

ІММОБІЛІЗАЦІЯ ТІОЛЬНИХ ГРУП НА ЦЕЛЮЛОЗНИХ МЕМБРАНАХ, МОДИФІКОВАНИХ ПОЛІЕТИЛЕНІМІНОМ

Розроблено методику отримання целюлозних мембран з мукоадгезивними властивостями, що полягає в прищепленні до мембранної поверхні ланцюгів поліетиленіміну з наступним ковалентним приєднанням до нього тіогліколевої кислоти. Досліджено вплив модифікування на продуктивність та розділювальні характеристики мембран. Встановлено оптимальні умови проведення модифікування для максимальної іммобілізації тіольних груп на мембранній поверхні.

Ключові слова: целюлозні мембрани, мукоадгезія, тіольні групи, поліетиленімін.

Вступ

Мембранні технології з кожним роком усе ширше використовуються у багатьох сферах життя і науки. Зокрема, в медицині та біотехнології мембрани застосовуються вже багато років в гемодіалізі, оксигенації крові, для лікування опіків, створення штучної шкіри тощо [1, 2]. Але й дотепер можливості таких апаратів залишаються досить обмеженими, що пов'язане зі складністю одержання мембранних матеріалів, які б могли вільно контактувати з живими тканинами та клітинами людського організму, не призводячи при цьому до негативних наслідків (утворення тромбів, гемолітична реакція, токсична й імунологічна реакція) [3]. Так, при оксигенації та гемодіалізі головними характеристиками мембрани є повна хімічна і біологічна сумісність з кров'ю, добрі механічні властивості і проникність, у даних випадках для глюкози, сечовини та інших метаболітів. Полімерні мембрани, які використовуються в клітинній інженерії для культивування клітин, повинні мати високу мукоадгезію та проліферацію фібробластів клітин до своєї поверхні.

Під мукоадгезією розуміють здатність синтетичних або біологічних макромолекул приєднуватися до слизових тканин за рахунок взаємодії з глікопротеїнами слизу, головним чином на основі нековалентних зв'язків (електростатичні взаємодії, водневі зв'язки, сили Вандерваальса) [2].

Сьогодні відомо досить багато природних та синтетичних полімерів із мукоадгезивними властивостями. Проте науковцями встановлено, що полімери з тіольними групами забезпечують набагато кращі адгезивні властивості, ніж полімери, які зазвичай вважали мукоадгезивними [3]. Підвищення мукоадгезії може бути пояснене утворенням ковалентних зв'язків

між полімером і слизовою тканиною. Так, тіольні полімери, або так звані тіомери, взаємодіють з багатими на цистеїн субдоменами глікопротеїнів слизу через тіольно/дисульфідну обмінну реакцію [4].

Метою нашого дослідження є розроблення методики отримання біосумісних целюлозних мембран з мукоадгезивними властивостями. Для досягнення зазначеної мети нами запропонована методика хімічної іммобілізації тіольних груп на мембранах, модифікованих поліетиленіміном (ПЕІ), та дослідження функціональних властивостей одержаних мембран.

Поліетиленімін на сьогодні вважається одним із перспективних синтетичних біосумісних полікатионітів з певною антимікробною активністю [5] для створення різних видів лікарських форм. Введення до складу макромолекул ПЕІ тіольних груп надасть їм ще й мукоадгезивних властивостей, що дозволить використовувати такі мембрани для різних потреб біотехнології (культивування клітин, іммобілізація білків та ферментів).

Матеріали і методи

Для дослідження процесу модифікування поверхні використано ультрафільтраційні целюлозні мембрани типу C005F, C010F, C030F, C100F (*Nadir*, Німеччина), *cut-off* яких відповідно становить 5, 10, 30 та 100 кДа. Для модифікування використовували поліетиленіміни (ПЕІ) з молекулярними масами 25 і 750 кДа (ПЕІ-25 та ПЕІ-750 відповідно) виробництва фірми *Fluka*.

Для визначення розділювальних характеристик мембран (об'ємного потоку води крізь мембрану та розділювальної здатності) використовували стандартну циліндричну комірку непротокового типу *Amicon 8200*, (виробництво *Millipore*, США). Внутрішній об'єм комірки становив

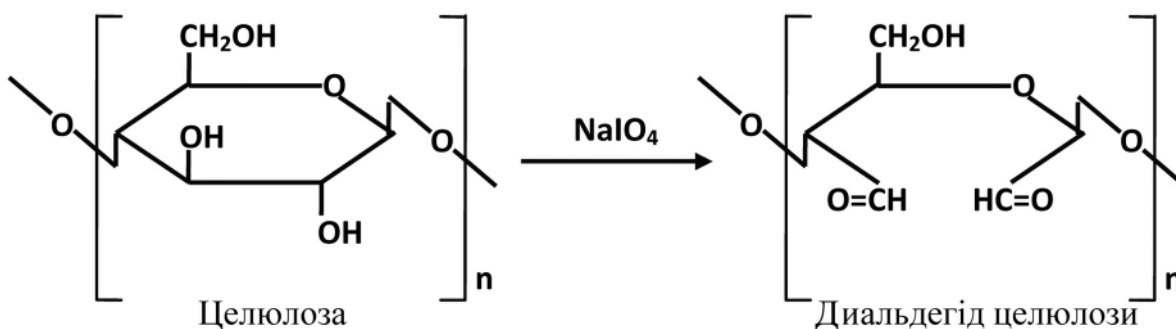
0,18 м³, площа робочої поверхні мембрани— 28,7 · 10⁻⁴ м².

Для визначення розділювальних властивостей мембран використовували 0,01н водні розчини NaCl, MgCl₂ (х. ч.); 0,1 % розчин глюкози (х. ч.) та 0,3 % водні розчини поліетиленгліколю з молекулярною масою 1500 Да (ПЕГ-1500). Вміст ПЕГ у початковому розчині та фільтраті визначали за допомогою інтерферометру марки ЛІР-2-УХЛ 4.2.

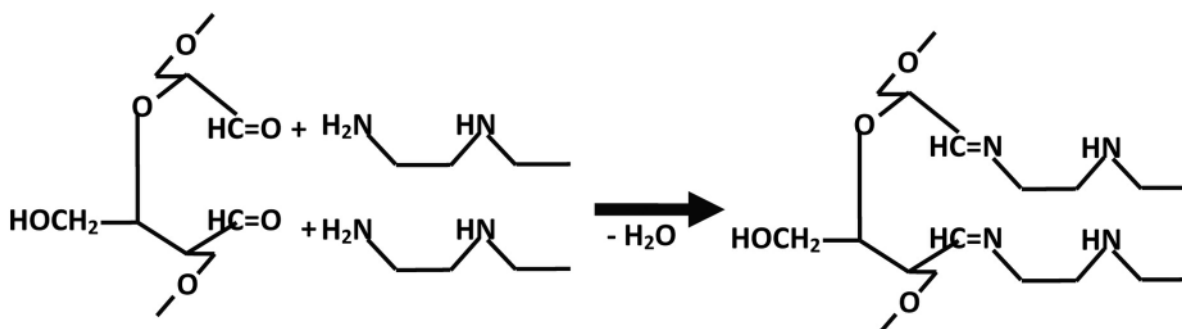
Прищеплення ПЕІ до поверхні целюлозних промислових мембран проводили у три стадії. Спершу мембрани окиснювали періодатом натрію для утворення на їх поверхні альдегідних груп. Після чого мембрани витримували в 2 % (мас.) водному розчині ПЕІ при кімнатній температурі протягом 20 год. Модифікування мембран завершувалось їх промиванням в дистильованій воді та відновленням боргідридом натрію.

Схема модифікування:

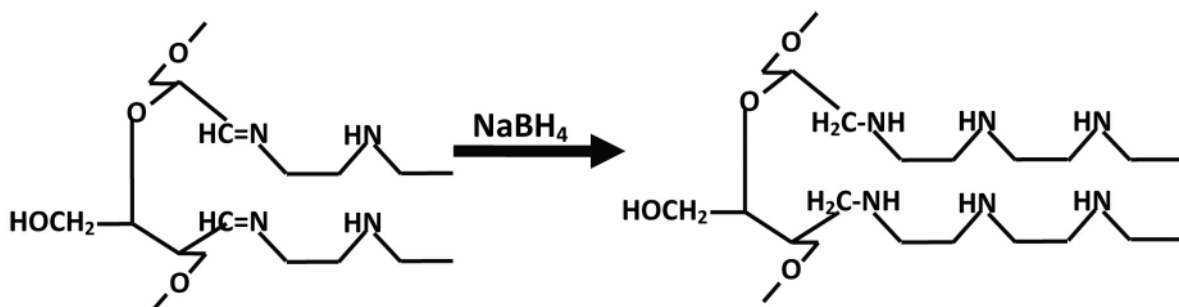
Стадія 1. Активування целюлози окисненням періодатом:



Стадія 2. Реакція диальдегіду целюлози з поліетиленіміном:

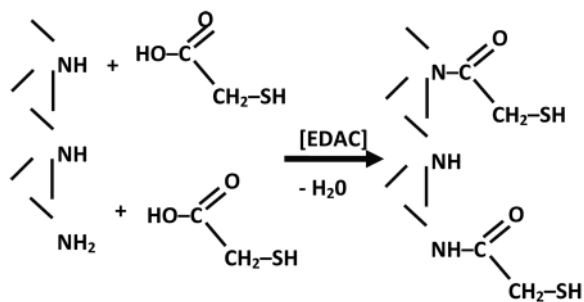


Стадія 3. Реакція відновлення основ Шиффа:



Для введення тіольних груп мембрани з прищепленими макромолекулами ПЕІ ацилювали тіогліколевою кислотою (ТГК) (*Fluka*). Для цього зразки мембран витримували у водних розчинах ТГК з концентрацією від 0,5 до 2 % (мас.) протягом 3 год за наявності присутності каталізатора EDAC (*Aldrich*) за кімнатної температури. Після чого мембрани ретельно промивали дистильованою водою.

Схема введення тіольних груп:



Концентрацію прищеплених SH-груп до модифікованої ПЕІ мембрани визначали йодометричним титруванням. Для цього подрібнену мембрану занурювали в дистильовану воду. Значення рН розчину доводили до 3. Як індикатор використовували свіжоприготований 1 % (мас.) розчин крохмалю. Як титрант – 0,001 М розчин йоду. Титрування продовжували до появи стабільного синього забарвлення.

Аналіз та узагальнення результатів

Для якісного визначення ПЕІ і тіольних груп на поверхні мембрани використали ІЧ-спектроскопію.

Як видно з рис. 1, для мембрани, модифікованої ПЕІ (крива 2), інтенсивність піка з частотою 1050 cm^{-1} зменшується приблизно вдвічі порівняно із спектром немодифікованої мембрани (крива 1). Оскільки ця частота відповідає за валентні коливання зв'язку С-О, то це свідчить про зменшення кількості ОН-груп у целюлозі після окиснення і приєднання по них ПЕІ. Також, після модифікування зменшується інтенсивність піку при 900 cm^{-1} , який відповідає валентним коливанням містку С-О-С.

Крім цього, на кривій 2 з'являється інтенсивний пік з частотою 1580 cm^{-1} , який відповідає деформаційним коливанням зв'язку N-H. Цей пік майже повністю зникає після модифікування ланцюгів ПЕІ тіогліколевою кислотою (рис. 1, крива 3).

Модифікування пористих полімерних мембран може істотно змінювати їхню хімічну та термічну стійкість, механічні властивості, здатність затримувати розчинені речовини, проникність стосовно водних розчинів тощо. Так, зниження водопроникності при модифікуванні мембран відбувається за рахунок зменшення розмірів пор, внаслідок чого за допомогою цього параметру можна опосередковано судити про ефективність проходження модифікування.

З діаграм, представлених на рис. 2, видно, що об'ємний потік води крізь модифіковану ПЕІ мембрану порівняно з об'ємним потоком крізь немодифіковану зменшується більше, ніж в десять разів для усіх мембран. Причому продуктивність практично не залежить від молекулярної маси ПЕІ. Це свідчить про те, що на мембранній поверхні утворився прищеплений шар полімеру, який зменшує ефективний радіус пор мембрани.

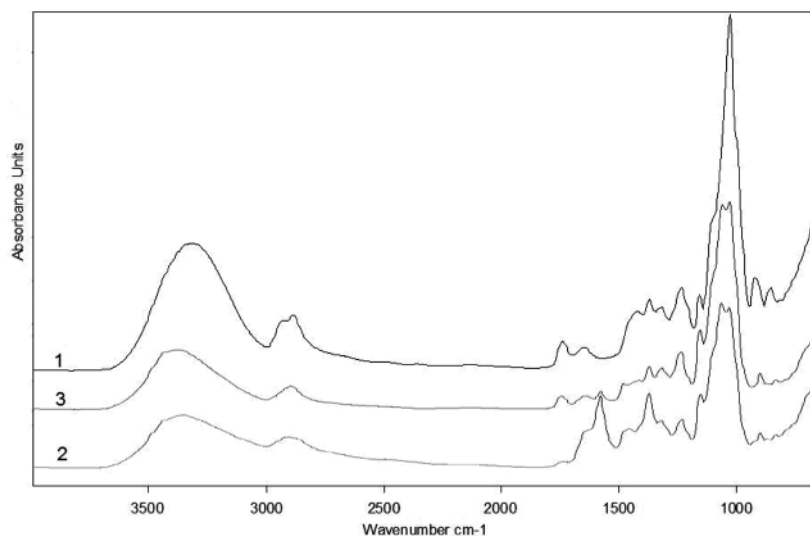


Рис. 1. ІЧ-спектри зразків целюлозних мембран С100 F: 1 – немодифікована мембрана, 2 – мембрана, модифікована ПЕІ, 3 – мембрана, модифікована ПЕІ та ТГК

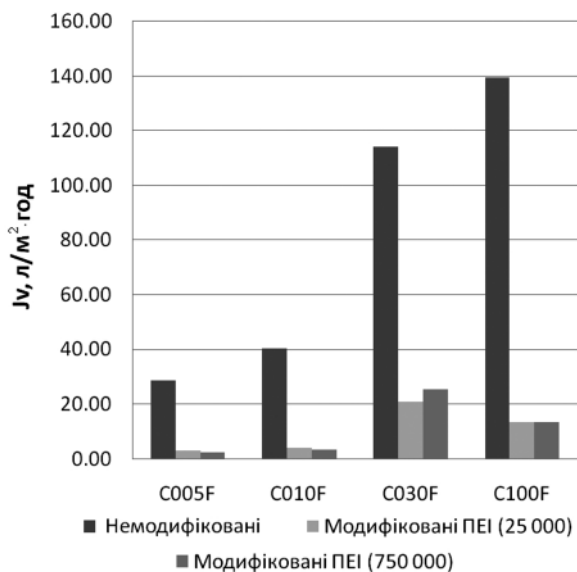


Рис. 2. Об’ємний потік води крізь мембрани, модифіковані PEI, різної молекулярної маси ($\Delta P = 0,5$ мПа для мембран C100F і C030F та 2 мПа для C010F і C005F)

Водночас із падінням продуктивності мембран після прищеплення до їх поверхні PEI спостерігається суттєве покращення розділювальної здатності цих мембран. Так, мембрана C100F, яка до модифікування затримувала на 97 % лише молекули PEG з ММ 100 кДа, після прищеплення до її поверхні макромолекул PEI з ММ 25 кДа почала на 94,4 % вилучати з розчину молекули PEG з ММ 1500 Да (табл. 1). Однак при модифікуванні цієї ж мембрани PEI вищої молекулярної маси її коефіцієнт затримування за PEG-1500 становить лише 37,8 %. Ці результати можна пояснити механізмом модифікування – макромолекули PEI прищеплюється до поверхні целюлозної мембрани тільки кінцевими первинними аміногрупами. Отже, оскільки PEI меншої молекулярної маси має набагато більше таких груп за однакової концентрації (2 %), то він набагато щільніше «зшиває» мембрану, тим самим зменшуючи її пори.

Таблиця 1. Коефіцієнт затримування (R, %) PEG-1500, NaCl, MgCl₂ та глюкози з їх водних розчинів мембранами C005F та C100F, модифікованими PEI різної молекулярної маси

Мембрана	R, %			
	PEG-1500	NaCl	MgCl ₂	глюкоза
C005F немодифік.	40	1,3	2,1	0
C100F немодифік.	0	0	0	0
C100F модифік. PEI-25	94,4	-	-	-
C005F модифік. PEI-25	100	32,5	42,3	1,1
C100F модифік. PEI-75	37,8	-	-	-
C005F модифік. PEI-75	100	27,7	21,5	5,0

Оскільки PEI є полікатионом, поверхня мембрани після прищеплення до неї його ланцюгів набуває позитивного заряду. Для підтвердження цього було проведено дослідження розділювальних властивостей зразків целюлозних мембран, модифікованих PEI, відносно електролітів, що містили катіони натрію і магнію.

Так, з даних табл. 1 видно, що мембрани, модифіковані PEI, затримують катіони і магнію, і натрію. Ймовірно, цей ефект пояснюється електростатичним відштовхуванням [8]. Причому мембрани з прищепленим PEI нижчої молекулярної маси характеризуються вищими коефіцієнтами затримування відносно електролітів. Встановлено, що мембрани, модифіковані PEI, практично не затримують глюкозу, про що свідчать низькі коефіцієнти затримування – 1,25 і 5,51 для мембран, модифікованих PEI, із ММ 25 та 750 кДа відповідно. Це пояснюється досить великим діаметром пор досліджуваних мембран і відсутністю електростатичної взаємодії з молекулами глюкози.

Для надання целюлозним мембранам з поверхнево прищепленими макроланцюгами PEI мукоадгезивних властивостей їх було додатково модифіковано ТКГ для імобілізації тіольних груп на поверхні мембрани.

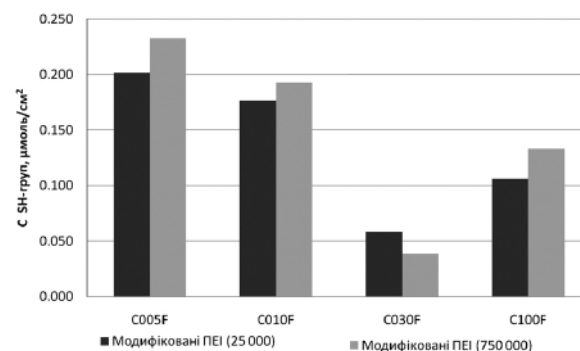


Рис. 3. Концентрація тіольних груп ($\mu\text{моль}/\text{см}^2$) на поверхні целюлозних мембран, модифікованих PEI, різної молекулярної маси

Як видно з рис. 3, найбільша концентрація тіольних груп спостерігається на мембранах C005F та C010F, модифікованих ТКГ, причому різниця між прищепленням SH-груп до мембран, модифікованих високо- і низькомолекулярним PEI, практично відсутня. Якщо порівняти діаграму (рис. 3) з діаграмою об’ємного потоку води крізь мембрани, модифіковані PEI (рис. 2), то можна простежити залежність між водопроникністю мембран, модифікованих PEI, і концентрацією тіольних груп, імобілізованих на мембрану. Так, встановлено, що найбільша концентрація тіольних груп, спостерігається на мембранах, падіння продуктивності яких після

прищеплення ПЕІ є максимальним. Тобто концентрація SH-груп безпосередньо залежить від кількості ланцюгів ПЕІ ковалентно приєднаних до целюлозних мембран, про що можна опосередковано судити за зниженням об'ємного потоку води крізь модифіковані мембрани.

Висновок

Проведене хімічне модифікування промислових целюлозних мембран з різними розмірами пор ПЕІ з молекулярними масами 25 і 750 кДа. Встановлено вплив модифікування на об'ємний потік води крізь мембрани та їх розділювальні властивості. Так, для усіх зразків мембран об'ємний потік води крізь мембрану після прищеплення до її поверхні ПЕІ зменшується більше ніж у 10 разів. Коефіцієнт затримування ПЕГ-1500 для мембрани С100F, модифікованої

ПЕІ-25000, становить 95 %, а модифікованої ПЕІ-750000 – лише 37 %.

Досліджено, що целюлозні мембрани, модифіковані ПЕІ, здатні затримувати низькомолекулярні електроліти за рахунок електростатичних сил. Так, для мембрани С050F, модифікованої ПЕІ-25000, $R_{NaCl} = 32\%$, $R_{MgCl_2} = 42\%$; для мембрани, модифікованої ПЕІ-750000, – $R_{NaCl} = 27\%$, $R_{MgCl_2} = 21\%$. При цьому мембрани практично не затримують глюкозу через відсутність електростатичної взаємодії і відносно великий розмір пор.

Розроблена методика прищеплення ТГК до целюлозних мембран, модифікованих ПЕІ, різної молекулярної маси. Встановлено, що найбільша концентрація тиольних груп – 0,233 ммоль/см² спостерігається для целюлозної мембрани С005F, модифікованої ПЕІ, більшої молекулярної маси.

- [1] Tomoaki Uchiyama. Biocompatible polymer alloy membrane for implantable artificial pancreas / Tomoaki Uchiyama, Junji Watanabe, Kazuhiko Ishihara // Journal of Membrane Science. – 2002. – V. 208. – P. 39–48.
- [2] Van den Kerckhove E. Silicones in the rehabilitation of burns : a review and overview / Eric van den Kerckhove // Burns. – 2001. – V. 27. – P. 205–214.
- [3] Bamford C. H. Studies in polymer surface functionalization and grafting for medical and other applications / C. H. Bamford, K. G. Al-Lamee // Polymer. – 1994. – V. 35. – P. 2844–2852.
- [4] Grabovac V. Comparison of the mucoadhesive properties of various polymers / V. Grabovac, D. Guggi, A. Bernkop-Schnurch // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2005. – V. 57. – P. 1713–1723.
- [5] Bernkop-Schnurch A. Thiolated polymers–thiomers : synthesis and in vitro evaluation of chitosan–2-iminothiolane conjugates / Andreas Bernkop-Schnürch, Margit Hornof, Theresa Zoidl // International Journal of Pharmaceutics. – 2003. – V. 260. – P. 229–237.
- [6] Kast C. E. Thiolated polymers thiomers : development and in vitro evaluation of chitosan thioglycolic acid conjugates / Constantia E. Kast, Andreas Bernkop // Biomaterials. – 2001. – V. 22. – P. 10–18.
- [7] Helander I. M. Polyethyleneimine is an effective permeabilizer of gram-negative bacteria / I. M. Helander, H. L. Alakomi, K. Latva-Kala, P. Koski // Microbiology. – 1997. – V. 143. – P. 3193–3199.
- [8] Nasefa M. M. Preparation and applications of ion exchange membranes by radiation-induced graft copolymerization of polar monomers onto non-polar films / Mohamed Mahmoud Nasefa, El-Sayed Ahmed Hegazy // Progress in Polymer Science. – 2004. – V. 29. – P. 499–561.

G. Pobigai, V. Konovalova, S. Gladchuk, A. Burban

IMMOBILIZATION OF THIOL-GROUPS ON CELLULOSE MEMBRANES MODIFIED WITH POLYETHYLENEIMINE

Cellulose membranes with mucoadhesive properties were obtained by attaching of polyethyleneimine to membrane surface, followed by covalent bonding of thioglycolic acid to it. Water flux and rejection characteristics after modification were investigated. Optimal conditions for maximal immobilization of thiol-groups on membrane surface were determined.

Keywords: cellulose membranes, mucoadhesion, thiol-groups, polyethyleneimine.