

## Ispitivanje antioksidativne aktivnosti kurkumina i njegovog uticaja na pasivna svojstva ćelijske membrane

*Ispitivana je antioksidativna aktivnost kurkumina, glavnog kurkuminoida biljke turmerik (Curcuma longa) kao i njegov uticaj na ćelijsku membranu i njena pasivna svojstva. Antioksidativna aktivnost kurkumina ispitivana je na osnovu procene stepena inhibicije oksidacije 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikala. Ispitivanje je vršeno korišćenjem pet rastućih koncentracija. Pokazano je da kurkumin poseduje antioksidativna svojstva koja su najizraženija pri koncentraciji od 170  $\mu\text{M}$ . Radi proučavanja uticaja na membranu, korišćen je nervni preparat barske žabe (Rana esculenta) pri čemu je meren pasivni odgovor membrane. Koncentracije kurkumina su iznosile 100 i 300  $\mu\text{M}$ . Rezultati ukazuju da kurkumin menja pasivna svojstva membrane kao i da poseduje antioksidativna svojstva koja se smanjuju upotrebom većih koncentracija.*

### Uvod

Fizičko-hemijska organizacija ćelijske membrane omogućava ćeliji selektivnost prilikom razmene supstanci sa vanćelijskim prostorom. Ova, takozvana semipermeabilnost ili polupropustljivost membrane obezbeđuje ćelijsku homeostazu održavanjem unutrašnjeg sastava ćelije i omogućavanjem razmene za ćeliju važnih jona i molekula. Transport kroz membranu odvija se na dva osnovna načina: kao aktivni transport za koji je potreban utrošak energije (ATP molekula) ili kao pasivni transport koji je vođen razlikom koncentracija između unutrašnjosti i spoljašnjosti ćelije (Konjević *et al.* 2004). Membranski potencijal postoji na ćelijskoj membrani gotovo svih

ćelija. Nastaje usled različite koncentracije jona sa obe strane ćelijske membrane, kao i različite propustljivosti membrane za jone. Membranski potencijal je bitan za nastanak i prenošenje nervnih impulsa, kao i za membranski transport (Guyton 2010).

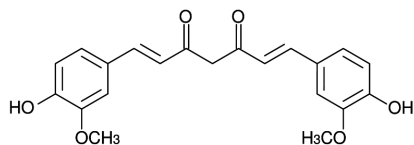
Turmerik (*Curcuma longa*) je višegodišnja biljka. Visoka je 60-100 cm. Koren je krtolast rizom čvrstog, smeđeg epidermisa i žuto-narandžaste unutrašnjosti. Turmerik ima blago sladak, ljutkast i pomalo gorak ukus. Aromatičnog je mirisa, koji podseća na narandžu, đumbir i biber. Jedan je od najviše korišćenih začina u istočnjačkoj kuhinji, a istovremeno je i važan sastojak u ajur-vedskim preparatima za šećernu bolest, hematološke, kožne i bolesti disajnih organa (<http://www.nutritional-supplement-educational-centre.com>).

Kurkumin ( $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_6$ ) je glavni kurkuminoid popularnog začina. Ranija istraživanja ukazuju na širok spektar mogućih terapijskih i preventivnih efekata kurkumina. Ispitivanja na životinjama ukazuju da poseduje snažno protivupalno, antivirusno, antioksidativno, antibakterijsko, antimikotičko i antikarcinogeno delovanje (Sun *et al.* 2002). U toku je veliki broj kliničkih istraživanja gde se proučava uticaj kurkumina na razne bolesti, uključujući karcinom pankreasa, mijelodisplazni sindrom, karcinom debelog creva, psorijaze i Alchajmerove bolesti (Hatcher *et al.* 2008). U tradicionalnoj kineskoj medicini kurkumin se već dugo primenjuje u lečenju različitih bolesti. Istraživanja sprovedena na životinjama ukazuju da kurkumin poseduje antiinflamatorna, antivirusna, antibakterijska, antimikotička i antikancerogena svojstva. Antiinflamatorna svojstva potiču od mogućnosti inhibicije biosinteze eikozanoida. Pokazao se kao efikasan u lečenju malarije, prevenciji raka grlića materice, a može uticati i na replikaciju HIV virusa (<http://www.scidev.net>). U slučaju poslednjeg, smatra se da deluje tako što reaguje sa P300/CREB-povezujućim proteinom (CBP). Najnovije studije iz 2008. godine pokazuju da niske koncentracije kurkumina ometaju

*Dolika Vasović (1993), Novi Pazar, Gojka Bačanina 40, učenica 3. razreda Gimnazije u Novom Pazaru*

*MENTOR: Milan Mišević, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu*

replikaciju HSV-1 (Kutluay *et al.* 2008). Kurkumin deluje kao antioksidant, inhibirajući lipidnu peroksidaciju i oksidativno oštećenje molekula DNK (<http://lpi.oregonstate.edu>).



Slika 1. Molekularna struktura kurkumina

Figure 1. Molecular structure of curcumin

Dva aromatična prstena kurkumina, polifenolnog tipa, spojena su pomoću dve  $\alpha$ ,  $\beta$ -nezasićene karbonylne grupe. Ove grupe formiraju diketon. Diketon obrazuje stabilne enole koji se lako deprotonuju i formiraju enolate, dok  $\alpha$ ,  $\beta$ -nezasićene karbonylne grupe podležu nukleofilnoj adiciji. Pošto je molekul lipidni pretpostavlja se da interaguje sa membranom i da u membrani služi kao antioksidant.

**Cilj** ovog rada je da opiše uticaj kurkumina na pasivna svojstva ćelijske membrane i njegovu antioksidativnu aktivnost.

## Materijal i metode

### Izolovanje kurkumina

Odmereno je 40 g sirovog turmerika i pomešano sa 100 mL hloroforma. Sve je refluktovano 60 minuta, a zatim profiltrirano korišćenjem vakuum pumpe. Tečni deo filtrata je uparen korišćenjem vakuum uparivača. Ulje crvenkaste boje je pomešano sa 40 mL heksana. Smeša je profiltrirana i dalje je korišćen talog koji ostaje na filter papiru. Talog je rastvoren u 50 mL 3% metanola i 97% dihlormetana. TLC analiza (3% metanola, 97% dihlormetana) je ukazala na prisustvo 3 komponente: diferuloilmetan ili kurkumin I (Rf. 0.49); dezmetoksikurkumin ili kurkumin II (Rf. 0.22); bis-dezmetoksikurkumin ili kurkumin III (Rf. 0.085). U eksperimentu je korišćen kurkumin I (u daljem tekstu kurkumin). Izolovanje kurkumina je izvršeno kolonskom hromatografijom (Flash drive). Kolona je pripremljena korišćenjem smeše dihlormetana i metanola 99 : 1 (v/v). Dobijena žuta supstanca

je uparena na rotacionom vakuum uparivaču. Apsorbanca frakcije je određivana spektrofotometrijski (Cintra 10 UV/VIS Spectrophotometer, GBC Spectral, Melbourne) na talasnoj dužini od 428 nm. Koncentracija kurkumina je izračunata pomoću Lambert Beerovog zakona:

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot C$$

gde je  $A$  – apsorbanca,  $b$  – širina kivete (1 cm),  $C$  – koncentracija, a  $\varepsilon$  – ekstinkcioni koeficijent (za kurkumin iznosi  $48000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

Dobijen je rastvor kurkumina u metanolu koncentracije 10 mM koji je uparen na vakuum uparivaču. Talog je rastvoren u 4 mL DMSO-a.

### Antioksidativna aktivnost kurkumina

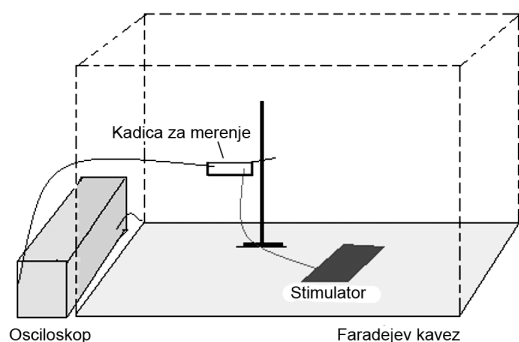
Antioksidativna aktivnost kurkumina ispitivana je na osnovu procene stepena inhibicije oksidacije 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikala. Korišćeno je 50 mL 80% metanola i 1.12 mg DPPH. Kao pozitivna kontrola koristi se kvercetin za koji je ranije pokazano da ima jako antioksidativno svojstvo (de Groot i Rauen 1998). Kvercetin je rastvaran u metanolu i korišćene su sledeće koncentracije: 0.025, 0.012, 0.006 i 0.003  $\mu\text{g/mL}$ . U staklene kivete je sipano po 50  $\mu\text{L}$  kvercetina i 1450  $\mu\text{L}$  DPPH. Nakon inkubacije od 15 minuta izmerene su apsorbance spektrofotometrijski na 517 nm uz korišćenje metanola kao slepe probe.

### Merenje pasivnih svojstava ćelijske membrane

Uticaj kurkumina na ćelijsku membranu meren je na osnovu promene pasivnih električnih svojstava membrane nakon aplikacije različitih koncentracija kurkumina.

Kao model sistem korišćen je nervni preparat žabe (*Rana esculenta*). Žabe su anestetizirane etrom i zatim dekapitovane. Posle preparacije išijadičnog nerva isti je podvezan i u najvećoj mogućoj dužini izolovan. Tako pripremljen nerv je potopljen u sud sa Ringerovim rastvorom (120 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM  $\text{CaCl}_2$  i 5 mM Tris-HCl) na sobnoj temperaturi i tamnom mestu.

Kadica za merenje pasivnog odgovora membrane, postavljena na masivni stalak, i stimulator, postavljeni su u Faradejev kavez radi smanjenja nivoa šuma (slika 2). Jedan od dva kanala osciloskopa je povezan sa stimulatorom dok je drugi



Slika 2. Skica aparature

Figure 2. Instrumental setup: osciloscope (left) and Faraday cage (right) with measuring tub and simulator

prikačen na kadicu za merenje tako da beleži odgovor nerva. Za kadicu je prikačena elektroda povezana za stimulator kako bi do nerva stizali električni stimulusi. Kavez je uzemljen povezivanjem za osciloskop. Na stimulatoru je podešena mogućnost slanja pojedinačnog stimulusa putem okidača. Nerv je stimulisan pravougaonim signalom jednosmerne struje od 500 mV. Dužina trajanja stimulusa iznosila je 25 ms.

Nerv se postavlja tako da dodiruje metalne žice na čije su krajeve prikačene elektrode (ona koja šalje stimulus i druga koja beleži odgovor nerva).

Za potrebe eksperimenta je pripremljeno 14 nerava od kojih je svaki bio sebi kontrola, a potom je tretiran rastućim dozama kurkumina. Nerv je prvo tretiran Ringerovim rastvorom, a zatim navedenim koncentracijama kurkumina. Korišćene su koncentracije od 100 i 300  $\mu\text{M}$ . Pre svakog merenja preparat je postavljan u neprozirnu posudu sa pripremljenim rastvorom kurkumina gde je inkubiran 5 minuta na sobnoj temperaturi zbog fotosenzitivnih osobina jedinjenja.

## Analiza podataka

Procenat stepena inhibicije oksidacije DPPH radikala kurkuminom izračunat je pomoću formule:

$$\text{PI} = \frac{A_c - A_t}{A_c} \times 100$$

gde je PI – procenat inhibicije,  $A_c$  – apsorbanca slepe probe DPPH,  $A_t$  – apsorbanca uzorka određene koncentracije kurkumina.

IC<sub>50</sub> je vrednost koja odgovara 50% inhibiciji DPPH kurkuminom. Vrednost IC<sub>50</sub> dobijena je korišćenjem formule:

$$\text{IC}_{50} = \frac{0.5 - b}{a}$$

Vrednosti  $a$  i  $b$  su poreklom iz linearne funkcije dobijene fitovanjem grafika (slika 4).

Pri obradi podataka određivana je amplituda, 63% amplitude i vrednost  $\tau$ . Tok promene potencijala membrane opisuju se eksponencijalnim jednačinama i to:

– uzlazna faza promene napona kao:

$$V_t = V_{\max} \left( 1 - e^{-\frac{t}{\tau}} \right)$$

gde je  $V_t$  – potencijal membrane u svakom trenutku vremena  $t$ ,  $V_{\max}$  je konačna, maksimalna vrednost potencijala membrane koja se dostigne u toku delovanja datog stimulusa, a  $\tau$  vremenska konstanta;

– silazna faza promene napona kao:

$$V_t = V_{\max} e^{-\frac{t}{\tau}}$$

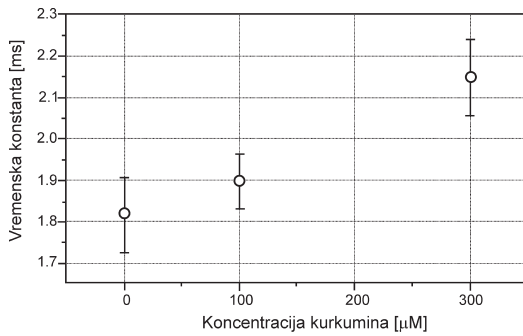
Ukoliko se jednačine reše za uslov  $t = \tau$  dobija se da je  $\tau$  vreme za koje vrednost elektrotoničnog potencijala dostigne 63% maksimalne vrednosti, tj. vreme nakon prestanka dejstva stimulusa za koje vrednost elektrotoničnog potencijala opadne na 37% maksimalne vrednosti i jednaka je  $\tau = r_m c_m$ .

## Rezultati i diskusija

Pri proučavanju antioksidativne aktivnosti kurkumina korišćene su koncentracije od 0.08, 0.10, 0.13, 0.17 i 0.25 mM. Spektrofotometrijski su određene apsorbanice koje su redom iznosile 0.237, 0.243, 0.174, 0.129 i 0.173. Apsorbanca slepe probe, DPPH, iznosila je 0.376. Procenati inhibicije za date koncentracije kurkumina redom iznose 37, 35, 53.6, 66 i 54 procenta. Dobijena IC<sub>50</sub> iznosi 0.088 što odgovara koncentraciji kurkumina od 0.09 mM. Sledi da pomenuta koncentracija kurkumina dovodi do inhibicije 50% DPPH.

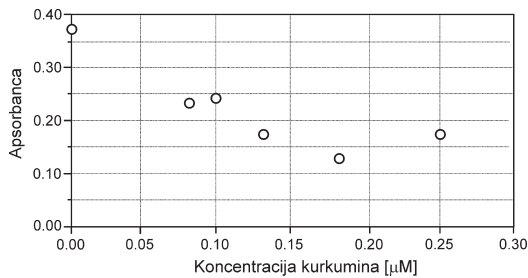
Elektrofiziološkim merenjima je pokazano da kurkumin menja pasivna svojstva membrane.

Obrada podataka ukazuje da koncentracija od 100  $\mu\text{M}$  ne pokazuje statistički značajnu razliku u uticaju na pasivna svojstva membrane. Korišćenjem



Slika 3. Zavisnost vrednosti  $\tau$  od koncentracije kurkumina

Figure 3. Dependence of  $\tau$  values on curcumin concentration



Slika 4. Zavisnost apsorbance od koncentracije kurkumina

Figure 4. Dependence of absorbance on curcumin concentration

koncentracije od 300  $\mu\text{M}$  dobijeni su rezultati koji ukazuju na znatnu razliku u odnosu na vrednosti  $\tau$  dobijene tretiranjem nerava kontrolom. Kao što je poznato, vremenska konstanta  $\tau$  jednaka je proizvodu otpora membrane i njene kapacitivnosti ( $\tau = r_m c_m$ ). Dobijeni rezultati ukazuju na porast vrednosti  $\tau$  što se može videti na slici 3. Statistički značajna razlika pri kojoj vrednost  $\tau$  raste zapaža se kod koncentracije od 300  $\mu\text{M}$ . Isti trend porasta vrednosti  $\tau$  nakon tretmana kurkuminom, primećuje se i primenom koncentracije od 100  $\mu\text{M}$  kurkumina. Iako ovaj rezultat nije statistički značajan, ne treba ga zanemariti. Porast vremenske konstante ukazuje na porast otpora ili kapacitivnosti membrane što sledi direktno primenom formule za izračunavanje vrednosti  $\tau$ . Ova pojava nas vodi do zaključka da kurkumin utiče na promenu pasivnih svojstava membrane.

Odradom rezultata DPPH testa potvrdili smo da kurkumin poseduje antioksidativna svojstva. Utvrđeno je i da se korišćenjem koncentracije od 250  $\mu\text{M}$  ista smanjuju. Rezultati o promeni vremenske konstante ukazuju da kurkumin utiče na pasivna svojstva ćelijske membrane koja linearno rastu sa porastom koncentracije kurkumina.

## Zaključak

Na osnovu rezultata zaključujemo da kurkumin poseduje antioksidativna svojstva kao i da se primenom većih koncentracija ista smanjuju. Kurkumin utiče na promenu pasivnog odgovora membrane povećanjem otpora ili kapacitivnosti. U eksperimentu sa više ponavljanja bi se verovatno dobila veća statistička značajnost, ali dobijene rezultate svakako treba uzeti u obzir. Eksperiment bi trebalo ponoviti sa većim brojem koncentracija kurkumina kako bi se još detaljnije ispitao njegov efekat. Dobijeni rezultati ukazuju na važnost daljeg ispitivanja kurkumina i njegovih lekovitih svojstava.

**Zahvalnost.** Zahvaljujem se Milanu Mišoviću, Milošu Rokiću i Ani Parabucki na sugestijama i ukazanoj pomoći. Posebnu zahvalnost dugujem Luki Mihajloviću, rukovodiocu programa, na njegovim stručnim savetima, a posebno na moralnoj podršci koja mi je u izvesnim trenucima bila preko potrebna.

## Literatura

- Anderson A., Mitchell M., Mohan R. 2000. Isolation of curcumin from turmeric. *Journal of chemical education*, **77** (3): 359.
- Barclay R., Vinqvist R., Mukai K., Goto H., Hashimoto Y., Tokunaga A., Uno H. 2000. On the antioxidant mechanism of curcumin: classical methods are needed to determine antioxidant mechanism and activity. *Org. Lett.*, **2** (18): 2841.
- Đuričić I. 1978. *Fiziološki praktikum*. Beograd: Naučna knjiga
- de Groot H., Rauen U. 2009. Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, **12** (3): 249.
- Guyton A. 2010. *Medicinska fiziologija*. Beograd-Zagreb: Medicinska knjiga

Hatcher H., Planalp R., Cho J., Torti M., Torti V. 2008. Curcumin: from ancient medicine to current clinical trials. *Cell. Mol. Life Sci.*, **65** (11): 1631.

Hsu H., Cheng L. 2007. Clinical studies with curcumin. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **595**: 471.

<http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/phytochemicals/curcumin/>

<http://www.nutritional-supplement-educational-centre.com/turmeric-benefits.html>

Konjević R., Cvijić G., Đorđević J., Nedeljković N. 2004. *Biologija za III razred gimnazije prirodno-matematičkog smera*. Beograd: Zavod za udžbenike

Kutluay B., Doroghazi J., Roemer E., Triezenberg J. 2008. Curcumin inhibits herpes simplex virus immediate-early gene expression by a mechanism independent of p300/CBP histone acetyltransferase activity. *Virology*, **373** (2): 239.

Masuda T., Maekawa T., Hidaka K., Bando H., Takeda Y., Yamaguchi H. 2001. Chemical studies on antioxidant mechanism of Curcumin: analysis of oxidative coupling products from curcumin and linoleate. *J. Agric. Food Chem.*, **49** (5): 178.

Rao B., Sudborough J., Watson H. 1925. Notes on some Indian essential oils. *J. Indian Inst. Sci. Sect. A.*, **8A** (10): 143.

Selvam R., Subramanian R., Gayathri R., Angayarkanni N. 1995. The anti-oxidant activity of turmeric (*Curcuma longa*). *J. Ethnopharmacol.*, **47** (2): 59.

Sun Y., Zhang H., Chen D., Liu C. 2002. Theoretical elucidation on the antioxidant mechanism of curcumin: a DFT study. *Org. Lett.*, **4** (17): 2909.

tating the exchange of important ions and molecules. Membrane potential is caused by different concentrations of ions on both sides of the cell membrane and different permeability of the membrane for ions. It has two basic functions. In electrically excitable cells such as neurons, it is used for transmitting signals between different parts of a cell. Transport through the membrane takes place in two major ways: as an active transport which needs energy (ATP molecules) or as a passive transport that is driven by the difference in concentration between the interior and exterior of a cell.

Curcumin is the principal curcuminoid found in turmeric (*Curcuma longa*). It incorporates several functional groups. The aromatic ring systems, which are polyphenols, are connected by two  $\alpha, \beta$ -unsaturated carbonyl groups. The two carbonyl groups form a diketone. The diketone form stable enols or are easily deprotonated and form enolates, while the  $\alpha, \beta$ -unsaturated carbonyl easily undergoes nucleophilic addition.

The purpose of this study is to analyze the antioxidant activity of curcumin and to determine its effect on passive membrane response, which would show the possibility of curcumin's antioxidant protection of membrane structures.

The antioxidative activity of curcumin is estimated upon the degree of inhibition 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) oxidation. The concentrations of curcumin were 80, 100, 120, 170 and 250  $\mu\text{M}$ . The antioxidative activity of curcumin is best shown using a concentration of 170  $\mu\text{M}$ .

Frog nerve preparation (*Rana esculenta*) is used as a model system. The concentrations of curcumin were 100 and 300  $\mu\text{M}$ . Ringer's solution was used for comparing the effect on passive membrane response with curcumin. Passive responses were recorded in a custom-made apparatus for signal detection. The interaction of curcumin with the membrane is based upon the changes in passive electrical properties of the membrane after the application of different curcumin concentrations.

We have concluded that curcumin has an effect on the cell membrane. Amplitudes of passive responses increased significantly at 300  $\mu\text{M}$ . It is shown that curcumin changes passive membrane response. It is also shown that curcumin acts like an antioxidant. Using higher concentrations of curcumin antioxidative activity decreases.



---

*Dolika Vasović*

## Antioxidant Activity of Curcumin and its Effect on Passive Membrane Response

The physical and chemical organization of the cell membrane allows its selectivity in the exchange of substances with extracellular space. This semipermeability, also termed partial permeability, of the membrane provides cellular homeostasis by maintaining the internal composition of the cell and facili-