

ГЕПАРИНІЗАЦІЯ ЦЕЛЮЛОЗНИХ МЕМБРАН ІЗ ПРИЩЕПЛЕНИМ ПОЛІЕТИЛЕНІМІНОМ ДЛЯ ГЕМОДІАЛІЗУ ТА ДОСЛІДЖЕННЯ ЇХ ТРАНСПОРТНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ

З метою покращення гемосумісності целюлозних мембран опрацьована методика їх гепаринізації, що базується на попередньому їх модифікуванні біосумісним полікатіоном поліетиленіміном та подальшому зв'язуванні останнього з гепарином у поліелектролітний комплекс. Досліджено зміну транспортних властивостей модифікованих мембран. Показано, що модифіковані мембрани характеризуються високою очисною здатністю та високими коефіцієнтами проникності щодо вітаміну B_{12} , сечовини та креатиніну, а отже, є цілком придатними для використання у гемодіалізаторних установках.

Ключові слова: гемосумісність, мембрана, гемодіаліз, фільтр, полімер.

Вступ

Мембрана є головним елементом апарату штучної нирки, який застосовують для детоксикації організму від продуктів обміну речовин. Сьогодні процедуру гемодіалізу проходять близько 1,5 млн пацієнтів, при цьому використовують понад 180 млн мембранних фільтрів, а загальна площа мембран для гемодіалізу, проданих у 2007 р., становить 450 млн km^2 [1]. Мембрани для гемодіалізу виготовляють із природних (целюлози та її похідних – купрофан, гемофан, ацетат целюлози) та синтетичних (поліакрилонітрил, полісульфон та поліефірсульфон, полікарбонат, поліамід, поліметилметакрилат) полімерів [2]. Мембрани на основі целюлози мають більш високу очисну здатність (високий кліренс), в той час як синтетичні мембрани мають вищу біосумісність. Причому, якщо відношення ринку продажу мембран на основі целюлози до мембран на основі полісульфону у 2000 р. становило 1:1, то в 2008 р. це відношення вже – 1:4, що пов'язане з припиненням виробництва мембран на основі целюлози основними виробниками, як, наприклад, *Polypore Inc.*

Полімерні мембрани, які застосовують для гемодіалізу та гемофільтрації, мають переважно гідрофобну поверхню і тому характеризуються здатністю до сорбції багатьох білків крові, що часто сприяє тромбоутворенню [3]. Тому пацієнту вводять досить великі дози гепарину, який часто необхідно нейтралізувати введенням інших препаратів, що, з одного боку, збільшує вартість процедури гемодіалізу, а з іншого – підвищує ризик ускладнень. Поверхнева модифікація гідрофобних поверхонь найвідоміша процедура, що застосовується для збільшен-

ня резистентності поверхні до сорбції білку [4]. Найвідомішими методами модифікування поверхні є введення гідрофільного полімеру в формувальний розчин [5], прищеплення гідрофільних груп за допомогою радикальної або УФ-ініційованої полімеризації та кополімеризації мономерів [6, 10], а також іммобілізація поліелектролітних полімерів та поліелектролітних комплексів [7–8].

Гепаринізація полімерних поверхонь, запропонована Готтом зі співробітниками на початку 60-х рр. ХХ ст., і нині лишається найбільш популярним засобом зниження тромбогенності матеріалів [9–10]. Метою нашої розвідки є дослідження методу гепаринізації мембран за рахунок утворення поліелектролітного комплексу з біосумісним полімером поліетиленіміном (ПЕІ), який було хімічно прищеплено до поверхні целюлозних мембран, що мають реакційно здатні групи та піддаються модифікуванню в м'яких умовах.

Матеріали і методи

Було використано промислові целюлозні мембрани С010 і С030 (*Microdyn Nadir*, Німеччина) з *cut off* 10 000 та 30 000 Da відповідно.

Методика модифікування

Мембрани були модифіковані поліетиленіміном (ПЕІ) з молекулярною масою 25000 (*Sigma*). Модифікацію проводили у 2 стадії. Спочатку мембрани окислювали 0,1М NaIO_4 протягом 1 год при температурі 55 °С. Після промивання дистильованою водою активовані мембрани витримували в 1 %-му водному розчині ПЕІ протягом 1 год. В результаті модифікування аміно-

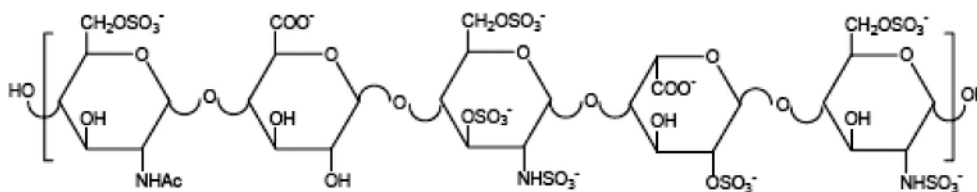


Рис. 1. Структурна ланка гепарину

групи ПЕІ реагували з альдегідними групами мембрани з утворенням основ Шиффа. Після модифікування основи Шиффа відновлювали 0,1М NaBH₄ протягом 30 хв.

Гепаринізацію проводили у водному розчині гепарину (*Fluka*, 154 u/mg) з концентрацією від 0,2 до 1 мг/мл при температурі 38 °С. Час гепаринізації змінювали від 15 до 100 хв.

Дослідження транспортних властивостей мембран

Величину об'ємного потоку води вимірювали на ультрафільтраційній комірці непротокового типу *Amicon 8050* (*Millipore*, USA). рН робочого розчину змінювали від 2 до 8.

Вимірювання коефіцієнта проникності мембрани за низькомолекулярними сполуками проводили в дифузійній комірці з перемішуванням, яка складається з двох камер об'ємом 200 см³, вертикально розділених мембраною, ефективна площа останньої становить 25 см². Одну з відділень (V₁) наповнювали досліджувальним розчином, друге (V₂) – ізотонічним розчином. Досліджувана речовина дифундує з V₁ у V₂ за рахунок різниці концентрацій.

Коефіцієнт проникності обчислювали за формулою:

$$J_s = \frac{P \cdot \Delta C}{l},$$

де J_s – потік розчиненої речовини через мембрану [моль/см² · хв], P – коефіцієнт проникності розчиненої речовини [см²/хв], ΔC – різниці концентрацій розчиненої речовини по обидва боки мембрани [моль/см³], l – товщина мембрани [см].

Коефіцієнти проникності мембран визначали за такими речовинами: вітамін В₁₂ з концентрацією 12 мг/л, креатинін з концентрацією 3,5 ммоль/л, сечовина з концентрацією 51 ммоль/л.

Концентрацію вітаміну В₁₂ визначали фотокориметрично при довжині хвилі 360 нм.

Концентрацію креатиніну та сечовини визначали біохімічними експрес-методами.

Концентрацію гепарину визначали колориметрично при довжині хвилі 580 нм за рахунок утворення ним забарвленого комплексу з азуром А.

Результати та їх обговорення

Модифікування целюлозних мембран ПЕІ та гепарином

Поліетиленімін – слабка поліоснова, що утворює з гепарином поліелектролітний комплекс за рахунок електростатичного притягання позитивно заряджених вторинних і первинних аміногруп ПЕІ та негативно заряджених сульфогруп гепарину. Про утворення поліелектролітного комплексу свідчить зміна об'ємного потоку води крізь мембрану. Як видно з рис. 2, гепаринізація вузькопористих та середньопористих мембран, модифікованих ПЕІ, проходить по-різному. При збільшенні часу гепаринізації об'ємний потік крізь середньопористу мембрану С030 знижується експоненційно. Найбільше зниження продуктивності, з 37 до 25 л/м²год, спостерігається протягом перших 20 хв експерименту. Рівновага встановлюється протягом 2 год. Вузькопориста мембрана С010 з прищепленим ПЕІ має дещо нижчу початкову водопроникність, проте в процесі гепаринізації вона зменшується дуже мало. Це може свідчити або про незначне прищеплення гепарину до мембрани, або про утворення рихлого поліелектролітного комплексу, що несуттєво знижує загальний опір мембрани.

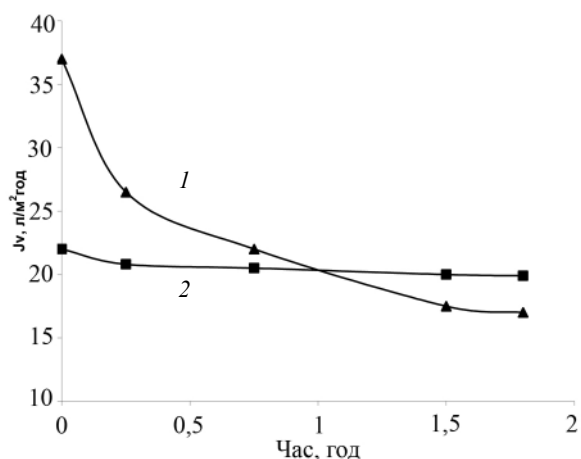


Рис. 2. Залежність об'ємного потоку води крізь мембрану, модифіковану ПЕІ, від часу гепаринізації: 1 – С030; 2 – С010

Як видно з рис. 3, кількість гепарину, адсорбованого на мембрані з прищепленим ПЕІ, зале-

жить від початкової концентрації розчину, яким модифікують мембрану. Виходячи з кривих сорбції, оптимальною концентрацією для модифікування є концентрація гепарину 0,8 мг/мл. Кількість гепарину, іммобілізованого на мембранах C010 та C030, становить 0,29 та 0,46 мг/см² відповідно. А отже, кількість гепарину, що зв'язується в поліелектролітний комплекс, вдвічі більша для мембрани C030, ніж для C010, що пов'язане з морфологією поверхні вихідної мембрани та кількістю прищепленого поліетиленіміну.

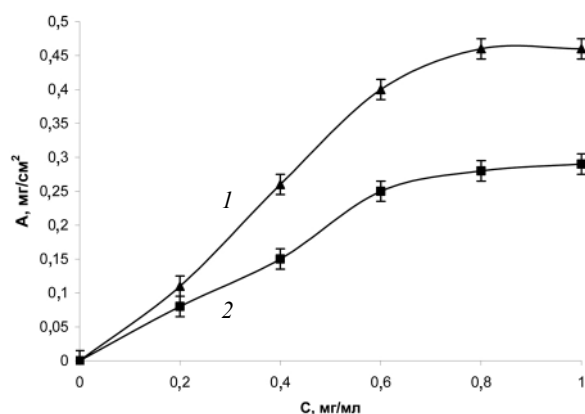


Рис. 3. Залежність кількості адсорбованого гепарину на мембрані від концентрації розчину модифікування: 1 – C030; 2 – C010

Очевидно, що мембрани, модифіковані поліелектролітними комплексами, характеризуватимуться рН-чутливими властивостями. Як видно з рис. 4, обидві досліджувані мембрани утворюють рН-чутливий поліелектролітний комплекс, стабільний в діапазоні рН від 2 до 9,5. Крива зміни об'ємного потоку води крізь мембрану від рН має мінімум при рН = 6. А отже, в діапазоні рН 5–7 утворюється поліелектролітний комплекс значно щільнішої структури, а в сильно кислому або сильно лужному середовищі відбувається його суттєве набрякання і, відповідно, розпушення структури.

Дослідження розділювальних властивостей модифікованих мембран

Видалення низькомолекулярних токсичних речовин із крові пацієнтів є найбільш важливою функцією гемодіалітичних мембран. Тому для дослідження їхніх розділювальних властивостей використовують такі метаболіти, як сечовина (ММ = 60), креатинін (ММ = 113) та як калібрант з середньою молекулярною масою, вітамін В₁₂ (ММ 1300). Використання ультрафільтраційних асиметричних мембран для гемодіалізу є ефективнішим, ніж застосування мембран із гомогенною структурою, оскільки останні мають набагато нижчі коефіцієнти проникності щодо низь-

комолекулярних речовин. Водночас мембрана має затримувати білки плазми крові, які мають молекулярну масу близько 60 кДа. Виходячи з вищезазначеного, оптимальним розміром пор будуть характеризуватися мембрани з cut off від 10 до 30 кДа, які й були використані як вихідні матеріали.

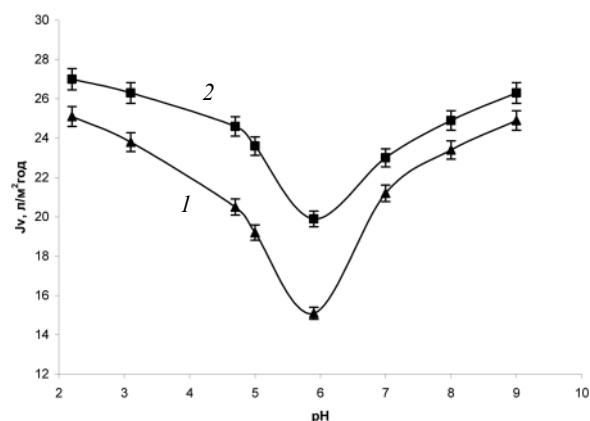


Рис. 4. Вплив рН на водопроникність гепаринізованих мембран: 1 – C030; 2 – C010

Таблиця 1. Транспортні характеристики мембран, модифікованих ПЕІ та гепарином

Мембрана	J _v , л/м² год	Коефіцієнт проникності Ps, см²/хв		
		В ₁₂	креатинін	сечовина
C010				
немодифікована	58,5	6,6±2·10 ⁻⁵	4,2±1·10 ⁻⁸	9,3±3·10 ⁻⁸
модифікована	21,9	2,88·10 ⁻⁵	3,7±1·10 ⁻⁸	6±1·10 ⁻⁸
C030				
немодифікована	139	3,7±1,4·10 ⁻⁵	8±3·10 ⁻⁸	1,6±0,3·10 ⁻⁶
модифікована	18,4	1,5±0,9·10 ⁻⁵	6±1·10 ⁻⁸	1,1±0,3·10 ⁻⁷

Процес модифікування мембран полімерними матеріалами змінює їхні транспортні та розділювальні характеристики. Прищеплення полімерних ланцюгів веде до зменшення ефективного радіусу пор або до часткового чи повного їх стеричного перекривання [11], що призводить до зміни продуктивності та селективності модифікованих зразків. Як видно з табл. 1, після модифікування мембран ПЕІ та гепарином водопроникність вузькопористої мембрани C010 знижується на 36 л/м² год та на 120 л/м² год для середньопористої C030. Тому основним завданням при вивченні очисної здатності мембран є дослідження зміни коефіцієнтів проникності щодо основних речовин до та після їх модифікування.

Як видно з табл. 1, коефіцієнти проникності немодифікованих мембран C010 та C030 за вітаміном В₁₂ та креатиніном мало відрізняються один від одного. Суттєво більшим (на 2 порядки)

коефіцієнтом проникності за речовиною з найменшою молекулярною масою, сечовиною, характеризується мембрана C030, оскільки є широкопористішою порівняно з C010. Після модифікування коефіцієнти проникності обох мембран за вітаміном B₁₂ та креатиніном дещо знижуються, оскільки модифіковані мембрани мають додатковий лімітуючий шар. Однак порядок коефіцієнтів проникності при цьому не змінюється, оскільки шар утвореного поліелектролітного комплексу є нанорозмірним і високогідрофільним. Значним зменшенням проникності за сечовиною характеризується мембрана C030. Так, до та після модифікування її коефіцієнти проникності дорівнюють $1,6 \pm 0,3 \cdot 10^{-6}$ та $1,1 \pm 0,3 \cdot 10^{-7}$ см²/хв відповідно. Але при цьому коефіцієнт проникності модифікованої мембрани C030 залишається на порядок вище, ніж немодифікованої мембрани C010.

Отже, гепаринізація мембран практично не змінює коефіцієнти проникності за такими речовинами, як вітамін B₁₂, креатинін, сечовина, що були вибрані для експерименту як такі, що контролюють процес гемодіалізу, а значить можна

стверджувати, що модифіковані мембрани характеризуються високою очисною здатністю і є цілком придатними для використання у гемодіалізаторних установках.

Висновки

У результаті роботи опрацьовано методику гепаринізації промислових целюлозних мембран, що базується на попередньому їх модифікуванні поліетиленіміном з молекулярною масою 25 000 та подальшому зв'язуванні останнього з гепарином у поліелектролітний комплекс. Досліджено зміну транспортних властивостей модифікованих мембран. Показано, що утворений поліелектролітний комплекс є чутливим до рН робочого розчину, а крива зміни об'ємного потоку води крізь мембрану має мінімум при рН = 6. Досліджено вплив гепаринізації мембрани на зміну коефіцієнта проникності за вітаміном B₁₂, сечовиною та креатиніном. Показано, що гепаринізація мембран практично не зменшує коефіцієнти проникності щодо низькомолекулярних речовин, а отже, мембрани є цілком придатними для використання у гемодіалізаторних установках.

- [1] Vienken J. Membranes for artificial organs / J. Vienken // Abstract book of International conference «Euromembrane 2009» (Montpellier, Sept. 6–10, 2009). – 2009. – 173 p.
- [2] Vienken J. Biocompatibility of dialysis membranes/ J. Vienken // Biomedicine & Pharmacotherapy. – 2006. – V. 60 (8). – P. 472–473.
- [3] Sun S. Protein adsorption on blood-contact membranes / S. Sun, Y. Yue, X. Huang, D. Meng // J. Membrane Science. – 2003. – V. 222. – P. 3–18.
- [4] Chen H. Biocompatible polymer materials : Role of protein-surface interactions/ H. Chen, L. Yuan, W. Song, Zh. Wu // Progress in Polymer Science. – 2008. –V. 33. – P. 1059–1087.
- [5] Chen Z. Preparation and performance of cellulose acetate/polyethyleneimine blend microfiltration membranes and their applications / Z. Chen, M. Deng, Y. Chen // Journal of Membrane Science. – 2004. – V. 235. – P. 73–86.
- [6] Hu M. Enhancing the hydrophilicity of polypropylene microporous membranes by the grafting of 2-hydroxyethyl methacrylate via a synergistic effect of photoinitiators / M. Hu, Q. Yang, Zh. Xu // Journal of Membrane Science. – 2006. – V. 285. – P. 196–205.
- [7] Fushimi F. Platelet Adhesion, Contact Phase Coagulation Activation, and C5a Generation of Polyethylene Glycol Acid-Grafted High Flux Cellulosic Membrane with Varieties of Grafting Amounts / F. Fushimi, M. Nakayama, K. Nishimura, T. Hi-yoshi // Artificial Organs. – 1998. –V. 22. – P. 821–826.
- [8] Lavallo Ph. Free standing membranes made of biocompatible polyelectrolytes using the layer by layer method / Ph. Lavallo, F. Boulmedais, V. Ball // Journal of Membrane Science. – 2005. – V. 253. – P. 49–56.
- [9] Lin D.-J. Young. Immobilization of heparin on PVDF membranes with microporous structures / D.-J. Lin, D.-T. Lin, T.-H. Young, et al. // Journal of Membrane Science. – 2004. – V. 245. – P. 137–146.
- [10] Yang J. Preparation of heparin containing SBS-g-VP-copolymer membrane for biomaterial usage / J. Yang, M. Wang, Y. Hsu, et al. // Journal of Membrane Science. – 1998. – V. 138. – P. 19–27.
- [11] Коновалова В. В. Модифікування целюлозних мембран хітозаном та їх антимікробні властивості / В. В. Коновалова, Г. А. Побігай, М. Т. Брик, А. Ф. Бурбан // Доповіді АН України. – 2005. – №11. – С. 134–139.

V. Konovalova, G. Pobigaj, K. Bytko, A. Burban

HEPARINIZATION OF CELLULOSE MEMBRANES GRAFTED POLYETHYLENEIMINE FOR HEMODIALYSIS AND STUDY OF THEIR TRANSPORT PROPERTIES

New method of cellulose membranes heparinization was developed in order to improve their hemocompatibility. This method is based on membranes previous modification with polycation polyethyleneimine and its following interaction with heparin. As a result a polyelectrolyte complex is formed. Transport characteristics of modified membranes were analyzed. It was shown that they are characterized by high separation factor and high permeability index by vitamin B12, urea and creatinine and therefore can be used in hemodialyzers.

Keywords: cellulose membranes, hemocompatibility, modification, polycation.