

КУРКУМИН-СЪДЪРЖАЩИ ВЛАКНЕСТИ МЕМБРАНИ С КОМПЛЕКСНИ СВОЙСТВА И БИОЛОГИЧНИ АКТИВНОСТИ

Мария СПАСОВА¹, Петя ЦЕКОВА¹, Невенка МАНОЛОВА¹, Илия РАШКОВ¹,
Надя МАРКОВА², Ани ГЕОРГИЕВА³ и Ренета ТОШКОВА³

¹Лаборатория Биологично активни полимери, Институт по полимери,
Българска академия на науките, ул. Акад. Г. Бончев, бл. 103А, 1113 София, България

²Институт по микробиология, Българска академия на науките,
ул. Акад. Г. Бончев, бл. 26, 1113 София, България

³ИЕМПАМ, Българска академия на науките,
ул. Акад. Г. Бончев, бл. 25, 1113 София, България

e-mail: mspasova@polymer.bas.bg; manolova@polymer.bas.bg

РЕЗЮМЕ

Куркуминът (*Curc*) притежава противовъзпалителна, антимикробна и противотуморна активност. Неговото клинично приложение се ограничава от изключително ниската му водоразтворимост и бионаличност. Получени бяха нови влакнести материали с подобрена разтворимост на *Curc*. При това, частици от *Curc/PVP* бяха успешно електроразпръснати върху влакнести материали от целулозен ацетат (СА) получени чрез електроовлажняване. Морфологията на получените влакнести материали беше наблюдавана на сканиращ електронен микроскоп (СЕМ), като СЕМ микрографиите показаха, че върху влакната се наблюдават електроразпръснати частици от *Curc/PVP*, които са отделени една от друга и са равномерно разпределени в обема на мата. Резултатите от рентгеноструктурния анализ показват, че *Curc* е в аморфно състояние. Проведеното *in vitro* освобождаване показва, че *Curc* се освобождава в по-голяма степен от получените в настоящето изследване *Curc/PVP-on-CA* материали в сравнение с материали, в които *Curc* е включен във влакна от СА. В допълнение, материалите, съдържащи куркумин, проявяват антибактериална активност спрямо Грам-положителни бактерии *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) и противотуморна активност спрямо HeLa туморни клетки.

Ключови думи: куркумин, целулозен ацетат, поливинилпиролidon, електроовлажняване, електроразпръскване, *S. aureus*, HeLa

CURCUMIN-LOADED FIBROUS MEMBRANES WITH COMPLEX ARCHITECTURE AND BIOLOGICAL ACTIVITIES

**Mariya SPASOVA¹, Petya TSEKOVA¹, Nevena MANOLOVA¹, Iliya RASHKOV¹,
Nadya MARKOVA², Ani GEORGIEVA³ and Reneta TOSHKOVA³**

¹Laboratory of Bioactive Polymers, Institute of Polymers,
Bulgarian Academy of Sciences, Akad. G. Bonchev St, bl. 103A, BG-1113 Sofia, Bulgaria

²Institute of Microbiology, Bulgarian Academy of Sciences,
cad. G. Bonchev St, bl. 26, BG-1113 Sofia, Bulgaria

³IEMPAM, Bulgarian Academy of Sciences, Acad. G. Bonchev St, bl. 25, BG-1113 Sofia, Bulgaria
e-mail: mspasova@polymer.bas.bg; manolova@polymer.bas.bg

ABSTRACT

*Curcumin (Curc) exhibits anti-inflammatory, antibacterial and antitumor activity. However, its clinical application is limited by its poor bioavailability related to its extremely low water solubility. Novel fibrous materials allowing increased release of Curc were obtained. The materials consisted of electrospun fibers from cellulose acetate (CA) decorated with electrospayed Curc/polyvinylpyrrolidone (Curc/PVP) particles. The morphology of the obtained fibrous materials was observed by scanning electron microscopy (SEM). The SEM micrographs showed that separated and evenly distributed particles of Curc/PVP were deposited on the surface of the mats and on the inner layers of the mat. X-ray diffraction studies showed that Curc was in amorphous state. In vitro studies demonstrated that Curc release was facilitated from the Curc/PVP-on-CA mats compared with the materials in which Curc was incorporated in the CA fibers. Moreover, the curcumin-containing materials exhibited antibacterial activity against Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) and high cytotoxicity towards HeLa tumor cells.*

Keywords: *curcumin, cellulose acetate, polyvinylpyrrolidone, electrospinning, electrospaying, S. aureus, HeLa*

УВОД

Известно е, че куркуминът (Curc) притежава съвкупност от ценни свойства. Доказано е неговото антибактериално [1], антиоксидантно [2], антикоагулантно [3], противовъзпалително [4] и противотуморно действие [5]. Известно е още, че Curc-ът е много слабо водоразтворим във вода и в телесни течности, и това силно затруднява достигането на необходимите терапевтични концентрации. Към тази трудност трябва да прибавим и неговата нестабилност към светлината и лесното му термично окисление [6]. Включването на Curc в полимерни матрици се очаква да е един от успешните подходи за преодоляване на някои от посочените недостатъци. Интересни възможности в тази насока предлагат електроовлажняването и електроразпръскването. Те се наложиха като много перспективни техники за получаването на микро- и наноструктурирани материали с биологична активност [7, 8]. В електроовлажнените полимерни материали могат да се включат различни нискомолекулни биологично активни вещества като получените материали могат да намерят приложение в медицината и фармацията [9-11].

Curc образува водородни връзки с някои полимери като: поливинилпирилодон (PVP), полиетиленгликол (PEG) и целулозен ацетат (CA), като преминава от кристално в аморфно състояние [12-14]. В настоящата работа е показана възможността да се получат нови влакнести материали от целулозен ацетат (CA) и поливинилпирилодон (PVP), съдържащи куркумин. Показана е възможността за модулиране на профила на освобождаване на куркумин чрез подходящ подбор на състава на полимерната матрица и избор на метода на получаване (електроовлажняване или едновременно електроовлажняване с електроразпръскване). Оценено е и влиянието на състава и структурата на влакнестите матове върху биологичното поведение при контакт с патогенни микроорганизми и туморни клетки.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА ЧАСТ

Материали

Бяха използвани целулозен ацетат (CA, Sigma-Aldrich) с $M_n = 30\ 000\ \text{g/mol}$ и съдържание на ацетилни групи 39.8 тегл.%, поливинилпирилодон (PVP, Fluka) с $M_r = 24\ 000\ \text{g/mol}$ и куркумин (Curc, Merck).

Използваният ацетон беше ч.з.а. (Sigma-Aldrich).

Получаване на влакнести матове

Curc беше включен в електроразпръснати частици от PVP, които са отложени върху електроовлажнени влакна от CA. Разтворът на PVP е с концентрация 5 тегл.% в ацетон/вода (80/20 v/v). Съдържанието на Curc в него е 10 тегл.% спрямо теглото на полимера. Разтвор на CA с концентрация 10 тегл.% в ацетон/вода (80/20 v/v) беше подложен на електроовлажняване, а разтвор на Curc/PVP беше подложен на електроразпръскване. Този тип материали са обозначени като Curc/PVP-on-CA.

Материалите от типа Curc/PVP-on-CA са получени чрез използване на: две помпи, доставящи (i) разтвор на CA и (ii) разтвор на Curc/PVP. Помпите бяха поставени под ъгъл 180° спрямо въртящия колектор (1000 rpm). Скоростта на подаване на разтворите беше 3 mL/h. Разстоянието от върха на иглите до колектора беше 15 cm, а приложеното напрежение: 25 kV.

За сравнение бяха получени и влакнести матове само от целулозен ацетат и такива с включен Curc в тях [15].

Охарактеризиране на влакнестите материали

Морфологията на влакнестите материали беше наблюдавана чрез сканираща електронна микроскопия (SEM). Пробите ($1\ \text{cm}^2$) бяха покрити под вакуум със злато и анализирани на Jeol JSM-5510 (Jeol Ltd., Япония). Средният диаметър на влакната беше определен с помощта на софтуер Image J, посредством измерване на поне 20 произволно избрани влакна от три различни SEM микрографии, общо 60 измервания. Морфологията на влакната беше оценена с помощта на критериите за комплексна оценка на електроовлажнени матове [16]. Рентгеноструктурният анализ беше осъществен при стайна температура на рентгенов дифрактометър D8 Advance ECO Bruker AXS. Контактния ъгъл беше определен чрез апарат Easy Drop DSA20E KRÜSS GmbH (Германия). Капки от дейонизирана вода (10 μL) бяха накапани върху тестваните образци. Стойността на контактния ъгъл беше осреднена от най-малко 10 измервания за всяка проба.

Освобождаването на куркумин беше изследвано *in vitro* при 37°C в ацетатен буфер с pH 5.5, йонна сила 0.1 ($\text{CH}_3\text{COONa}/\text{CH}_3\text{COOH}$)

съдържащ PVP (ацетатен буфер/PVP = 98/2 v/v). Матовете бяха потопени в 100 mL буферен разтвор при разбъркване 150 г/min на електромагнитна бъркалка. На определени интервали от време бяха вземани аликвоти от изследвания разтвор и беше снета тяхната абсорбция при дължина на вълната 440 nm. Количеството на отделения куркумин с течение на времето беше определено с помощта на калибровъчна крива.

Антибактериалната активност на матовете спрямо Грам-положителни бактерии *S. aureus* беше оценена чрез използване метода на преброяване на преживелите клетки. Бактериалните клетки *S. aureus* (NBIMCC 749) бяха доставени от Национална банка за промишлени микроорганизми и клетъчни култури (България).

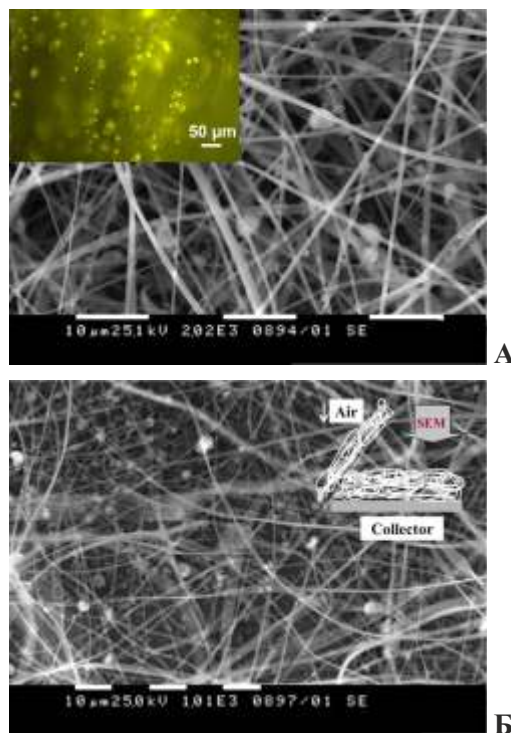
Беше осъществено оцветяване на ядрата на HeLa клетки с 4',6-диамино-2-фенилиндол (DAPI). Клетките (1×10^5 клетки/ямка) бяха култивирани в присъствие на матовете за 24 часа. След това, клетките бяха фиксирани и морфологията на ядрата беше наблюдавана на флуоресцентен микроскоп (Leica DM 5000B, Германия).

РЕЗУЛТАТИ

В настоящето изследване използвахме едновременно техниките на електроовлажняване и електроразпръскване за включване и стабилизиране на Curc в частици от PVP, които са отложени върху влакнест материал от СА.

На **Фигура 1** са представени SEM микрографии на влакнест материал от Curc/PVP-*on*-СА. Забелязва се, че върху влакната от СА са отложени частици от Curc/PVP. Това се потвърждава и от наблюдаването на материалите на флуоресцентен микроскоп, където Curc, включен в PVP частиците, флуоресцира. Образуване на Curc/PVP частици се наблюдава както по повърхността на мата, така й във вътрешността му. Това е доказателство, че използваните концентрации на Curc/PVP разтвора са подходящи и водят до образуване само на отделни частици. SEM микрографиите и снимките от флуоресцентен микроскоп показват, че една значителна част от получените частици се намират върху влакната от СА, като се забелязват и частици, които са разположени в пространството между влакната или са разположени върху по-долните етажи от влакна. Това

е доказателство, че при синхронно електроовлажняване/електроразпръскване върху всички слоеве, изграждащи мата, има влакна, които са декорирани с частици. Средният диаметър на влакната от СА е 780 ± 110 nm, а средният диаметър на частиците около 1200 ± 250 nm.



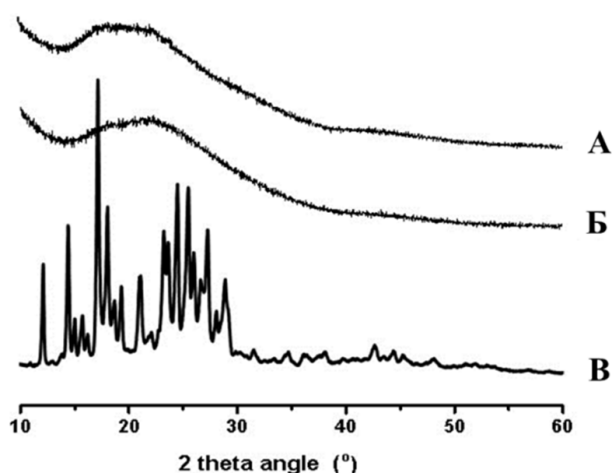
Фигура 1 SEM микрографии и снимка от флуоресцентен микроскоп (вмъкната фигура) на влакнести матове от Curc/PVP-*on*-СА:

- А.** на повърхността на мата и
- Б.** във вътрешността на мата.

Рентгеноструктурен анализ

Рентгенограми на СА мат (**Фигура 2А**), Curc/PVP-*on*-СА мат (**Фигура 2Б**) и Curc на прах (**Фигура 2В**), записани в обхват 2θ от 10 до 60° са представени на **Фигура 2**. Рентгеноструктурният анализ показва, че матовете от СА са аморфни. Този резултат е в съответствие с резултати, получени от Zhou *et al.* [17].

На **Фигура 2В** е представена рентгенограмата на Curc (прах), където ясно се забелязват основните дифракционни пикове за Curc, които се наблюдават при $2\theta = 14.5^\circ, 17.2^\circ, 18.2^\circ$ и 23.3° . При Curc/PVP-*on*-СА мата (**Фигура 2Б**) не се забелязват характеристичните пикове за Curc, което доказва че Curc, който е включен в частиците от PVP и електроразпръснат върху влакната от СА, е в аморфно състояние.



Фигура 2 Рентгенограми на: А. СА мат, Б. Curc/PVP-on-CA мат и В. Curc на прах.

Контактен ъгъл на влакнестите матове

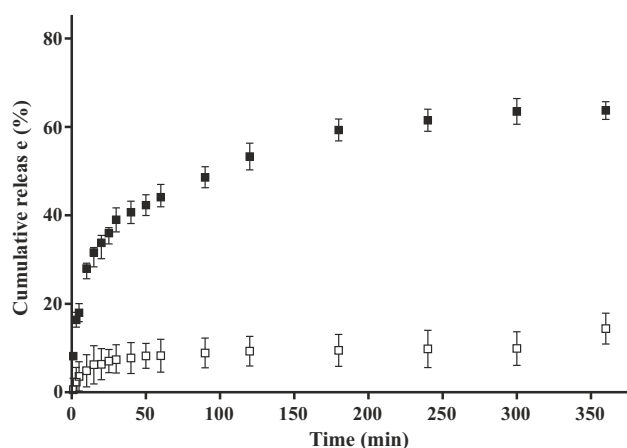
Измерени бяха контактните ъгли на омокряне спрямо вода на влакнестите матове от СА, Curc-in-CA, и Curc/PVP-on-CA. Установено беше, че стойността на контактния ъгъл зависи от състава на получените матове. Голяма стойност на контактния ъгъл беше измерена за матовете от СА, които са хидрофобни със стойност на ъгъла - $123^{\circ} \pm 2^{\circ}$. Най-голяма стойност на контактния ъгъл от $129.4 \pm 3.8^{\circ}$ беше измерена при матовете Curc-in-CA, което се дължи на включване на хидрофобното биологично активно вещество Curc. Установено беше, че матовете, получени чрез електроовлажняване на СА и електроразпръскване на Curc/PVP имат най-малка стойност на контактния ъгъл: $81^{\circ} \pm 2.5^{\circ}$. Забелязва се, че добавянето на водоразтворимия полимер - PVP в мата води до хидрофилизиране на мата и до намаляване на неговия контактен ъгъл.

In vitro освобождаване на куркумин

В литературата има данни за използването на PVP като стабилизиращ агент за слабо разтворими лекарствени вещества като той подпомага тяхното разтваряне [18].

Освобождаването на Curc от Curc-in-CA и Curc/PVP-on-CA влакнести матове беше проследено спектрофотометрично в ацетатен буфер/PVP (98/2 v/v) и е представено на **Фигура 3**. Както се вижда от фигурата, Curc се отделя най-бавно и в най-малка степен от Curc-in-CA мата. До 360 мин. отделеното количество

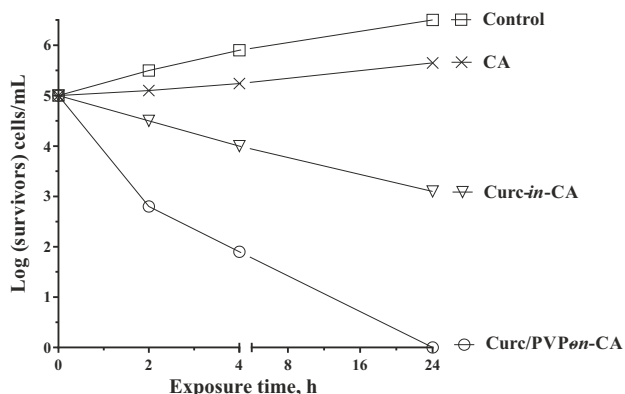
Curc от хидрофобния Curc-in-CA мат е 14%. Curc се отделя много по-бързо и в по-голяма степен до около 64%, когато е включен в частици от PVP, които са разположени по повърхността на влакната от СА.



Фигура 3 Освобождаване на Curc от Curc-in-CA (□) и Curc/PVP-on-CA (■) Резултатите са представени като средни стойности от три отделни измервания със съответните стандартни отклонения; ацетатен буфер/PVP (98/2 v/v), pH 5.5, 37°C, йонна сила 0.1.

Микробиологични изследвания

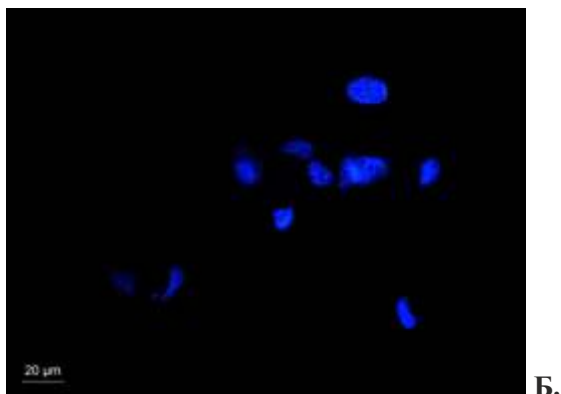
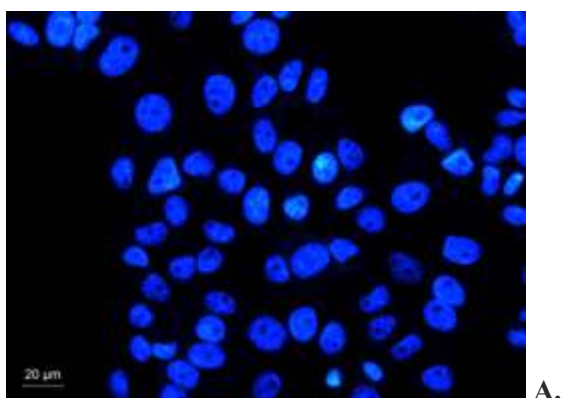
Беше изследвана антибактериалната активност на влакнести материали от СА, Curc-in-CA и Curc/PVP-on-CA матове спрямо патогенния микроорганизъм *S. aureus*. Броят на преживелите бактериални клетки беше определен чрез посяване и преброяване върху твърда среда. На **Фигура 4** е представен броят на преживелите клетки *S. aureus* като функция от времето. За сравнение също така е представено и развитието на контрола от бактериални клетки *S. aureus*. Установено е, че контролите се развиват нормално за времето на експеримента. Също така се забелязва, че мат от СА, която не съдържа биологично активната субстанция, не потиска развитието на бактериалните клетки и след 24-часов контакт броя на клетките е над 6 логаритъма. Както се вижда от фигурата, има намаляване на броя на клетките след 2-часов контакт на матовете, съдържащи куркумин, с бактериалната суспензия. Нещо повече, мат Curc/PVP-on-CA, който е бил в контакт с бактериални клетки *S. aureus* след 24 часа е убил всички бактерии.



Фигура 4 Логаритъм от броя на живите бактериални клетки *S. aureus* като функция от времето (в часове).

Оцветяване с DAPI

Беше осъществено оцветяване на ядрата на HeLa туморни клетки *in vitro*. На **Фигура 5** са представени снимки от флуоресцентен микроскоп. При клетките, контактували с мат от СА, се забелязва, че ядрата са интактни, овални и с равномерно разпределен хроматин (**Фигура 5А**).



Фигура 5 Флуоресцентни снимки на HeLa клетки, които са били в контакт с матове: А. СА и Б. Curc/PVP-on-СА.

При клетките, които са контактували с матове, съдържащи Curc, се забелязват промени в ядрата: нехомогенно разпределение на хроматин, фрагментиране на ядрата и образуване на апоптотични тела (**Фигура 5Б**). Установихме, че най-висока цитотоксичност спрямо HeLa ракови клетки се наблюдава при мата от Curc/PVP-on-СА (**Фигура 5Б**).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получени са успешно електроовлакнени материали от СА, които са декорирани с частици от Curc/PVP. При това, частиците бяха електро-разпръснати върху влакната с цел модулиране на омекването на влакната и подпомагане разтварянето и освобождаването на Curc от получените материали. Установихме, че използването на PVP води до хидрофилизиране на матовете и по-бързо освобождаване на фенолното съединение от тях. В допълнение, матовете, съдържащи Curc, проявяват анти-бактериална активност срещу *S. aureus* и противотуморна активност спрямо HeLa ракови клетки.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторите благодарят за финансовата подкрепа на Фонд научни изследвания (Договор: T02/1-2014).

ЛИТЕРАТУРА

- [1] H. Wang, L. Hao, P. Wang, M. Chen, S. Jiang, S. Jiang, Release kinetics and antibacterial activity of curcumin loaded zein fibers, *Food Hydrocolloid.*, 2017, 63, 437-446.
- [2] T. Ak, I. Gulcin, Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin, *Chem. Biol. Interact.*, 2008, 174, 27-37.
- [3] G. Yakub, A. Toncheva, N. Manolova, I. Rashkov, D. Danchev, V. Kussovski, Electrospun polylactide-based materials for curcumin release: Photostability, antimicrobial activity, and anticoagulant effect, *J. Appl. Polym. Sci.*, 2015, 133, 42940, 1-11.
- [4] M. C. Fadus, C. Lau, J. Bikhchandani, H. T. Lynch, Curcumin: An age-old anti-inflammatory and anti-neoplastic agent, *J. Tradit. Complement. Med.*, 2016, 7, 339-346.
- [5] M. Sathuvan, R. Thangam, M. Gajendiran, R. Vivek, S. Balasubramanian, S. Nagaraj, P. Gunasekaran, B. Madhan, R. Rengasamy, κ-Carrageenan: An effective drug carrier to

- deliver curcumin in cancer cells and to induce apoptosis, *Carbohydr. Polym.*, 2017, 160, 184-193.
- [6] P. Anand, A. B. Kunnumakkara, R. A. Newman, B. B. Aggarwal, Bioavailability of curcumin: problems and promises, *Mol. Pharmaceutics*, 2007, 4, 807-818.
- [7] A. Khalf, S. V. Madhally, Review article Recent advances in multi-axial electrospinning for drug delivery, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2017, 112, 1-17.
- [8] N. Bock, M. A. Woodruff, D. W. Huttmacher, T. R. Dargaville, Electrospinning, a reproducible method for production of polymeric microspheres for biomedical applications, *Polymers*, 2011, 3, 131-149.
- [9] M. Ranjbar-Mohammadi, S. Rabbani, S. Hajir Bahrami, M. T. Joghataei, F. Moayer, Antibacterial performance and in vivo diabetic wound healing of curcumin loaded gum tragacanth/poly(ϵ -caprolactone) electrospun nanofibers, *Mat. Sci. Eng. C*, 2016, 69, 1183-1191.
- [10] S. Chou, D. Carson, K. A. Woodrow, Current strategies for sustaining drug release from electrospun nanofibers, *J. Control. Release*, 2015, 220, 584-591.
- [11] R. Sedghi, A. Shaabani, Z. Mohammadi, F. Yazdi Samadi, E. Isaei, Biocompatible electrospinning chitosan nanofibers: A novel delivery system with superior local cancer therapy, *Carbohydr. Polym.*, 2017, 159, 1-10.
- [12] G. Yakub, A. Toncheva, N. Manolova, I. Rashkov, V. Kussovski, D. Danchev, Curcumin-loaded poly(L-lactide-co-D,L-lactide) electrospun fibers: Preparation and antioxidant, anticoagulant, and antibacterial properties, *J. Bioact. Compat. Pol.*, 2014, 29, 607-627.
- [13] A. Paradkar, A. A. Ambike, B. K. Jadhav, K. R. Mahadik, Characterization of curcumin-PVP solid dispersion obtained by spray drying, *Int. J. Pharm.*, 2004, 271, 281-286.
- [14] S. Wan, Y. Sun, X. Qi, F. Tan, Improved bioavailability of poorly water-soluble drug curcumin in cellulose acetate solid dispersion, *AAPS PharmSciTech.*, 2012, 13, 159-166.
- [15] P. Tsekova, M. Spasova, N. Manolova, N. Markova, I. Rashkov, Electrospun curcumin-loaded cellulose acetate/polyvinylpyrrolidone fibrous materials with complex architecture and antibacterial activity, *Mat. Sci. Eng. C: Mat. Biol. Appl.*, 2017, 73, 206-214.
- [16] M. Spasova, R. Mincheva, D. Paneva, N. Manolova, I. Rashkov, Perspectives on: Criteria for complex evaluation of the morphology and alignment of electrospun polymer nanofibers, *J. Bioact. Compat. Polym.*, 2006, 21, 465-479.
- [17] W. Zhou, J. He, S. Cui, W. Gao, Studies of electrospun cellulose acetate nanofibrous membranes, *The Open Materials Science Journal*, 2011, 5, 51-55.
- [18] K. Gowthamarajan, S. Singh, Dissolution testing for poorly soluble drugs: a continuing perspective, *Dissolut. Technol.*, 2010, 17, 24-32.