

Ispitivanje uticaja gingerola na vijabilnost ćelijske linije mišijeg melanoma B16

Rizom đumbira sadrži fenolna jedinjenja koja su jednim imenom označena kao gingeroli, od kojih je najznačajniji [6]-gingerol. Ranije je pokazano da gingerol dovodi do morfoloških promena i inhibicije rasta HeLa ćelija. U ovom radu ispitan je uticaj gingerola na ćelijske linije mišijeg melanoma B16. Iz ekstrakta đumbira, preparativnom tankoslojnom hromatografijom prečišćena je gingerolska frakcija kojom su ćelije tretirane u koncentracijama od 0.015, 0.03, 0.045 0.06 mg/mL tokom 24 h. Urađeni su MTT i SRB eseji u cilju ispitivanja vijabilnosti ćelija. MTT testom je pokazano da do statistički značajnog pada vijabiliteta ćelija dolazi nakon tretmana gingerolskom frakcijom koncentracije 0.06 mg/mL (24% živih ćelija nakon tretmana) u odnosu na kontrolu ($p < 0.001$). Rezultati su potvrđeni i SRB testom, pomoću kog je pokazano da i pri koncentraciji 0.045 mg/mL, kao i 0.06 mg/mL dolazi do statistički značajnog pada vijabiliteta. Tretman gingerolom je u ovom istraživanju doveo do značajnog pada vijabiliteta ćelija u odnosu na kontrolu. Rezultati ukazuju na potencijalno antitumorsko dejstvo gingerolske frakcije i mogu biti osnov za dalja istraživanja na drugim ćelijskim linijama.

Uvod

Rizom đumbira sadrži fenolna jedinjenja koja su jednim imenom označena kao gingeroli, od kojih je [6]-gingerol (gingerol) najznačajniji. Poznato je da gingerol ispoljava antitumorski, antiinflamatorni i antioksidativni efekat, ali i

mnoge druge. Antikancerski efekat gingerol ispoljava dejstvom na različite biološke puteve koji su uključeni u apoptozu, regulaciju ćelijskog ciklusa, citotoksičnu aktivnost i inhibiciju angiogeneze (Wang *et al.* 2014). Zbog svoje efikasnosti i sigurnosti za ljudsku upotrebu, gingerol se koristi u istraživanjima kao potencijalni terapijski agens za prevenciju i/ili lečenje mnogih bolesti (*Ibid*). *In vitro* i *in vivo* studijama pokazano je da gingerol ispoljava antioksidativnu aktivnost inhibicijom peroksidacije fosfolipida indukovanom $FeCl_3$ -askorbatnim sistemom. Gingerol inhibira adheziju, invaziju i motilitet MMP-2 i MDA-MB-231 ćelijskih linija kancera dojke, a pokazano je i da gingerol inhibira rast HeLa ćelija i dovodi do morfoloških promena (Lee *et al.* 2008; Zhang *et al.* 2017). Takođe, gingerol je indukovao zastoj ćelijskog ciklusa u G0/G1 fazi što je kao krajnji ishod dovelo do apoptoze (*Ibid.*). Gingerol je doveo do smanjenja ekspresije ciklina A, D1 i E1 i blagog smanjenja ekspresije CDK-1, p21 i p27, a pokazano je i da do indukcije apoptoze dovodi povećanje koncentracije Bax/Bcl-2, oslobađanje citohroma c i rascepa kaspaza 3, 8 i 9 i fosforibozil-priofosfata (PRPP) u tretiranim ćelijama (Zhang *et al.* 2017). Gingerol dovodi do aktivacije AMP-om aktivirane protein kinaze (AMPK) i inhibira fosforilaciju fosfatidilinozitol-3 kinaze (PI3K) i protein kinaze B (AKT) smanjenjem ekspresije ribozomalni-protein S6 kinaze beta-1 (P70S6K) i suprimira fosforilaciju mTOR proteina (Zhang *et al.* 2017).

U studijama izvedenim na ćelijskim linijama neurona i mišićnih ćelija pokazano je da gingerol ne samo da nije uspeo da zaštiti ćelije od bloka-

Anđela Milošević (1999), Kragujevac, Deligradska 5, učenica 3. razreda Prve kragujevačke gimnazije u Kragujevcu

MENTORI:

Jovan Traparić, student Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Anđelika Kalezić, istraživač pripravnik, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković” u Beogradu

torima sarkoplazmin-endoplazmin retikulum Ca^{2+} ATP-aze (SERCA) indukovanog stresa endoplazminog retikuluma (ER) i ćelijske smrti, već je potentno indukovao ćelijsku smrt. Pokazano je i da je gingerol aktivator SERCA. Tretman gingerolom doveo je do ispražnjenja ER kao depoa jona kalcijuma i pokazano je da je tretman gingerolom povezan sa putevima influksa jona kalcijuma (Zhang *et al.* 2015).

Kancer koji se razvija iz pigmentnih ćelija kože, melanocita, označen je kao melanom (Kim *et al.* 2005). U studiji u kojoj je ispitan uticaj gingerola na melanogenezu B16F10 ćelija, pokazano je da gingerol inhibira aktivnost tirozinaze i time smanjuje koncentraciju melanina. Rezultati ove studije pokazali su da gingerol inhibira melanogenezu u ćelijama melanoma tako što redukuje MITF i inhibira aktivnost tirozinaze (Huang *et al.* 2011). Takođe, pokazano je da gingerol zaustavlja rast ćelija melanoma in vivo i da zaustavlja angiogenezu (Kim *et al.* 2005).

Budući da je u prethodnim studijama na nekim ćelijskim linijama pokazano da gingerol ispoljava antiproliferativno dejstvo (Zhang *et al.* 2017), cilj ovog rada bio je da se ispita uticaj gingerola na vijabilnost ćelijske linije mišijeg melanoma B16.

Materijal i metode

Iz ekstrakta đumbira, preparativnom tankoslojnom hromatografijom prečišćena je gingerska frakcija kojom su tretirane ćelije mišjeg melanoma u koncentracijama od 0.015 mg/mL, 0.03 mg/mL, 0.045 mg/mL i 0.06 mg/mL tokom 24 h. Urađeni su MTT i SRB eseji u cilju ispitivanja vijabilnosti ćelija.

Ćelijske linije. U radu su korišćene ćelijske linije mišijeg melanoma B16. Ćelije su gajene u DMEM medijumu sa 10% FBS, 1% Pen/Strep i čuvane na 37°C, 95% vlažnosti vazduha i 5% CO_2 .

Ekstrakcija gingerola. Rizom đumbira sitno je iseckan i ostavljen da se suši preko noći na 40°C. Nakon toga, suvi komadići rizoma dodatno su usitnjeni nakon čega je vršena metanolna ekstrakcija tri puta na sobnoj temperaturi. Ekstrakt je potom koncentrovan uparavanjem na

vakuu uparivaču na 45°C. U metanolni ekstrakt tri puta je dodan etil-acetat, etil-acetatna faza je odvojena, a potom je etil-acetat uparen do suva na vakuu uparivaču na 45°C. Suvi ostatak prebačen je u tamnu bočicu. Komponente ekstrakta su razdvojene TLC-om na staklenim pločama sa silika gelom (20×20 cm, debljina sloja: 0.2 mm). Kao razvijatelj, korišćena je smeša petroletra i acetona (8 : 2 v/v). Nakon razdvajanja, ploča je poprskana 50% sumpornom kiselinom, kako bi se vizuelizovale trake. Rf vrednost standarda za gingerol iznosi 0.15. Ponovljen je preparativni TLC, a dve trake oko Rf vrednosti za gingerol su sastrugane, rastvorene u smeši rastvarača petrol-etar:acetona (8:2 v/v), profiltrirane i uparene do suva. Ovako prečišćeni suvi ostaci čuvani su u bočicama do analize na FTIR-u i GC-MS-u.

Tretmani. Ekstrakt je razblaživan u DMSO i PBS-u tako da finalna koncentracija DMSO-a bude 0.4%. Ćelije melanoma B16 su tretirane ekstraktom u koncentracijama 0.015 mg/mL, 0.03 mg/mL, 0.045 mg/mL i 0.06 mg/mL.

MTT esej. Ćelije su gajene u mikrotitar ploči sa 96 bunarića tako da je u svakom bunariću bilo 104 ćelija. Nakon tretmana, ćelije su isprane PBS-om, koji je potom odliven i dodan je rastvor MTT boje koncentracije 5 mg/mL medijuma. Ćelije su potom inkubirane tri sata na 37°C. Medijum sa MTT bojom je odliven, dodan je izopropanol, nakon čega su ćelije inkubirane 10 minuta na sobnoj temperaturi. Apsorbanca je očitana na 540 nm.

SRB esej. Ćelije su gajene u mikrotitar ploči sa 96 bunarića tako da je u svakom bunariću bilo 104 ćelija. Medijum je odliven, a ćelije su fiksirane sa 0.5 mg/mL TCA (trihloracetatna kiselina). Ćelije su inkubirane 1 h na 4°C, nakon čega su isprane pet puta destilovanom vodom. Nakon toga, dodato je 4 mg/mL rastvora SRB boje, a ćelije su inkubirane 30 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, rastvor boje je odliven, a ćelije isprane 1% sirćetnom kiselinom. Dodan je 10 mM Tris bazni rastvor pH 10.5, ćelije su inkubirane 5 minuta na sobnoj temperaturi, a apsorbanca je očitana na 492 nm.

Statističke analize. Za statističku obradu rezultata korišćeni su ANOVA T test. Testovi su rađeni u heksaplikatu. Obrada podataka rađena je u programu GraphPad Prism 7.0.

Rezultati

MTT esej. U cilju ispitivanja antitumorskog dejstva supstance, eksperiment je obuhvatio i ispitivanje vijabiliteta u širokom opsegu koncentracija. Vijabilitet ćelija predstavljen je kao procent živih ćelija u odnosu na netretiranu kontrolu (100% vijabilitet) i određen je MTT testom. MTT testom pokazano je da do statistički značajnog pada vijabiliteta dolazi nakon tretmana gingerolskom frakcijom koncentracije 0.06 mg/mL (24.4% živih ćelija nakon tretmana) u odnosu na kontrolu ($p < 0.001$). Rezultati dobijeni nakon tretiranja ćelija sa ostalim koncentracijama nisu doveli do statistički značajne promene u vijabilitetu B16 ćelija (slika 1).

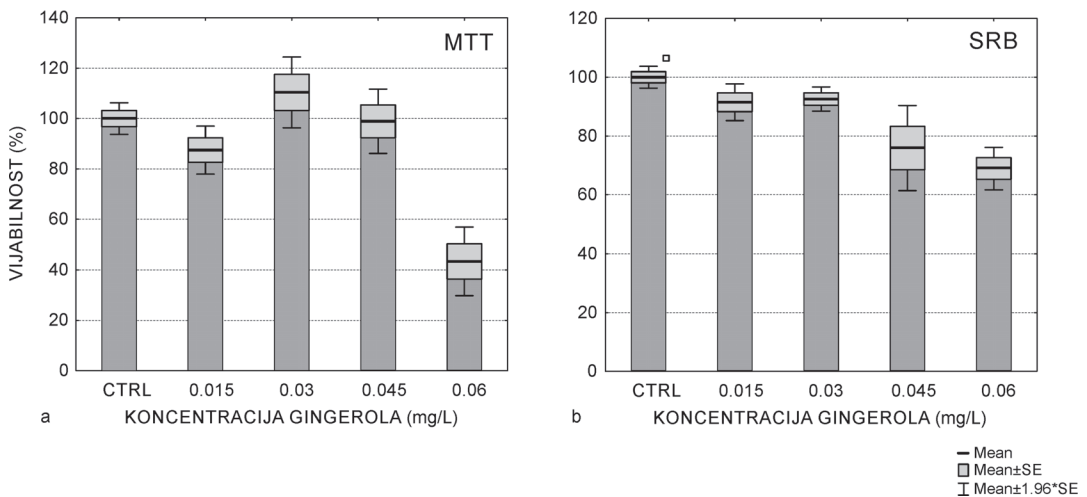
SRB esej. Rezultati MTT eseja potvrđeni su i SRB testom, pomoću kojeg je pokazano da i pri koncentraciji 0.045 mg/mL (68.6% živih ćelija) u odnosu na kontrolu, kao i 0.06 mg/mL dolazi do statistički značajnog pada vijabiliteta ćelija (59.7% živih ćelija) u odnosu na kontrolu. Re-

zultati dobijeni nakon tretiranja ćelija sa ostalim koncentracijama nisu doveli do statistički značajne promene u vijabilitetu B16 ćelija (slika 1).

Zaključak

U ranijim studijama pokazano je da gingerol inhibira melanogenezu u ćelijama B16F10 melanoma. Rezultati jedne studije pokazali su da gingerol inhibira aktivnost tirozinaze i tako smanjuje produkciju melanina (Huang *et al.* 2011).

U ovom radu je pokazan uticaj gingerola na vijabilnost B16 ćelija melanoma. Dobijeni rezultati mogu se iskoristiti kao polazište za dalja istraživanja uticaja sinergizma gingerola i drugih potentnih antikancerskih agenasa. Kim i Kim (2013) su pokazali da prilikom tretmana PANC-1 ćelija gingerolom u koncentracijama opsega 0-20 μ M izostaje citotoksični efekat. Suprotno rezultatima dobijenim u toj studiji, tretman gingerolom je u našem istraživanju doveo do značajnog pada vijabiliteta ćelija u odnosu na



Slika 1. Uticaj gingerola na vijabilitet B16 ćelija. Rezultati dobijeni merenjem vijabiliteta ćelija MTT testom (a) pokazali su da je pad vijabiliteta ćelija melanoma nakon tretmana gingerolom jedino statistički značajan pri koncentraciji od 0.06 mg/mL. Rezultati dobijeni merenjem vijabiliteta ćelija SRB testom (b) pokazali su da je pad vijabiliteta ćelija melanoma nakon tretmana gingerolom statistički značajan pri koncentracijama od 0.045 mg/mL i 0.06 mg/mL.

Figure 1. Testing gingerol effect on the viability of murine B16 melanoma cell line. The results obtained by measuring the cellular viability with MTT test (a) showed that the decline in cellular ability of melanoma cells after treatment with gingerol is only statistically significant at a concentration of 0.06 mg/mL. The results obtained by measuring the viability of the SRB-test cells (b) showed that melanoma's decreased cellular viability after treatment with gingerol is statistically significant at concentrations of 0.045 mg/mL and 0.06 mg/mL.

kontrolu. Dobijeni rezultati ukazuju na antitumorsko dejstvo gingerolske frakcije i mogu biti osnov za dalja istraživanja na drugim ćelijskim linijama.

Anđela Milošević

Gingerol Effect on the Viability of Murine B16 Melanoma Cell Line

Literatura

Huang H., Chiu S., Chang T. 2011. Inhibitory Effect of [6]-Gingerol on Melanogenesis in B16F10 Melanoma Cells and a Possible Mechanism of Action. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **75**(6): 1067.

Kim E. C., Min J. K., Kim T. Y., Lee S. J., Yang H. O., Han S., Kim Y. M., Kwon Y. G. 2005. [6]-Gingerol, a pungent ingredient of ginger, inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *Biochemical and biophysical research communications*, **335**(2): 300-308.

Kim S. O., Kim M. R. 2013. [6]-gingerol Prevents disassembly of cell junctions and activities of MMPs in invasive human pancreas cancer cells through ERK/NF- κ B/Snail Signal Transduction Pathway. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2013**(1-9): 761852.

Lee H., Seo E., Kang N., Kim W. 2008. [6]-Gingerol inhibits metastasis of MDA-MB-231 human breast cancer cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, **19**(5): 313.

Wang S., Zhang C., Yang G., Yang Y. 2014. Biological properties of 6-Gingerol: a brief review. *Natural product communications*, **9**(7): 1027.

Zhang C., Bose D., Thomas D. 2015. Paradoxical effects of sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) activator gingerol on NG115-401L neuronal cells: Failure to augment ER Ca²⁺ uptake and protect against ER stress-induced cell death. *European Journal of Pharmacology*, **762**: 165.

Zhang F., Zhang J., Qu J., Zhang Q. Prasad C., Wei Z. 2017. Assessment of anti-cancerous potential of 6-gingerol (Tongling White Ginger) and its synergy with drugs on human cervical adenocarcinoma cells. *Food and Chemical Toxicology*, **109**(2): 910.

Ginger rhizome contains phenolic compounds known as gingerols, with [6]-gingerol (gingerol) being one of the most prominent ones (Lee *et al.* 2008). Studies show that gingerol treatment leads to morphology changes and growth inhibition of HeLa cells. The mechanism of inhibition is achieved through apoptosis as a consequence of G0/G1-phase cell cycle arrest. In this work, the effect of gingerol on murine B16 melanoma cell line was observed. The gingerol fraction was prepared by thin layer chromatography (TLC) from the gingerol-rich extract. The cells were treated with a gingerol fraction at concentrations of 0.015 mg/mL, 0.03 mg/mL, 0.045 mg/mL and 0.06 mg/mL for 24 h. MTT and SRB essays were performed to test cell viability, and statistical analysis was performed using ANOVA and t-test. MTT results showed the treatment of cells with a ginger fraction at the concentration of 0.06 mg/mL decreases cell viability in a statistically significant manner (24.4% of living cells after treatment) compared to the control ($p < 0.001$). The results were confirmed with the SRB test, which showed a concentration of 0.045 and 0.06 mg/mL decreases cell viability in a statistically significant manner. Kim and Kim (2013) showed a lack of cytotoxic effect of gingerol on PANC-1 cell line in the concentration range of 0-20 μ M. Contrary to these results, the gingerol fraction showed a cytotoxic effect in this study and a significant decrease in cell viability compared to the control. These results indicate the antitumor effect of gingerol and set a basis for further research on additional cell lines, and also indicate that the synergistic effect of gingerol with alternative compounds with proven cytotoxic and antiproliferative effects on malignant cells should be tested. 