ZESZYTY NAUKOWE POLITECHNIKI ŚLĄSKIEJ 2002
Seria: INŻYNIERIA ŚRODOWISKA z.47 Nr kol. 1537

Ludomira GRANICKA [1], Żaneta KACZMAREK-BARANEK[1],
Andrzej CHWOJNOWSKI[1], Jerzy KAWIAK[1]

BADANIE WPŁYWU SILANIZACJI NA WŁASNOŚCI TRANSPORTOWE MEMBRAN DO IMMUNOIZOLACJI

Streszczenie. Modyfikowano powierzchnię polipropylenowych, półprzepuszczalnych membran kapilarnych przy zastosowaniu różnych sposobów silanizacji, badając wpływ pokrywania powierzchni membran na ich własności transportowe z punktu widzenia przyszłych zastosowań in vivo. Badano też obrastanie tkanką łączną membran modyfikowanych różnymi sposobami we wszczepach in vivo. Stwierdzono, że badane membrany spełniają wymogi membran do immunoizolacji komórek.

EVALUATION OF SILIKONIZATION INFLUENCE ON TRANSPORT PROPERTIES OF THE MEMBRANES FOR CELL IMMUNOISOLATION

Summary. The permiselective polypropylene hollow fiber's surface was modified using different ways of silanization and the influence of silanization on membrane transport properties was assessed. The tissue overgrowth of different modified membranes was evaluated in vivo. It was found that the membranes comply with the requirements for membranes applied for immunoisolation.

1. Wstęp

Modyfikując membranę polipropylenową poprzez silanizację można otrzymać membrany, które nie obrastają tkanką łączną w przeszczepie *in vivo*. Jednocześnie otrzymane membrany pozwalają uzyskać założony punkt odcięcia oraz nie wykazują toksycznego działania na komórki w nich zamknięte.

Sposób wytwarzania membran do immunoizolacji komórek [1, 2] polega na tym, że w pory membrany wprowadza się roztwór oleju silikonowego. Na membranie polimerowej sta-

[1] Instytut Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej, PAN, ul. Księcia Trojdena 4, 02-109 Warszawa, e-mail: ludomira@ibib.waw.pl

nowiącej podłoże tworzy się warstwę ciekłą. Membranę poddaje się kąpieli w roztworze oleju silikonowego w rozpuszczalniku w odpowiednio dobranych warunkach ciśnieniowych, temperaturowych i czasowych, tak aby faza membrany ciekłej została zaadsorbowana przez podłoże.

Modyfikowano powierzchnię polipropylenowych półprzepuszczalnych membran kapilarnych przy zastosowaniu różnych sposobów silanizacji. Badano wpływ pokrywania powierzchni membran siloksanami na własności transportowe membrany biorąc pod uwagę głównie przyszłe ich zastosowanie do immobilizacji komórek.

2. Materiały i metody

2.1. Materiały

Kapilary polipropylenowe K600®PP, Accurel, Niemcy (Akzo-Nobel) o średnicy wewnętrznej 0.6 mm, grubości ścianki 0.2 mm, punkcie odcięcia 200 kDa. *Rozpuszczalnik* n-heksan spektralnie czysty (MERCK). *Silikony* OV1, OV7, OV17 (SERVA) skład i postać przedstawione są w tabeli 2.1. *Zwierzęta* myszy, szczep CDF1 (hodowla - Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa) *Kreatynina* 99% czystości (Sigma), *Albumina* 95% czystości (Krakowska Wytwórnia Surowic i Szczepionek), *IgG* 95% czystości (Warszawska Wytwórnia Surowic i Szczepionek).

Tabela 1

Rodzaje użytych siloksanów

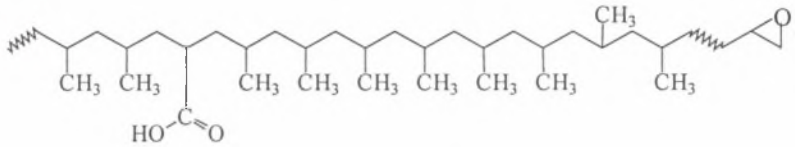
Symbol silikonu	Skład silikonu	Postać	Stężenie roztworu silikonu [%]
OV 1	100% metylo silan	stały – kauczuk	1,0
OV 7	80% metyl 20% fenyl	ciekły – olej	5,0
OV 17	50% metyl 50% fenyl	ciekły – olej	5,0

2.2. Metody

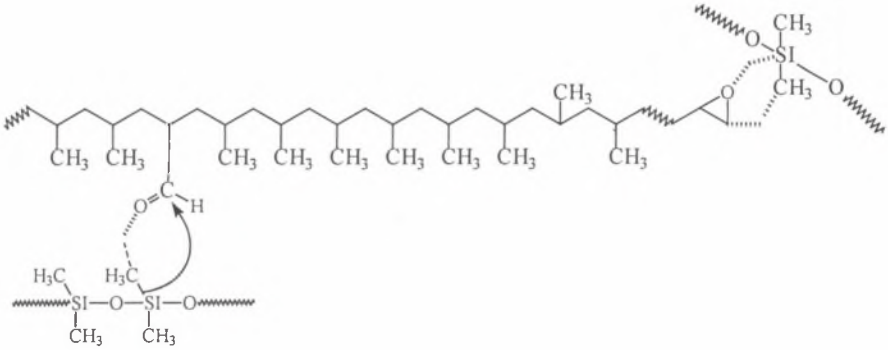
2.2.1. Mechanizm silanizacji kapilar polipropylenowych

Warunki produkcji kapilar (temperatura, ciśnienie, dostęp powietrza) oraz obecność olejów roślinnych (kwasy nienasycone) są przyczyną powstawania: epitlenków i nadtlenków zarówno w samym oleju, jak i łańcuchu polimeru. Następuje nawet utlenienie pewnych grup -CH_3 na powierzchni membran. Szacuje się, że do 0,2% grup -CH_3 znajdujących się na powierzchni kapilary może ulec utlenieniu do grup karboksylowych (dane nie publikowane

firmy ENKA). Wiązania podwójne C=C, znajdujące się na końcach łańcuchów utleniają się do epitlenków.



Podczas danego cyklu produkcyjnego część grup karboksylowych ulega redukcji do grup karbonylowych. Mogą one, jak również i grupy epoksydowe, wchodzić w reakcję ze związkami krzemoorganicznymi. Grupy epitlenkowe reagują z silanami, a głównie ze znajdującymi się w silanach śladowymi ilościami silanochloropochodnych. Grupy epoksydowe znajdujące się na powierzchni PP (niewielkie ilości) oddziaływają również z siloksanem, lecz mechanizm tej reakcji nie jest do końca poznany.



Stwierdzono, że w środowisku biologicznym, w bezpośrednim kontakcie z krwią, grupy karboksylowe (ta część, która nie została zredukowana) są atakowane przez znajdujące się we krwi białka, które kolejno reagują z siloksanami, w wyniku czego powstaje wiązanie z krzemem (krzem-tlen-węgiel). Istota tej reakcji jest badana przez biochemików, lecz jak dotąd, nie została do końca wyjaśniona. W ostatecznym rezultacie silanizacja membrany następuje w serii procesów fizycznych i chemicznych, w wyniku których następuje rozpuszczenie: części siloksanu w polimerze oraz przyłączenie łańcuchów siloksanowych do łańcuchów polimeru tworzącego membranę.

2.2.2. Sposoby silanizacji membran kapilarnych

1. Kapilary K600 PP, moczone przez 15 min w etanolu, umieszczane były następnie w roztworze siloksanu o stężeniu 1% (OV1) lub 5% (OV7, OV17) na 5 min w temperaturze 20^0C, pod ciśnieniem atmosferycznym.

2. Kapilary K600 PP, moczone przez 15 min. w etanolu, umieszczane były następnie w roztworze siloksanu o stężeniu 1% (OV1) lub 5% (OV7, OV17) przez 5 min, następnie wstawiane do komory próżniowej na czas 60 minut, w temp. 20^0C, pod ciśnieniem: p= -0,1 MPa.

2.2.3. Badanie przepuszczalności dyfuzyjnej membran kapilarnych

Przepuszczalność dyfuzyjna membran była badana na podstawie opisu termodynamicznego transportu masy w modelu 2-kompartmentowym (kompartment 1 reprezentuje roztwór badanej cząsteczki wewnątrz kapilary, a kompartment 2 - roztwór soli fizjologicznej na zewnątrz kapilary). Opisując zmianę ilości masy w kompartmentach 1 i 2 można wyprowadzić wzór w formie regresji liniowej, przy użyciu którego możliwe jest określenie przepuszczalności dyfuzyjnej membrany, mając dane stężenie wyjściowe roztworu badanej cząsteczki, którym napełniona jest kapilara oraz zmierzone w czasie stężenia roztworu na zewnątrz kapilary) dla kreatyniny, albuminy oraz IgG.

Metoda badania została opisana wcześniej [3].

2.2.4. Wszczepianie membran zwierzętom

Kapilary o długości ok. 12 cm, silanizowane pod ciśnieniem atmosferycznym, wszczepiono podskórnie myszom CDF1 (1kapilara/1mysz) na okres 6 miesięcy. Każdy rodzaj kapilary wszczepiano 2 myszom. Po upływie 6 miesięcy kapilary eksplantowano i poddano badaniu histologicznemu w celu zbadania obrastania membran tkanką łączną.

3. Wyniki i ich omówienie

3.1. Eksperyment in vitro

Przepuszczalność dyfuzyjną membran badano dla każdego rodzaju cząsteczki, dla każdego rodzaju membrany w 3 powtórzeniach. Na rysunku 1 przedstawione są wartości przepuszczalności dyfuzyjnej membran dla dużych (IgG, albumina) i małych cząsteczek (kreatynina). Wraz ze wzrostem wielkości cząsteczki wartość współczynnika dyfuzyji membrany maleje ok. 38-krotnie, jeśli porówna się współczynnik dyfuzji dla membran wyjściowych i silanizowanych pod ciśnieniem atmosferycznym.

W celu sprawdzenia wpływu różnych sposobów silanizacji na własności transportowe membrany porównywano otrzymane wartości współczynników dyfuzji membran do współczynników dyfuzji w wodzie dla badanych cząsteczek.

Średni stosunek współczynnika dyfuzji dla danej cząsteczki poprzez membrany wyjściowe i silanizowane pod ciśnieniem atmosferycznym oraz poprzez membrany silanizowane w próżni do współczynnika dyfuzji tej cząsteczki w wodzie jest największy dla kreatyniny i wynosi odpowiednio [%] 20.55±5.46 oraz 19.90±2.92, spadając odpowiednio 1.85 oraz 7.10-krotnie dla IgG i osiągając wartości odpowiednio 11.12±6.44 oraz 2.80±1.65. Jednakże wartość tego stosunku dla albuminy jest najwyższa, osiągając wartości odpowiednio 43.18±3.66 oraz 22.58±4.24, co można tłumaczyć oddziaływaniami elektrostatycznymi między badaną cząsteczką a materiałem membrany [4] (rysunek 2).

Wpływ ciśnienia silikonowania na transport dyfuzyjny cząsteczki uwidacznia się w miarę wzrostu masy cząsteczkowej. Dla IgG lub albuminy transport dyfuzyjny poprzez membranę silanizowaną próżniowo jest średnio 4 lub odpowiednio 2 razy mniejszy od transportu poprzez membranę silanizowaną pod ciśnieniem atmosferycznym.

Porównując średni współczynnik dyfuzji (P) dla membran silanizowanych różnymi siloksanami pod ciśnieniem –0.1 MPa (P(-0.1 MPa)) ze współczynnikiem dyfuzji membran silikonowanych różnymi siloksanami pod ciśnieniem atmosferycznym (P(0.1 MPa)), można stwierdzić, że dla IgG stosunek ten (P(-0.1 MPa/ P(0.1 MPa)) wynosi 0.25, dla albuminy 0.54, dla kreatyniny 1.05.

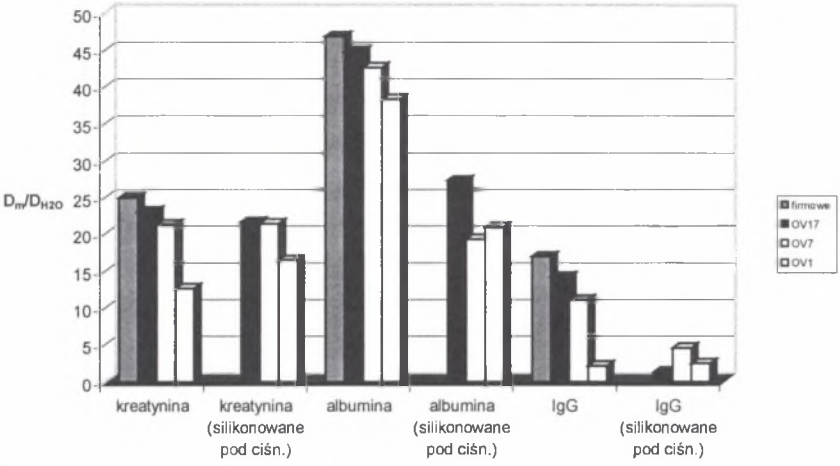
Dla kreatyniny stosunek P(-0.1 MPa)/P(0.1 MPa) jest zbliżony do 1, co oznacza niewielki wpływ ciśnienia silikonowania na transport dyfuzyjny dla tej cząsteczki.

Przyjmując kryterium, iż dla wartości stosunku współczynnika dyfuzji membrany do współczynnika dyfuzji w wodzie dla danej cząsteczki, mniejszego od 5%, membrana jest dla tej cząsteczki nieprzepuszczalna, można stwierdzić, iż zastosowanie ciśnienia –0.1 MPa przy modyfikacji membran poprzez silanizację spowodowało zmniejszenie punktu odcięcia wszystkich badanych membran z 200 kDa do 150 kDa.

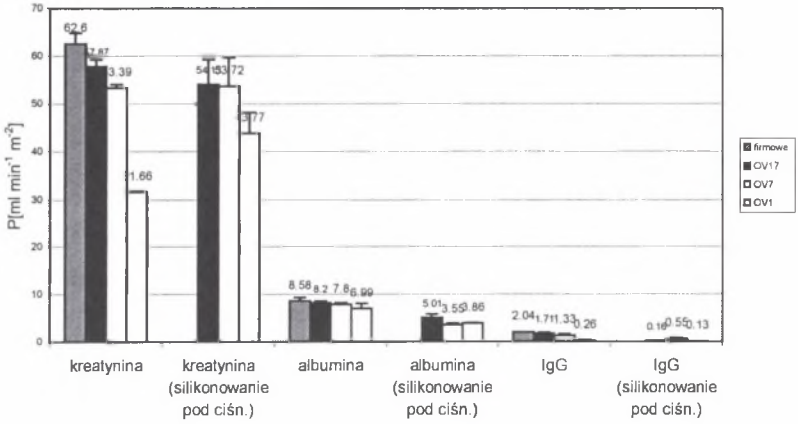
Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że silanizacja pod ciśnieniem atmosferycznym nie zmienia punktu odcięcia membrany, ani jej właściwości transportowych. Stosując ciśnienie (tu: –0.1 MPa) przy modyfikacji membran poprzez silanizację można ograniczyć transport dyfuzyjny poprzez membranę dla większych cząsteczek, bez jednoczesnej zmiany tego transportu dla małych cząsteczek.

Może to znaleźć zastosowanie przy dostosowaniu membran do izolacji komórek, dla której wymagany jest niższy punkt odcięcia niż w membranach wyjściowych, bez jednoczesnego ograniczenia transportu dla substancji odżywczych (mniejszych cząsteczek) niezbędnych do życia zamkniętych w membranie komórek.

Zastosowane do modyfikacji kapilar silikony mają różną polarność. Polarność silikonu OV17 zawierającego 50% grup metylowych i 50% grup fenylowych jest 4–krotnie wyższa od polarności silikonu OV1 zawierającego 100% grup metylowych. Nie stwierdzono jednakże wpływu polarności użytych do silanizacji silikonów na wartości przepuszczalności dyfuzyjnej modyfikowanych nimi membran.



Rys. 1. Wartości przepuszczalności dyfuzyjnej membran modyfikowanych różnymi sposobami
Fig. 1. The diffusive permeability values of different modified membranes



Rys.2. Stosunek współczynnika dyfuzji cząsteczki w membranie do współczynnika dyfuzji tej cząsteczki w wodzie
Fig. 2. The ratio of solute diffusive coefficient in membrane to solute diffusive coefficient in water

3.2. Eksperyment in vivo

W przypadku wszystkich badanych kapilar (silikonowanych OV1 lub OV7 lub OV17) w badaniu histologicznym nie stwierdzono obrastania ściany zewnętrznej kapilar tkanką łączną, nie stwierdzono również reakcji dookoła ciała obcego. W ścianach wszystkich badanych membran kapilarnych stwierdzono obecność wtrąceń fosforanów wapnia.

4. Wnioski

1. Membrany poddane silanizacji różnymi sposobami pozwalają uniknąć obrastania tkanką łączną we wszczepie in vivo.
2. Stosując ciśnienie przy modyfikacji membran poprzez silanizację można w miarę potrzeb ograniczyć transport dyfuzyjny poprzez membranę dla większych cząsteczek, bez jednoczesnej zmiany tego transportu dla małych cząsteczek.
3. Materiał biologiczny zamknięty w opracowanych, silanizowanych membranach, nie obrastających tkanką łączną, posiadających odpowiedni punkt odcięcia, może służyć jako układ do produkcji substancji biologicznie czynnych w zastosowaniach *in vivo*.

Literatura

1. Kawiak J., Granicka L., Piątkiewicz W.: Modyfikowana membrana poliolefinowa do immunoizolacji komórek i sposób jej otrzymywania. Patent nr 175147, 1998.
2. Granicka L., Kawiak J.: Nowa membrana poliolefinowa do immunoizolacji komórek i sposób jej wytwarzania. Biuletyn Urzędu Patentowego RP Nr 11(663), 1999.
3. L. Granicka, J. Kawiak, E. Głowacka, Weryński A.: Encapsulation of OKT3 Cells in Hollow Fibers. ASAIO Journal, 1996, Vol.42, s. 863-866.
4. M.K. Menon, Zydney A. L.: Effect of ion binding on protein transport through ultrafiltration membranes. Biotechnology and Bioengineering, 1999, Vol. 63, s. 298.

Abstract

The membranes allowing to avoid tissue overgrowth as well as toxic influence on encapsulated within cells, could be obtained by modifying a polypropylene membrane by silikonization.

The permiselective polypropylene hollow fiber's surface was modified using different ways of silanization. The influence of the way of silanization in different pressure conditions with different viscosity silikons on membrane diffusive transport properties was assessed.

The tissue overgrowth of modified membranes was evaluated in vivo. It was stated that pressure application during membrane modification by silikonization allow to decrease the diffusive transport through the membrane for large solutes without diminishing the diffusive permeability for small solutes. All the modified membranes allowed to avoid tissue overgrowth during 6 month implantation into mouse. Evaluated membranes with encapsulated cells within may be applied as the systems for production of biologically active substances.