidí starších 60 let je šance na uzdravení pouze 15 % (Pulte et al. 2013). Z tohoto důvodu je vkládáno velké úsilí do výzkumu molekulární podstaty vzniku T-ALL pro vývoj účinnějších a méně toxických léčiv (Aifantis et al 2008).

1.1.1 Molekulární podstata

Maligní transformace vedoucí k T-ALL je mnohastupňový proces, ke kterému dochází v důsledku mutací v genech regulujících normální tvorbu T-LC (Pui a Evans 2013). Příčina vzniku těchto mutací není zcela objasněna, avšak důležitá úloha je přisuzována vnějším faktorům jakými jsou ionizující záření nebo lidský lymfotropický virus 1 (HLTV1) (Preston et al. 1994; Greaves 2006). Klíčovou roli při vzniku mutací hraje také oxidační stres spojený s produkcí reaktivních forem kyslíku (ROS) (viz kapitola 1.2). U 50 % pacientů s T-ALL byly zjištěny mutace v genech pro receptory signální dráhy Notch1 (Weng et al. 2004). Tato dráha reguluje růst, dělení a přežití T-LB a mutace jsou spojeny s její nadměrnou stimulací (Demarest et al. 2008; Radtke et al. 2013). Notch1 je jedním ze čtyř transmembránových receptorů Notch, které jsou svými extracelulárními a intracelulárními doménami nekovalentně spojeny pomocí heterodimerizační domény (Lobry et al. 2011). Po navázání příslušných ligandů jsou tyto receptory vystaveny proteolytickému štěpení enzymem γ -sekretázou, které má za následek uvolnění intracelulární domény Notch1 (NICD). Přemístění NICD do jádra vede k zahájení transkripce genů pro faktory zapojené do regulace buněčného cyklu, diferenciace a inhibice apoptózy (Lin et al. 2002). Patří sem například transkripční faktory Hes1, GATA-3, RUNX3 nebo nukleární faktor κ B (NF- κ B; viz kapitola 1.2.1), jejichž zvýšená exprese je jednou z hlavních příčin transformace T-LB. (Lobry et al. 2011; Koyama et al. 2014).

Bylo zjištěno, že ke vzniku T-ALL významně přispívá také ztráta nádorových supresorů p16INK4A a p14/ARF v důsledku delece na chromozomu 9p21, která je diagnostikována u více jak 70 % pacientů (Hebert et al. 1994; Zhang et al. 1998). Produkt genu p16INK4A se za normálního stavu podílí na regulaci buněčného cyklu inhibicí komplexu cyklinu D s cyklin dependentní kinázou 4 a 6, zatímco p14/ARF blokuje funkci proteinu MDM2 a brání tak degradaci důležitého supresoru p53 (Zhang et al. 1998). Významně se na rozvoji T-ALL podílí také zvýšená exprese proteinů TAL1, TLX1, TLX3 a LMO2, které jsou zapojeny do diferenciace krevních buněk (Larson et al. 1996; Ferrando et al. 2002; van Vlierberghe a Ferrando 2011). S narušením diferenciace jsou spojeny i odlišnosti v signalizaci zprostředkované receptory T-buněk, které byly pozorovány u 35% pacientů (Cauwelier 2006).

1.1.2 Diagnostické znaky

Včasná a přesná diagnostika je důležitá pro zahájení vhodné a účinné léčby. Mezi základní vyšetření u všech ALL patří vyšetření krevního obrazu. Pro ALL je charakteristický výrazně zvýšený podíl nezralých buněk bílé krevní řady, který přesahuje 25 % (Estey 2012). Provádět lze také cytochemické testy na přítomnost enzymu myeloperoxidázy, který se nevyskytuje u 97% buněk ALL. Pro přesnější určení fenotypu nádorových buněk slouží průtoková cytometrie s přesností diagnózy 98 % (Channa et al. 2000). Tato metoda umožňuje rozlišení jednotlivých buněčných typů a jejich stádií vývoje na základě detekce membránových nebo cytoplazmatických antigenů. Pro všechny normální T-LB a T-LC je společný výskyt glykoproteinů CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7 a CD8 (Chiaretti a Foà 2009). Při T-ALL jsou detekovány antigeny CD2, CD5 a CD7, které jsou však společné pro většinu T-LB a diagnózu upřesňuje až přítomnost CD3 (Chiaretti et al. 2014). Častým znakem pro T-ALL je i povrchový CD52, který je detekován přibližně v 60% případů (Chiaretti a Foà 2009). Zhruba ve 25 % případů bývá detekován i antigen CD10 a přítomny mohou být i antigeny vyskytující se u myeloidních leukémií (Couston-Smith et al. 2009; Pui et al. 1993). Diagnostiku T-ALL upřesňuje i cytogenetické vyšetření pro sledování chromozomálních aberací. Pro T-ALL jsou charakteristické delece na chromozomu 9 (Mrózek et al. 2009).

1.1.3 Léčba

Při chemoterapii T-ALL je nejčastěji podávaným lékem cytostatikum vinkristin, který se řadí do skupiny tzv. vinka alkaloidů izolovaných z rostliny katarantu růžového (*Catharanthus roseus*) (Davis a Farag 2013). Vinkristin se v průběhu mitózy váže na protein tubulin, čímž způsobuje depolymerizaci mikrotubulů a zástavu dělení v metafázi s následným přechodem buněk do apoptózy (Mohammadgholi et al. 2013). Pro léčbu T-ALL je také často aplikováno antibiotikum daunorubicin pocházející z bakterie *Streptomyces peuceitius*, které svým zabudováním do struktury DNA zabraňuje přepisu genů pro enzym topoizomerázu II (Bachur et al. 1992). Tento enzym je nezbytný pro

správné vinutí DNA a tím i průběh transkripce. Ukázalo se, že daunorubicin vykazuje i cytotoxické účinky spojené s produkcí ROS (Booser a Hortobagyi 1994).

Důležitým prognostickým faktorem pro léčbu T-ALL je minimální reziduální choroba (MRD). Jedná se o zbytkové množství maligních buněk v počtu až 10^{10} , které se nacházejí v organismu pacienta i po vymizení příznaků nemoci a mohou mít za následek jejich opětovný návrat (van Dongen et al. 2015). Bylo zjištěno, že k relapsu T-ALL dochází nejrychleji u pacientů, u kterých jsou při stanovení MRD detekovány nádorové buňky v kostní dřeni. U těchto pacientů dochází k relapsu T-ALL v průběhu 18 měsíců od stanovení počáteční diagnózy. Vysoce rizikovou skupinou jsou také pacienti, u kterých byly zbytkové nádorové buňky nalezeny v období mezi 18 měsíci od diagnózy a 6 měsíci po dokončení zahájené léčby (Eckert et al. 2013). V těchto případech je řešením transplantace kmenových hematopoetických buněk (Zachary a Leffell 2014).

Moderním trendem je individualizovaná a cílená léčba, která se zaměřuje na ovlivnění konkrétních patologických procesů v nádorových buňkách. Výhodou cílené léčby oproti chemoterapii je zmírnění cytotoxických účinků, které jsou pro systémovou chemoterapii typické. Častým molekulárním cílem je dráha Notch1 (viz kapitola 1.1.1). Pro léčebné účely se často používají například inhibitory enzymu γ -sekretázy, které aktivaci Notch1 zamezují (Olsauskas-Kuprys et al. 2013).

1.2 Oxidační stres

Oxidační stres vzniká následkem nerovnováhy mezi produkcí a eliminací ROS. K jejich nadbytečné produkci přispívá nejčastěji působení chemických kancerogenů, ultrafialové záření, vyšší věk a obezita (Kovacic a Jacintho 2001). Hladiny ROS jsou zvyšovány i aktivitou enzymů NADPH oxidáz a cyklooxygenáz (Le Lay et al. 2014). Nadměrná tvorba ROS vede k poškození buněčných struktur a makromolekul, které může vyústit až v buněčnou smrt (Barja 1998). ROS je označení pro kyslíkové radikály a některé deriváty kyslíku, které jsou schopny tvořit vysoce reaktivní molekuly vyznačující se přítomností alespoň jednoho nepárového elektronu (Halliwell 2011). Pojem ROS zahrnuje například superoxidové ($O_2^{\cdot-}$) hydroxylové (OH^{\cdot}) radikály nebo

peroxid vodíku (H_2O_2) a singletový kyslík ($^1\text{O}_2$) (Zorov et al. 2014). Za fyziologických podmínek vznikají tyto molekuly při chemických reakcích bazálního metabolismu a uplatňují se v buněčné signalizaci (Richter et al. 1988). Studie prokázaly, že se tyto molekuly svým působením podílejí na stimulaci buněčného dělení a antiapoptotických mechanismech (Burdon et al. 1995; Brown et al. 1999). Tyto skutečnosti jsou v řadě případů spojeny s aktivitou faktoru NF- κ B.

1.2.1 NF- κ B a oxidační stres

NF- κ B je transkripční faktor, který se váže na sekvence DNA označované jako κ B elementy nacházející se v regulačních oblastech genů (Ghosh et al. 1998). Cílové geny pro NF- κ B jsou zapojeny zejména do inhibice apoptózy, stimulace buněčného dělení nebo adheze buněk (Hayden a Ghosh 2004). NF- κ B je důležitým aktivátorem imunitní odpovědi, který stimuluje expresi prozánětlivých cytokinů a chemokinů a má význam také pro zrání T-LC (Kane et al. 2002; Hayden a Ghosh 2004). Z tohoto hlediska je jeho zvýšená aktivita spojena s dlouhodobým zánětem, který může výrazně přispívat ke vzniku nádorového onemocnění (Prasad et al. 2010). K jeho aktivaci dochází za účasti mnoha stimulů jakým je například tumor nekrotizující faktor α (TNF α) nebo bakteriální lipopolysacharidy (LPS). Předpokládá se, že důležitou úlohu pro aktivaci NF- κ B hrají i ROS, které zde plní funkci sekundárních posílů pro stimuly aktivující tento faktor (Kabe et al. 2005). Například po aplikaci LPS byla pozorována aktivace NADPH oxidáz s následnou produkcí H_2O_2 a aktivací NF- κ B (Andreakos et al. 2004). Předpokládá se, že zvýšená exprese NF- κ B je hlavním antiapoptotickým mechanismem v řadě nádorových linií, včetně buněk akutní myeloidní leukémie nebo buněk T-ALL, a to zejména v důsledku zvýšené exprese proteinů Bcl-xL nebo Mcl-1 (Frelin et al. 2005; Dos Santos et al. 2010).

1.2.2 Oxidační stres v nádorových buňkách

Mnohými odborníky je oxidační stres považován za hlavní příčinu vzniku nádorových onemocnění (López-Lázaro 2007; Halliwell 2011). Vzhledem ke své vysoké reaktivitě

jsou ROS schopny interagovat s DNA a vyvolávat tak její poškození a mutace vedoucí k maligní transformaci (Le Lay et al. 2014). Řada studií potvrdila nadměrnou tvorbu ROS v nádorových buňkách, což je spojeno s jejich zvýšenou metabolickou aktivitou. Tato skutečnost byla prokázána například u buněk chronické lymfocytární leukémie nebo u buněk Burkittova lymfomu (Halliwell 2011). Ačkoli jsou nádorové buňky vystaveny nadměrným koncentracím ROS, jejich cytotoxickému působení zabraňují aktivními detoxifikačními mechanismy jako jsou například glutathionová nebo thioredoxinová antioxidační dráha (Harris et al. 2015). Přestože je oxidační stres jedním ze zásadních faktorů při vzniku rakoviny, lze jej využít i jako účinnou a selektivní léčebnou strategii. Jako vhodná se pro tyto účely ukázala být přírodní léčiva, která jsou schopna ovlivňovat redoxní stav v nádorových buňkách (Martin-Cordero et al. 2012).

1.2.3 Prooxidační přírodní léčiva

Protinádorové účinky přírodních léčiv jsou často spojeny s jejich prooxidačními vlastnostmi, které úzce souvisejí s jejich koncentrací v buňkách (Lopez-Lazaro 2007). Stejně sloučeniny, které svou antioxidační aktivitou působí preventivně proti vzniku nádorového onemocnění, jsou ve vysokých koncentracích schopny selektivního zabíjení nádorových buněk (Martin-Cordero et al. 2012). Přesné mechanismy účinku řady těchto látek nejsou zcela objasněny, avšak mnoho studií poukazuje na jejich schopnost zvyšování hladin ROS, zejména H_2O_2 (Alexandre et al. 2006). Jak již bylo uvedeno (viz kapitola 1.2.2), nádorové buňky vykazují vysoké hladiny ROS, které po aplikaci látek s prooxidační aktivitou přesáhnou kritickou hranici a vedou k jejich zániku. K tomuto efektu přispívá i skutečnost, že geny podílející se na opravách DNA, jsou u mnoha typů nádorových buněk mutovány, což činí buňky zranitelnější vůči oxidačnímu stresu (Vogelstein a Kinzler et al. 2004).

Tyto látky v nižších koncentracích vykazují také opačný efekt a jsou schopny stimulovat proliferaci buněk. Přestože prooxidační působení těchto léčiv nemusí být hlavním zdrojem jejich protinádorové aktivity, jsou jednoznačně důvodem jejich selektivního účinku proti nádorovým buňkám. Typickým příkladem je široce využívané cytostatikum paklitaxel nebo již zmíněný daunorubicin (viz kapitola 1.1.3), které zvyšováním hladin ROS činí nádorové buňky zranitelnější vůči svým

antiproliferativním vlastnostem, které mohou jinak postihovat i zdravé dělící se buňky (Vogelstein a Kinzler et al. 2004). Výše zmíněné důvody vedly za poslední roky ke zvýšenému zájmu o studium prooxidačních účinků přírodních sloučenin se známými antioxidačními vlastnostmi a jejich využití při léčbě rakoviny.

1.3 Zázvorník lékařský

Zázvorník lékařský (*Zingiber officinale*) je jednoděložná vytrvalá rostlina s bohatou historií a tradicí. Zázvorník je pěstován především pro své oddenky, které jsou vyhledávaným kořením a léčivem (White 2007). Oddenky se suší a následně melou, případně jsou využívány v čerstvé podobě (viz Obrázek 1). Lidově je zázvorník označován jako zázvor. První zmínky o této rostlině pocházejí z jihovýchodní Asie, ze které se vzhledem k postupně se rozvíjejícímu obchodu rozšířil do celého světa (Khodaie a Sadeghpour 2015). Již před 5000 lety se čínský císař Šen-nung věnoval popisu zázvorníku ve svém díle, ve kterém tuto rostlinu považoval za jednu z nejvýznamnějších k léčbě poruch zažívacího traktu a revmatu (White 2007). Blahodárné účinky zázvoru znali také ve starém Egyptě, Řecku a Římě a od 9. století byl rozšířen do celé Evropy (Khodaie a Sadeghpour 2015). Dnes je zázvor nejběžněji používané koření na světě s významným postavením zejména v indické kuchyni (Park a Pezzuto 2002). Zázvorové koření je typické svým výrazným aroma a charakteristickou ostrou chutí. Za posledních 30 let výrazně vzrostl počet zpráv o protizánětlivých a antimikrobiálních účincích zázvoru (Grzanna et al. 2005; Azu a Onyeagba 2007). Zvýšil se tak i vědecký zájem o jeho farmakologické vlastnosti.



Obrázek 1 Usušený oddenek zázvorníku lékařského (převzato z Rahmani et al. 2014).

1.3.1 Charakteristika zázvorníku

Zázvorník je řazen do čeledi zázvorníkovitých (*Zingiberaceae*) a jedná se o vytrvalou bylinu dosahující výšky až 1,5 m s dužnatým, hlízovitým a rozvětveným oddenkem. Z oddenků vyrůstají štíhlé, vysoké stonky, na které přisedají listy s tenkou a kopinatou čepelí (Evans 2002). Zázvorník kvete obvykle v období od dubna do srpna. Rozmnožování probíhá u této rostliny vegetativně pomocí oddenků (Ali 1998).

Původním biotopem zázvorníku jsou tropické deštné lesy jihovýchodní Asie, které vytvářejí ideální podmínky pro růst. Tato rostlina vyžaduje ke svému růstu půdu bohatou na živiny a dostatek vláhy (Ali 1998). V současnosti je zázvorník pro své oddenky běžně pěstován jako užitková rostlina například v Indii, Číně, ale i v Japonsku, Austrálii nebo Jižní Americe. Planě se tato rostlina již nevyskytuje (Evans 2002).

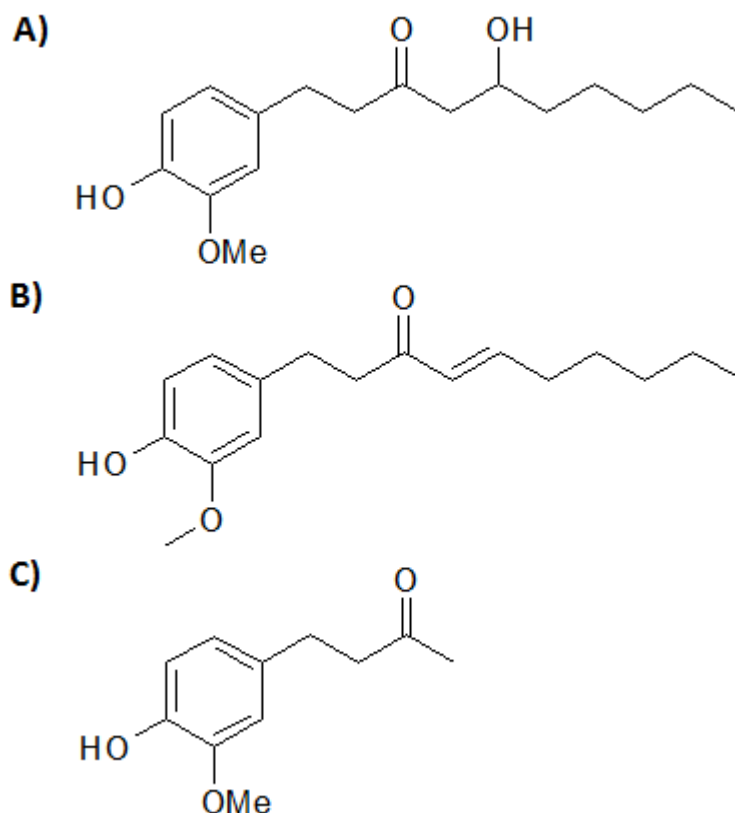
V zázvorníku je obsažen například škrob (až 50%), lipidy, volné mastné kyseliny (např. kyselina palmitová, kyselina stearová, kyselina olejová, kyselina linolová, aj.), triglyceridy, kyselina fosfatidová a lecitiny (Geiger 2005; Ali et al. 2008). Tato rostlina je také bohatým zdrojem některých minerálních látek jakými jsou hořčík, draslík, vápník, fosfor a železo (Shirin a Prakash 2010). Významnou skupinu sloučenin v zázvorníku tvoří fenyylpropanoidy.

1.3.2 Fenylypropanoidy v zázvorníku

Zázvorník obsahuje velké množství fenylypropanoidů. Jedná se o rozmanitou skupinou organických sloučenin rostlinného původu, pro kterou je společným znakem struktura fenylypropanového skeletu (Carvalho et al. 2015). Tyto sloučeniny jsou produkovány jako sekundární metabolity a mohou rostlinám sloužit jako ochrana proti UV záření, býložravcům a různým patogenům. Jsou syntetizovány nejčastěji z aminokyselin fenylyalaninu a tyrosinu (Stafford 1991). Hojně se vyskytují v pryskyřicích a silicích oddenku zázvorníku. Jejich obsah je ovlivněn místem původu, odrůdou, ale i metodami zvolenými při jeho zpracování (Badreldin et al. 2008). Složení závisí také na tom, zdali jsou oddenky čerstvé nebo usušené. Fenylypropanoidy se společně s dalšími složkami podílejí na výsledné vůni a chuti zázvorníku. U fenylypropanoidů byly pozorovány antimikrobiální, antivirální, protizánětlivé a protinádorové vlastnosti (Chahar et al. 2011).

Gingeroly jsou hlavní skupinou látek, obsažených v pryskyřici zázvorník (33 %), které jsou zodpovědné za palčivou chuť čerstvého zázvoru. Chemicky se jedná o homology fenolických ketonů. Z gingerolů je v čerstvém zázvoru nejvíce zastoupen 6-gingerol (58 %), který se vyskytuje jako žlutý olej nebo krystalická látka s nízkou teplotou tání. Zástupci 8-gingerol a 10-gingerol jsou zde zastoupeny výrazně méně (Chen et al. 2012). Obsah gingerolů v čerstvém oddenku je zřetelně vyšší než když je oddenek v sušeném stavu. Gingeroly slouží jako prekurzory pro syntézu shogaolů.

Shogaoly vznikají dehydratací gingerolů během sušení nebo tepelného zpracování zázvorníku. Tato přeměna je kromě teploty závislá i na hodnotě pH (Badreldin et al. 2008). Shogaoly způsobují štiplavost suchého zázvoru (Badreldin et al. 2008). Hlavním zástupcem této skupiny je 6-shogaol, který je téměř třikrát palčivější než 6-gingerol. Mezi další deriváty patří 8- a 10- shogaol. Poměry jednotlivých derivátů v zázvorníku jsou podmíněny rozsahem dehydratace a podmínkami skladování. Realdolizací shogaolů vzniká, mimo příslušné alkany, také zingeron (Ahmad et al. 2015). Pro své výrazné aroma je používán například jako ochucovadlo a je i častou složkou parfémů.



Obrázek 2 Strukturální vzorce fenylpropanoidů 6-gingerolu (A), 6-shogaolu (B) a zingeronu (C).

1.3.3 Protinádorové účinky zázvorníku

Mnoho různých *in vitro* a *in vivo* studií prokázalo, že gingeroly, shogaoly a jejich deriváty vykazují řadu příznivých antioxidačních, antiproliferativních a protinádorových účinků (Rahmani et al. 2014). Silné antioxidační vlastnosti jsou spojeny s vychytáváním ROS a také se zvyšováním antioxidační odezvy v buňkách. Nejúčinnějším antioxidantem je 6-shogaol, u kterého byly pozorovány i výrazné protizánětlivé účinky. Tato aktivita je přisuzována zejména přítomnosti α , β -nenasycené ketoskupiny (viz Obrázek 2; Dugasani et al. 2010). Velký význam má také délka uhlíkové řetězce. Z gingerolů je nejsilnějším antioxidantem derivát 10-gingerol (Dugasani et al. 2010).

Chemopreventivní účinky proti oxidačnímu stresu a vzniku rakoviny byly pozorovány i u 6-gingerolu, 6-shogaolu a jejich derivátů. Tyto vlastnosti jsou spojeny se schopností aktivovat jaderný faktor Nrf2, který je součástí dráhy Nrf2/ARE (Surh et al. 2008). Dráha Nrf2/ARE reguluje expresi enzymů zapojených do antioxidačních reakcí

v řadě lidských buněk (Surh et al. 2008). Antiproliferativní a proapoptotické vlastnosti fenyylpropanoidů jsou spojeny s inhibicí NF- κ B (Saha et al. 2014). Potlačení funkce NF- κ B vede také k inhibici cyklooxygenázy 2 (COX-2), což je spojeno s jejich výrazným protizánětlivým působením (Chen a Castranova et al. 2007).

Gingeroly mohou mít také selektivní prooxidační cytotoxické účinky na některé nádorové linie. Jako řada jiných antioxidantů se i gingeroly mohou stát prooxidanty a přispívat k tvorbě ROS (Martin-Cordero et al. 2012). Tyto účinky byly pozorovány u buněk Burkittova lymfomu, buněk T-ALL, buněk promyelocytární leukémie HL-60 a u buněk plicního karcinomu (Halliwell et al. 2007). Martin-Cordero et al. (2012) uvádí, že mezi různými rostlinnými alkaloidy, terpenoidními a fenolickými sloučeninami jsou 6-gingerol, 6-shogaol a 8-shogaol považovány za významná prooxidační činidla s potenciálním využitím v protinádorové terapii. Významný účinek 6-gingerolu a 6-shogaolu byl prokázán také na leukemických buňkách HL-60. Po aplikaci těchto derivátů byla pozorována zvýšená tvorba ROS, výrazný pokles potenciálu mitochondriální membrány a také události spojené s apoptózou jakými jsou uvolnění cytochromu c a následná aktivace prokaspáz 3 a 9 (Shieh et al. 2010). Bylo také zjištěno, že 6-gingerol a 8-shogaol jsou schopny indukovat apoptózu a oxidační stres v buňkách kolorektálního karcinomu a buňkách epidermoidního karcinomu A431 (Pan et al. 2008; Nigam et al. 2009).

2. CÍLE PRÁCE

Fenylpropanoidy obsažené v zázvorníku mohou vzhledem ke svému prooxidačním účinkům vykazovat protinádorovou aktivitu v některých nádorových buněčných liniích. Zatím však nebylo provedeno mnoho studií, které by tyto účinky prokázaly v řadě linií včetně buněk T-ALL. Práce je zaměřena na studium selektivních účinků fenylpropanoidů na tyto buňky. Přesněji lze cíle práce definovat takto:

1. Stanovení cytotoxických účinků fenylpropanoidů v extraktu z oddenku zázvorníku na buňky T-ALL, buňky lidského hepatokarcinomu HepG2, imortalizované keratinocyty HaCaT, buňky lidského maligního gliomu U87 MG a fibroblasty CRL-2522 odvozené z lidské předkožky.
2. Určení spojitosti mezi cytotoxickými a proapoptotickými účinky fenylpropanoidů v zázvorníku.

3. MATERIÁL A METODY

3.1 Biologický materiál

Pro experimenty jsem použil zárodečné buňky ledvin HEK293, fibroblasty CRL-2522 odvozené z lidské předkožky a imortalizované keratinocyty HaCaT. Z lidských nádorových buněk jsem použil buňky akutní T-lymfoblastické leukémie CCRF-CEM, buňky lidského hepatokarcinomu HepG2 a buňky lidského maligního gliomu U87 MG. Stanovení exprese NF- κ B jsem provedl na nádorových buňkách C6, odvozených z glioblastomu potkana obecného (*Rattus norvegicus*) a transfektovaných genovým konstruktem obsahujícím luciferázovou reportérovou sekvenci pro expresi NF- κ B. Buňky C6 byly poskytnuty Mgr. Ivo Frydrychem, Ph.D. z Ústavu molekulární a translační medicíny Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Veškeré manipulace s buňkami jsem prováděl ve flowboxu s laminárním prouděním MSC-Advantage (ThermoScientific, USA) a dodržoval jsem podmínky práce v aseptickém prostředí.

Extrakt ze zázvorníku lékařského byl pro testování poskytnut vedoucím práce Mgr. Erminem Schadichem, Ph.D., kterým byla provedena také hmotnostní analýza prokazující přítomnost 6-gingerolu, 6-shogaolu a jejich derivátů.

3.2 Kultivace buněk

Při kultivaci jsem buňky inkuboval v inkubátoru HERAcell 150i (ThermoScientific, USA) při 37 °C v atmosféře s 5 % CO₂ a při 100% vzdušné vlhkosti. Pro kultivaci linie CCRF-CEM jsem použil Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI; Sigma Aldrich, USA) s obsahem 1 mM neesenciálních aminokyselin (NEA; Sigma-Aldrich, USA), 1 mM pyruvátu sodného (SP; Sigma-Aldrich, USA), 10 % fetálního telecího séra (FCS; PAN-Biotech GmbH, Německo), 100 U/ml penicilinu (Biotika, Česká republika) a 50 μ g/ml streptomycinu (Sigma-Aldrich, USA). Linii C6 jsem kultivoval v Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Sigma-Aldrich, USA) s obsahem 1 mM NEA (Sigma-Aldrich, USA), 1 mM SP (Sigma-Aldrich, USA), 10 % FCS (PAN-

Biotech GmbH, Německo), 100 U/ml penicilinu (Biotika, Česká republika) a 50 µg/ml streptomycinu (Sigma-Aldrich, USA). Buňky HEK293, HaCaT, U87 MG, HepG2 a CRL-2522 jsem kultivoval v Minimum Essential Medium Eagle (MEM, Sigma-Aldrich, USA) s obsahem 1 mM NEA (Sigma-Aldrich, USA), 1 mM SP (Sigma-Aldrich, USA), 10 % FCS (PAN-Biotech GmbH, Německo), 100 U/ml penicilinu (Biotika, Česká republika) a 50 µg/ml streptomycinu (Sigma-Aldrich, USA). Kvalitu buněk jsem pravidelně kontroloval inverzním mikroskopem IX51 (Olympus, USA).

3.3 Sklizení buněk

Prvním krokem při sklizení adherentních buněk bylo odstranění média a promytí 1 ml 1x fosfátového pufru (PBS), připraveného ze zásobního roztoku (viz Příloha 1) ve dvou opakováních. Následně jsem přidal roztok Tryplu (Life Technologies, USA) o objemu 0,5 ml pro oddělení buněk přisedlých na dně kultivační nádoby. Buňky jsem poté inkuboval při 37 °C v atmosféře s 5% CO₂ a při 100% vzdušné vlhkosti po dobu 4-5 minut. Působení Tryplu (Life Technologies, USA) jsem zastavil přidáním 9 ml média. Suspenzi jsem centrifugoval 5 minut při 12 000 otáčkách/min. Vzniklý supernatant jsem odstranil a pelet resuspendoval v čerstvém médiu. Buňky jsem naředit na požadovanou koncentraci s využitím analyzátoru ViCell® XR (Beckman Coulter Inc., USA). S jeho pomocí jsem zkontroloval také životnost buněk. V případě suspenzních CCRF-CEM jsem vynechal promytí 1x PBS a inkubaci v přítomnosti Tryplu (Life Technologies, USA).

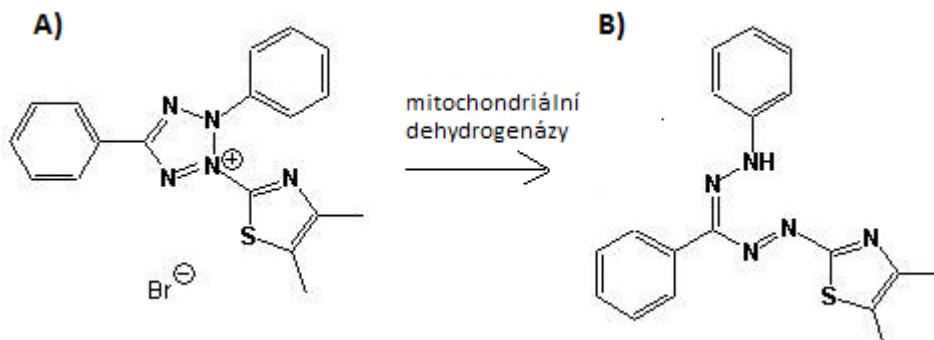
3.4 MTT test

MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid) test je využíván ke stanovení proliferace a životaschopnosti buněk po aplikaci chemické látky (Mosmann 1983). Principem stanovení je konverze látky MTT na fialový krystalický formazan v důsledku působení mitochondriálních dehydrogenáz v metabolicky aktivních buňkách (viz Obrázek 3). Míra redukce MTT na formazan je úměrná životaschopnosti buněk po

aplikaci testované látky. Účelem testu bylo stanovení schopnosti extraktu z oddenku zázvorníku potlačovat růst netransformovaných linií CRL-2522, HaCaT, HEK293 a buněk nádorových linií HepG2, U-87 MG a CCRF-CEM.

Do jamek 96 jamkového panelu jsem nanesl 100 μ l buněčné suspenze. Pro linie CRL-2522, HaCaT, HEK293 a U-87 MG jsem použil koncentrace buněk 5 000 buněk/ml. V případě linií CCRF-CEM a HepG2 jsem buňky vysel v koncentraci 10 000 buněk/ml. Jako blank jsem použil 1 jamku se 100 μ l média. Vyšetě buňky jsem ponechal v inkubátoru přes noc. Během celého experimentu jsem buňky inkuboval při 37 °C v atmosféře s 5 % CO₂ a při 100% vzdušné vlhkosti. Následující den jsem médium odstranil, jamky jsem promyl 100 μ l 1x PBS a přidal 75 μ l média s 10% FCS. Vysoký obsah růstových faktorů v FCS, jakými jsou například interleukin-2 (IL-2) nebo kolonie stimulující faktor GM-CSF, může znehodnocovat výsledky testu (Brunner et al. 2010). Z tohoto důvodu jsem test provedl také na buňkách CCRF-CEM, které jsem v průběhu experimentu inkuboval v médiu s 0,5% FCS. Extrakt jsem aplikoval v objemu 25 μ l o koncentracích 40-0,16 μ g/ml s faktorem ředění 2. V případě suspenzí buněk CCRF-CEM jsem extrakt aplikoval do 100 μ l suspenze bez výměny média. Extrakt v jednotlivých koncentracích jsem testoval v pěti opakováních. Jako kontrolu jsem použil buňky v čistém médiu s 10% FCS. Pro kontrolu působení chemického rozpouštědla jsem buňky inkuboval také v médiu s 0,05% DMSO. Pro srovnání inhibičního účinku jsem u linie CCRF-CEM aplikoval cytostatikum vinkristin o koncentraci 100 μ g/ml. Buňky jsem inkuboval 72 hodin.

Do všech jamek jsem následně přidal 10 μ l MTT ze zásobního roztoku o koncentraci 5 μ g/ml (viz Příloha 1). Po 4-5 hodinách inkubace s MTT jsem buňky zlyzoval přidávkem 100 μ l detergentu SDS a ponechal v inkubátoru přes noc. V závěru testu jsem změřil absorbanci vzniklého lyzátu na spektrofotometru EnSpire (Perkin Elmer, USA) při 560 nm. Naměřená data jsem normalizoval průměrem získaným z kontrol v 0,05% DMSO a vyjádřil jako relativní inhibiční účinek (%). Test jsem pro každou linii provedl ve třech nezávislých opakováních, ze kterých jsem vypočetl směrodatnou odchylku (SD) a sestavil růstové křivky. Pro CCRF-CEM jsem vypočetl polovinu maximální inhibiční koncentrace (IC₅₀). S využitím nepárového t-testu jsem stanovil statistickou relevanci pozorovaných dat porovnáním vzorků vystavených působení extraktu o koncentraci 40 μ g/ml s kontrolami inkubovanými v 0,05% DMSO.



Obrázek 3 Konverze MTT (A) na nerozpustný formazan (B) v důsledku působení mitochondriálních dehydrogenáz metabolicky aktivních buněk.

3.5 FACS analýza linie CCRF-CEM

Třídění buněk založené na fluorescenci (FACS) je typ průtokové cytometrie, který umožňuje třídění jednotlivých buněk do dvou nebo více oddílů na základě rozptylu světla a fluorescenčních vlastností každé buňky (Julius et al. 1972). K účelům stanovení podílu apoptotických buněk ve vzorku je nejčastěji využíváno fluorescenční barvivo propidium jodid (PI). Jedná se o interkalační barvivo, které je schopno procházet pouze poškozenými membránami mrtvých nebo pozdně apoptotických buněk, ve kterých se nespecificky zabudovává do struktury DNA (Vermes et al. 1995). Po excitaci modrým světlem v cytometru je detekována červená fluorescence, která je umocněna vazbou PI na DNA. Cílem tohoto experimentu bylo měření schopnosti zázvorníkového extraktu navozovat apoptózu v buňkách CCRF-CEM.

Do 15 jamek 24 jamkového panelu jsem vysel 2×10^5 buněk CCRF-CEM v suspenzi o objemu 1 ml. Vyšeté buňky jsem inkuboval přes noc při 37 °C v atmosféře s 5% obsahem CO₂ a při 100% vzdušné vlhkosti. Následující den jsem aplikoval zázvorníkový extrakt o objemu 250 µl v koncentracích 10 a 40 µg/ml. Testované koncentrace jsem nanesl v pěti opakováních. Buňky v čistém RPMI s 10% FCS ve zbývajících pěti jamkách jsem použil jako kontrolu. Ošetřené buňky jsem inkuboval 10 hodin při 37 °C v atmosféře s 5% obsahem CO₂ a při 100% vzdušné vlhkosti. Poté jsem buňky posbíral do zkumavek a centrifugoval 7 minut při 8 000 otáčkách/min. Vzniklý supernatant jsem odstranil a buňky zafixoval resuspendováním peletu ve 2 ml 70% etanolu vychlazeného na -20 °C. Buňky jsem uchoval přes noc v mrazničce při teplotě -20 °C.

Před průběhem FACS analýzy jsem zafixované buňky nejprve centrifugoval 7 minut při 8 000 otáčkách/min a resuspendoval v 1 ml citrátového pufru (viz Příloha 1). Následně jsem přidal 3 ml 1x citrátového pufru a buňky jsem opětovně centrifugoval 7 minut při 8 000 otáčkách/min. Po odstranění supernatantu jsem ke vzorkům přidal 600 μ l čerstvého roztoku PI o koncentraci 50 μ g/ml (viz Příloha 1). Směs zafixovaných buněk a PI jsem intenzivně protřepal na laboratorní třepače a inkuboval 15 minut ve tmě při 37 °C. Posledním krokem bylo ošetření vzorků 500 μ l roztoku RNAsy (viz Příloha 1) a opětovná inkubace při 37 °C po dobu 15 minut ve tmě. Před analýzou jsem vzorky stabilizoval ponecháním 1 hodinu v lednici při 4°C. Samotná FACS analýza byla provedena Mgr. Petrem Konečným z Ústavu molekulární a translační medicíny Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci na buněčném analyzáru BD FACSCalibur (BD Biosciences, USA) s využitím CellQuest Pro Software (BD Biosciences, USA).

Naměřené hodnoty jsem vyjádřil jako procentuální podíl apoptotických buněk ve vzorku. Ze tří opakování experimentu jsem vypočetl SD. Statistickou relevanci pozorovaných dat jsem určil porovnáním vzorků s kontrolami v nepárovém t-testu.

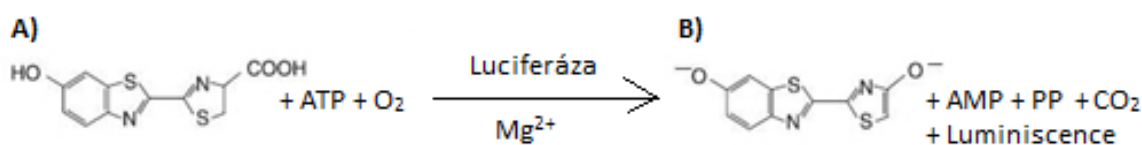
3.6 Stanovení exprese NF- κ B v linii C6

Pro stanovení exprese NF- κ B po působení zázvorového extraktu jsem využil buňky C6 transfektované genovým konstruktem obsahujícím luciferázovou reportérovou sekvenci pro NF- κ B. Exprese tohoto faktoru je zesilována působením bakteriálního LPS (viz kapitola 1.2.1). Po indukci exprese NF- κ B je konstruktem produkována luciferáza, kterou lze přidáním substrátu detekovat jako luminiscenci. Luminiscence vzniká v důsledku monoxygenační reakce iniciované luciferázou, která za účasti O_2 , molekul adenosin trifosfátu (ATP) a Mg^{2+} přeměňuje svůj substrát luciferin na oxyluciferin za vzniku adenosinmonofosfátu (AMP), uvolnění difosfátu (PP) a CO_2 (viz Obrázek 4; Luciferase Assay System, Promega; handbook). Přebytná energie reakce je vyzářena v podobě luminiscence s její intenzita je úměrná míře exprese NF- κ B.

Po kultivaci jsem buňky sklídl a vysel do jamek 96 jamkového panelu v koncentraci 10 000 buněk na jamku v objemu 100 μ l. Buňky jsem ponechal v inkubátoru přes noc. Druhý den jsem buňky promyl v 1x PBS a přidal 75 μ l čerstvého

média. Následně jsem aplikoval 25 μl extraktu o koncentraci 40 $\mu\text{g/ml}$ a buňky jsem inkuboval 12 hodin. Během celého experimentu jsem buňky inkuboval při 37 $^{\circ}\text{C}$ v atmosféře s 5 % CO_2 a při 100% vzdušné vlhkosti. Extrakt jsem testoval v triplikátu. Expresi NF- κB jsem zesílil přidávkem LPS (Sigma Aldrich, USA) o koncentraci 20 ng/ml a objemu 100 μl a následně jsem buňky inkuboval 6 hodin. Pro kontrolu exprese jsem použil buňky inkubované s LPS (Sigma-Aldrich, USA) po dobu 6 hodin a buňky inkubované v 0,05% DMSO, které jsem na panel nanesl ve třech opakováních.

Pro měření luminiscence jsem obsah jamek odsál a aplikoval jsem 20 μl roztoku lyzačního pufru (viz Příloha 1; Promega, USA) získaného smícháním se sterilní H_2O v poměru 4:1. Buňky jsem ponechal 10 minut na laboratorní třepačce. Po 10 minutách jsem do jamek přenesl 100 μl luciferázové směsi připravené přidáním luciferázového pufru (Promega, USA) do lahvičky s lyofilizovaným substrátem luciferázy (Promega, USA). Bezprostředně poté jsem na spektrofotometru EnSpire (Perkin Elmer, USA) změřil vzniklou luminiscenci při 560 a 450 nm. Luciferázová aktivita odpovídá naměřeným hodnotám luminiscence (arbitrary units). Test jsem provedl ve třech opakováních. Data jsem normalizoval hodnotami získanými z MTT testu provedeného s buňkami C6 dle postupu uvedeného v kapitole 3.4. Buňky určené pro normalizaci jsem ovlivnil stejným způsobem jako buňky pro měření luminiscence. Statistickou relevanci pozorovaných dat jsem stanovil porovnáním vzorků s kontrolami v nepárovém t-testu.



Obrázek 4 Konverze luciferinu (A) na oxyluciferin (B) (převzato a upraveno z Luciferase Assay System, Promega; handbook)

3.7 Nepárový t-test

Nepárový t-test se využívá pro stanovení relevance pozorovaných dat. Při nepárovém t-testu jsou porovnávány průměry dat, tvořené dvěma nezávislými výběry (vzorek a

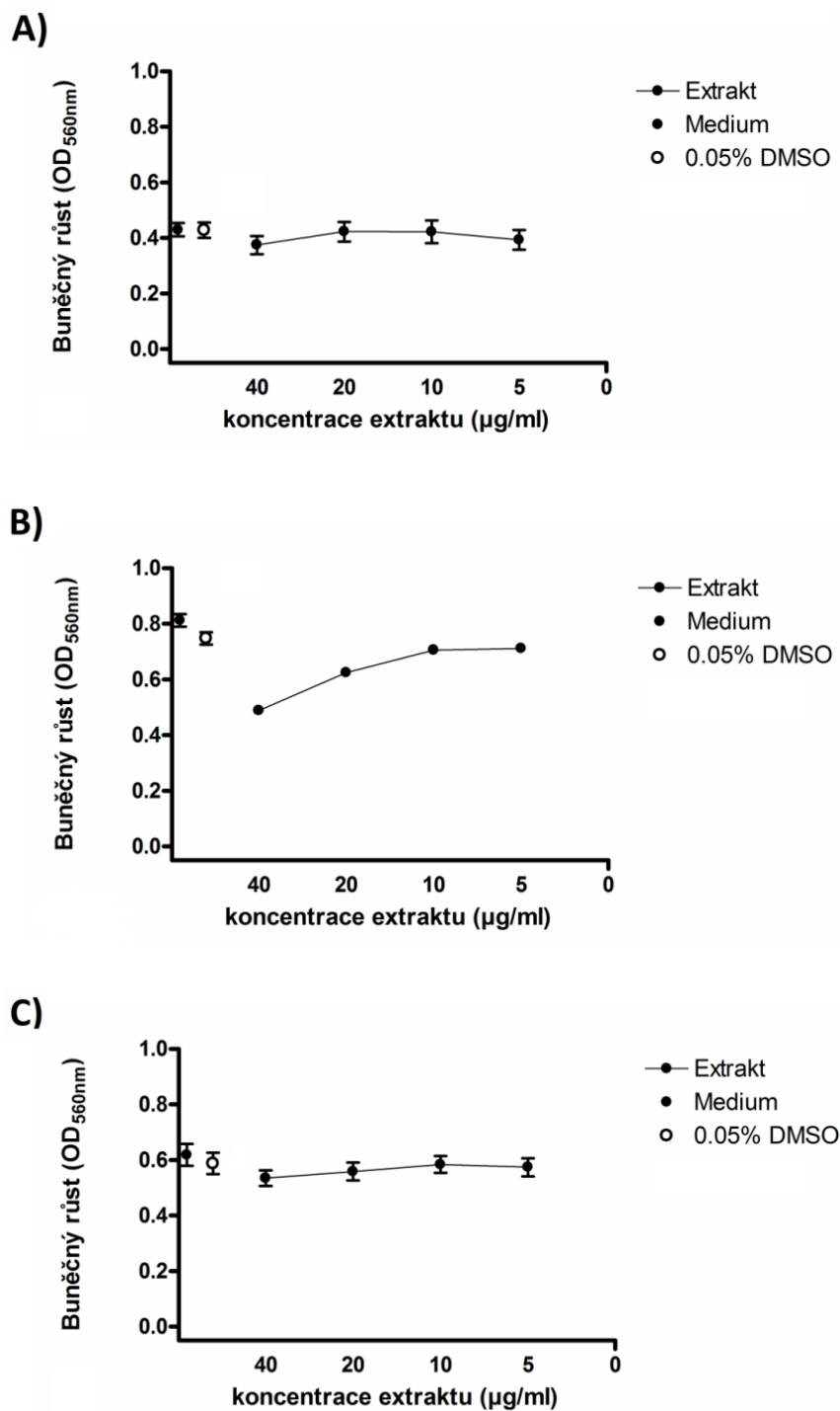
kontrola). Výsledná hodnota $p < 0,05$ poukazuje na spolehlivost analyzovaných dat a vypočetl jsem ji ze tří opakování experimentu a po provedení Bonferroniho opravy. Vypočetl jsem také hodnotu df (Degrees of freedom) vyjadřující počet hodnot v konečném výsledku, které se mohou lišit. Výsledkem nepárového t-testu je i hodnota t, která vyjadřuje velikost rozptylu pozorovaných dat. Hodnoty t blízké 0 poukazují na malý rozptyl.

4. VÝSLEDKY

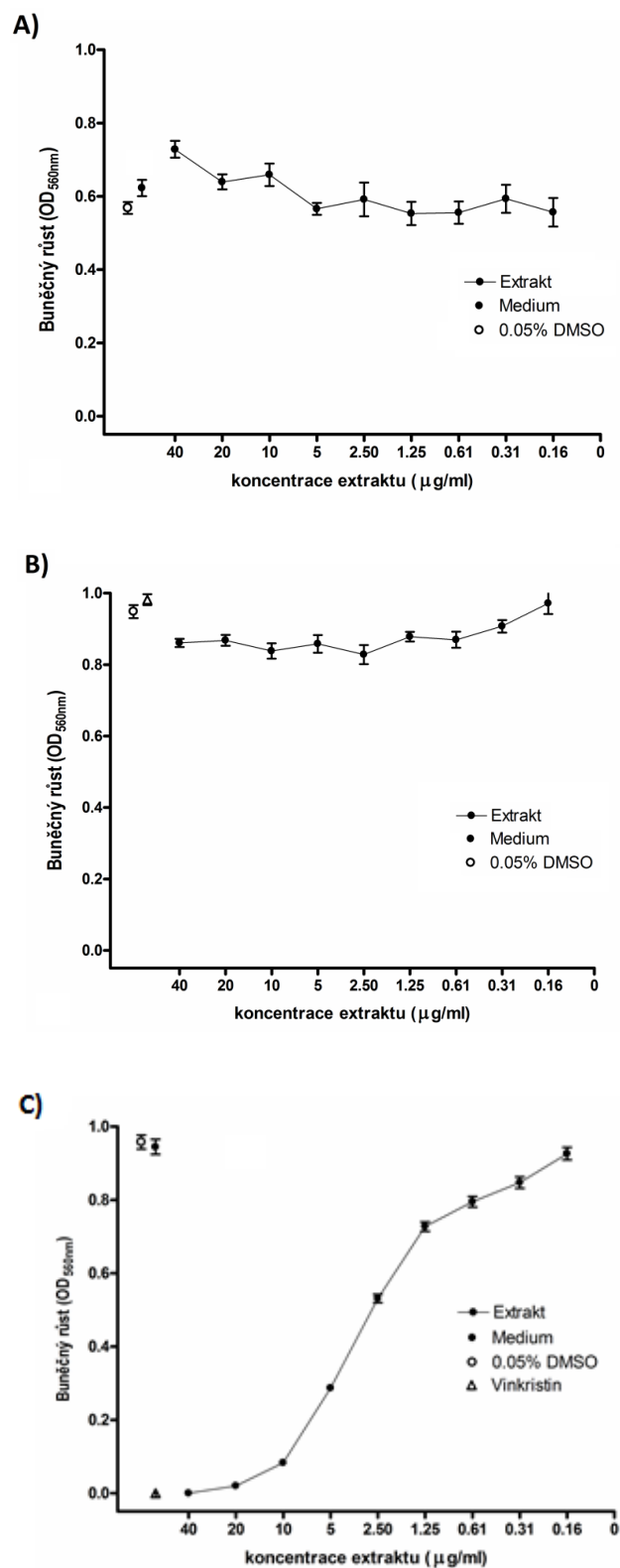
4.1 MTT test

MTT test zázvorníkového extraktu jsem provedl s cílem stanovit jeho schopnost potlačovat růst testovaných linií a zjistit hodnotu IC_{50} pro buňky CCRF-CEM. Po 72 hodinách působení extraktu jsem pozoroval rozdílné účinky na netransformované buňky CRL-2522, HaCaT a HEK293 a na nádorové linie HepG2, U-87 MG a CCRF-CEM. Růst buněk byl zcela potlačen pouze v případě CCRF-CEM (100 %) (viz Tabulka 1). U této linie jsem pozoroval významnou inhibici také v koncentracích 20 a 10 $\mu\text{g/ml}$, která u obou přesahovala 90 % (viz Příloha 2). Pro srovnání inhibičního účinku jsem v případě linie CCRF-CEM aplikoval cytostatikum vinkristin o koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$, u kterého jsem pozoroval maximální inhibiční účinek. Hodnotu IC_{50} zázvorníkového extraktu u CCRF-CEM jsem stanovil na 9,63 $\mu\text{g/ml}$ (viz. Tabulka 3). U netransformovaných linií jsem nejvyšší inhibici pozoroval u buněk HaCaT (35,7 %). Hodnoty u zbylých linií byly nevýznamné. Na základě hodnoty p nepárového t-testu jsem zjistil, že naměřená data u linií CRL-2522 a HEK293 nejsou statisticky relevantní (viz Tabulka 2). Růstové křivky netransformovaných linií po inkubaci s extraktem jsou uvedeny v Obrázku 4. Křivky pro nádorové linie jsou uvedeny na Obrázku 5. Hodnoty relativního inhibičního účinku pro nejvyšší testovanou koncentraci extraktu 40 $\mu\text{g/ml}$ jsou uvedeny v Tabulce 1. Tabulka s hodnotami relativního inhibičního účinku pro všechny testované koncentrace je obsažena v Příloze 2. Hodnoty nepárového t-testu pro koncentraci extraktu 40 $\mu\text{g/ml}$ jsou uvedeny v Tabulce 2.

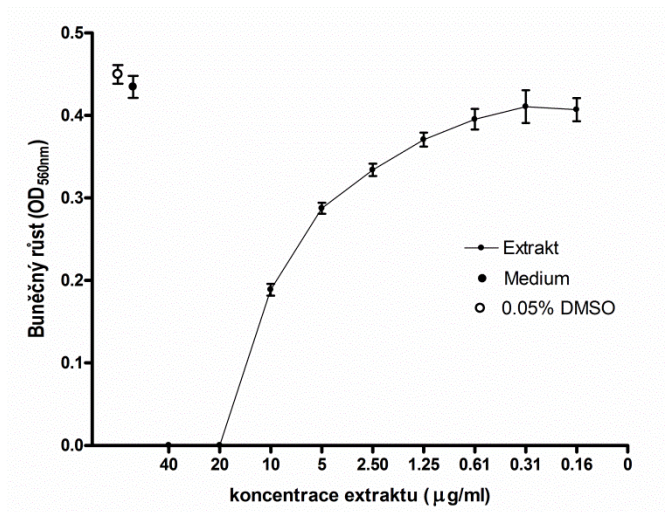
Pro sledování vztahu cytotoxicity extraktu a koncentrací FCS jsem využil linii CCRF-CEM. U buněk inkubovaných v médiu s 0,05% FCS jsem v případě koncentrací extraktu 40 a 20 $\mu\text{g/ml}$ pozoroval 100% potlačení růstu (viz Tabulka 1; Příloha 1). V koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$ byl účinek téměř poloviční. Růstová křivka linie CCRF-CEM v přítomnosti 0,5% FCS je zobrazena na Obrázku 6. Hodnota IC_{50} se výrazně nelišila od buněk v 10% FCS (viz Tabulka 3). Hodnoty IC_{50} pro 10% a 0,5% FCS jsem porovnal v nepárovém t-testu, který prokázal statistickou významnost pozorovaných dat ($t = 2,86$; $df = 4$; $p < 0,05$).



Obrázek 4 Účinek extraktu z oddenku zázvorovníku na růst netransformovaných buněčných linií. Buňky CRL-2522 (A), HaCaT (B) a HEK293 (C) jsem inkuboval v přítomnosti zázvorového extraktu v rozmezí koncentrací 40-5 µg/ml s faktorem ředění 2 ve třech nezávislých opakováních po dobu 72 hodin. Pro kontrolu působení chemického rozpouštědla jsem buňky inkuboval v 0,05% DMSO. Uvedeny jsou i hodnoty SD získané ze třech nezávislých opakování MTT testu



Obrázek 5 Účinek extraktu z oddenku zázvorníku na růst nádorových buněčných linií po 72 hodinách. Buňky HepG2 (A), U-87 MG (B) a CCRF-CEM (C) jsem inkuboval v přítomnosti zázvorového extraktu v rozmezí koncentrací 40-0,16 µg/ml s faktorem ředění 2 ve třech nezávislých opakováních. Pro srovnání inhibičního účinku jsem buňky CCRF-CEM inkuboval s vinkristinem o koncentraci 100 µg/ml. Pro kontrolu působení chemického rozpouštědla jsem buňky inkuboval v 0,05% DMSO. Uvedeny jsou i hodnoty SD získané ze třech nezávislých opakování MTT testu.



Obrázek 6 Účinek extraktu z oddenku zázvorníku po 72 hodinách na růst nádorové buněčné linie CCRF-CEM. Extrakt jsem testoval v rozmezí koncentrací 40-0,16 µg/ml s faktorem ředění 2 ve třech nezávislých opakováních a v přítomnosti 0,5% FCS. Pro kontrolu působení chemického rozpouštědla jsem buňky inkuboval v 0,05% DMSO. Uvedeny jsou i hodnoty SD získané ze třech nezávislých opakování MTT testu.

| Linie | Relativní inhibiční účinek (%)±SD |
|----------|-----------------------------------|
| CRL-2522 | 14,6±8,5 |
| HaCaT | 35,7±1,1 |
| HEK293 | 3,6±12,3 |
| HepG2 | 0±0 |
| U-87 MG | 11,5±13,6 |
| CCRF-CEM | 100±0*(100±0*) |

Tabulka 1 Hodnoty relativního inhibičního účinku (%) extraktu z oddenku zázvorníku testovaného v koncentraci 40 µg/ml po 72 hodinách. Naměřená data jsem normalizoval průměrem z naměřených hodnot pro 0,05% DMSO. Hodnoty v závorce u linie CCRF-CEM vyjadřují relativní inhibiční účinek zázvorového extraktu v přítomnosti 0,5% FCS. Hodnoty jsou uvedeny včetně SD získaných ze třech nezávislých opakování MTT testu. Symbolem * jsou označeny statisticky významné hodnoty.

| Linie | t | df | p |
|-----------------|-------------|-----------|-----------------|
| CRL-2522 | 1,3 | 28 | 0,22 |
| HaCaT | 10,8 | 28 | <0,05* |
| HEK293 | 1 | 28 | 0,28 |
| HepG2 | 5,7 | 28 | <0,05* |
| U-87 MG | 4 | 28 | <0,05* |
| CCRF-CEM | 50,9 (39,9) | 28 (28) | <0,05* (<0,05*) |

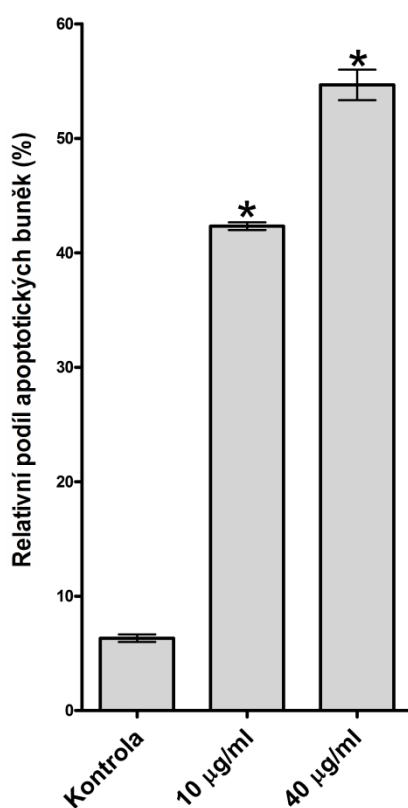
Tabulka 2 Hodnoty nepárového t-testu pro normalizovaná data získaná z MMT testu extraktu z oddenku zázvořníku pro koncentraci 40 µg/ml. Naměřená data jsem porovnal s kontrolními buňkami inkubovanými s 0,05% DMSO. Hodnoty v závorce u linie CCRF-CEM náležejí hodnotám t-testu pro buňky inkubované v přítomnosti 0,5% FCS. Symbol * u hodnoty p značí statistickou významnost analyzovaných dat.

| Koncentrace FCS (%) | IC₅₀ (µg/ml)±SD |
|----------------------------|-----------------------------------|
| 10 % | 9,63±0,5 |
| 0,5 % | 12,94±1,94 |

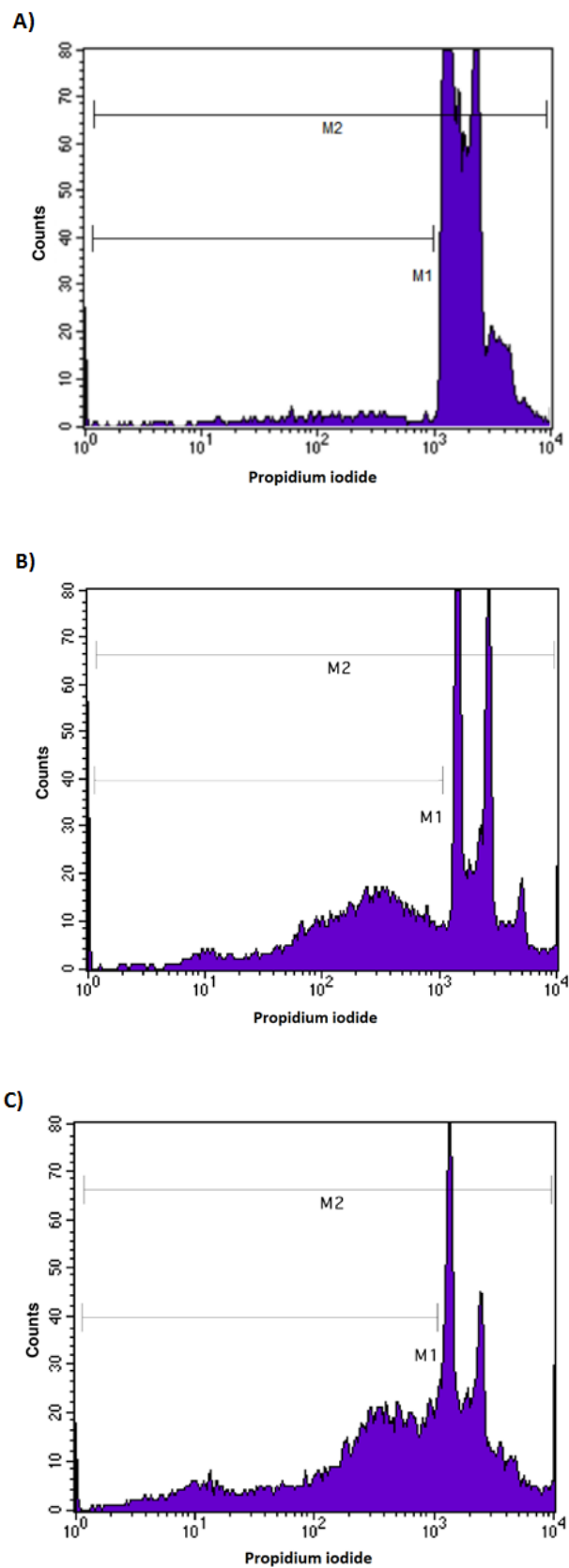
Tabulka 3 Hodnoty IC₅₀ (µg/ml) pro zázvořníkový extrakt testovaný na buňkách CCRF-CEM inkubovaných v přítomnosti 10 a 0,5% FCS. Uvedeny jsou i hodnoty SD ze třech nezávislých opakování MTT testu.

4.2 FACS analýza linie CCRF-CEM

Za účelem stanovení podílu apoptotických buněk po 10 hodinách působení extraktu z oddenku zázvorníku jsem provedl FACS analýzu. U linie CCRF-CEM vystavené koncentraci extraktu 40 $\mu\text{g/ml}$ dosahoval podíl apoptotických buněk $54,6 \pm 2,3$ % (viz Obrázek 7), což odpovídá téměř 8 krát vyššímu podílu buněk než u buněk kontrolních. V případě koncentrace 10 $\mu\text{g/ml}$ byl podíl vyšší cca 6 krát, což odpovídá $42,3 \pm 0,8$ %. Na Obrázku 8 jsou zobrazeny reprezentativní záznamy z průběhu analýzy. Na základě hodnot nepárového t-testu získaných porovnáním vzorků s kontrolami považují data za statisticky relevantní (40 $\mu\text{g/ml}$: $t = 35$; $df = 4$; $p < 0,05$; 10 $\mu\text{g/ml}$: $t = 76$; $df = 4$; $p < 0,05$).



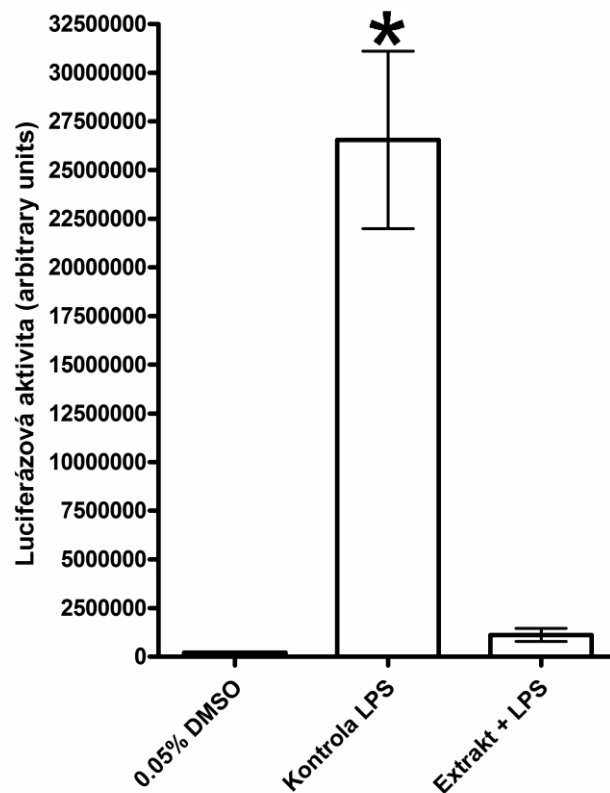
Obrázek 7 Relativní podíl apoptotických buněk (%) linie CCRF-CEM po 10 hodinách působení extraktu z oddenku zázvorníku. Extrakt jsem testoval v koncentracích 10 a 40 $\mu\text{g/ml}$ ve třech nezávislých opakováních. Pro kontrolu jsem buňky inkuboval v RPMI s 10% FCS. Uvedeny jsou i hodnoty SD ze třech nezávislých opakování. Symbol * označuje statisticky významnou hodnotu.



Obrázek 8 Reprezentativní záznamy FACS analýzy linie CCRF-CEM pro buňky kontrolní (A) a buňky testované v koncentracích 10 a 40 µg/ml (B, C). Oblast označená M1 koresponduje s velikostí apoptotických buněk. Oblast označená M2 koresponduje s velikostí všech buněk ve vzorku.

4.3 Stanovení exprese NF- κ B v linii C6

Míru exprese NF- κ B jsem stanovil na základě luciferázové aktivity v buňkách C6, které jsem vystavil účinkům zázvorníkového extraktu. Po 12 hodinách působení extraktu o koncentraci 40 μ g/ml s následnou 6 hodinovou inkubací LPS jsem naměřil přibližně 11 krát nižší relativní luciferázovou aktivitu než v případě buněk stimulovaných pomocí LPS bez aplikace extraktu. Aktivita luciferázy u kontrolních buněk inkubovaných v 0,05% DMSO byla nulová. Na Obrázku 9 je zobrazeno srovnání luciferázových aktivit. Hodnoty nepárového t-testu pro vzorky s extraktem a LPS prokázaly statistickou relevanci pozorovaných dat ($t = 8,53$; $df = 28$; $p < 0,05$).



Obrázek 9 Luciferázová aktivita buněk C6 transfektovaných genovým konstruktem nesoucího faktor NF- κ B a reportérovou sekvencí pro produkci luciferázy. Luciferázová aktivita odpovídá hodnotám luminiscence (arbitrary units) naměřených na spektrofotometru EnSpire. Buňky jsem vystavil působení extraktu o koncentraci 40 μ g/ml po dobu 12 hodin. LPS jsem aplikoval v koncentraci 20 ng/ml na dobu 6 hodin. Pro kontrolu jsem buňky inkuboval také v přítomnosti 0,05% DMSO. Uvedeny jsou i hodnoty směrodatných odchylek ze třech nezávislých opakování. Symbol *označuje statisticky významnou hodnotu.

5. DISKUZE

Cílem práce bylo stanovení cytotoxicity fenylpropanoidů v extraktu z oddenku zázvorníku lékařského proti buňkám T-ALL CCRF-CEM, buňkám lidského hepatokarcinomu HepG2, buňkám lidského maligního gliomu U87 MG, embryonálním buňkám ledvin HEK293, fibroblastům CRL-2522 odvozených z lidské předkožky a imortalizovaným keratinocytům HaCaT. Výsledky ukázaly, že působení tohoto extraktu je selektivní proti linii CCRF-CEM s $IC_{50}=9,63 \mu\text{g/ml}$, zatímco všechny ostatní buněčné linie byly rezistentní (viz Tabulka 1; Obrázky 4 a 5). Tento významný inhibiční účinek může být do jisté míry způsoben vysokou citlivostí linie CCRF-CEM k různým cytostatikům (Jensen a Sehested 1995). Na působení extraktu má vliv také řada faktorů jakými jsou například použité médium, inkubační podmínky, stav oddenků, metoda použitá pro extrakci nebo obsah fenylpropanoidů v extraktu (Jiang et al. 2007; Classen et al. 2003). S využitím několika typů analýz jsem určil faktory, které by mohly mít vliv na cytotoxicitu fenylpropanoidů v zázvorníku, včetně jejich koncentrace, typu buněčné smrti a ovlivnění exprese faktoru NF- κ B.

V sérii provedených MMT testů jsem demonstroval výrazný inhibiční účinek fenylpropanoidů z výtažku zázvorníkových oddenků proti linii CCRF-CEM, u které po 72 hodinách působení, došlo k úplnému zastavení buněčného růstu. Dle ATCC (American Type Culture Collection), je $IC_{50}=30 \mu\text{g/ml}$ u rostlinných výtažků, testovaných na nádorových liniích, hraniční hodnota pro jejich purifikaci. V případě linie CCRF-CEM odpovídala hodnota IC_{50} testovaného extraktu $9,63 \mu\text{g/ml}$. Z tohoto důvodu považuji testovaný extrakt za vhodný pro purifikaci a chemickou analýzu. Získané hodnoty IC_{50} u linie CCRF-CEM jsou srovnatelné s hodnotami ze studie z roku 2011 ($IC_{50}=8,82 \mu\text{g/ml}$; Kuete et al. 2011). Obdobný cytotoxický účinek byl na těchto buňkách zaznamenán také u extraktů z tropických rostlin *Gladiolus quartinianus* ($IC_{50}=10,57 \mu\text{g/ml}$), *Olax subscorpioidea* ($IC_{50}=10,65 \mu\text{g/ml}$; Kuete et al. 2013). Naproti tomu byla ve stejné studii stanovena vyšší cytotoxicita proti CCRF-CEM u výtažku z rostliny *Xylopiya aethiopica* ($IC_{50}=3,96 \mu\text{g/ml}$; Kuete et al. 2013), označované jako etiopský pepř. V případě buněk lidského hepatokarcinomu HepG2 a buněk lidského maligního gliomu U87 MG, se mi nepodařilo prokázat protinádorové vlastnosti fenylpropanoidů v extraktu. U výtažku ze zázvorníku nebyla doposud zaznamenána výrazná cytotoxicita proti těmto nádorovým liniím, přestože u linie HepG2 byl po

aplikaci purifikovaného 6-gingerolu pozorován přechod do apoptózy (Impheng et al. 2015). Cytotoxicitu zázvorníkového extraktu v rozmezí testovaných koncentrací jsem nezaznamenal ani vůči netransformovaným liniím CRL-2522, HEK293, což souvisí s jejich přirozeně nižší produkcí ROS. U imortalizovaných keratinocytů HaCaT byl růst po působení extraktu potlačen pouze na 35 %, a to v nejvyšší testované koncentraci 40 µg/ml. Na základě výsledků provedených MMT testů lze účinek testovaného zázvorníkového extraktu považovat za selektivní proti buňkám T-ALL bez výrazné cytotoxicity proti buňkám netransformovaným.

Po stanovení selektivního působení extraktu proti buňkám CCRF-CEM, jsem tuto linii podrobil FACS analýze za účelem stanovení podílu apoptotických buněk po 10 hodinách působení extraktu v koncentracích 10 a 40 µg/ml. V případech obou testovaných koncentrací, jsem zaznamenal výrazný podíl apoptotických buněk ve vzorku, který přesahoval 30 %. Analýza cytotoxického působení zázvorníkového extraktu proti buňkám CCRF-CEM v přítomnosti 0,5% FCS, prokázala, že růstové faktory, včetně GM-CSF a IL-2, neovlivnily podíl apoptotických buněk ve vzorku (viz Tabulka 3). Ve studii z roku 1987 bylo zjištěno, že citlivost buněk CCRF-CEM k proapoptickým účinkům bioaktivních sloučenin může být zvýšena snížením koncentrace FCS v kultivačním médiu (Lange et al. 1987). Z tohoto důvodu je pravděpodobnější, že k apoptóze těchto buněk docházelo v důsledku nárůstu produkce ROS, oxidačnímu poškození mitochondriální membrány a aktivaci apoptotických signálních drah, jak již bylo pozorováno v minulosti u řady látek s prooxidačními účinky (Halliwell et al. 2007; Shieh et al. 2010; Martin-Cordero et al. 2012).

Zázvorníkový extrakt vykazoval výraznou schopnost modulovat signální dráhu NF-κB v buňkách potkaního gliomu C6. Po stimulaci exprese NF-κB pomocí LPS, došlo po aplikaci extraktu k jejímu výraznému poklesu (viz Obrázek 9). Tento fakt poukazuje na antiproliferativní, proapoptické a protizánětlivé účinky fenylypropanoidů v extraktu na některé nádorové linie, jak již bylo prokázáno (Prasad et al. 2010). Ke snížení exprese mohla vést zejména přítomnost 6-gingerolu a 6-shogaolu, u kterých byly tyto účinky v minulosti prokázány například v buňkách rakoviny žaludku, slinivky břišní nebo rakoviny prostaty. Například u 6-shogaolu byla prokázána schopnost potlačovat konstitutivní a expresi NF-κB vyvolanou TNFα v buňkách rakoviny prostaty (Saha 2014). Vzhledem k tomu, že jsem tyto účinky pozoroval na nádorových buňkách se sníženým obsahem FCS, jehož koncentrace neovlivňovala aktivitu extraktu, není

pravděpodobné, že by proapoptotické působení zázvorníkového extraktu bylo zprostředkováno ovlivněním funkce faktoru NF- κ B.

Ačkoli jsem výrazné protinádorové vlastnosti zázvorníkového extraktu pozoroval pouze v případě linie CCRF-CEM, domnívám se, že vzhledem k jeho prooxidačnímu působení, by tyto látky mohly zvyšovat selektivitu účinku jiných léčiv u řady nádorových linií a snižovat tak jejich cytotoxicitu proti zdravým buňkám. Za vhodné považuji také purifikaci a detailnější chemickou analýzu těchto látek, případně přípravu chemické knihovny a testování derivátů účinných látek ze zázvorníkových oddenků. Vzhledem ke schopnosti fenylypropanoidů v zázvorníku snižovat expresi NF- κ B, považuji za vhodné testování těchto látek v souvislosti s onemocněními vyznačujícími se přetrvávajícím zánětem jakým je například diabetes mellitus 2. typu. V souvislosti s nádorovými onemocněními, je inhibice NF- κ B spjata i s potlačením angiogeneze (Prasad et al. 2010). Předpokládám, že z tohoto důvodu by mohly tyto sloučeniny nalézt uplatnění také při potlačení růstu solidních nádorů a tvorby metastáz.

ZÁVĚR

V této práci jsem se zabýval účinky fenylypropanoidů obsažených v extraktu z oddenku zázvorníku lékařského (*Zingiber officinale*). Po provedení série MTT testů, jsem prokázal jejich selektivní protinádorovou aktivitu proti buňkám CCRF-CEM, která by mohla souviset s prooxidačními účinky fenylypropanoidů. Naproti tomu extrakt nevykazoval cytotoxicitu proti buňkám lidského hepatokarcinomu HepG2 a buňkám lidského maligního gliomu U87 MG. Cytotoxické působení extraktu jsem nezaznamenal ani u embryonálních buněk ledvin HEK293, u fibroblastů CRL-2522 a ani u imortalizovaných keratinocytů HaCaT. Jak prokázala FACS analýza, cytotoxické účinky extraktu proti linii CCRF-CEM byly spojeny se schopností fenylypropanoidů indukovat apoptózu. Aktivita extraktu nebyla závislá na koncentraci růstových faktorů, což poukazuje na prooxidační působení fenylypropanoidů. Vzhledem k dosaženým výsledkům považuji fenylypropanoidy v extraktu ze zázvorníkových oddenků za vhodné kandidáty pro potenciální využití v prevenci a klinické praxi při léčbě T-ALL.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Ahmad B., Rehman M. U., Amin I., Arif A., Rasool S., Bhat S. A., Afzal I., Hussain I., Bilal S., Mir M. U.: A Review on Pharmacological Properties of Zingerone (4-(4-Hydroxy-3 methoxyphenyl)-2-butanone) (2015). *Scientific World Journal*; 2015: 816364.

Aifantis I., Raetz E., Buonamici S.: Molecular pathogenesis of T-cell leukaemia and lymphoma (2008). *Nature Reviews Immunology*; 8(5): 380-390.

Alexandre J., Batteux F., Nicco C., Chéreau C., Laurent A., Guillevin L., Weill B., Goldwasser F.: Accumulation of hydrogen peroxide is an early and crucial step for paclitaxel-induced cancer cell death both *in vitro* and *in vivo* (2006). *International Journal of Cancer*; 119(1): 41-8.

Ali B. H., Blunden G., Tanira M. O., Nemmar A.: Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (*Zingiber officinale Roscoe*): a review of recent research (2008). *Food and Chemical Toxicology*; 46(2): 409-20.

Ali M.: Text book of Pharmacognosy, 2nd Edition (1998). *CBS publishers and Distributors*; 258-262.

Andreaskos E., Sacre S. M., Smith C., Lundberg A., Kiriakidis S., Stonehouse T., Monaco C., Feldmann M., Foxwell B. M.: Distinct pathways of LPS-induced NF- κ B activation and cytokine production in human myeloid and nonmyeloid cells defined by selective utilization of MyD88 and Mal/TIRAP (2004). *Blood*; 103(6): 2229-37.

Azu N., Onyeagba R.: Antimicrobial Properties Of Extracts Of *Allium cepa* (Onions) and *Zingiber officinale* (Ginger) On *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* and *Bacillus subtilis* (2007). *The Internet Journal of Tropical Medicine*; 3: 1-10.

Badreldin H. A., Gerald B., Musbah O. T.: Some phytochemical and toxicological properties of ginger (*Zingiber officinale Roscoe*): A review of recent research (2008). *Food and Chemical Toxicology*; 46(2): 409-420.

Bachur N. R., Yu F., Johnson R., Hickey R., Wu Y., Malkas L.: Helicase inhibition by anthracycline anticancer agents (1992). *Molecular Pharmacology*; 41(6): 993-8.

Barja G.: Mitochondrial free radical production and aging in mammals and birds (1998). *Annals of the New York Academy of Sciences*; 854: 224-38.

Bhojwani D., Pui C. H.: Relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia (2013). *Lancet Oncology*; 14(6): 205-217.

Booser D. J., Hortobagyi G. N.: Anthracycline antibiotics in cancer therapy. Focus on drug resistance (1994). *Drugs*; 47(2): 223-58.

Brown M. R., Miller F. J., Li W. G.: Overexpression of human catalase inhibits proliferation and promotes apoptosis in vascular smooth muscle cells (1999). *Circulation Research*; 85: 524-33.

Brunner D., Frank J., Appl H., Schöffl H., Pfaller W., Gstraunthaler G.: Serum-free cell culture: the serum-free media interactive online database (2010). *ALTEX*; 27(1): 53-62.

Burdon R. H.: Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation (1995). *Free Radical Biology & Medicine*; 18: 775-94.

Carvalho A. A., Andrade L. N., de Sousa É. B., de Sousa D. P.: Antitumor phenylpropanoids found in essential oils (2015). *BioMed Research International*; 2015: 392674.

Cauwelier B., Dastugue N., Cools J., Poppe B., Herens C., De Paepe A., Hagemeyer A., Speleman F.: Molecular cytogenetic study of 126 unselected T-ALL cases reveals high incidence of TCRbeta locus rearrangements and putative new T-cell oncogenes (2006). *Leukemia*; 20(7): 1238-44.

Classen C. F., Falk C. S., Friesen C., Fulda S., Herr I., Debatin K. M.: Natural killer resistance of a drug-resistant leukemia cell line, mediated by up-regulation of HLA class I expression (2003). *Haematologica*; 88(5):509-21.

Coustan-Smith E., Mullighan C. G., Onciu M.: Early T-cell precursor leukaemia: a subtype of very high-risk acute lymphoblastic leukaemia (2009). *Lancet Oncology*; 10: 147-156.

Davis T., Farag S. S.: Treating relapsed or refractory Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia: liposome-encapsulated vincristine (2013). *International Journal of Nanomedicine*; 8: 3479-3488.

de Oliveira-Marques V., Cyrne L., Marinho H. S., Antunes F.: A quantitative study of NF- κ B activation by H₂O₂: relevance in inflammation and synergy with TNF α (2007). *The Journal of Immunology*; 178: 3893-3902.

Demarest R. M., Ratti F., Capobianco A. J.: It's T-ALL about Notch (2008). *Oncogene*; 27(38): 5082-91.

Dos Santos N. R., Ghezzi M. N., da Silva R. C., Fernandes M. T.: NF- κ B in T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia: Oncogenic Functions in Leukemic and in Microenvironmental Cells (2010). *Cancers*; 2(4): 1838-60.

Dugasani S., Pichika M. R., Nadarajah V. D., Balijepalli M. K., Tandra S., Korlakunta J. N.: Comparative antioxidant and anti-inflammatory effects of 6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol and 6-shogaol (2010). *Journal of Ethnopharmacology*; 127(2): 515-20.

Eckert C., Henze G., Seeger K., Hagedorn N., Mann G., Panzer-Grümayer R., Peters C., Klingebiel T., Borkhardt A.: Use of allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation based on minimal residual disease response improves outcomes for children with relapsed acute lymphoblastic leukemia in the intermediate-risk group (2013). *Journal of Clinical Oncology*; 31(21): 2736-42.

Estey E. H.: Acute myeloid leukemia: 2012 update on diagnosis, risk stratification, and management (2012). *American Journal of Hematology*; 87(1): 89-99.

Evans W. C.: Trease and Evans Pharmacognosy, 16th Edition (2002). *Saunders Elsevier*; 289-292.

Ferrando A. A., Neuberg D. S., Staunton J., Loh M. L., Huard C., Raimondi S. C., Behm F. G., Pui C. H., Downing J. R., Gilliland D. G., Lander E. S., Golub T. R., Look A. T.: Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia (2002). *Cancer Cell*; 1(1): 75-87.

Ferrando A. A.: Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia (2002). *Cancer Cell*; 1(1): 75-87.

Frelin C., Imbert V., Griessinger E., Peyron A. C., Rochet N., Philip P., Dageville C., Sirvent A., Hummelsberger M., Berard E., Dreano M.: Targeting NF- κ B activation via pharmacologic inhibition of IKK2-induced apoptosis of human acute myeloid leukemia cells (2005). *Blood*; 105: 804-811.

Geiger J.: The essential oil of ginger and anaesthesia (2005). *International Journal of Aromatherapy*; 15(1): 7-14.

Ghosh S., May M. J., Kopp E. B.: NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses (1998). *Annual Review of Immunology*; 16: 225-260.

Greaves M.: Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia (2006). *Nature Reviews Cancer*; 6(3): 193-203.

Grzanna R., Lindmark L., Frondoza C. G.: Ginger-An herbal medicinal product with broad anti-inflammatory actions (2005). *Journal of Medicinal Food*; 8:125-132.

Halliwell B.: Biochemistry of oxidative stress (2007). *Biochemical Society Transactions*; 35(5): 1147-50.

Halliwell B.: Free radicals and antioxidants - quo vadis? (2011). *Trends in Pharmacological Sciences*; 32(3): 125-30.

Harris I. S., Treloar A. E., Inoue S., Sasaki M., Gorrini C., Lee K. C., Yung K. Y., Brenner D., Knobbe-Thomsen C. B.: Glutathione and thioredoxin antioxidant pathways synergize to drive cancer initiation and progression (2015). *Cancer Cell*; 27(2): 211-22.

Hayden M. S., Ghosh S.: Signaling to NF- κ B (2004). *Genes & Development*; 18: 2195-2224.

Hebert J., Cayuela J. M., Berkeley J., Sigaux F.: Candidate tumor-suppressor genes MTS1 (p16INK4A) and MTS2 (p15INK4B) display frequent homozygous deletions in primary cells from T- but not from B-cell lineage acute lymphoblastic leukemias (1994). *Blood*; 84(12): 4038-44.

Chahar M. K., Sharma N., Dobhal M. P., Joshi Y. C.: Flavonoids: a versatile source of anticancer drugs (2011). *Pharmacognosy Reviews*; 5(9): 1-12.

Channa J., Shamsi T., Hashmi K.: Role of immunophenotyping in diagnosis of acute leukemia (2000). *Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan*; 10: 158-60.

Chen C. Y., Cheng K. CH., Chang A. Y., Lin Y. T., Hseu Y. C., Wang H. M.: 10-Shogaol, an Antioxidant from *Zingiber officinale* for Skin Cell Proliferation and Migration Enhancer (2012). *International Journal of Molecular Sciences*; 13: 1762-1777.

Chen F., Castranova V.: NF- κ B, an unappreciated tumor suppressor (2007). *Cancer Research*; 67: 11093-11098.

Chiaretti S., Foà R.: T-cell acute lymphoblastic leukemia (2009). *Haematologica*; 94(2): 160-162.

Chiaretti S., Zini G., Bassan R.: Diagnosis and Subclassification of Acute Lymphoblastic Leukemia (2014). *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*; 6(1): e2014073.

Impheng H., Richert L., Pekthong D., Scholfield C. N., Pongcharoen S., Pungpetchara I., Srisawang P.: 6-Gingerol inhibits *de novo* fatty acid synthesis and carnitine palmitoyltransferase-1 activity which triggers apoptosis in HepG2 (2015). *American Journal of Cancer Research*; 5(4): 1319-36.

Inaba H., Greaves M., Mullighan C. G.: Acute lymphoblastic leukaemia (2013). *Lancet*; 381(9881): 62187-4.

Jensen P. B., Sehested M.: *In vitro* models for testing of cytostatic agents in small cell lung cancer (1995). *Cancer Treatment and Research*; 72: 171-91.

Jiang H., Timmermann B. N., Gang D. R.: Characterization and identification of diarylheptanoids in ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) using high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry (2007). *Rapid Communications in Mass Spectrometry*; 21(4): 509-18.

Julius M. H., Masuda T., Herzenberg L. A.: Demonstration that antigen-binding cells are precursors of antibody-producing cells after purification with a fluorescence-activated cell sorter (1972). *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 69(7): 1934-8.

Kabe Y., Ando K., Hirao S., Yoshida M., Handa H.: Redox regulation of NF- κ B activation: distinct redox regulation between the cytoplasm and the nukleus (2005). *Antioxidants & Redox Signaling*; 7: 395-403.

Kane L. P., Lin J., Weiss A.: It's all Rel-ative: NF- κ B and CD28 costimulation of T-cell activation (2002). *Trends in Immunology*; 23: 413-420.

Khodaie L., Sadeghpour O.: Ginger from ancient times to the new outlook (2015). *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*; 10(1): e18402.

Kovacic P., Jacintho J. D.: Mechanisms of carcinogenesis: focus on oxidative stress and electron transfer (2001). *Current Medicinal Chemistry*; 8: 773-96.

Koyama D., Kikuchi J., Hiraoka N., Wada T., Kurosawa H., Chiba S., Furukawa Y.: Proteasome inhibitors exert cytotoxicity and increase chemosensitivity via transcriptional repression of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia (2014). *Leukemia*; 28(6): 1216-26.

Kuete V., Fankam A. G., Wiench B., Efferth T.: Cytotoxicity and Modes of Action of the Methanol Extracts of Six Cameroonian Medicinal Plants against Multidrug-Resistant Tumor Cells (2013). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*; 2013: 285903.

Kuete V., Krusche B., Youns M.: Cytotoxicity of some Cameroonian spices and selected medicinal plant extracts (2011). *Journal of Ethnopharmacology*; 134(3): 803-812.

Lange B., Valtieri M., Santoli D., Caracciolo D., Mavilio F., Gemperlein I., Griffin C., Emanuel B., Finan J., Nowell P., Rovera G.: Growth Factor Requirements of Childhood Acute Leukemia: Establishment of GM-CSF-Dependent Cell Lines (1987). *Blood*; 70(1): 192-9.

Larson R. C., Lavenir I., Larson T. A., Baer R., Warren A. J., Wadman I., Nottage K., Rabbitts T. H.: Protein dimerization between Lmo2 (Rbtn2) and Tal1 alters thymocyte development and potentiates T cell tumorigenesis in transgenic mice (1996). *The EMBO Journal*; 15(5): 1021-7.

Le Lay S., Simard G., Martinez M. C., Andriantsitohaina R.: Oxidative Stress and Metabolic Pathologies: From an Adipocentric Point of View (2014). *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*; 2014: 908539.

Lin S. E., Oyama T., Nagase T., Harigaya K., Kitagawa M.: Identification of new human mastermind proteins defines a family that consists of positive regulators for notch signaling (2002). *Journal of Biological Chemistry*; 277(52): 50612-20.

Lobry C., Oh P., Aifantis I.: Oncogenic and tumor suppressor functions of Notch in cancer: it's NOTCH what you think (2011). *The Journal of Experimental Medicine*; 208(10): 1931-5.

Lopez-Lazaro M.: Dual role of hydrogen peroxide in cancer: Possible relevance to cancer chemoprevention and therapy (2007). *Cancer Letters*; 252: 1-8.

Martin-Cordero C., Leon-Gonzalez A. J., Calderon-Montano J. M., Burgos-Moron E., Lopez-Lazaro M.: Pro-oxidant natural products as anticancer agents (2012). *Current Drug Targets*; 13(8): 1006-28.

Meyer M., Schreck R., Baeuerle P. A.: H₂O₂ and antioxidants have opposite effects on activation of NF- κ B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor (1993). *The EMBO Journal*; 12: 2005-2015.

Mohammadgholi A., Rabbani-Chadegani A., Fallah S.: Mechanism of the Interaction of Plant Alkaloid Vincristine with DNA and Chromatin: Spectroscopic Study (2013). *DNA and Cell Biology*; 32: 228-235.

Mosmann T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays (1983). *Journal of Immunological Methods*; 65(1-2): 55-63.

Mrózek K., Harper D. P., Aplan P. D.: Cytogenetics and molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia (2009). *Hematology/Oncology Clinics of North America*; 23(5): 991-1010.

Neely S. M.: Adult T-cell leukemia-lymphoma (1989). *Western Journal of Medicine*; 150(5): 557-561.

Nigam N., Bhui K., Prasad S., George J., Shukla Y.: 6-Gingerol induces reactive oxygen species regulated mitochondrial cell death pathway in human epidermoid carcinoma A431 cells (2009). *Chemico-Biological Interactions*; 181(1): 77-84.

Olsauskas-Kuprys R., Zlobin A., Osipo C.: Gamma secretase inhibitors of Notch signaling (2013). *OncoTargets and Therapy*; 6: 943-955.

Pan M. H., Hsieh M. C., Kuo J. M., Lai C. S., Wu H., Sang S., Ho C. T.: 6-Shogaol induces apoptosis in human colorectal carcinoma cells *via* ROS production, caspase activation, and GADD 153 expression (2008). *Molecular Nutrition & Food Research*; 52(5): 527-37.

Park E. J., Pezzuto J. M.: Botanicals in cancer chemoprevention (2002). *Cancer and Metastasis Reviews*; 21: 231-255.

Prasad S., Ravindran J., Aggarwal B. B.: NF- κ B and cancer: how intimate is this relationship (2010). *Molecular and Cellular Biochemistry*; 336(1-2): 25-37.

Preston D. L., Kusumi S., Tomonaga M., Izumi S., Ron E., Kuramoto A., Kamada N., Dohy H., Matsuo T.: Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part III. Leukemia, lymphoma and multiple myeloma, 1950-1987 (1994). *Radiation Research*; 137(2): 68-97.

Pui C. H., Robison L. L., Look A. T.: Acute lymphoblastic leukaemia (2008). *Lancet*; 371: 1030-43.

Pui C. H., Behm F. G., Crist W. M.: Clinical and biologic relevance of immunologic marker studies in childhood acute lymphoblastic leukemia (1993). *Blood*; 82(2): 343-62.

Pui C. H., Evans W. E.: A 50-Year Journey to Cure Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia (2013). *Seminars in Hematology*; 50(3): 185-196.

Pulte D., Redaniel M. T., Jansen L., Brenner H., Jeffreys M.: Recent trends in survival of adult patients with acute leukemia: overall improvements, but persistent and partly increasing disparity in survival of patients from minority groups (2013). *Haematologica*; 98(2): 222-229.

Radtke F., MacDonald H. R., Tacchini-Cottier F.: Regulation of innate and adaptive immunity by Notch (2013). *Nature Reviews Immunology*; 13(6): 427-37.

Rahmani A. H., Shabrmi F. M., Aly S. M.: Active ingredients of ginger as potential candidates in the prevention and treatment of diseases *via* modulation of biological activities (2014). *International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology*; 6(2): 125-136.

Richter C., Park J. W., Ames B. N.: Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive (1988). *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 85(17): 6465-7.

Rothenberg E. V., Taghon T.: Molecular genetics of T cell development (2005). *Annual Review of Immunology*; 23: 601-49.

Saha A., Blando J., Silver E., Beltran L., Sessler J., DiGiovanni J.: 6-Shogaol from dried ginger inhibits growth of prostate cancer cells both *in vitro* and *in vivo* through inhibition of STAT3 and NF- κ B signaling (2014). *Cancer Prevention Research*; 7(6): 627-38.

Shieh P. C., Chen Y. O., Kuo D. H., Chen F. A., Tsai M. L., Chang I. S., Wu H., Sang S., Ho C. T., Pan M. H.: Induction of apoptosis by 8-shogaol *via* reactive oxygen species generation, glutathione depletion, and caspase activation in human leukemia cells (2010). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 58(6): 3847-54.

Shirin P. R. A., Prakash J.: Chemical composition and antioxidant properties of ginger root (*Zingiber officinale*) (2010). *Journal of Medicinal Plants Research*; 4(24): 2674-2679.

Siegel R., Naishadham D., Jemal A.: Cancer statistics (2012). *Cancer Journal for Clinicians*; 62: 10-29.

Stafford H.: Flavonoid evolution: An enzymic approach (1991). *Plant Physiology*; 96: 680-685.

Stein P., Peiper S., Butler D., Melvin S., Williams D., Stass S.: Granular acute lymphoblastic leukemia (1983). *American Journal of Clinical Pathology*; 79(4): 426-30.

Surh Y. J., Kundu J. K., Na H. K.: Nrf2 as a master redox switch in turning on the cellular signaling involved in the induction of cytoprotective genes by some chemopreventive phytochemicals (2008). *Planta Medica*; 74(13): 1526-39.

van Dongen J. J., van der Velden V. H., Brüggemann M., Orfao A.: Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: need for sensitive, fast, and standardized technologies (2015). *Blood*; 125(26): 3996-4009.

van Vlierberghe P., Ferrando A. A.: The molecular basis of T cell acute lymphoblastic leukemia (2012). *Journal of Clinical Investigation*; 122(10): 3398-3406.

Vermes I., Haanen C., Steffens-Nakken H., Reutelingsperger C.: A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labeled Annexin V (1995). *Journal of Immunological Methods*; 184: 39-51.

Vogelstein B., Kinzler K. W.: Cancer genes and the pathways they control (2004). *Nature Medicine*; 10: 789-99.

Weng A. P., Weng A. P., Ferrando A. A., Lee W., Morris J. P., Silverman L. B., Sanchez-Irizarry C., Blacklow S. C., Look A. T., Aster J. C.: Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia (2004). *Science*; 306(5694): 269-271.

White B.: Ginger: an overview (2007). *The American Family Physician*; 75(11): 1689-1691.

Zachary A. A., Leffell M. S.: Desensitization for solid organ and hematopoietic stem cell transplantation (2014). *Annual Review of Immunology*; 258(1): 183-207.

Zhang Y., Xiong Y., Yarbrough W. G.: ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways (1998). *Cell*; 92(6): 725-734.

Zorov D. B. , Juhaszova M., Sollott S. J.: Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release (2014). *Physiological Reviews*; 94(3): 909-950.

SEZNAM ZKRATEK

| | |
|--------------------------------|--|
| ALL | Acute lymphoblastic leukemia |
| AMP | Adenosine monophosphate |
| ARE | Antioxidant response element |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| ATP | Adenosine triphosphate |
| Bcl-xL | B-cell lymphoma-extra large |
| CD | Cluster of differentiation |
| COX-2 | Cyclooxygenase-2 |
| Df | Degrees of freedom |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle's Medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxide |
| DNA | Deoxyribonucleic acid |
| FACS | Fluorescence-activated cell sorting |
| FCS | Fetal Calf Serum |
| GATA-3 | GATA binding protein 3 |
| GM-CSF | Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor |
| Hes1 | Hairy and enhancer of split-1 |
| HLTV1 | Human T-lymphotropic virus 1 |
| IC₅₀ | Half maximal inhibitory concentration |
| IL-2 | Interleukin-2 |
| LMO2 | LIM domain only 2 (rhombotin-like 1) |
| LPS | Lipopolysaccharides |
| Mcl-1 | Myeloid cell leukemia 1 |
| MDM2 | Murine double minute 2 |
| MEM | Minimum Essential Medium Eagle |
| MRD | Minimal residual disease |
| MTT | (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) |
| NADPH | Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate |
| NEA | Non-Essential Amino Acids |
| NF-κB | Nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B |
| NICD | Intracellular domain of Notch |

| | |
|-------------------------------|---|
| Nrf2 | Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 |
| OPTI-MEM | Reduced-Serum Medium |
| PBS | Phosphate-buffered saline |
| PI | Propidium iodide |
| PP | Diphosphate |
| ROS | Reactive oxygen species |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute medium |
| RUNX3 | Runt-related transcription factor 3 |
| SD | Standard deviation |
| SP | Sodium pyruvate |
| T-ALL | T-cell acute lymphoblastic leukemia |
| T-LB | T-lymphoblasts |
| T-LC | T-lymphocytes |
| TLX1 | T-cell leukemia homeobox 1 |
| TLX3 | T-cell leukemia homeobox 3 |
| TNFα | Tumor necrosis factor α |

PŘÍLOHA 1

SEZNAM CHEMIKÁLIÍ

dihydrát citrátu sodného - Sigma-Aldrich, USA
DMEM - Sigma-Aldrich, USA
DMSO - Sigma-Aldrich, USA
FCS - PAN-Biotech GmbH, Německo
LPS - Sigma-Aldrich, USA
luciferázový pufr - Promega, USA
lyofilizovaný substrát luciferázy - Promega, USA
lyzační pufr - Promega, USA
MEM - Sigma-Aldrich, USA
MTT - Sigma-Aldrich, USA
NEA - Sigma-Aldrich, USA
penicilin - Biotika, Česká republika
PI - Sigma- Aldrich, USA
SP - Sigma-Aldrich, USA
RNAasa - Sigma-Aldrich, USA
RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium) - Sigma Aldrich, USA
SDS - Sigma-Aldrich, USA
Streptomycin - Sigma-Aldrich, USA
Triton X-100 - Sigma-Aldrich, USA
Trypl - Life Technologies, USA

SEZNAM ROZTOKŮ

PBS: 137 mM NaCl, 1,6 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄.12H₂O, 1,8 mM KH₂PO₄ (pH=7,4)

MTT: 5 mg MTT (Sigma-Aldrich, USA) v 1 ml sterilního 1x PBS. Uchováno při -20°C.

Citrátový pufr: 5,68 g dihydrátu citrátu sodného (Sigma-Aldrich, USA) v 500 ml deionizované H₂O

Propidium jodid: 2 mg propidium jodidu (Sigma-Aldrich, USA), 4 ml 2% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, USA), 36 ml deionizované H₂O

2% Triton X-100: 2 ml Tritonu X-100 (Sigma-Aldrich, USA) ve 100 ml citrátového pufru. Uchováno při 4°C.

Lyzační pufr: 200 µl lyzačního pufru (Promega, USA) v 800 µl sterilní H₂O v poměru

RNAasy: 10 mg RNAasy (Sigma- Aldrich, USA) v 5 ml 1x citrátového pufru

SEZNAM VYBAVENÍ

flowbox s laminárním prouděním MSC Advantage - ThermoScientific, USA

inkubátor HERAcell 150i - ThermoScientific, USA

automatický čítač buněk Vi-CELLXR Cell Viability Analyzer - Beckman Coulter, USA

spektrofotometr EnSpire - Perkin Elmer, USA

centrifuga Rotina 420 R - Hettich, Německo

inverzní mikroskop IX51 - Olympus, USA

buněčný analyzátor BD FACSCalibur - BD Biosciences, USA

laboratorní třepačka

software CellQuest Pro Software - BD Biosciences, USA

PŘÍLOHA 2

| Koncentrace extraktu ($\mu\text{g/ml}$) \pm SD | 40 | 20 | 10 | 5 | 2,5 | 1,25 | 0,6 | 0,3 | 0,16 |
|--|------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------|
| CRL-2522 | 14,6 \pm 8,5 | 13,1 \pm 8,9 | 8,9 \pm 10,9 | 6,9 \pm 9,8 | - | - | - | - | - |
| HaCaT | 35,7 \pm 1,1 | 20,1 \pm 7,6 | 8,1 \pm 4,7 | 9,9 \pm 6,1 | - | - | - | - | - |
| HEK293 | 3,6 \pm 12,3 | 0 \pm 0 | 0 \pm 0 | 0 \pm 0 | - | - | - | - | - |
| HepG2 | 0 \pm 0 | 0 \pm 0 | 0 \pm 0 | 0 \pm 0 | 0 \pm 0 | 9,6 \pm 8,7 | 8,1 \pm 13,8 | 5,1 \pm 7,9 | 2,8 \pm 10,7 |
| U-87 MG | 11,5 \pm 13,6 | 7,9 \pm 23,4 | 7,5 \pm 28,2 | 6 \pm 30,1 | 7,6 \pm 32,1 | 5 \pm 27,2 | 5,6 \pm 27,8 | 2,4 \pm 29,6 | 0 \pm 32,3 |
| CCRF-CEM | 100 \pm 0 (100 \pm 0) | 98 \pm 1,5 (100 \pm 0) | 91,4 \pm 2,5 (58 \pm 6,6) | 70,1 \pm 2,8 (36,1 \pm 5) | 44,7 \pm 2,5 (25,8 \pm 6,7) | 24,2 \pm 5,7 (17,6 \pm 6,1) | 17,2 \pm 5,2 (12,1 \pm 10,7) | 11,7 \pm 5,7 (8,8 \pm 16,8) | 3,5 \pm 4 (9,5 \pm 9,9) |

Tabulka relativních inhibičních účinků (%) extraktu z oddenku zázvorníku na růst vybraných buněčných linií po 72 hodinách působení. Naměřená data jsem normalizoval průměrem z naměřených hodnot pro 0,05% DMSO. Extrakt jsem testoval v koncentracích 40-0,16 $\mu\text{g/ml}$ s faktorem ředění 2. Hodnoty v závorce u linie CCRF-CEM vyjadřují relativní inhibiční účinek zázvorníkového extraktu v přítomnosti 0,5% FCS. Hodnoty jsou uvedeny včetně směrodatných odchylek získaných ze třech nezávislých opakování MTT testu.