

Optimizacija tretmana kurkuminom inkapsuliranim u kompleks želatina i arapske gume u odbrani melanoma B16 od UV-A zračenja

Kurkumin, pigment iz biljke Curcuma longa, jedan je od mnogobrojnih pigmenta koji imaju ulogu u odbrani od UV zračenja. Međutim, pokazano je da produkti nastali njegovom fotodegradacijom mogu dovesti do oštećenja ili smrti ćelija. Bioraspoloživost, fotostabilnost i termostabilnost kurkumina se mogu produžiti inkapsulacijom u fotostabilne i netoksične čestice, koje se generalno koriste u svrhe doplemanja lekova u in vivo i in vitro sistemima. Jedan od tih kompleksa jeste kompleks želatina i arapske gume. U ovom istraživanju, ćelije mišjeg melanoma B16 su izlagane UV-A zračenju u cilju utvrđivanja optimalne koncentracije ovih čestica sa inkapsuliranim kurkuminom, koja bi dovela do zaštite ćelija od UV zračenja i smanjila fotolabilnost kurkumina. Rezultati su pokazali da čestice sa najvećom koncentracijom kurkumina nisu uspele da spreče njegovu fotodegradaciju, te je pri ovom tretmanu došlo do značajnog pada vijabilnosti ćelija u odnosu na kontrolu. Nasuprot tome, tretman manjim koncentracijama inkapsuliranog kurkumina pokazao se efikasnim u inhibiciji fotodegradacije kurkumina. Prazne čestice, očekivano, ni pri većim koncentracijama nisu ispoljile citotoksično dejstvo, štaviše, moguće je da ispoljavaju citoprotektivno dejstvo, budući da je kod tretiranih ćelija došlo do blagog smanjenja ekspresije enzima katalaze, čija je ekspresija u korelaciji sa intenzitetom oksidativnog stresa, u ovom slučaju izazvanog UV zračenjem.

Uvod

Glavni tipovi UV zračenja koji znatno utiču na vijabilnost ćelija jesu UV-C (100-280 nm), UV-B (280-315 nm) i UV-A (315-400 nm) (Spacewx.com 2007). UV zračenje je izrazito štetno za epitelne ćelije, prvenstveno jer direktno oštećuje DNK, na nivou oba ili samo jednog lanca molekula DNK. Zračenje može dovesti do dvolančanih prekida, pa i do fragmentacije molekula DNK. UV-B i UV-C zračenje direktno oštećuju DNK, a UV-A zračenje dovodi do oštećenja biomakromolekula posredno – formiranjem reaktivnih vrsta kiseonika (Reactive Oxygen Species, ROS).

Vladana Sušić
(1999), Beograd,
Bulevar Arsenija
Čarnojevića 148,
učenica 3. razreda
Pete beogradske
gimnazije

MENTORI:

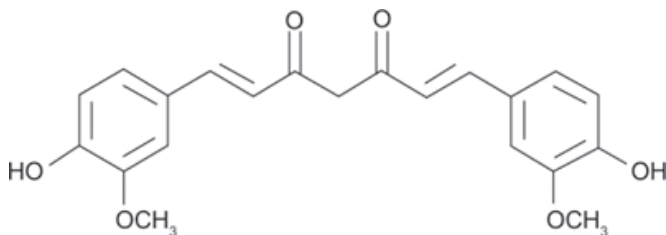
Ana Arsenijević,
master molekularne
biologije

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

Jovan Traparić,
student Biološkog
fakulteta Univerziteta
u Beogradu

To su relativno kratkoživeći produkti koji indukuju oksidativni stres u ćelijama, koji posledično dovodi i do oksidativnih oštećenja azotnih baza u molekulu DNK (Rastogi *et al.* 2010). Zbog nemogućnosti da se greške na DNK poprave usled njihovog prevelikog broja ili oštećenja reparativnih mehanizama, dolazi ili do apoptoze ili do nekontrolisane proliferacije ćelija (neoplastične transformacije) (Who.int 2006). Neki od enzima koji uklanjaju reaktivne vrste kiseonika u ćelijama su superoksid dismutaza (SOD), peroksidaze od kojih je najistaknutija glutathion peroksidaza (GPx) i, u ovom radu ispitivana, katalaza (Muller *et al.* 2007).

Da bi se ćelije zaštitile od štetnih uticaja UV zračenja, koriste se mnogobrojni materijali i supstance među kojima organska jedinjenja pretežno apsorbuju UV zračenje (Chemistry LibreTexts 2017), a neorganska ga reflektuju (Turner i Parisi 2009). Pigmenti su organska jedinjenja koja se sve više koriste kao komponente losiona i krema za sunčanje. Između ostalog, vršena su istraživanja o efikasnosti kurkumina (slika 1), pigmenta iz biljke *Curcuma longa* i jednog od liposolubilnih karotenoida, u odbrani od UV zračenja. Pokazano je da on ima antioksidativna, antiinflamatorna i antimikrobna svojstva i pomaže u zarastanju rana, te se neretko stavlja u kozmetičke preparate (Nguyen i Freidman 2013). Kurkumin je uključen u regulaciju funkcije određenih proteina u imunološkom odgovoru i generalno u ćelijskoj signalizaciji. Međutim, zbog polarnosti je prilično nedostupan za unošenje u ćelije. Pored toga, pokazano je da njegovom relativno brzom fotodegradacijom nastaju raspadni produkti koji mogu dovesti do ćelijskih oštećenja, apoptoze ili nekroze ćelije (Chopra *et al.* 2016).



Slika 1.
Strukturna formula
kurkumina

Figure 1.
Curcumin structural
formula

Kako bi se poboljšao efekat kurkumina, razvijene su formulacije u kojima će on biti inkapsuliran u biokompatibilne, biorazgradive i fotostabilne čestice. Uloga tih čestica jeste da dovedu molekul do željenog mesta i da ga tu oslobode. Oslobođanje inkapsuliranog jedinjenja iz kapsule je sporo, te se biorazpoloživost, uključujući za ovaj projekat značajnu foto- i termostabilnost, produžava. Jedan tip primenjivanih čestica za transport i dopremanje lekova do ciljanih delova tela, a i na ćelijskim kulturama, jesu čestice sačinjene od želatina i arapske gume (Qv *et al.* 2011).

U ovom radu testirane su različite koncentracije čestica od arapske gume i želatina u kojima je inkapsuliran kurkumin, sa ciljem određivanja optimalnog tretmana za ćelije.

Materijal i metode

Radi utvrđivanja efikasnosti inkapsuliranog kurkumina u odbrani ćelija od UV zračenja, sintetisane su čestice u kojima je kurkumin inkapsuliran u smešu želatina i arapske gume. Čelije su tretirane decimalnim razblaženjima rastvora čestica sa kurkuminom, a potom UV zračenjem. Ispitivana je vijabilnost ćelija nakon tretmana MTT i SRB testom, kao i relativna ekspresija proteina katalaze Western Blot metodom.

Ćelijska kultura. Eksperiment je rađen na ćelijskoj kulturi melanoma B16, gajenog u 96-well pločama (za MTT esej i SRB esej) i 6-well pločama (za Western Blot). Medijum koji je korišćen bio je DMEM medijum sa 10% fetalnog goveđeg seruma (Fetal Bovine Serum, FBS). Čelije su inkubirane na 37°C, dok je vlažnost vazduha bila 95%, a koncentracija CO₂ 5%.

Inkapsulacija kurkumina u kompleks sa želatinom i arapskom gumom. Odnos želatina (G) i arapske gume (GA) bio je 1:1. Napravljen je rastvor G/GA u vodi koncentracije 1% (u zapreminskom odnosu), a potom je dodat kurkumin u odnosu 1:1 kurkumin:G/GA. Vrednost pH podešena je na 4.4. U vodenom kupatilu je pravljen emulzija tokom 30 minuta na 45°C uz mešanje na 550 rpm. Nakon toga pH vrednost je podešena na 7.0 i dodata je mala količina glicerina, pa je sve mešano na 350 rpm tokom 30 minuta. Čestice su izbrojane na hemocitometru i izračunata je koncentracija čestica po mililitru rastvora. Isti postupak ponovljen je bez kurkumina i takođe su prebrojane čestice. Čestica sa kurkuminom bilo je $2.75 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$, a praznih $1.87 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$.

Tretmani ćelija. Od rastvora sintetisanih praznih čestica i čestica sa kurkuminom napravljena su decimalna razblaženja od 10, 100 i 1000 puta i ona su korišćena kao tretmani ćelija. Čelije su nakon tretiranja odmah izlagane UV zračenju bez prethodne inkubacije.

UV zračenje. Korišćena je UVA lampa snage 8 W i talasne dužine 366 nm. Čelije su odmah po tretmanu stavljene u inkubator obložen aluminijumskom folijom zajedno sa lampom i zračene tokom 1.5 h. Ovaj period je odabran zato što je u pilot eksperimentima rađenim sa netretiranim ćelijama tokom intervala od 1, 4, 7 i 10 sati ustanovljeno da ćelije imaju jednake izmene morfologije (videti odeljak Rezultati i diskusija). Nakon zračenja inkubirane su 12 sati, jer se u ovom intervalu dešavaju sve promene ćelijske strukture koje se dešavaju nakon zračenja (Who.int 2006) i nakon toga su podvrgavane testovima.

Određivanje vijabilnost ćelija MTT esejom. Iz 96-well ploča energično je odliven medijum i u svaki bunarić dodato je po 100 µL rastvora MTT boje (20 mg MTT reagensa u 40 mL medijuma). Čelije su u toj ploči inkubirane 3 sata na 37°C. Taj medijum sa bojom ponovo je odliven i dodato je po 100 µL rastvora za rastvaranje kristala formazana (168 µL 35% HCl u 40 mL izopropanola). Čelije su ponovo inkubirane tokom 10 minuta na sobnoj temperaturi i očitana je apsorbanca na 450 i 620 nm na ELISA Readeru, pa je pri računanju vijabilnost i standardne devijacije određivana srednja vrednost ova dva snimanja.

Određivanje vijabilnost ćelija SRB esejom. U 96-well ploče sipano je po 25 μ L rastvora trihlorosirćetne kiseline (4.5 g trihlorosirćetne kiseline u 9 mL hladne destilovane vode iz frižidera) bez odlivanja medijuma. To je inkubirano 1 sat u frižideru na 4°C. Potom su bunarići pet puta isprani PBS-om sa po 200 μ L po bunariću. Ploča je ispražnjena i u nju dodato po 50 μ L SRB boje (60 mg SRB boje u 15 mL 1% sirćetne kiseline čuvane na 4°C) po bunariću i to je inkubirano 30 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga je pet puta isprano sa po 200 μ L 1% sirćetne kiseline po bunariću. Na kraju je ploča ponovo ispražnjena i na dnu svakog bunarića su bile vidljive ljubičaste grupe ćelija. Bunarići su napunjeni sa po 100 μ L TRIS-a i nakon 5 minuta je očitana apsorbancu na 450 i 620 nm na ELISA Readeru, gde je, kao i kod MTT esreja, kasnije određivana srednja vrednost oba merenja.

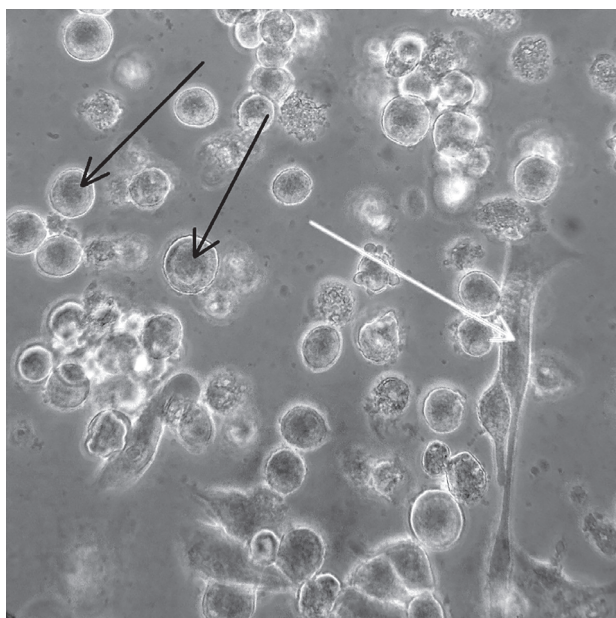
Određivanje proteinske ekspresije enzima katalaze Western Blot metodom. Ispražnjene su 6-well ploče i isprane sa po 1 mL PBS-a po bunariću, nakon čega je i on uklonjen. Sipano je po 1 mL pufera za liziranje u svaki bunarić, nakon čega su skrejperom sastrugane ćelije sa dna bunarića. Dobijena ćelijska suspenzija je stavljena u zasebne Eppendorf tube koje su potom odlagane su na led. Uzeto je po 10 μ L svakog uzorka i stavljeno u nove Eppendorf tube zajedno sa po 10 μ L pufera za uzorke (korišćen je 2x pufer: 50 μ L 0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 80 μ L glicerola, 80 μ L 10% SDS, 40 μ L 2-merkaptetanola, 20 μ L 1% bromfenol-plavog u 530 μ L destilovane vode). Te nove Eppendorf tube odnete su na kuvanje u termo šejkeru na 95°C bez obrtanja tokom 10 minuta, nakon čega su odnete na mini centrifugu. Potom su polako naneti svi uzorci (po 20 μ L) na gel i puštena je proteinska SDS elektroforeza. Proteini iz ćelija su razdvojeni, prebačeni su na PVDF membranu (idući od negativne ka pozitivnoj elektrodi stavljeni su sunder, Whatman filter papir, gel, membrana, ponovo Whatman papir i sunder, a struja je išla od negativne ka pozitivnoj elektrodi). Membrane su inkubirane sa primarnim antitelima (zečje anti-katalaza) tokom noći. Membrane su potom inkubirane sa sekundarnim antitelima (kozje anti-zečje) tokom dva sata na sobnoj temperaturi. Sistemom za detekciju pri kome luminol reaguje sa vodonik-peroksidom, proteinske trake su vizuelizovane na filmovima tačno na mestima na kojima su bile na membrani.

Statistička obrada. Za obradu podataka korišćena je analiza varijanse sa Dunnettovim naknadnim testom za utvrđivanje razlike između eksperimentalnih i kontrolne grupe.

Rezultati i diskusija

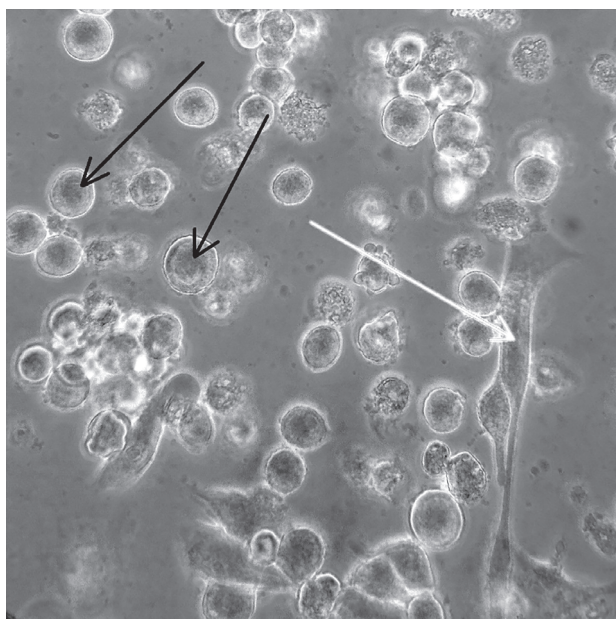
Praćenje promene morfologije ćelija pod uticajem UV-A zračenja

U pilot eksperimentima u kojima je određivano optimalno vreme zračenja koje dovodi do velikog smanjenja vijabilnosti ćelija, očekivano je da će UV-A zračenje izazvati povećani broj slobodnih radikala u ćeliji koji će oštećivati DNK. Samim tim, očekivano je da duže zračenje dovodi do geneze više slobodnih radikala, shodno tome više oštećenja molekula DNK



Slika 2. Žive ćelije, zalepljene za podlogu (bela strelica), ostale ćelije su mrtve (crna strelica). Uvećanje na mikroskopu je 20 puta.

Figure 2. Viable cells, attached to the substrate (white arrow), the rest are the non-viable cells (black arrow). The magnification on the microscope is 20-power magnification.



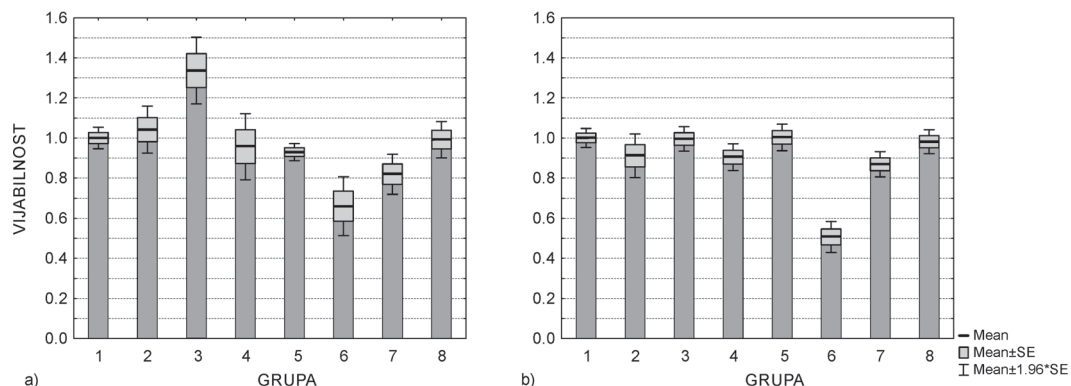
Slika 3. Ćelije sa promenjenom morfologijom usled UV-A zračenja. Usled promene morfologije one su nepravilnog oblika, neravnih membrana i poseduju specifične citoplazmatične izraštaje. Uvećanje na mikroskopu je 20 puta.

Figure 3. Cells with modified morphology caused by UV-A radiation. Because of changes in morphology, they have irregular shapes, ragged membranes and characteristic cytoplasmic extensions. The magnification on the microscope is 20-power magnification.

i apoptoze ćelija naposljetku (slika 2). Međutim, nakon zračenja u trajanju od 1, 4, 7 i 10 sati, u sva tri slučaja ćelije su bile žive, ali se nisu delile i imale su potpuno promenjenu morfologiju (slika 3). Vijabilnost tih ćelija potvrđen je vitalnim bojenjem Tripin plavom bojom, koja boji samo mrtve ćelije. Njihova sprečena ili smanjena proliferacija konstatovana je posmatranjem na svetlosnom mikroskopu, gde je pri svakom posmatranju izbrojan isti broj ćelija.

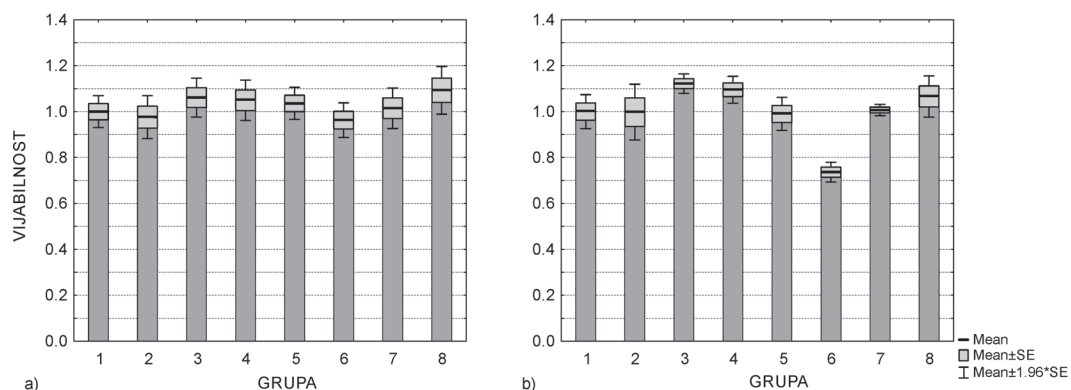
Određivanje vijabilnosti ćelija MTT esejom i SRB esejom

Pri tretmanu ćelija najvećom koncentracijom čestica sa kurkuminom pokazan je značajan pad vijabilnosti u odnosu na kontrolu (slika 4). To ukazuje na prisustvo nekog citotoksičnog agensa u datom kompleksu. S obzirom na to da iz navedenih rezultata MTT esej i SRB esej pre i posle zračenja (slike 4 i 5) prazne čestice nisu pokazale citotoksični efekat, pro-



Slika 4. Vijabilnost ćelija utvrđena MTT esejom pre zračenja (a) i nakon zračenja (b); kontrola (1), ćelije sa PBS-om (2), tretman praznim česticama, redom 10, 100 i 1000 puta razblaženje (3, 4 i 5), tretman česticama sa kurkuminom, redom 10, 100 i 1000 puta razblaženje (6, 7 i 8).

Figure 4. Cell viability before irradiation determined by MTT assay (a), and after irradiation (b); control (1), cells with PBS (2), treatment with empty particles, 10-fold, 100-fold and 1000-fold dilutions, respectively (3, 4 and 5), treatment with particles with curcumin 10-fold, 100-fold and 1000-fold dilutions, respectively (6, 7 and 8).



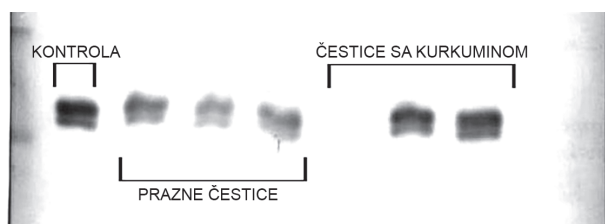
Slika 5. Vijabilnost ćelija utvrđena SRB esejom pre zračenja (a) i nakon zračenja (b); kontrola (1), ćelije sa PBS-om (2), tretman praznim česticama, redom 10, 100 i 1000 puta razblaženje (3, 4 i 5), tretman česticama sa kurkuminom, redom 10, 100 i 1000 puta razblaženje (6, 7 i 8).

Figure 5. Cell viability before irradiation determined by SRB assay (a), and after irradiation (b); control (1), cells with PBS (2), treatment with empty particles, 10-fold, 100-fold and 1000-fold dilutions, respectively (3, 4 and 5), treatment with particles with curcumin 10-fold, 100-fold and 1000-fold dilutions, respectively (6, 7 and 8).

izilazi da je glavni uzrok ćelijskih oštećenja neki od raspadnih produkata kurkumina, nastao fotodegradacijom. Čestice od arapske gume i želatina nisu uspele da spreče fotodegradaciju kurkumina pri visokim koncentracijama kurkumina, te su njegovi raspadni produkti doveli do značajnog pada vijabilnost ćelija. Interesantno, tretman manjim koncentracijama čestica sa kurkuminom nije doveo do pada vijabilnosti ćelija nakon zračenja. Ovakav rezultat ukazuje na postojanje optimalnog odnosa koncentracije kurkumina i čestica od želatina i arapske gume, pri kome se inhibira fotodegradacija kurkumina.

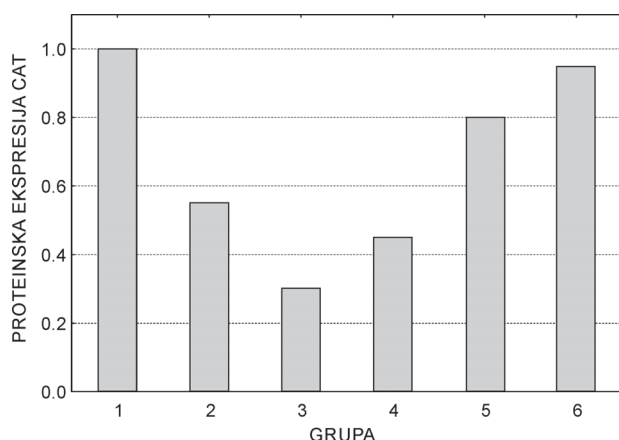
Određivanje proteinske ekspresije katalaze Western Blot metodom

Western Blot je rađen sa ciljem da se odredi relativna količina enzima koji su zaslužni za neutralisanje reaktivnih vrsta kiseonika u ćelijama. Pri formiranju traka proteina na filmu, uočeno je da ne postoji traka na mestu na kome je nanet uzorak ćelija tretiranih najvećom koncentracijom čestica sa kurkuminom (slika 6). Uočeno je blago smanjenje ekspresije katalaze kod ćelija tretiranih praznim česticama u odnosu na ćelije tretirane inkapsuliranim kurkuminom i u odnosu na kontrolu (slika 7). Smanjena ekspre-



Slika 6. Slika proteinskih traka katalaze na filmu. Sleva na desno: kontrola, tretmani praznim česticama (10, 100 i 1000 puta razblaženje) i tretmani česticama sa kurkuminom (10, 100 i 1000 puta razblaženje).

Figure 6. Image of catalase protein strips on a film. From left to right: the control, treatments with empty particles (10-fold, 100-fold and 1000-fold dilution), and treatments with curcumin particles (10-fold, 100-fold and 1000-fold dilution)



Slika 7. Relativna proteinska ekspresija katalaze, utvrđena Western Blotom; kontrola (1), tretman praznim česticama, redom 10, 100 i 1000 puta razblaženje (2, 3 i 4), tretman česticama sa kurkuminom, redom 100 i 1000 puta razblaženje (5 i 6).

Figure 7. Relative catalase expression, determined by Western Blot; control (1), treatment with empty particles, 10-fold, 100-fold and 1000-fold dilutions, respectively (2, 3 and 4), treatment with curcumin particles, 100-fold and 1000-fold dilutions, respectively (5 and 6).

sija katalaze može posredno ukazivati na smanjenu potrebu za uklanjanjem slobodnih radikala, odnosno smanjeno formiranje slobodnih radikala u ćeliji. Kako UV zračenje dovodi do geneze reaktivnih kiseoničnih vrsta, može se zaključiti da prazne čestice apsorbiraju deo UV zračenja čime smanjuju genezu slobodnih radikala i posledično dovode do smanjenja ekspresije enzima katalaze. Potencijalno, na taj način čestice od želatina i arapske gume mogu obezbediti zaštitu od UV zračenja.

Zaključak

Rezultati testova vijabilnosti pokazuju da najveća koncentracija čestica sa kurkuminom izaziva značajan pad vijabilnosti ćelija tretiranih UV zračenjem. Iz toga se može zaključiti da je povećana citotoksičnost tog tretmana potencijalno izazvana nesprečenom degradacijom kurkumina. Takođe, ukoliko se uporede uticaji različitih koncentracija čestica sa kurkuminom na smanjenje pada vijabilnosti, primećuje se da je najmanja koncentracija u odnosu na kontrolu u tome značajno efikasna, dok najveća koncentracija izaziva značajan pad vijabilnosti. Iz ovoga se može zaključiti da je tretman potencijalno efikasan, ali da ga je neophodno dalje optimizovati.

Za sintezu čestica je korišćen protokol u kome su želatin i arapska guma u optimalnom odnosu i na optimalnim temperaturama za lutein, ksantofil, koji je u njih inkapsuliran (Qv *et al.* 2011). Imajući to u vidu, trebalo bi odrediti optimalni odnos želatina i arapske gume i optimalnu temperaturu za inkapsulaciju kurkumina u čestice, jer efikasnost inkapsulacije može drastično da varira i kod jedinjenja koja imaju relativno slična fizička i hemijska svojstva. Želatin i arapska guma mogu i sa drugim supstancama da grade čestice, kao na primer sa proteinom surutke (Weinbreck *et al.* 2004). S obzirom na to da se kompatibilnost supstance koja treba da se inkapsulira sa materijalom u kapsuli ogleda prevashodno u polarnosti, trebalo bi ispitati koliko efikasno želatin i arapska guma sa drugim supstancama mogu da grade čestice. Kada se odredi sastav čestica za najefikasniju inkapsulaciju, treba varirati koncentracije tih čestica u tretmanima ćelija zbog drastičnih razlika u dobijenim rezultatima u ovom eksperimentu.

Takođe, potrebno je dalje istražiti mutacije do kojih je dovelo UV-A zračenje ove talasne dužine i jačine i zašto su se ćelije baš na taj način promenile. Istraživanje se može razviti i u smeru otkrivanja interakcija ćelija sa česticama. Sistemi za ciljano dopremanje lekova u obliku mikročestica ili nanočestica funkcionišu tako što u telu pri interakciji sa određenim ligandima koji su specifični za ćelije određenog tkiva (Lamprecht *et al.* 2001). Samim tim se zaštita od zračenja ne mora zasnivati samo na mehaničkoj, već se može modulisati ćelijski metabolizam i samim tim odgovor epidermisa na zračenje.

Zahvalnost. Zahvaljujem se mentorima Ani Arsenijević, Anđeliki Kalezić i Jovanu Trapariću za pomoć pri formiranju ideje i realizaciji ovog rada. Veliku zahvalnost uputila bih Petru Đuriću za izuzetne napore i domišljatost u toku ovog istraživanja. Takođe, hvala i rukovodiocu Ivanu Milenkoviću za pomoć i podršku. Zahvaljujem se celom kolektivu seminara biomedicine za usmeravanje na pravi put do cilja i za veliku podršku pri svakom posustajanju.

Literatura

- Chemistry LibreTexts. 2017. What Causes Molecules to Absorb UV and Visible Light. [https://chem.libretexts.org/Textbook_Maps/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_\(Physical_and_Theoretical_Chemistry\)/Spectroscopy/Electronic_Spectroscopy/Electronic_Spectroscopy_Basics/What_Causes_Molecules_to_Absorb_UV_and_Visible_Light](https://chem.libretexts.org/Textbook_Maps/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Spectroscopy/Electronic_Spectroscopy/Electronic_Spectroscopy_Basics/What_Causes_Molecules_to_Absorb_UV_and_Visible_Light).
- Chopra D., Ray L., Dwivedi A., Tiwari S. K., Singh J., Singh K. P., Kushwaha H. N., Jahan S., Pandey A., Gupta S. K., Chaturvedi R. K., Pant A. B., Ray R. S., Gupta K. C. 2016. Photoprotective efficiency of PLGA-curcumin nanoparticles versus curcumin through the involvement of ERK/AKT pathway under ambient UV-R exposure in HaCaT cell line. *Biomaterials*, **84**: 25.
- Lamprecht A., Ubrich N., Yamamoto H., Schäfer U., Takeuchi H., Maincent P., Kawashima Y., Lehr C. M. 2001. Biodegradable nanoparticles for targeted drug delivery in treatment of inflammatory bowel disease. *European Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **299** (2): 775.
- Muller F. L., Lustgarten M. S., Jang Y., Richardson A., Van Remmen H. 2007. Trends in oxidative aging theories. *Free radical biology & medicine*, **43** (4): 477.
- Nguyen T. A., Freidman A. J. 2013. Curcumin: a novel treatment for skin-related disorders. *Journal of drugs in dermatology*, **12** (10): 131.
- Qv X.-Y., Zeng Zh.-P., Jiang J.-G. 2011. Preparation of lutein microencapsulation by complex coacervation method and its physicochemical properties and stability. *Food Hydrocolloids*, **25** (6): 1596.
- Rastogi R. P., Richa, Kumar A., Tyagi M., Sinha R. 2010. Molecular Mechanisms of Ultraviolet Radiation-Induced DNA Damage and Repair. *Journal of Nucleic Acids*, **2010**: 1.
- Spacewx.com. 2007. https://www.spacewx.com/pdf/SET_21348_2004.pdf.
- Turner J., Parisi A. V. 2009. Measuring the influence of UV reflection from vertical metal surfaces on humans. *Photochemical &*

photobiological sciences: Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology, **8** (1): 62.

Weinbreck F., Tromp R. H., Kruif C. G. 2004. Composition and Structure of Whey Protein/Gum Arabic Coacervates. *Biomacromolecules*, **5** (4): 1437.

Who.int. 2006. http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/43505/9241594403_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y.

Vladana Sušić

Optimization of Treatment with Curcumin Encapsulated in Gelatin/Gum Arabic Complexes as a Defense of the B16 Melanoma from the UV-A Radiation

Curcumin, a pigment from the plant *Curcuma longa*, is one of the many pigments that play a role in the defense against UV radiation. However, it has been shown that the products resulting from its photodegradation can lead to cell damage or cell death. The bioavailability, photostability, and thermostability of curcumin can be prolonged by an encapsulation into photostable and non-toxic particles, which are generally used for a drug delivery in the in vivo and in vitro systems. One of these complexes is the complex of gelatin and gum arabic. In this study, the cells of mouse melanoma B16 were exposed to the UV-A radiation in order to determine the optimum concentration of these particles with encapsulated curcumin, which would lead to the protection of the cells from the UV radiation and reduce the photolability of curcumin. The results showed that the particles with the highest concentration of curcumin did not prevent its photodegradation, and therefore this treatment led to a significant decrease in cell viability compared to the control group. By contrast, the treatment with lower concentrations of encapsulated curcumin has been shown to be effective in inhibiting the curcumin photodegradation. Empty particles, as expected, did not exhibit a cytotoxic effect even at higher concentrations. Moreover, it is possible to exhibit cytoprotective effects, since the treated cells have mildly reduced the expression of catalase enzymes, the expression of which in principle correlates with the intensity of oxidative stress, in this case caused by UV radiation.

