

ВЛАКНЕСТИ МАТЕРИАЛИ ОТ ЦЕЛУЛОЗЕН АЦЕТАТ С ВКЛЮЧЕН КУРКУМИН "В" ИЛИ "ВЪРХУ" ВЛАКНАТА: ПОЛУЧАВАНЕ, АНТИБАКТЕРИАЛНА И ПРОТИВОТУМОРНА АКТИВНОСТ

**Мария Спасова¹, Петя Цекова¹, Невенка Манолова¹, Илия Рашков¹,
Надя Маркова², Ани Георгиева³ и Ренета Тошкова³**

¹Лаборатория Биологияно 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

Успешно бяха получени влакнести материали от целулозен ацетат (СА) и поливинилпиролон (PVP), съдържащи биологично активното вещество куркумин с оригинален дизайн чрез електроовлажняване и едновременно електроовлажняване и електроразпръскване. Новите материали бяха охарактеризирани чрез сканираща електронна микроскопия (СЕМ), инфрачервена спектроскопия с Фурие трансформация (ИЧ), ултравиолетова спектроскопия (УВ), определяне на статичния контактен ъгъл на омокряне спрямо вода, микробиологични изследвания и тестове за цитотоксичност. Включването на поливинилпиролон в състава на влакнестия материал води до нарастване на хидрофилността на влакната и до по-бързото освобождаване на куркумина от влакната. Установено беше, че влакнестите матове съдържащи биологично активното вещество притежават антибактериална и противотуморна активност.

Ключови думи: куркумин, електроовлажняване, електроразпръскване, поливинилпиролон, целулозен ацетат, антибактериална и противотуморна активност

CELLULOSE ACETATE FIBROUS MATERIALS LOADED WITH CURCUMIN "/>IN" OR "ON": PREPARATION, ANTIBACTERIAL AND ANTITUMOR 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, Acad. G. Bonchev St, bl. 103A, BG-1113 Sofia, Bulgaria

²Institute of Microbiology, Bulgarian Academy of Sciences, Acad. 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

Fibrous materials from cellulose acetate (CA) and polyvinylpyrrolidone (PVP) containing curcumin with original design were prepared by one-pot electrospinning or electrospinning in conjunction with electrospraying. The new materials were characterized by scanning electron microscopy (SEM), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), ultraviolet-visible spectroscopy (UV-Vis), water contact angle measurements, microbiological tests and cytotoxicity experiments. The incorporation of polyvinylpyrrolidone resulted in increased hydrophilicity of the fibers and in faster curcumin release. The curcumin-containing mats exhibited antibacterial and antitumor activity.

Keywords: *curcumin, electrospinning, electrospraying, polyvinylpyrrolidone, cellulose acetate, antibacterial and antitumor activity*

УВОД

Куркуминът е биологично активно вещество открито в корените на растението *Curcuma longa*. Това природно полифенолно съединение притежава забележително антибактериално, антивирусно, антимикотично, антиоксидантно, противотуморно и антикоагулантно действие [1-4]. Слабата водоразтворимост на куркумина, неговата термична и химична нестабилност и фоточувствителност, заедно с неговото бързо елиминиране от човешкото тяло ограничават неговите приложения. Перспективен подход да се избегнат тези недостатъци куркумина се включва в полимерни матрици.

Напоследък, (нано) влакнести материали, получени чрез електроовлажняване, показват голям потенциал като ново поколение материали за лечение на рани [7-9]. Голямата специфична повърхност на електроовлажнените материали и възможността за постепенно освобождаване на активните съставки водят до намаляване на нежеланите странични ефекти и подобряване на терапевтичния ефект на използваните съединения. Показано е, че електроовлажнените влакнести материали са подходящи носители на биологично активното вещество - куркумин. До момента, куркумин е успешно включен в електроовлажнен материал от целулозен ацетат [8,9], поли(L-лактид-co-D,L-лактид) [10], и др.

В настоящата работа е показана възможността да се получат нови влакнести материали от целулозен ацетат (СА) и поливинилпиролон (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 електропръскване). Оценено е й 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 (СА, Aldrich) с $nM = 30\,000\text{ g/mol}$ и съдържание на ацетилни групи 39.8 тегл.%, поливинилпиролон (PVP, Fluka) с $M_r = 360\,000\text{ g/mol}$ и куркумин (Curc, Merck). Използваният ацетон беше ч.з.а. (Sigma-Aldrich).

Получаване на влакнести матове тип "in" чрез електроовлажняване

Чрез електроовлажняване бяха получени влакнестите матове: СА, Curc-in-СА и Curc-in-СА/PVP. За приготвянето им бяха използвани следните полимерни разтвори: СА (10 тегл.%) в ацетон/вода 80/20 v/v; PVP (10 тегл.%) в ацетон/вода 50/50 v/v; СА/Curc (СА 10 тегл.% и Curc 10 тегл.% спрямо теглото на полимера) в ацетон/вода 80/20 v/v и СА/PVP/Curc (СА 10 тегл.%, PVP 10 тегл.% и Curc 10 тегл.% спрямо теглото на полимерите) в ацетон/вода 70/30 v/v.

Предилните разтвори бяха поставени в спринцовка с метална игла (размер: 20GX1½"), която беше свързана към положително зареден електрод на генератор за високо напрежение (до 30 kV). Електроовлажняването беше проведено при постоянна стойност на приложеното напрежение от 25 kV и разстояние 15 cm от върха на иглата до заземен въртящ се алуминиев колектор (1000 rpm). Постоянната скорост на подаване на предилните разтвори 3 mL/h беше осигурена от помпа Syringe Pump NE-300 (New Era Pump Systems, Inc.).

Получаване на влакнести матове тип "on" чрез едновременно електроовлажняване и електропръскване

Curc беше включен в електропръскнати частици от PVP, които са отложени върху електроовлажнени влакна от СА. Този тип материали

са обозначени като Curc/PVP-on-СА и бяха получени чрез едновременно електроовлажняване и електроразпръскване. Разтвор на СА с концентрация 10 тегл.% в ацетон/вода (80/20 v/v) беше подложен на електроовлажняване, а разтвор на Curc/PVP беше подложен на електроразпръскване.

Материалите от типа Curc/PVP-on-СА са получени чрез използване на: две помпи доставящи (i) разтвор на СА 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.

Охарактеризиране на влакнестите материали

Морфологията на влакнестите материали беше наблюдавана чрез сканираща електронна микроскопия (SEM). Пробите (1 cm²) 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 [11], 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 [12]. Инфрочервените спектри на матовете (1 cm²) бяха снети на IRAffinity-1 спетрофотометър (Shimadzu Co., Япония), снабден с приставка MIRacle ATR (диамантен кристал; дълбочина на проникване на лъча около 2 μm) (PIKE Technologies, САЩ) в диапазона 600-4000 cm⁻¹ при резолюция of 4 cm⁻¹. Всички спектри са коригирани спрямо H₂O and CO₂ използвайки софтуер IRsolution. Контактните ъгли на омокряне на влакнестите материали бяха определени на апарат Easy Drop DSA20E KRÜSS GmbH (Германия). Капки от дейонизирана вода (10 μL) бяха накапани върху тестовите 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 (CH₃COONa/CH₃COOH) съдържащ PVP (ацетатен буфер/PVP = 98/2 v/v). Матовете бяха потопени в 100 mL буферен разтвор при разбъркване 150 r/min на електро-

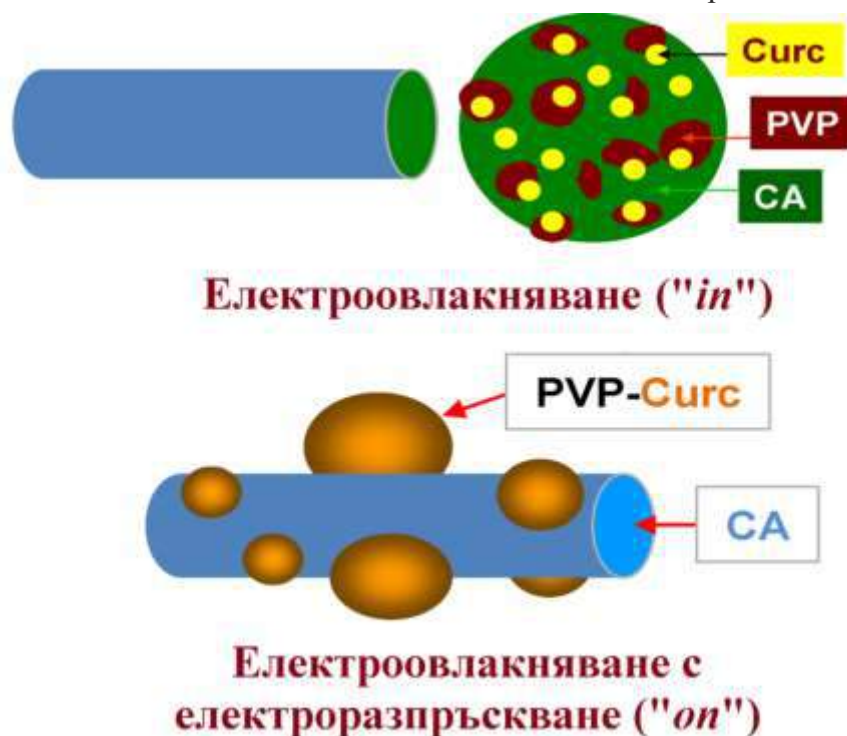
магнитна бъркалка. На определени интервали от време бяха вземани аликвоти от изследвания разтвор и беше снета тяхната абсорбция при дължина на вълната 440 nm. Количеството на отделения куркумин с течение на времето беше определено с помощта на калибровъчна крива.

Оценка на взаимодействието между *Escherichia coli* 3588 и матовете беше определена чрез директно наблюдение на сканиращ електронен микроскоп Jeol JSM-5510 (Jeol Ltd., Япония) на адхезираните *E. coli* клетки по повърхността на матовете, които са били в контакт с клетъчната култура (10^5 клетки/мл). Матовете бяха фиксирани, промити и лиофилизирани. След това бяха покрити със злато и наблюдавани на СЕМ.

Беше осъществено оцветяване на ядрата на HeLa клетки с 4',6-диамино-2-фенилиндол (DAPI). Клетките (1×10^5 клетки/гнездо) 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 настоящото изследване бяха получени следните влакнести материали: CA, Curc-*in*-CA, Curc-*in*-CA/PVP и Curc/PVP-*on*-CA. Материалите тип "in" са получени чрез електроовлажняване, а тип "on" чрез едновременно електроовлажняване с електроразпръскване и са схематично представени на **Фигура 1**.



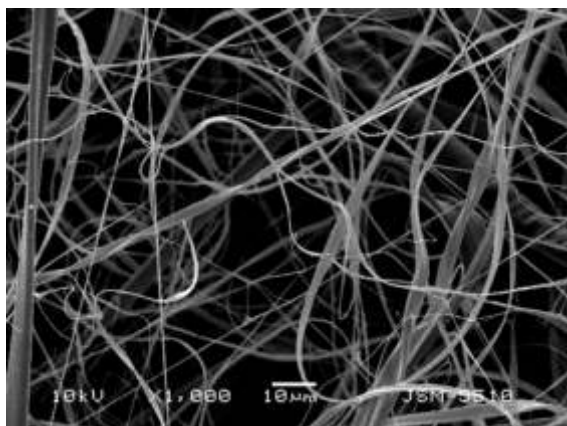
Фигура 1 Схематично представяне на влакна тип "in" получени чрез електроовлажняване и "on" чрез едновременно електроовлажняване и електроразпръскване.

На **Фигура 2** са представени СЕМ микрографии на получените CA, Curc-*in*-CA, Curc-*in*-CA/PVP и Curc/PVP-*on*-CA влакнести материали. Електроовлажняването на разтвор на CA (концентрация на полимера 10 тегл.%) при избраните условия води до получаването на влакна със среден диаметър - 780 ± 110 nm (Фигура 2А). Средните диаметри на влакна от Curc-*in*-CA и Curc-*in*-CA/PVP са съответно 1150 ± 260 nm и 1560 ± 145 nm (Фигура 2Б и 2В). На

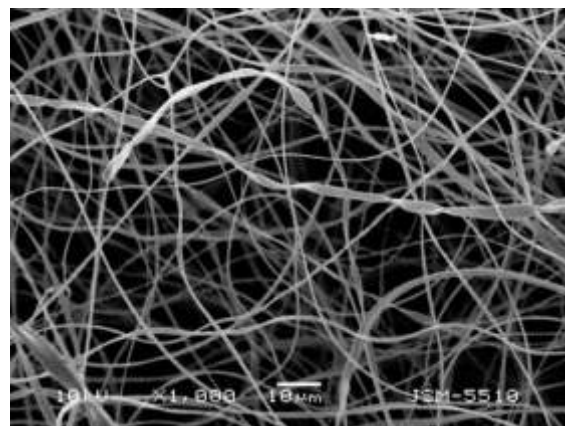
Фигура 2 Г е представена СЕМ микрография на Curc/PVP-*on*-CA мат. Забелязва се, че при този тип матове върху влакната от CA са отложени частици от Curc/PVP. Образоването на Curc/PVP частици се наблюдава както по повърхността на мата, така и във вътрешността му. Това е доказателство, че използваната концентрация на Curc/PVP разтвора е подходяща и води до образуване само на отделни частици. Средният размер на частиците на Curc/PVP-*on*-

СА материала е съответно 1400 ± 300 nm (Фигура 2Г). Микрочастиците, получени посредством електроразпръскване, притежават голям потенциал за приложения като доставя-

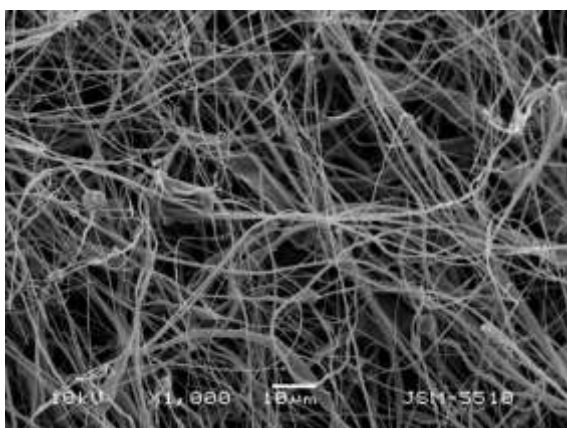
нето на лекарствени вещества, включването на биомолекули, получаване на антибактериални покрития, и др.



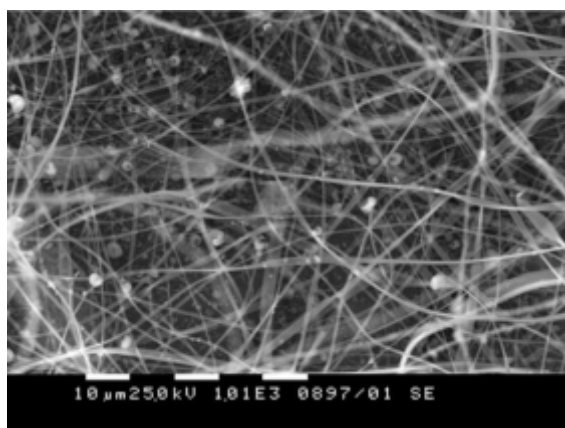
А.



Б.



В.



Г.

Фигура 2 СЕМ микрографии на влакнести материали от:
А. СА; Б. Curc-in-CA; В. Curc-in-CA/PVP и Г. Curc/PVP-on-CA.

ИЧ-спектри на влакнестите материали

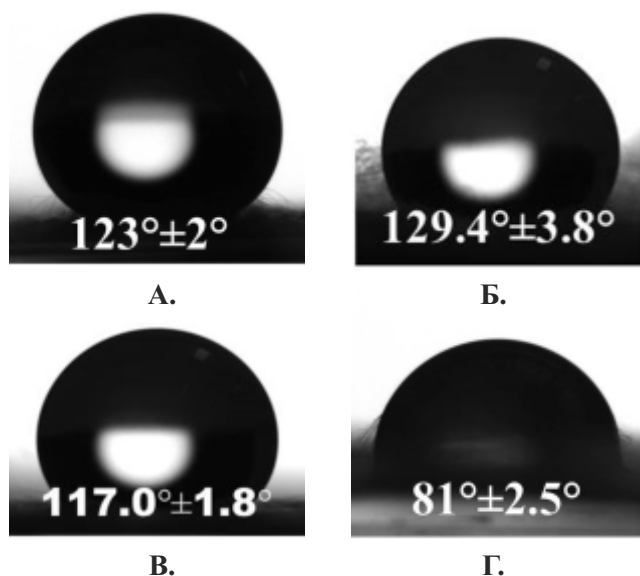
Бяха снети ИЧ-спектрите на всички получени матове и на куркумин (прах). В спектъра на куркумина се забелязва абсорбционна ивица при 3510 cm^{-1} , дължаща се на фенолните О-Н валентни трептения. Наблюдават се характеристични ивици при 1625 cm^{-1} (от бензеновия пръстен), 1506 cm^{-1} (C=O и C=C трептения) и 1427 cm^{-1} (C-H деформационни трептения). Характеристични ивици за C-O връзките, участващи в изграждането на енолната връзка в структурата на Curc, се забелязват при 1274 cm^{-1} . Ивиците при 808 cm^{-1} и 962 cm^{-1} се приписват на деформационни трептения за C-H връзките ($\text{RCH}=\text{CH}_2$). В ИЧ-спектрите на Curc-in-

СА/PVP и Curc/PVP-on-CA матове се наблюдават характеристични ивици за C=O функционални групи при 1740 cm^{-1} , за CH_2 групи при 1369 и 1226 cm^{-1} , както и за етерните C-O-C функционални групи при 1037 cm^{-1} , характерни за СА [13]. Забелязаните характеристични ивици в спектъра при 1653 cm^{-1} , 1286 cm^{-1} и 1423 cm^{-1} съответстващи на C=O, C-N и CH деформационни трептения се дължат на присъствието на PVP във влакнения мат. Наблюдава се присъствието на ивица с широка площ между $3050\text{--}3620\text{ cm}^{-1}$ с максимум при 3414 cm^{-1} , характеристична за валентни N-H трептения на PVP. В спектрите на влакнестите Curc-in-CA/PVP и Curc/PVP-on-CA матове се забелязват също така

характеристични ивици, показващи присъствието на куркумин.

Контактен ъгъл на влакнестите матове

Измерени бяха контактните ъгли на омокряне спрямо вода на влакнестите матове от СА, Curc-in-CA, Curc-in-CA/PVP и Curc/PVP-on-CA. На **Фигура 3** са представени дигитални снимки на капките, накапани върху повърхността на матовете при измерване на стойността на контактния ъгъл. Установено беше, че стойността на контактния ъгъл зависи от състава на получените матове. Голяма стойност на контактния ъгъл беше измерена за мата, изграден от СА. Матът е хидрофобен със стойност на ъгъла - $123^{\circ} \pm 2^{\circ}$ (**Фигура 3А**). Най-голяма стойност на ъгъла от $129.4^{\circ} \pm 3.8^{\circ}$ беше измерена при мата Curc-in-CA (**Фигура 3Б**), което се дължи на включване на хидрофобното биологично активно вещество Curc в мата от СА. Включването на водоразтворимия полимер - PVP води до намаляване на стойностите на контактните ъгли и за Curc-in-CA/PVP и Curc/PVP-on-CA матове те са съответно $117^{\circ} \pm 1.8^{\circ}$ и $81^{\circ} \pm 2.5^{\circ}$.



Фигура 3 Дигитални снимки на водна капка върху повърхност на мат от:
А. СА, Б. Curc-in-CA, В. Curc-in-CA/PVP и Г. Curc/PVP-on-CA

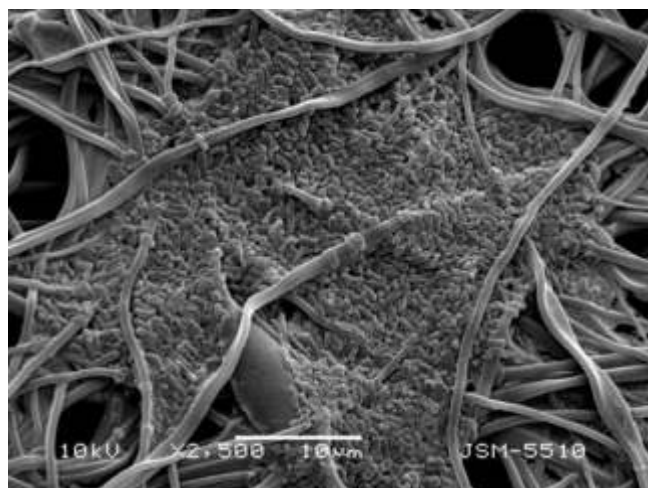
In vitro освобождаване на куркумин

Съставът на полимерната матрица играе съществена роля върху профила на освобожда-

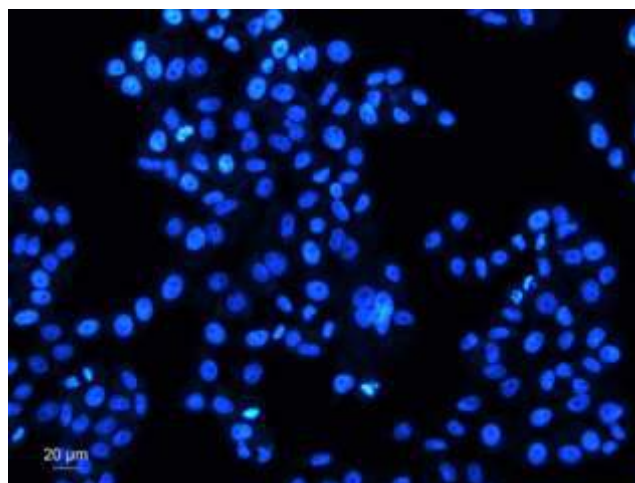
ването на куркумина от влакнестите материали. Освобождаването беше проследено спектрофотометрично за 24 часа в ацетатен буфер/поливинилпиролidon (98/2 v/v). Беше установено, че Curc се освобождава най-бавно и в най-малки количества (са. 10% за 300 мин.) от хидрофобния мат Curc-in-CA. Куркуминът се освобождава по-бързо, когато във влакнестия мат се включи водоразтворимия полимер PVP. Количеството на освободената биологично активна субстанция от влакната на Curc-in-CA/PVP беше около 22% в рамките на 300 минути. Curc се отделя много по-бързо и в по-голяма степен, когато е включен в частици от PVP, които са разположени по повърхността на влакната от СА. Отделеното количество Curc от Curc/PVP-on-CA е съответно 64%. Този резултат е в съответствие с резултатите от определяне на контактния ъгъл, където при Curc/PVP-on-CA мата е отчетена най-ниска стойност на ъгъла от около 81° . Получените резултати показват, че Curc/PVP-on-CA матовете могат да се използват за създаването на системи за отделяне на слабо водоразтворими съединения като например Curc.

Микробиологични изследвания

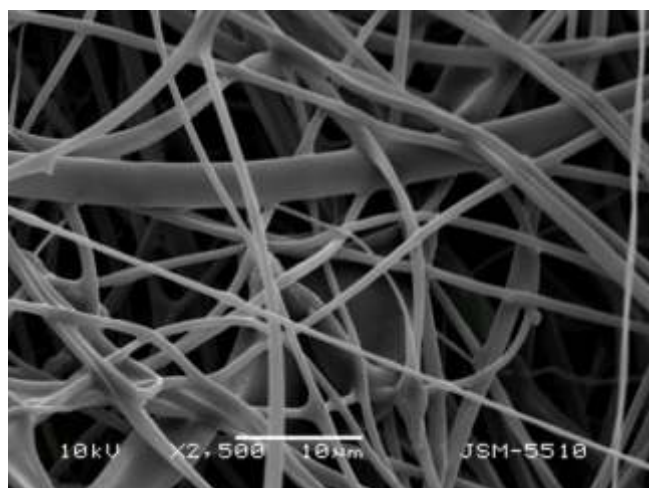
С цел да се проследи прикрепянето и развитието на бактериални клетки *E. coli* към повърхността на матовете, матовете бяха поставени в бактериална суспензия за 4 часа. След това, матовете бяха фиксирани, лиофилизирани и наблюдавани на сканиращ електронен микроскоп (SEM). SEM микрографии на матове, контактували с бактериалната суспензия са представени на **Фигура 4**. Беше установено, че клетките *E. coli* се прикрепват към мата от СА, който не съдържа биологично активното вещество. Клетъчната морфология е непроменена (**Фиг. 4А**). Това показва, че влакнестият мат от СА не повлиява растежа и развитието на патогенните микроорганизми. Обратно, при матовете, съдържащи куркумин, не се забелязват адхезирали бактерии върху повърхността на влакната (**Фиг. 4Б**). Това най-вероятно се дължи на антибактериалните свойства на включения във матовете - куркумин. Този резултат показва, че включването на куркумин в матовете води до получаване на материали с антибактериални свойства.



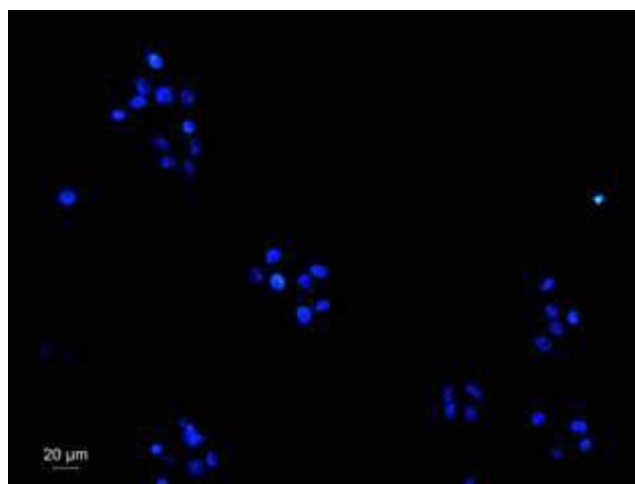
А.



А.



Б.



Б.

Фигура 4 СЕМ микрографии на влакнести материали, контактували 24 часа с *E. coli* от:
А. СА; Б. Curc/PVP-*on*-СА

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

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

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получени бяха влакнести материали от целулозен ацетат и/или поливинилпиролон, съдържащи биологично активното вещество куркумин чрез електроовлажняване и едновременно електроовлажняване с електроразпръскване. Установено беше, че съставът на полимерната матрица и методът на получаване на матовете оказват влияние върху вида на влакнения мат и профила на освобождаване на куркумина. Включването на водоразтворим полимер води до хидрофилизиране на мата и по-бързо освобождаване на куркумина. Добавянето на куркумин към влакнестите материали от СА и СА/PVP им придава антибактериални свойства спрямо *E. coli* и противотуморна

активност спрямо HeLa ракови клетки. Резултатите показваха, че получените нови антибактериални материали, съдържащи куркумин могат да намерят потенциални биомедицински приложения.

БЛАГОДАРНОСТИ

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

ЛИТЕРАТУРА

- [1] S. Moghadamtousi, H. Kadir, P. Hassandarvish, H. Tajik, S. Abubakar, K. Zandi, A Review on antibacterial, antiviral, and antifungal activity of curcumin, *BioMed Research International*, 2014, Article ID 186864, 1-12.
- [2] T. Ak, I. Gulcin, Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin, *Chem.Biol. Interact.*, 174 (2008) 27-37.
- [3] P.Basnet, N. Skalko-Basnet, *Review: Curcumin: An anti-Inflammatory molecule from a curry spice on the path to cancer treatment*, *Molecules*, 16 (2011) 4567-4598.
- [4] 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.*, 133 (2016) 42940.
- [5] A. Toncheva, M. Spasova, D. Paneva, N. Manolova, I. Rashkov, Polylactide (PLA)-based electrospun fibrous materials containing ionic drugs as wound dressing materials: A review, *Int. J. Polym. Mat. Polym. Biomat.*, 63 (2014) 657-671.
- [6] M. Ignatova, I. Rashkov, N. Manolova, Drug-loaded electrospun materials in wound-dressing applications and in local cancer treatment, *Expert Opin. Drug Deliv.*, 10 (2013), 469-483.
- [7] M. Spasova, D. Paneva, N. Manolova, P. Radenkov, I. Rashkov, Electrospun chitosan-coated fibers of poly(L-lactide) and poly(L-lactide)/poly(ethylene glycol): Preparation and characterization, *Macromol. Biosci.*, 8 (2008) 153-162.
- [8] O. Suwantong, P. Opanasopit, U. Ruktanonchai, P. Supaphol, Electrospun cellulose acetate fiber mats containing curcumin and release characteristic of the herbal substance, *Polymer*, 48 (2007) 7546-7557.
- [9] 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.*, 73: 206-214 (2017)
- [10] 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. Polym.*, 29 (2014) 607-627.
- [11] W. S. Rasband, ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2016.
- [12] 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.*, 21 (2006) 465-479.
- [13] S. Wan, Y. Sun, X. Qi, F. Tan, Improved Bioavailability of Poorly Water-Soluble Drug Curcumin in Cellulose Acetate Solid Dispersion, *AAPS PharmSciTech*, 13 (2012) 159-166.