

ФІЗИЧНАЯ ХІМІЯ
PHYSICAL CHEMISTRY

УДК 544.778.3+66.084.8+621.318.134+66.095.39
<https://doi.org/10.29235/1561-8331-2020-56-4-391-398>

Поступила в редакцию 05.08.2020
Received 05.08.2020

К. В. Лазнев, В. Е. Агабеков

Институт химии новых материалов Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

**МИКРОСФЕРЫ ИЗ СШИТОГО ГЛУТАРАЛЬДЕГИДОМ ПОЛИВИНИЛОВОГО СПИРТА
ДЛЯ ИММУНОМАГНИТНОЙ СЕПАРАЦИИ КЛЕТОК**

Аннотация. Установлено, что эмульгируемость водных растворов NaCl и CaCl₂ в изооктане с добавками Span 85 и Tween 85 зависит от концентрации солей и от природы катиона, при этом Ca²⁺ эффективнее стабилизирует эмульсию, чем Na⁺. При смешивании растворов 275 г/л глутаральдегида и 1М CaCl₂ в воде и 2,8 %_m Span 85 и 1,5 %_m Tween 85 в изооктане с последующим ультразвуковым диспергированием смеси получена эмульсия с мутностью ≤20 ЕМФ, которая была применена в качестве сшивающего агента для формирования микросфер из взвешенных в изооктане микрокапель магнитных жидкостей, содержащих поливиниловый спирт и наночастицы магнетита. Синтезированные магнитные микросферы модифицированы авидином и использованы для иммуномагнитной сепарации клеток.

Ключевые слова: микросферы, эмульсии, поливиниловый спирт, глутаральдегид, иммуномагнитная сепарация

Для цитирования. Лазнев, К. В. Микросферы из сшитого глутаральдегидом поливинилового спирта для иммуномагнитной сепарации клеток / К. В. Лазнев, В. Е. Агабеков // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. хим. наук. – 2020. – Т. 56, № 4. – С. 391–398. <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2020-56-4-391-398>

K. V. Laznev, V. E. Agabekov

Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Science of Belarus, Minsk, Belarus

**MICROSPHERES MADE OF POLYVINYL ALCOHOL CROSSLINKED WITH GLUTARALDEHYDE
FOR IMMUNOMAGNETIC CELL SEPARATION**

Abstract. Emulsification of water solutions of NaCl and CaCl₂ in iso-octane with Span 85 and Tween 85 additives was found to depend on the salt content and the cation nature, Ca²⁺ being more effective stabilizer than Na⁺. When the solutions of 275 g/l glutaraldehyde with 1M CaCl₂ in water and 2.8 %_m Span 85 with 1.5 %_m Tween 85 in iso-octane were mixed and sonicated, the transparent emulsion (turbidity ≤20 FNU) was acquired. It was used as a crosslinking agent to synthesize microspheres from magnetic fluids containing polyvinyl alcohol and magnetite nanoparticles dispersed as microdroplets in iso-octane. The microspheres were modified with avidin and used for immunomagnetic separation of cells.

Keywords: microspheres, emulsions, polyvinyl alcohol, glutaraldehyde, immunomagnetic separation

For citation. Laznev K. V., Agabekov V. E. Microspheres made of polyvinyl alcohol crosslinked with glutaraldehyde for immunomagnetic cell separation. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical Series*, 2020, vol. 56, no. 4, pp. 391–398 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2020-56-4-391-398>.

Введение. Иммуномагнитная сепарация (ИМС) широко применяется в медицине, биологии и биотехнологии, в частности, для разделения клеток с различным антигенным составом поверхности (фенотипом). С помощью ИМС обнаруживают циркулирующие опухолевые клетки в крови [1], разделяют популяции лейкоцитов [2], получают культуры стволовых клеток, а также очищают трансплантируемый материал от лейкоцитов для регенеративной медицины и тканевой инженерии [1, 2]. Производительность процедуры ИМС достигает более 10¹⁰ клеток в час, а чистота выделенных популяций составляет более 95 % [1].

ИМС основана на селективном связывании магнитных частиц (МЧ) с целевыми объектами (объектами-мишенями), которыми могут быть биологические молекулы, клетки, органеллы, микроорганизмы, вирусы [1–3]. Селективность обеспечивается аффинным межмолекулярным взаимодействием, обычно между антителом на поверхности МЧ и антигеном мишени [1–3]. После инкубации МЧ вместе со связавшими их объектами улавливаются магнитом, а супернатант удаляется [3].

Для ИМС чаще применяются композитные МЧ размером от 50 нм [2, 3], а также магнитные микросферы (ММС) размером от долей микрона до 10 мкм [1–3], которые содержат магнитные наночастицы в полимерной матрице, покрытой оболочкой из гидрофильных нейтральных полимеров, таких как полиэтиленгликоль (ПЭГ) [2], поливиниловый спирт (ПВС), декстран. Поверхность ММС для иммуномагнитной сепарации модифицирована аффинными биомолекулами [1–3].

Требованием к магнитным наночастицам, применяемым в составе микросфер для ИМС, является суперпарамагнетизм, т. е. высокая магнитная восприимчивость и отсутствие заметной остаточной намагниченности. Такими свойствами обладают, в частности, магнетит $\text{FeO}\cdot\text{Fe}_2\text{O}_3$ и маггемит $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ в форме наночастиц размером до 15 нм [4].

В качестве полимерной матрицы используют полистирол [2–4], полиакриламид [4], полиметакрилаты [4], целлюлозу [2, 3], агарозу [2, 3], альгиновую кислоту [4–6], ПВС [2] и другие полимеры [4]. Одним из способов получения микросфер является желирование глутаральдегидом микрокапель растворов хитозана и/или ПВС в эмульсиях [7, 8]. Глутаральдегид эффективно сшивает полиамины и некоторые полиспирты, такие как ПВС [9, 10]. Для инактивации непрореагировавших при сшивке карбонильных групп применяют боргидрид натрия [9]. В случае сшитых полиаминов боргидрид обеспечивает также восстановление оснований Шиффа до аминов, в результате чего полимерная матрица становится более устойчивой к гидролизу [9]. Образующаяся в реакции борная кислота служит дополнительным сшивающим агентом по отношению к ПВС [11]. В неполярную дисперсионную среду глутаральдегид обычно вносят в виде раствора в толуоле [7, 8, 12]. В качестве дисперсионной среды для получения эмульсий водных растворов полимеров применяется, в частности, раствор Span 85 и Tween 85 в изооктане [5, 6].

Гидрофильная оболочка необходима для предотвращения агрегации микросфер в водной среде и для минимизации неспецифического связывания их с биологическими объектами [2]. Для ковалентной иммобилизации лигандов, ответственных за селективность связывания, в состав оболочки вводятся реакционно активные группы: карбоксильные, аминные, тиольные или эпоксидные [9]. Количество заряженных групп не должно быть избыточным во избежание потери оболочкой способности блокировать неспецифическую адгезию клеток, причем карбоксильные группы меньше способствуют адгезии, чем аминокгруппы [15].

В качестве аффинных молекул на поверхности ММС, как правило, иммобилизуют антитела, либо связывающие биотин белки (авидин, стрептавидин), которые обеспечивают иммобилизацию биотинилированных антител [1, 3]. Применение вторичных антител или биотинсвязывающих белков позволяет использовать одни и те же ММС для сепарации клеток с разным антигенным составом поверхности.

Распространенным способом иммобилизации белков на поверхности полимера, содержащего карбоксильные группы, является ее обработка N-замещенными карбодиимидами, например 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимидом (EDC). Получаемые при этом активные интермедиаты реагируют с аминами белков [1, 9]. Для стабилизации интермедиатов применяют N-гидроксисукцинимид (NHS), это позволяет осуществить иммобилизацию в две стадии: активация частиц и их инкубация в растворе белка после отмывки от EDC и NHS [9]. При этом EDC не реагирует с карбоксильными группами белка и не вызывает кластеризации его молекул, как это происходит при одностадийной иммобилизации, когда белок и EDC присутствуют в среде одновременно [9].

Цель данной работы – получение микросфер на основе сшитого глутаральдегидом ПВС, содержащих наночастицы магнетита и модифицированных авидином для иммуномагнитной сепарации клеток.

Для этого необходимо было изучить влияние концентрации солей в водных растворах, содержащих глутаральдегид, на их диспергируемость в изооктане с добавками Span 85 и Tween 85. Ранее нами были разработаны методики получения суперпарамагнитных наночастиц магнетита [16], магнитных жидкостей, содержащих магнетит и гидрофильные полимеры [17], эмульсий растворов гидрофильных полимеров с узким распределением микрокапель по размеру [18], а также изучено влияние состава оболочки ММС на их неспецифическое связывание с лейкоцитами [19].

Экспериментальная часть. Массовое соотношение Span 85 и Tween 85 в дисперсионной среде составляло 1,9:1,0 [5, 6], а содержание Span 85 от 1,4 до 2,8 %_m. Для эмульгирования водных растворов солей и глутаральдегида применяли погружной ультразвуковой диспергатор (22 кГц, 100 Вт). Мутность оценивали через 2 мин после приготовления эмульсий по боковому светорассеянию на спектрофлуориметре Solar CM 2203 (Беларусь) или визуально, сравнивая со стандартом 20 единиц мутности формазина (ЕМФ).

Суперпарамагнитные наночастицы магнетита, имеющие средний размер 10–15 нм, и поливинилспиртовые ММС получали согласно методике [16]. Микросферы покрывали слоем ПВС [19]. Использовали ПВС, динамическая вязкость 4 %-ного водного раствора которого составляет 10–12 мПа·с, а массовая доля ацетатных групп – 1,1–1,9 %. ММС обрабатывали раствором 40 г/л перекиси водорода в дистиллированной воде или 10 %_v уксусной кислоте. Завершающим этапом синтеза микросфер были два цикла обработки NaBH_4 10 мг/мл в буфере NaCl 0,5М, NaP_i 0,2М, рН 9, 20 мин при 60 °С, после первого цикла ММС обрабатывали УЗ 22 кГц 50 Вт в течение 15 с. Дзета-потенциал ММС определяли на приборе Malvern ZetaSizer Nano-ZS (Великобритания).

Влияние условий обработки микросфер реактивами EDC и NHS на иммобилизацию авидина изучали на коммерческих (MagnosphereTM 300 Carboxyl) и поливинилспиртовых микросферах. Иммобилизацию проводили двумя способами: одностадийным, когда микросферы обрабатывали раствором EDC 20 г/л и авидина 250 мг/л в 0,1 М (рН 6) буфере 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты (MES) в течение 2,5 ч; двухстадийным, при котором микросферы обрабатывали раствором EDC 20 г/л и NHS 10 г/л в MES-буфере в течение 15 мин, дважды отмывали, инкубировали 2,5 ч в MES-буфере, содержащем 250 мг/л авидина.

После инкубации с авидином микросферы трижды отмывали 0,15М (рН 7,4) фосфатно-солевым буфером (ФСБ) с добавкой 5 г/л бычьего сывороточного альбумина (БСА) и обрабатывали раствором биотин-4-флуоресцеина 1 мг/л в ФСБ для флуоресцентного мечения иммобилизованного авидина. Флуоресценцию метки исследовали в камере Горяева на оптическом микроскопе «Планар Микро МБ» [16], сравнивая с флуоресценцией микросфер, не модифицированных авидином и обработанных таким же раствором биотин-4-флуоресцеина. Яркость изображений микросфер на микрофотографиях количественно определяли с помощью программного обеспечения ImageJ [20]. Статистическую обработку данных проводили в Microsoft Excel.

Магнитную сепарацию лимфоцитов CD8⁺ из суспензии мононуклеаров периферической крови (МПК) осуществляли в сепарационной среде, которая представляла собой ФСБ с добавками 5,0 г/л БСА и 2,0 мМ этилендиаминтетраацетата натрия. ММС инкубировали 15 мин с биотинилированными антителами анти-CD8, взятыми в количестве 2,00 или 6,25, или 12,50 мкг на 10⁹ микросфер, после чего трижды отмывали. ММС, «нагруженные» анти-CD8, смешивали с клетками в соотношении 10:1, инкубировали 20 мин, осторожно перемешивая каждые 5 мин, и осаждали на магните. В исходной суспензии и супернатантах клетки окрашивали мечеными фикоэритрином антителами CD8 и на проточном цитофлуориметре Beckman Coulter FC500 (США) исследовали их распределение по размеру и интенсивности флуоресценции фикоэритрина, различая популяции с низкой, средней (интенсивность флуоресценции $\geq 1 \cdot 10^3$ у.е.) и высокой (интенсивность флуоресценции $\geq 2 \cdot 10^4$ у.е.) экспрессией CD8.

Жизнеспособность клеток определяли по окрашиванию ядер флуорохромами Hoechst-33342 и иодистый пропидий. Специфичность сепарации рассчитывали как отношение количества клеток CD8⁺ к общему количеству клеток в выделенной суспензии. Выход целевой популяции определяли как соотношение количеств CD8⁺ в выделенной суспензии и в исходной суспензии. Удаление целевой популяции из 1-го супернатанта вычисляли путем деления разности между долями CD8⁺ в исходной суспензии и в 1-м супернатанте на долю CD8⁺ в исходной суспензии.

Результаты и их обсуждение. Эмульгируемость водных растворов CaCl_2 в изооктане с добавками Span 85 и Tween 85 при ультразвуковой обработке зависит от концентраций соли и ПАВ. Условия получения прозрачных эмульсий (<20 ЕМФ), стабильных в течение ≥ 2 мин, представлены в таблице.

Условия получения прозрачных эмульсий (<20 ЕМФ) водных растворов CaCl_2 в изооктане с добавками Span 85 и Tween 85

The conditions necessary to acquire transparent emulsions (< 20 FNU) of CaCl_2 water solutions in iso-octane with Span 85 and Tween 85 additives

CaCl_2 , М	Tween 85, % _m	Span 85, % _m	Минимальное объемное соотношение вода : изооктан
0,25	1,5	2,8	1 : 40
0,5	1,5	2,8	1 : 24
1	1,5	2,8	1 : 15
1	0,75	1,4	1 : 21

Прозрачную эмульсию водного раствора хлорида кальция в изооктане с добавками Span 85 и Tween 85 удастся получить уже при концентрации CaCl_2 0,1 М. Однако она мутнеет менее чем за минуту. Это свидетельствует о том, что электролиты влияют преимущественно на стабильность эмульсий, а не на дробление микрокапель (которое зависит от поверхностного натяжения на границе раздела фаз).

Одним из механизмов влияния электролитов на стабильность слоя ПАВ на границе раздела полярной и неполярной фаз является уменьшение гидратации полярных групп сурфактантов, приводящее к высаливанию амфифильных молекул из раствора [21]. Однако нами установлено, что дисперсность водных растворов солей в изооктане с добавками Span 85 и Tween 85 зависит не только от ионной силы эмульгируемого раствора, но и от природы катиона. Об этом свидетельствует, что наименьшее соотношение водной и изооктановой фаз, при котором образуется прозрачная эмульсия раствора соли в изооктане с добавками Span 85 2,8 %_m и Tween 85 1,5 %_m, составляет (приблизительно) 1:15 для 1М раствора CaCl_2 , 1:30 для 1М NaCl и 1:20 для 2М NaCl (в котором концентрация Cl^- такая же как в 1М CaCl_2).

Не исключено, что механизмом стабилизации ионами, особенно двухвалентными катионами, эмульсий водных растворов солей в изооктане с добавками Span 85 и Tween 85 является формирование обратных мицелл, в том числе заряженных [22], слой которых стабилизирует микрокапли аналогично слою твердых частиц в эмульсиях Пикеринга [4].

Раствор 275 г/л глутаральдегида и 1М CaCl_2 удается диспергировать до прозрачной эмульсии (<20 ЕМФ) в изооктане с добавками 1,5 %_m Tween 85 и 2,8 %_m Span 85 при соотношении водной и изооктановой фаз $\leq 1:12$. Отсутствие видимой опалесценции свидетельствует о том, что порядок размера капель водной фазы – несколько десятков нм [23]. При этом концентрация глутаральдегида в эмульсии достигает 21,2 г/л. Широко применяемый метод внесения глутаральдегида в виде раствора в толуоле не позволяет получать концентрации такого порядка [7, 8, 12]. Вносимое количество толуола составляет не более 19 % итогового объема неполярной фазы [7], что с учетом концентрации насыщенного раствора ГА в толуоле 33 г/л [12] соответствует конечной концентрации ГА не более 6,3 г/л.

Поливинилспиртовые микросферы, полученные эмульсионным способом при желировании глутаральдегидом микрокапель магнитной жидкости, содержащей 50 г/л ПВС и наночастицы магнетита, имели средний размер 3,3–5,1 мкм, индекс полидисперсности 0,08–0,10. Дзета-потенциал микросфер, обработанных перекисью водорода и боргидридом натрия, составлял от –3,35 до + 3,71 мВ.

Интенсивность флуоресценции (за вычетом контроля) меченных биотин-4-флуоресцеином микросфер после иммобилизации авидина двухстадийным способом на $90,0 \pm 2,0$ % больше, чем после иммобилизации одностадийным. В дальнейшем применялся двухстадийный способ.

На микросферах, обработанных перекисью водорода в 10 %_v уксусной кислоте (рН 2) и модифицированных авидином по двухстадийному способу, интенсивность флуоресценции (за вычетом

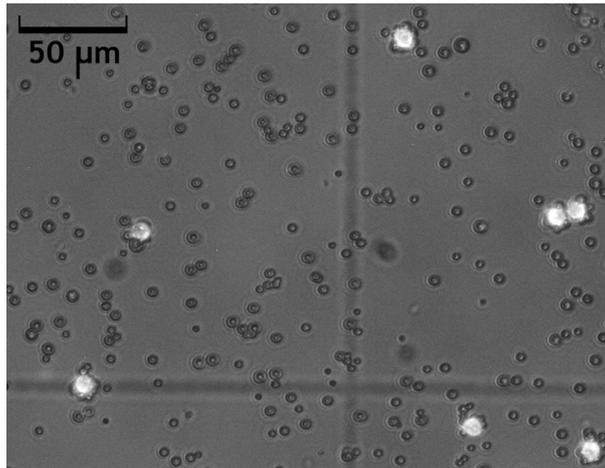


Рис. 1. Микрофотография ресуспендированного осадка после магнитной сепарации.
Клетки окрашены флуоресцентными антителами анти-CD8

Fig. 1. Microphotograph of the resuspended sediment after magnetic separation.
Cells are labeled with fluorescent anti-CD8 antibodies

контроля) биотин-4-флуоресцеина на $102,0 \pm 15,0$ % больше, чем на микросферах, модифицированных авидином без предварительной обработки H_2O_2 . По-видимому, это объясняется существенным увеличением количества карбоксильных групп на поверхности микросфер за счет конверсии карбонильных групп. При сравнении обработки микросфер перекисью водорода при pH 2 (в 10 %_v уксусной кислоте) и pH 5–6 установлено, что кислотность практически не влияет на последующую иммобилизацию авидина. Микросферы, несущие биотинилированные антитела, формируют вокруг клеток CD8⁺ характерные розетки (рис. 1).

ММС, обработанные 2,0 мкг анти-CD8 на 10^9 микросфер, извлекают из суспензии мононуклеаров только клетки с высокой экспрессией антигена (CD8^{high}), а обработанные 6,25 мкг анти-CD8 на 10^9 микросфер – также клетки с низкой экспрессией CD8 (рис. 2). Во втором случае специфичность сепарации составляла $94,2 \pm 4,5$ %, выход CD8⁺ – $84,8 \pm 11,0$ %, удаление CD8⁺ из 1-го супернатанта – $96,5 \pm 3,6$ %, жизнеспособность клеток в осадке – $97,9 \pm 2,3$ %. При сепарации микросферами, «нагруженными» из расчета 12,5 мкг анти-CD8 на 10^9 ММС, жизнеспособность клеток в осадке была $89,0 \pm 3,6$ %. При сепарации CD8⁺ из суспензии МНК с помощью коммерческих микросфер MagCelectTM Streptavidin Ferrofluid специфичность составляла $93,0 \pm 2,0$ %.

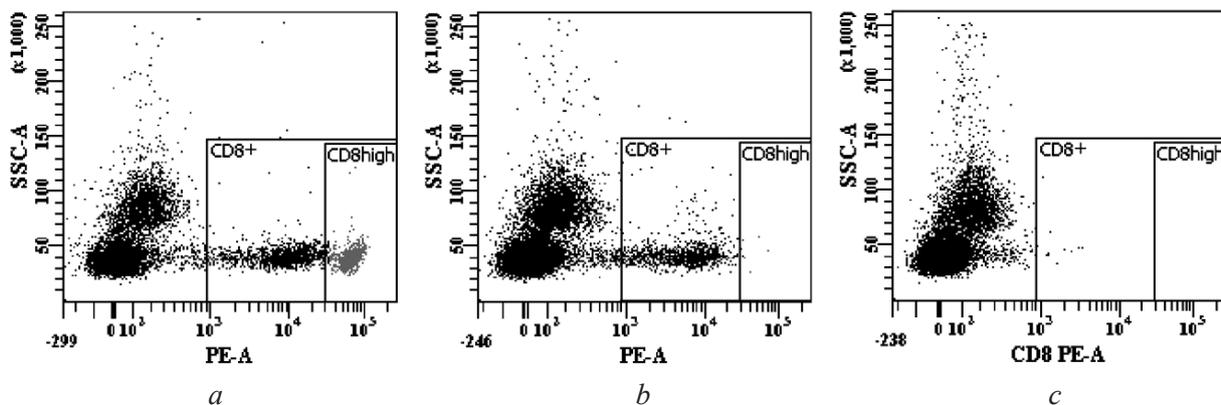


Рис. 2. Данные проточной цитофлуориметрии: *a* – исходной суспензии МНК; *b* – супернатанта после магнитной сепарации (2,0 мкг анти-CD8 на 10^9 микросфер); *c* – супернатанта после магнитной сепарации (6,25 мкг анти-CD8 на 10^9 микросфер)

Fig. 2. Flow cytometry data: *a* – genuine sample; *b* – supernatant after magnetic separation (2.0 μg of anti-CD8 per 10^9 microspheres); *c* – supernatant after magnetic separation (6.25 μg of anti-CD8 per 10^9 microspheres)

Заклучение. Получены микросферы на основе сшитого глутаральдегидом ПВС, содержащие наночастицы магнетита. Присутствие 1М CaCl₂ в растворе глутаральдегида, диспергируемом в изооктане с добавками Span 85 2,8 %_м и Tween 85 1,5 %_м, позволяет получать практически прозрачные эмульсии (мутность ≤20 ЕМФ) с содержанием глутаральдегида до 21,2 г/л, что многократно превышает концентрации, достигаемые путем внесения в изооктан насыщенного раствора глутаральдегида в толуоле. Стабильность прозрачных эмульсий в среде изооктан/Tween 85/Span 85 зависит от концентрации электролитов в эмульгируемом растворе и от природы катиона: Ca²⁺ более эффективный стабилизатор, чем Na⁺. Конъюгированные с авидином с помощью EDC и NHS поливинилспиртовые микросферы пригодны для магнитной сепарации клеток, обеспечивая специфичность, сопоставимую с коммерческими микросферами. При двухстадийном способе сепарации с применением микросфер, различающихся поверхностной плотностью иммобилизации антител, возможно разделение популяций клеток с высокой и низкой экспрессией одного и того же антигена.

Список использованных источников

1. Plouffe, B. D. Fundamentals and application of magnetic particles in cell isolation and enrichment / B. D. Plouffe, S. K. Murthy, L. H. Lewis // *Rep. Prog. Phys.* – 2015. – Vol. 78, N 1. – Article 016601. <https://doi.org/10.1088/0034-4885/78/1/016601>
2. Safarikova, M. The application of magnetic techniques in biosciences / M. Safarikova, I. Safarik // *Magnetic and Electrical Separation.* – 2001. – Vol. 10, N. 4. – P. 223–252. <https://doi.org/10.1155/2001/57434>
3. Safarik, I. Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides / I. Safarik, M. Safarikova // *Biomagn. Res. Technol.* – 2004. – Vol. 2, N. 1. – Article 7. <https://doi.org/10.1186/1477-044X-2-7>
4. Magnetic polymer beads: recent trends and developments in synthetic design and applications / O. Philippova [et al.] // *European Polymer Journal.* – 2011. – Vol. 47, N. 4. – P. 542–559. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2010.11.006>
5. Synthesis, characterization, and application of composite alginate microspheres with magnetic and fluorescent functionalities / J. Liu [et al.] // *Journal of Applied Polymer Science.* – 2009. – Vol. 113, N. 6. – P. 4042–4051. <https://doi.org/10.1002/app.30487>
6. Brown, J. Q. Encapsulation of glucose oxidase and an oxygen-quenched fluorophore in polyelectrolyte-coated calcium alginate microspheres as optical glucose sensor systems / J. Q. Brown, R. Srivastava, M. J. McShane // *Biosensors and Bioelectronics.* – 2005. – Vol. 21, N. 1. – P. 212–216. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2004.08.020>
7. Formulation and evaluation of glutaraldehyde-crosslinked chitosan microparticles for the delivery of ibuprofen / K. C. Ofokansi [et al.] // *Tropical Journal of Pharmaceutical Research February.* – 2013. – Vol. 12, N 1. – P. 19–25. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v12i1.4>
8. Campos, E. An improved method for preparing glutaraldehyde cross-linked chitosan–poly(vinyl alcohol) microparticles / E. Campos, P. Coimbra, M. H. Gil // *Polym. Bull.* – 2013. – Vol. 70, N. 2. – P. 549–561. <https://doi.org/10.1007/s00289-012-0853-4>
9. Hermanson, G. T. *Bioconjugate techniques* / G. T. Hermanson. – 2nd edition. – Elsevier, 2008. – 1202 p. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370501-3.X0001-X>
10. FTIR spectroscopy characterization of poly (vinyl alcohol) hydrogel with different hydrolysis degree and chemically crosslinked with glutaraldehyde / H. S. Mansur [et al.] // *Materials Science and Engineering: C.* – 2008. – Vol. 28, N 4. – P. 539–548. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2007.10.088>
11. Complex of polyvinyl alcohol with boric acid: Structure and use / Yu. Prosanov [et al.] // *Materialstoday communications.* – 2018. – Vol. 14. – P. 77–81. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2017.12.012>
12. Characterization and release kinetics of red ginger oleoresin encapsulation based on the effect of glutaraldehyde concentration as crosslinking agent / Jayanudin [et al.] // *Res. J. Chem. Environ.* – 2019. – Vol. 23, N 3. – P. 15–25.
13. Salmaso, S. Stealth properties to improve therapeutic efficacy of drug nanocarriers / S. Salmaso, P. Caliceti // *J. Drug Deliv.* – 2013. – Vol. 2013. – Article 374252. <https://doi.org/10.1155/2013/374252>
14. A biotechnological perspective on the application of iron oxide magnetic colloids modified with polysaccharides / A. M. G. C. Dias [et al.] // *Biotechnology Advances.* – 2011. – Vol. 29, N. 1. – P. 142–155. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.10.003>
15. Self-assembled monolayers with different terminating groups as model substrates for cell adhesion studies / N. Faucheux [et al.] // *Biomaterials.* – 2004. – Vol. 25, N. 14. – P. 2721–2730.
16. Поливинилспиртовые магнитные микросферы, содержащие 2-аминопиримидин-бис-этен-бис-диалкилфениламины в качестве флуоресцентных индикаторов pH / К. В. Лазнев [и др.] // *Докл. Нац. акад. наук Беларуси.* – 2018. – Т. 62, № 5. – С. 563–568. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2018-62-5-563-568>
17. Лазнев, К. В. Получение и свойства магнитных микросфер на основе гидрофильных полимеров / К. В. Лазнев, Е. Е. Шумская, В. Е. Агабеков // *Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. хім. навук.* – 2020. – Т. 56, № 2. – С. 135–142. <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2020-56-2-135-142>
18. Кутузов, М. Д. Влияние параметров эмульгирования на размер капель и полидисперсность эмульсии раствора высокомолекулярного хитозана / М. Д.Кутузов, К. В. Лазнев, М. Ю. Рощина // *Молодежь в науке–2016: материалы XIII междунар. науч. конф. молодых ученых.* – Минск. 2016. – Т. 2. – С. 388–393.

19. Лазнев, К. В. Связывание гелевых магнитных микросфер с мононуклеарными клетками крови / К. В. Лазнев, В. Е. Агабеков // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2016. – Т. 60, № 2. – С. 67–72.
20. Image J: Image processing and analysis in Java [Electronic resource]. – Mode of access: <https://imagej.nih.gov/ij>. – Date of access: 31.07.2020.
21. Lu, D. Nonideality in mixed monolayers of sorbitan oleates is enhanced by elevated ionic strength / D. Lu, D. J. Burgess, D. G. Rhodes // *Langmuir*. – 2000. – Vol. 16, N. 26. – P. 10329–10333. <https://doi.org/10.1021/la001058u>
22. Regulation of charged reverse micelles on particle charging in nonpolar media / H. Cao [et al.] // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2013. – Vol. 15, N. 29. – P. 12227–12234. <https://doi.org/10.1039/C3CP51212F>
23. CO₂-responsive TX-100 emulsion for selective synthesis of 1D or 3D gold / J. Zhang [et al.] // *Soft Matter*. – 2010. – Vol. 6, N. 24. – P. 6200–6205. <https://doi.org/10.1039/c0sm00063a>

References

1. Plouffe B. D., Murthy S. K., Lewis L. H. Fundamentals and application of magnetic particles in cell isolation and enrichment: a review. *Reports on Progress in Physics*, 2015, vol. 78, no. 1, p. 016601. <https://doi.org/10.1088/0034-4885/78/1/016601>
2. Safarikova M., Safarik I. The application of magnetic techniques in biosciences. *Magnetic and Electrical Separation*, 2001, vol. 10, no. 4, pp. 223–252. <https://doi.org/10.1155/2001/57434>
3. Safarik I., Safarikova M. Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides. *BioMagnetic Research and Technology*, 2004, vol. 2, no. 1, article 7. <https://doi.org/10.1186/1477-044X-2-7>
4. Philippova O., Barabanova A., Molchanov V., Khokhlov A. Magnetic polymer beads: recent trends and developments in synthetic design and applications. *European Polymer Journal*, 2011, vol. 47, no. 4, pp. 542–559. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2010.11.006>
5. Liu J., Zhang Y., Yang T. Ge Y., Zhang S., Chen Z., Ning G. Synthesis, characterization, and application of composite alginate microspheres with magnetic and fluorescent functionalities. *Journal of Applied Polymer Science*, 2009, vol. 113, no. 6, pp. 4042–4051. <https://doi.org/10.1002/app.30487>
6. Brown J.Q., Srivastava R., McShane M.J. Encapsulation of glucose oxidase and an oxygen-quenched fluorophore in polyelectrolyte-coated calcium alginate microspheres as optical glucose sensor systems. *Biosensors and Bioelectronics*, 2005, vol. 21, no. 1, pp. 212–216. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2004.08.020>
7. Ofokansi K. C., Kenekwaku F. C., Isah A. B., Okigbo E. L. Formulation and evaluation of glutaraldehyde-crosslinked chitosan microparticles for the delivery of ibuprofen. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research February*, 2013, vol. 12, no. 1, pp. 19–25. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v12i1.4>
8. Campos E., Coimbra P., Gil M. H. An improved method for preparing glutaraldehyde cross-linked chitosan–poly(vinyl alcohol) microparticles. *Polymer Bulletin*, 2013, vol. 70, no. 2, pp. 549–561. <https://doi.org/10.1007/s00289-012-0853-4>
9. Hermanson G.T. *Bioconjugate techniques*. 2nd ed. Elsevier, 2008. 1202 p. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370501-3.X0001-X>
10. Mansur H. S., Sadahira C. M., Souza A. N., Mansur A. A. P. FTIR spectroscopy characterization of poly (vinyl alcohol) hydrogel with different hydrolysis degree and chemically crosslinked with glutaraldehyde. *Materials Science and Engineering: C*, 2008, vol. 28 no. 4, pp. 539–548. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2007.10.088>
11. Prosanov I. Yu., Abdulrahman S. T., Thomas S., Bulina N. V., Gerasimov K. B. Complex of polyvinyl alcohol with boric acid: structure and use. *Materials today communications*, 2018, vol. 14, pp. 77–81. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2017.12.012>
12. Jayanudin, Fahrurrozi M., Wirawan S. K., Rochmadi. Characterization and release kinetics of red ginger oleoresin encapsulation based on the effect of glutaraldehyde concentration as crosslinking agent. *Research Journal of Chemistry and Environment*, 2019, vol. 23, no. 3, pp. 15–25.
13. Salmaso S., Caliceti P. Stealth properties to improve therapeutic efficacy of drug nanocarriers. *Journal of Drug Delivery*, 2013, vol. 2013, article 374252. <https://doi.org/10.1155/2013/374252>
14. Dias A. M. G. C., Hussain A., Marcos A. S., Roque A. C. A. A biotechnological perspective on the application of iron oxide magnetic colloids modified with polysaccharides. *Biotechnology Advances*, 2011, vol. 29, no. 1, pp. 142–155. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.10.003>
15. Fauchoux N., Schweiss R., Lutzow K., Werner C., Groth T. Self-assembled monolayers with different terminating groups as model substrates for cell adhesion studie. *Biomaterials*, 2004, vol. 25, no., 14, p. 2721–2730.
16. Laznev K. V., Ignatovich Zh. V., Kukhta I. N., Agabekov V. E. Polyvinyl alcohol magnetic microspheres containing 2-aminopyrimidin-bis(ethene)-bis(dialkylphenylamine) compounds as fluorescent pH indicators. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2018, vol. 62, no. 5, pp. 563–568 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2018-62-5-563-568>
17. Laznev K. V., Shumskaya Ye.Y., Agabekov V. E. Synthesis and properties of magnetic microspheres based on magnetite and hydrophilic polymers. *Vesti Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical series*, 2020, vol. 56, no. 2, pp. 135–142 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2020-56-2-135-142>
18. Kutuzov M. D., Laznev K. V., Roschina M. U. Influence of emulsification parameters on droplet size and polydispersity of emulsion of high molecular weight chitosan solution. *Molodezh' v nauke–2016: materialy XIII mezhdunar. nauch. konf. molodykh uchennykh* [Youth in Science. Proc. 13th. Int. Conf. of Young Scientists]. Minsk, 2016, vol. 2, pp. 388–393 (in Russian).

19. Laznev K. V., Agabekov V. E. Binding of magnetic gel microspheres to blood mononuclear cells. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2016, vol. 60, no 2, pp. 67–72 (in Russian).

20. *Image J: Image processing and analysis in Java*. Available at: <https://imagej.nih.gov/ij/> (accessed 25 February 2020).

21. Lu D., Burgess D. J., Rhodes D. G. Nonideality in mixed monolayers of sorbitan oleates is enhanced by elevated ionic strength. *Langmuir*, 2000, vol. 16, no. 26, pp. 10329–10333. <https://doi.org/10.1021/la001058u>

22. Cao H., Lu N., Ding B., Qi M. Regulation of charged reverse micelles on particle charging in nonpolar media. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2013, vol. 15, no. 29, pp. 12227–12234. <https://doi.org/10.1039/C3CP51212F>

23. Zhang J., Zhao Y., Li J., Yang G., Han B., Wu Zh., Li Zh. CO₂-responsive TX-100 emulsion for selective synthesis of 1D or 3D gold. *Soft Matter*, 2010, vol. 6, no. 24, pp. 6200–6205. <https://doi.org/10.1039/c0sm00063a>

Информация об авторах

Лазнев Константин Владимирович – науч. сотрудник. Институт химии новых материалов НАН Беларуси (ул. Ф. Скорины, 36, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: kvlaznev@mail.ru

Агабеков Владимир Енокович – академик, д-р хим. наук, профессор, директор Института химии новых материалов НАН Беларуси (ул. Ф. Скорины, 36, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: ichnm@ichnm.basnet.by

Information about the authors

Konstantin V. Laznev – Researcher. Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus (36, F. Skaryna Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kvlaznev@mail.ru

Vladimir Ye. Agabekov – Academician, D. Sc. (Chemistry), Professor, Director of the Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus (36, F. Skaryna Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ichnm@ichnm.basnet.by