

ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ИНСТИТУТ ХИМИИ НОВЫХ МАТЕРИАЛОВ
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ»

На правах рукописи

УДК 544.773.33:544.778.3:544.72.05:537.621.4

ЛАЗНЕВ

Константин Владимирович

**Микросферы на основе эмульсий и дисперсий гидрофильных полимеров
для иммуномагнитной сепарации**

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук
по специальности 02.00.11 – коллоидная химия

Научный руководитель
академик, доктор химических наук,
профессор Агабеков В.Е.

Минск, 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.....	5
ГЛАВА 1. ПРИМЕНЕНИЕ ЭМУЛЬСИЙ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ИММУНОМАГНИТНЫХ МИКРОСФЕР: АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	9
1.1 Эмульсионные способы получения полимерных и композитных микросфер	9
1.2 Применение эмульсий для получения магнитных микросфер на основе полимеров.....	16
1.3 Свойства и применение иммуномагнитных микросфер	18
1.4 Выводы к главе 1	28
ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	30
2.1 Получение магнитных наночастиц.....	30
2.2 Получение магнитных жидкостей	31
2.3 Получение эмульсий магнитных жидкостей.....	33
2.4 Вывод кинетических уравнений для массовой доли фракции капель дисперсной фазы эмульсии	35
2.5 Получение эмульсий сшивающих реагентов	37
2.6 Получение магнитных микросфер.....	38
2.7 Получение флуоресцентных магнитных микросфер.....	41
2.8 Модификации поверхности микросфер.....	43
2.9 Биологические испытания	46
2.10 Выводы к главе 2	48
ГЛАВА 3. ЭМУЛЬГИРОВАНИЕ МАГНИТНЫХ ЖИДКОСТЕЙ, ВОДНЫХ РАСТВОРОВ ГЛУТАРАЛЬДЕГИДА И ХЛОРИДОВ НАТРИЯ И КАЛЬЦИЯ В ИЗООКТАНЕ С ДОБАВКАМИ SPAN 85 И TWEEN 85.....	49
3.1 Влияние пипетирования на размер капель магнитной жидкости	49
3.2 Влияние скорости течения среды на кинетику дробления капель.....	52
3.3 Влияние концентраций CaCl_2 и NaCl на агрегативную устойчивость наноэмульсий их водных растворов	55
3.4 Использование CaCl_2 для стабилизации эмульсий водных растворов глутаральдегида.....	56
3.5 Выводы к главе 3	57
ГЛАВА 4. СВОЙСТВА МАГНИТНЫХ МИКРОСФЕР И МОДИФИКАЦИЯ ИХ ПОВЕРХНОСТИ ДЛЯ ИММУНОМАГНИТНОЙ СЕПАРАЦИИ КЛЕТОК.....	58
4.1 Микросферы на основе альгиновой кислоты и пектина	58

4.2	Микросферы на основе желатина, хитозана и поливинилового спирта..	61
4.3	Модификация поверхности микросфер для иммуномагнитной сепарации клеток.....	67
4.4	Выводы к главе 4	71
ГЛАВА 5. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ПОЛУЧЕННЫХ МАГНИТНЫХ МИКРОСФЕР.....		73
5.1	Имуномагнитная сепарация лейкоцитов	73
5.2	Определение рН среды.....	75
5.3	Оценка фагоцитарной активности нейтрофилов	78
5.4	Обеспечение зазоров в жидкокристаллических ячейках	80
5.5	Выводы к главе 5	80
ЗАКЛЮЧЕНИЕ		82
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК		85
ПРИЛОЖЕНИЕ А. Лабораторный технологический регламент на получение опытной партии поливинилспиртовых магнитных микросфер, модифицированных дрожжевым лизатом		100
ПРИЛОЖЕНИЕ Б. Акты клинических испытаний магнитных микросфер «МСС-4.12-avidin», ТУ ВУ 100289145.020		113
ПРИЛОЖЕНИЕ В. Регистрационное удостоверение Министерства здравоохранения Республики Беларусь на изделие медицинского назначения «Микросферы магнитные МСС-4.12-avidin, ТУ ВУ 100289145.020»		116
ПРИЛОЖЕНИЕ Г. Справка о реализации опытных партий магнитных микросфер		117
ПРИЛОЖЕНИЕ Д. Письмо УП «Дисплей» (Минск) о результатах испытаний микросфер ТУ ВУ 100289145.020		118

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- АПМ – 4,4'-(1E,1'E)-2,2'-(2-аминопиримидин-4,6-диил) бис(этен-2,1-диил) бис(N,N-диметилфениламин)
- АПЭ – 4,4'-(1E,1'E)-2,2'-(2-аминопиримидин-4,6-диил) бис(этен-2,1-диил) бис(N,N-диэтилфениламин)
- ГЛБ – гидрофильно-липофильный баланс
- ДС – дисперсионная среда
- ДФ – дисперсная фаза
- ЕМФ – единица мутности по формазину
- ИМС – иммуномагнитная сепарация
- ИПД – индекс полидисперсности
- ИФЛА – иммунофлуоресцентный анализ
- ККМ – критическая концентрация мицеллообразования
- КМД – карбоксиметилдекстран
- МЖ – магнитная жидкость
- ММС – магнитные микросферы
- МНЧ – магнитные наночастицы
- МОС – металлоорганические соединения
- МПК – моноклеары периферической крови
- МЧ – магнитные частицы
- ПАВ – поверхностно-активное вещество
- ПВС – поливиниловый спирт
- у.е. – условная единица
- УЗ – ультразвуковой
- ФИ – фагоцитарный индекс
- ФСБ – фосфатно-солевой буфер
- ФЧ – фагоцитарное число
- d_k – критический диаметр капли
- EDC – 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид
- $I_{фл.}$ – интенсивность флуоресценции
- IST – изооктан с добавками Span 85 и Tween 85
- m_m/m_n – массовое соотношение магнитных наночастиц и полимера в магнитной жидкости
- NHS – N-гидроксисукцинимид
- λ – длина волны

ВВЕДЕНИЕ

Эмульсионными способами получают микросферы различного состава, в том числе содержащие магнитные наночастицы, связанные с полимерной матрицей. Одним из применений таких микросфер является иммуномагнитная сепарация (ИМС), которая широко используется в биологии, биотехнологии, регенеративной медицине и лабораторной диагностике для концентрирования микроорганизмов, обнаружения циркулирующих опухолевых клеток и других редких клеточных популяций, получения стволовых клеток и очистки трансплантируемого материала от лейкоцитов. ИМС основана на селективном связывании магнитных носителей аффинных молекул (например, антител) с различными объектами: молекулами, клетками, органеллами, микроорганизмами и вирусами. В качестве магнитных носителей обычно применяются монодисперсные и квазимонодисперсные микросферы размером от долей микрона до 10 мкм, в которых наночастицы оксидов железа инкорпорированы в матрицу из полимеров, таких, как полистирол или полиметилметакрилат. Минимизация неспецифического связывания магнитных микросфер (ММС) с сепарируемыми объектами обеспечивается оболочкой из гидрофильных полимеров, таких, как декстран.

Для оптимизации эмульсионной технологии получения микросфер, применяемых в ИМС, а также увеличения их биосовместимости перспективно применение гидрофильных нетоксичных биodeградебельных полимеров в качестве материала не только оболочки, но и полимерной матрицы микросфер. Кроме того, модифицирование таких ММС полимерными оболочками и аффинными биомолекулами перспективно для их использования при иммуномагнитной сепарации лейкоцитов, а флуорохромами – для визуализации микросфер.

Микросферы для ИМС, как правило, характеризуются узким распределением по размеру. Для их получения методом «эмульсия/дисперсия» необходимо обеспечить малый индекс полидисперсности (ИПД) каплей дисперсной фазы, что, как правило, достигается эмульгированием с помощью микрогидродинамических устройств. Однако при эмульгировании магнитных жидкостей (МЖ) агрегаты магнитных частиц препятствуют прохождению капель через микроканалы, поэтому был разработан способ получения эмульсий МЖ с ИПД около 0,1 пипетированием.

Для увеличения стабильности эмульсий водных растворов глутаральдегида и хлорида кальция, обеспечивающих сшивку полимеров в составе МЖ, необходимо было установить влияние солевого состава дисперсной фазы на её коалесценцию в изооктане с добавками ПАВ Span 85 и Tween 85 – дисперсионной среде, широко применяемой при получении микросфер методом «эмульсия/дисперсия».

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с крупными научными программами (проектами) и темами. Работа выполнялась в рамках ГП «Инновационные биотехнологии», задание 8 «Создать иммуномагнитные наноматериалы и методы магнитной сепарации мезенхимальных стволовых клеток» (№ ГР 20102766, 2010-2012 гг.), ГНТП «Инфекции и микробиологические нанотехнологии», задание 02.12 «Разработать технологию получения функционально активных наночастиц и сконструировать тест-систему для выявления персистентных форм хламидийной инфекции» (№ ГР 20115361, 2011-2014 гг.), ГПНИ «Конвергенция-2020», задание 3.05 «Создание микрокомпозитов с лабильными флуорохромами и изучение изменений их флуоресценции при фагоцитозе» (№ ГР 20163613, 2016-2018 гг.).

Цель и задачи исследования. Цель – создание на основе магнитных наночастиц и гидрофильных полимеров микросфер, пригодных для иммуномагнитной сепарации лейкоцитов. Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- установить влияние условий и времени эмульгирования растворов хитозана, поливинилового спирта (ПВС), желатина, альгиновой кислоты, пектина в изооктане с добавками неионных ПАВ Span 85 и Tween 85 (IST) на размер капель дисперсной фазы эмульсий;
- изучить влияние концентраций CaCl_2 и NaCl , Span 85 и Tween 85 на стабильность эмульсий водных растворов хлоридов кальция и натрия, а также глутаральдегида в IST;
- синтезировать ММС путём ковалентной сшивки хитозана, ПВС и желатина глутаральдегидом, а также ионного желирования альгиновой кислоты и пектина хлоридом кальция, в водных растворах, эмульгированных в IST и содержащих магнитные наночастицы;
- изучить магнитную восприимчивость полученных микросфер и их стабильность при хранении в физиологическом растворе;
- установить влияние оболочек ММС из карбоксиметилдекстрана и ПВС на их неспецифическое связывание с лейкоцитами периферической крови;
- функционализовать ММС авидином и биотинилированными антителами анти-CD8 и анти-CD4 для магнитной сепарации лимфоцитов, дрожжевыми антигенами для магнитной сепарации нейтрофилов;
- модифицировать ММС флуорохромами для их визуальной идентификации и оценки pH среды.

Предмет исследования: закономерности формирования эмульсий водных растворов глутаральдегида, хлоридов кальция и натрия, хитозана, ПВС, желатина, альгиновой кислоты, пектина в IST; распределение по размеру, магнитная вос-

приимчивость, флуоресценция, специфическая и неспецифическая адгезия микросфер к клеткам.

Объекты исследования: эмульсии водных растворов хлоридов кальция и натрия, глутаральдегида, хитозана, ПВС, желатина, альгиновой кислоты, пектина в IST; микросферы, полученные из содержащих наночастицы магнетита водных растворов хитозана, ПВС, желатина, альгиновой кислоты, пектина.

Научная новизна и значимость полученных результатов. Установлены закономерности эмульгирования водных растворов хитозана, желатина и ПВС в IST в зависимости от условий пипетирования, что позволило получать эмульсии с заданным распределением капель дисперсной фазы (ДФ) по размеру. Выявлена линейная зависимость между ионной силой водных растворов хлорида натрия или кальция и их максимальной объёмной долей в стабильной эмульсии в IST, что делает целесообразным добавление хлорида кальция в водный раствор глутаральдегида, эмульгируемый в IST в качестве сшивающего агента для получения микросфер. Впервые получены иммуномагнитные микросферы на основе магнетита и сшитых глутаральдегидом хитозана и ПВС для сепарации лейкоцитов. Разработан новый способ оценки локального pH среды, основанный на регистрации соотношения красной и зелёной флуоресценции флуорохромов 4,4'-(1E,1'E)-2,2'-(2-аминопиримидин-4,6-диил) бис(этен-2,1-диил) бис(N,N-диметилфениламина) (АПМ) или 4,4'-(1E,1'E)-2,2'-(2-аминопиримидин-4,6-диил) бис(этен-2,1-диил) бис(N,N-диэтилфениламина) (АПЭ) в сшитых глутаральдегидом поливинилспиртовых микросферах.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту.

1. Закономерности эмульгирования водных растворов хитозана, желатина и ПВС в IST в зависимости от частоты пипетирования, скорости течения эмульсии через наконечник пипетки и доли объёма эмульсии, обрабатываемой за один цикл, установление которых позволило обеспечить заданный размер капель ДФ 2 – 20 мкм и индекс полидисперсности в интервале 0,1 – 0,2.

2. Увеличение агрегативной устойчивости эмульсий водных растворов глутаральдегида и хлоридов натрия и кальция в IST с ростом ионной силы ДФ, позволившее получить наноэмульсии с содержанием глутаральдегида до 21,2 г/л и разработать новый эмульсионный способ синтеза микросфер из магнетитсодержащих водных растворов хитозана, желатина и ПВС.

3. Модификация поверхности сшитых глутаральдегидом поливинилспиртовых ММС поливиниловым спиртом и пероксидом водорода, позволившая минимизировать неспецифическую и регулировать специфическую адгезию микросфер к лейкоцитам, что обеспечило магнитную сепарацию лимфоцитов CD8+ из суспензии мононуклеарных клеток крови с показателями: специфичность $94,2 \pm 4,5$ %, выход $84,8 \pm 11,0$ %, удаление из 1-го супернатанта $96,5 \pm 3,6$ %, жизнеспособность $97,9 \pm 2,3$ %.

4. Способ оценки локального рН среды, основанный на регистрации соотношения красной и зелёной флуоресценции рН-чувствительных флуорохромов АПМ и АПЭ в сшитых глутаральдегидом поливинилспиртовых микросферах.

Личный вклад соискателя: анализ литературных данных по теме диссертационной работы; выполнение экспериментов по получению микрофер, установлению их физико-химических характеристик, магнитной сепарации клеток и оценки рН среды. Постановка целей и задач исследования, планирование и обсуждение полученных результатов осуществлялось совместно с научным руководителем академиком, д.х.н., профессором В.Е. Агабековым. Исследования магнитных свойств микрофер выполнены совместно с н.с. Е.Е. Шумской. Биологические испытания проведены совместно с к.б.н. Ж.А. Ибрагимовой, к.б.н. Е.М. Ермоленко и к.б.н. С.Е. Семерихиной, клинические – с сотрудниками РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии, НИЛ БелМАПО и УЗ «9-я городская клиническая больница г. Минска».

Апробация результатов диссертации. Результаты представлены на 9th International Conference on the Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers (Миннеаполис, США, 2012), V научной конференции армянского химического общества (Ереван, Армения, 2017 г.), XIII международной научной конференции молодых учёных «Молодёжь в науке» (Минск, Беларусь, 2016).

Опубликованность результатов диссертации. Результаты опубликованы в 6 статьях в журналах, соответствующих Перечню научных изданий ВАК для опубликования результатов диссертационных исследований по отрасли химические науки, общим объемом 3,08 авторских листа, 2 статьях в сборниках научных трудов, 3 тезисах докладов конференций, 1 патенте РБ.

Структура и объём диссертации. Диссертация состоит из введения, аналитического обзора литературы, 4 экспериментальных глав, заключения, библиографического списка (177 наименований использованных источников и 12 наименований публикаций соискателя), 5 приложений. Полный объём диссертации 118 страниц, в том числе 84 страницы текста диссертации, 44 рисунка, 7 таблиц.

ГЛАВА 1

ПРИМЕНЕНИЕ ЭМУЛЬСИЙ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ИММУНОМАГНИТНЫХ МИКРОСФЕР: АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Микросферами называют сферические частицы размером от 100 мкм до 1 мм [1-3]. Применения полимерных и композитных (содержащих полимерную матрицу и разнородные включения) микросфер многообразны и включают аддитивные технологии [4-6], обеспечение зазоров в жидкокристаллических устройствах [7], создание пигментов [6], хроматографию [8], очистку вод от растворимых примесей [9, 10] и масел [9-11], стабилизацию эмульсий «масло в воде» [12] и «вода в масле» [13], доставку лекарств [1, 2, 9, 14, 15], инкапсулирование клеток для культивирования и трансплантации [9, 16], ферментный катализ [9], а также магнитную сепарацию биомолекул и более крупных объектов [9, 17-21].

1.1 Эмульсионные способы получения полимерных и композитных микросфер

Большинство способов получения полимерных и композитных микросфер основаны на применении эмульсий [2, 14, 15, 22]. Эти способы можно разделить на две группы: микросферы формируются либо в дисперсионной среде (ДС), либо в дисперсной фазе (ДФ).

В первом случае «строительные блоки», обычно мономеры, диффундируют из ДФ к растущим микросферам. Примером является бессурфактантная эмульсионная полимеризация (*soapless emulsion polymerization*), в результате которой получают монодисперсные полистироловые микросферы в смеси стирола и деионизированной воды, в которую добавлены водорастворимые инициаторы полимеризации и комомеры [23].

Во втором случае, как правило, из одной капли жидкой ДФ, содержащей «строительные блоки», формируется одна микросфера или микрокапсула (полая микросфера). Такой метод называется «эмульсия/дисперсия» [22]. «Строительными блоками» в данном методе могут служить как мономеры [14, 22, 24], так и полимеры [14, 22, 24]. Мономеры подвергают полимеризации: либо объёмной, когда инициатор внесён в фазу с мономером [22, 24], либо на поверхности раздела фаз, когда мономер и инициатор растворены в разных фазах [14]. Среди эмульсионных способов получения микросфер из готовых полимеров выделяют основанные на применении их расплавов [1, 2] и растворов [9, 14, 24-35]. В основе формирования твёрдой фазы в эмульгированных растворах полимеров лежат процес-

сы коагуляции [33-35], ионного желирования [24, 26-28] либо ковалентной перекрёстной сшивки [25, 29-32]. Сшивка важна для микросфер, эксплуатируемых в средах, являющихся растворителями для составляющих их полимеров, например, для применяемых в водной среде микросфер на основе полисахаридов [24, 25].

Коагуляционные способы получения микросфер в эмульсиях основаны на уменьшении ёмкости ДФ для растворённого в ней полимера, которое может быть достигнуто изменением состава ДФ, приводящим к уменьшению растворимости полимера (пример – получение микросфер из белка молочной сыворотки за счёт закисления ДФ [34]), либо изменением температуры (пример – терможелирование хитозана в присутствии дигидрофосфата, либо гидрокарбоната, либо β -глицерофосфата натрия в результате изменения протонного равновесия между полимером и солью при нагревании до 37 °С [35]), либо уменьшением объёма ДФ за счёт диффузии растворителя из неё в ДС. Последний способ, называемый эмульсионно-диффузионным [33], применяется наиболее часто, при этом различают его разновидности в зависимости от метода удаления растворителя из ДФ: экстракция или выпаривание. Для экстракции необходима достаточная ёмкость ДС для растворителя, составляющего основу ДФ. При выпаривании путём увеличения температуры и/или уменьшения давления добиваются удаления из эмульсии экстрагированного в ДС растворителя ДФ, что позволяет обойтись меньшим объёмом ДС. Условием выпаривания является бóльшая летучесть растворителя ДФ по сравнению с растворителем ДС [14]. В некоторых методиках коагуляции полимеров предшествует формирование коацерватов [14].

Ионное желирование (ионная перекрёстная сшивка) полимеров обеспечивается как взаимодействием поликатионов и полианионов, например, хитозана и альгиновой [28] или гиалуроновой кислоты [35], так и связыванием ионного полимера с низкомолекулярными ионами. Полианионы (например, альгиновая кислота и пектин) желируются катионами металлов, кроме одновалентных [22, 24, 36], а поликатионы (например, хитозан) – триполифосфат-анионами [35]. Как и в случае коагуляции, иногда ионному желированию предшествует коацервация [35]. Ионная сшивка двухвалентными катионами обратима: она нарушается, например, при вытеснении Ca^{2+} катионами Na^+ [24] и при добавлении хелатирующих агентов [24, 37]. Набухание и растворение микросфер на основе ионных полимеров может быть также рН- и термочувствительным [24].

В качестве реагентов для ковалентной сшивки гидрофильных полимеров применяют диальдегиды [29, 30], эпихлоргидрин [25], борную кислоту [24], диамины [24], полиэтиленимин [24]. Иногда для улучшения биосовместимости микросфер сшивку проводят природными вяжущими веществами: например, ванилином сшивают хитозан [38], а генипином – хитозан [31] и белки [32].

В эмульсии источником ионных или ковалентных сшивающих реагентов обычно служит ДС либо капли ДФ, не содержащие сшиваемого полимера (такое

возможно при смешивании эмульсий с разными составами ДФ). Реже сшиваемый полимер и сшивающий агент эмульгируются совместно. В таком случае процесс сшивки называют внутренним желированием независимо от того, находятся они в одной или разных фазах в составе ДФ [22]. Вариантом внутреннего желирования является сшивка полианионов двухвалентными катионами, высвобождаемыми при закислении среды из хелатов или других солей (например, CaCO_3), растворённых или присутствующих в ДФ в виде микрокристаллов [16, 22]. Другим вариантом внутреннего желирования является перекрёстная сшивка полимеров за счёт собственных реакционно активных групп: так получают микросферы из растворов белков при нагревании [14].

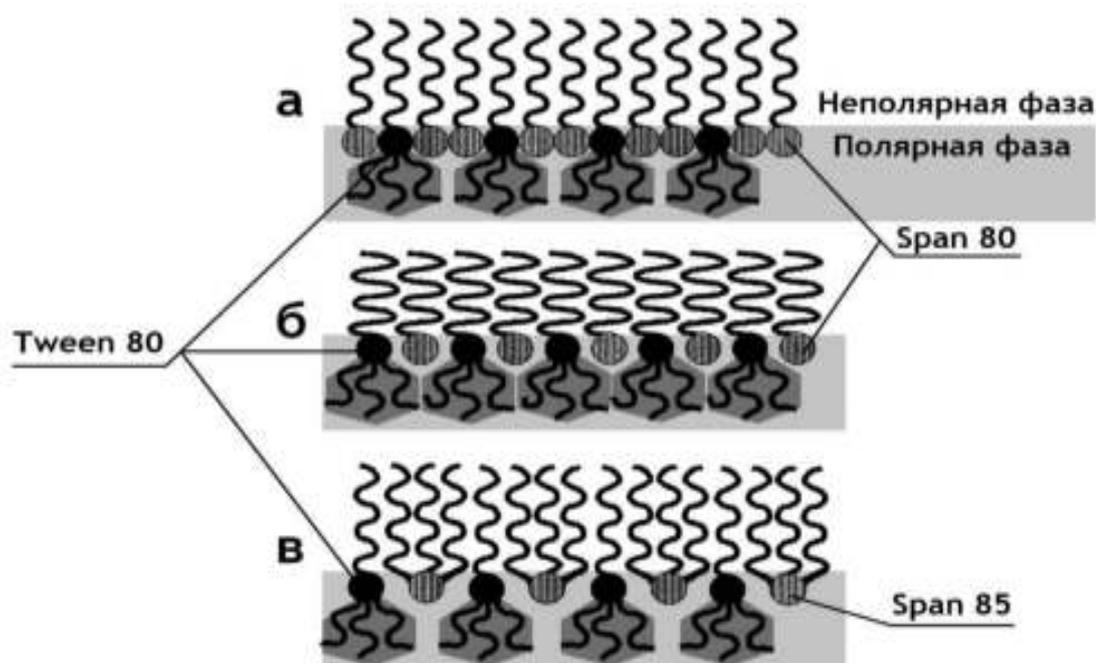
Кроме способов получения твёрдой фазы, разновидности метода «эмульсия/дисперсия» различаются также по типу применяемых эмульсий. Для формирования микросфер из гидрофобных «строительных блоков» используют эмульсии «масло в воде» [9, 24], а из гидрофильных, таких, как биополимеры – «вода в масле» [24-27, 29, 30, 33]. Кроме того, применяют двойные и более сложные эмульсии, например, «масло в воде в масле» [39] и «вода в масле в воде» [9, 14, 40] для получения микросфер сложной структуры.

Для синтеза микросфер применяют как эмульсии, стабилизированные с помощью поверхностно-активных веществ (ПАВ) [26, 27, 29], так и эмульсии Пикеринга, стабилизированные с помощью твёрдых коллоидных частиц [9, 11, 24, 39] либо их комбинаций с ПАВ [41].

При выборе ПАВ руководствуются шкалой гидрофильно-липофильного баланса (ГЛБ), предложенной У. Грифффином [42, 43]. Как правило, эмульсии «масло в воде» стабилизируются гидрофильными ПАВ (ГЛБ от 8), а «вода в масле» – гидрофобными (ГЛБ до 6) [44]. Из ПАВ с разными числами ГЛБ получают смеси с усреднённым числом [45], которые обычно стабилизируют эмульсию более эффективно, чем индивидуальные сурфактанты с таким же числом ГЛБ, обеспечивая меньшее поверхностное натяжение на границе раздела дисперсионной среды и дисперсной фазы [46]. Для стабилизации эмульсий «вода в масле» эффективны комбинации неионных ПАВ: гидрофобных группы Span и гидрофильных группы Tween [26, 27, 47], например, Span 85 (ГЛБ ≈ 2) и Tween 85 (ГЛБ 11) [26, 27]. Эффективная стабилизация достигается также применением комбинаций ПАВ, в которые кроме мицеллообразующих входят немиецеллообразующие (со-ПАВ), например, жирные спирты [24, 45]. Вместе с ионными ПАВ в качестве дополнительных стабилизаторов применяются противоположно заряженные полиэлектролиты [48]. Кроме электростатической и/или стерической стабилизации эмульсий [49, 50], ПАВ уменьшают поверхностное натяжение на границе раздела фаз, способствуя дроблению капель ДФ.

Строение и реологические свойства смешанного монослоя ПАВ зависят от соотношения размеров гидрофильных и гидрофобных частей молекул

(рисунок 1.1). Более плотная упаковка гидрофобных «хвостов» обеспечивает увеличение толщины монослоя и уменьшение поверхностного натяжения [50]. Если плотность молекул в монослое стерически ограничена размером полярных «головок» – то создаются условия для менее плотной упаковки «хвостов» и толщина монослоя уменьшается (рисунок 1.1, б). Этот эффект может быть компенсирован добавлением молекул с более объёмной гидрофобной частью, таких, как Span 85 (рисунок 1.1, в).



**а – Span 80 (67%) + Tween 80 (33%); б – Span 80 + Tween 80 (по 50%);
в – Span 85 + Tween 80 (по 50%)**

Рисунок 1.1 – Смешанный монослой гидрофильных и гидрофобных ПАВ [50]

На свойства слоя ПАВ влияет состав водной фазы, в частности, ионная сила. В случае неионных сурфактантов это влияние может реализовываться через высаливание гидрофильных ПАВ [51, 52] и уменьшение глубины погружения полярных частей молекул гидрофобных сурфактантов в водную фазу [51]. Поскольку гидрофобные ПАВ часто применяются в концентрациях выше критической концентрации мицеллообразования (ККМ), слой ПАВ на границе раздела фаз может существенно отличаться от классического монослоя [46] (рисунок 1.2), и в стабилизации могут принимать участие мицеллы, формирующие сплошной слой, подобно твёрдым частицам в эмульсиях Пикеринга. Влияние состава водной фазы на свойства эмульсий, стабилизированных Span 85 и Tween 85, взятыми в концентрациях выше ККМ, изучено недостаточно для применения результатов на практике и требует дальнейших исследований.

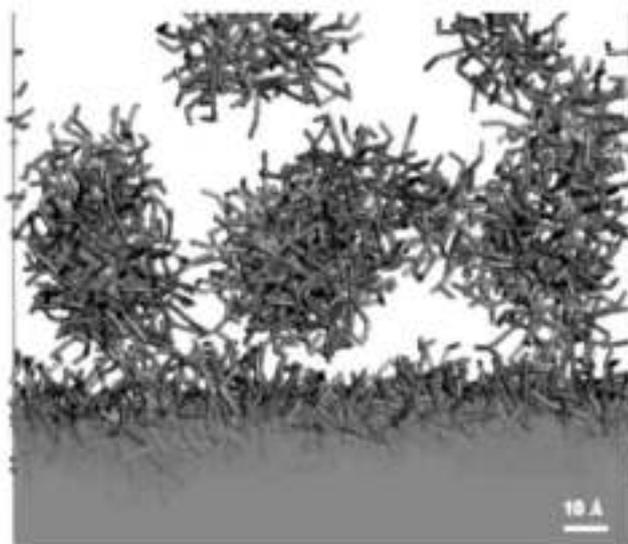


Рисунок 1.2 – Изображение границы между водой и додеканом с добавкой 1 % Span 20, полученное методом цифрового моделирования диссипативной динамики частиц [46]

В эмульсиях Пикеринга в качестве стабилизирующих частиц применяют зёрна гидроксиапатита [53], глины [53], SiO_2 , в том числе гидрофобизованного [39, 53], диатомита [11], магнитные наночастицы [24, 53], углеродные нанотрубки [53], частицы биополимеров (например, крахмала, декстрана, циклодекстрина, хитозана, белка молочной сыворотки, зеина, соевого белка) [9, 53], нановолокна целлюлозы [9], клетки микроорганизмов и споры [9, 53], полимерные [12] и биополимерные [13] микросферы. Эмульсии Пикеринга применяют как для получения микросфер способом «эмульсия/дисперсия» [53], так и для преобразования микросфер, формирующих стабилизирующий слой на поверхности раздела фаз, в так называемые янус-микросферы, то есть обладающие разным составом поверхности на противоположных полюсах. Для этого в состав одной из фаз вводят модифицирующий реагент либо разные реагенты вводят в разные фазы [53].

При механическом диспергировании на размер капель эмульсий и формируемых из них микросфер существенно влияет вязкость ДС, так, в менее вязких средах получают более мелкие микросферы [54]. В качестве дисперсионной среды при получении эмульсий «вода в масле», используемых для синтеза ММС из гидрофильных полимеров, часто применяют насыщенные углеводороды [26, 27, 29, 47], в том числе изооктан, которому свойственна химическая инертность, низкие вязкость и летучесть [26, 27, 47]. Чтобы увеличить стабильность эмульсий и уменьшить диффузию веществ из полярной фазы в неполярную, применяют насыщение неполярной фазы водой: например, интенсивно перемешивают содержащий ПАВ изооктан и воду в соотношении 9:1, затем капли воды удаляют цен-

трифугированием, а супернатант используют для приготовления эмульсий растворов целевых веществ [55].

Коммерческие микросферы, как правило, характеризуются узким распределением по размеру. В качестве численной характеристики распределения микросфер и других частиц по размеру применяют коэффициент вариации [56], вычисляемый по формуле (1.1), либо индекс полидисперсности [57, с. 374; 58], рассчитываемый согласно формуле (1.2), либо дисперсию [56, 59], определяемую по формуле (1.3). Иногда дисперсию называют индексом полидисперсности [56].

$$KB = \sigma_d/d_{cp} \text{ ,} \quad (1.1)$$

$$ИПД = (\sigma_d/d_{cp})^2 = KB^2 \text{ ,} \quad (1.2)$$

$$D = d_m/d_{cp} = d_v/d_{cp} \text{ ,} \quad (1.3)$$

где KB – коэффициент вариации, $ИПД$ – индекс полидисперсности, D – дисперсия, d_{cp} – средний диаметр частиц в выборке, σ_d – его стандартное отклонение, $d_m = d_v$ – диаметр частиц, соответствующий среднему значению массы и объёма.

Исторически первым методом, позволившим синтезировать значительные количества монодисперсных полимерных микросфер, был предложенный Угельстадом метод активного набухания, представляющий разновидность зародышевого синтеза [60]. В настоящее время разработаны более простые способы получения монодисперсных микросфер, представляющие разновидности преципитационной [56, 61, 62] и так называемой дисперсионной полимеризации [56, 63], при которой в составе среды кроме мономеров и инициатора присутствует полимерный диспергент, формирующий слой на поверхности растущих полимерных частиц.

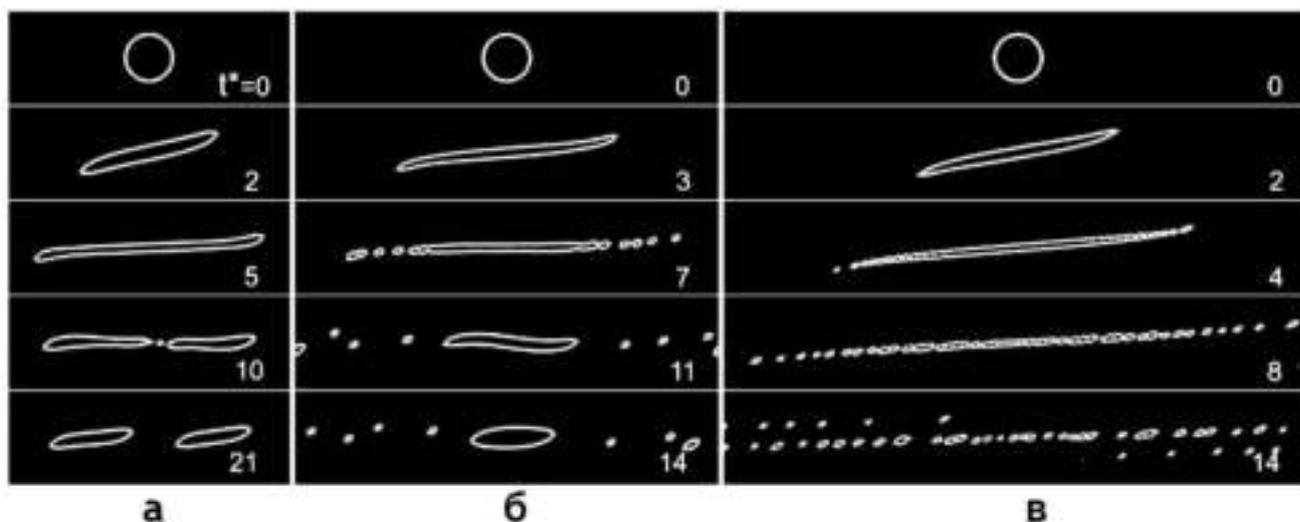
При использовании методов «эмульсия/дисперсия» задача получения микросфер нужного размера сводится к получению капель определённого диаметра. В эмульсиях Пикеринга узкое распределение капель ДФ по размеру обеспечивается за счёт предела коалесценции [9]. Поскольку практически все стабилизирующие частицы локализованы на поверхности раздела фаз, их концентрация на единицу площади поверхности зависит от дисперсности эмульсии. Если концентрация частиц недостаточна для стабилизации, происходит коалесценция и рост капель до размера, при котором их общая поверхность достаточно мала для формирования сплошного стабилизирующего слоя частиц (предел коалесценции). Таким образом, итоговый размер капель в эмульсиях Пикеринга, диспергированных до состояния, когда стабилизирующих частиц не хватает для стабилизации, определяется соотношением объёма ДФ и количества стабилизирующих частиц.

В случае стабилизации ПАВ монодисперсные (KB до 3 %) и квазимонодисперсные (KB до 15 %) эмульсии обычно получают с помощью микрогидродинамических устройств различных типов, одно- и многоканальных [40, 55, 56, 64-66].

Разновидностью многоканальных микрогидродинамических устройств являются приспособления для мембранного эмульгирования, в которых жидкость продавливается через микропористую мембрану в канал или сосуд с текущей в нём дисперсионной средой [56, 65, 66]. В микрогидродинамических устройствах диаметр капилляров или пор обычно меньше размера получаемых капель. Узкие каналы подвержены засорению, что накладывает ограничение на применение данной группы методов для диспергирования жидкостей, содержащих твёрдые включения, таких, как магнитные жидкости.

Представляет интерес формирование эмульсий в широких каналах за счёт градиента скорости течения жидкости. Размер формируемых таким способом капель ДФ может быть существенно меньше диаметра канала [67]. В капле, попавшей в область, где существует градиент скорости течения среды, возникают напряжения сдвига, приводящие к её вытягиванию. Устойчивость капли в этих условиях зависит от соотношения сил вязкого трения и поверхностного натяжения [34, 67]. Существует критическое соотношение, при котором капля дробится [67]. Если вязкости сплошной и дисперсной фаз, поверхностное натяжение на их границе и градиент скорости течения постоянны, то существует критический диаметр капли d_k . В данных условиях капли диаметром от d_k и больше дробятся, а меньшие – остаются целыми.

Различают критический, ближний сверхкритический и дальний сверхкритический режимы дробления капель (рисунок 1.3). В критическом режиме капля дробится примерно пополам, иногда одновременно с «половинками» формируются существенно более мелкие «побочные» капли (рисунок 1.3, а). Двукратное уменьшение объёма капли соответствует уменьшению диаметра на $\approx 21\%$.



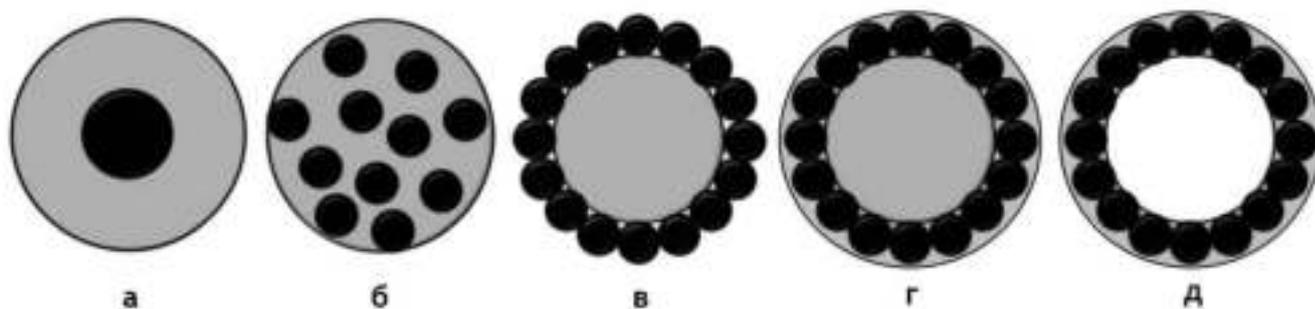
а- критический, б – ближний сверхкритический, в – дальний сверхкритический

Рисунок 1.3 – Режимы дробления капель в градиенте скорости течения среды [67]

Таким образом, если избегать сверхкритических режимов (например, пропускать жидкость через капилляр многократно, от раза к разу постепенно увеличивая скорость течения), то должна получиться эмульсия с узким распределением капель по размеру: большинство из них будут иметь диаметр от $0,79d_k$ до d_k .

1.2 Применение эмульсий для получения магнитных микросфер на основе полимеров

Магнитные микросферы (ММС), как правило, являются композитными и содержат магнитные наночастицы (МНЧ), инкорпорированные в полимерную матрицу [24]. В качестве материалов полимерной матрицы применяются полистирол [24, 69, 70], полиакриламид [24], полиметакрилаты [24, 65], целлюлоза [69, 70], агароза [69, 70], альгиновая кислота [26, 27], хитозан [29, 30], поливиниловый спирт [70], а также сополимеры и блок-сополимеры различного состава [24, 71, 72]. Матрица составляет основной объём ММС и определяет её размер, обеспечивает прочность микросферы и удержание МНЧ. Синтез полимерной матрицы может осуществляться из мономеров или полимеров [24]. Иногда используют полимеры, которые для лучшего удержания МНЧ специально модифицированы, например, путём введения карбоксильных групп [24]. По распределению МНЧ в матрице полимерные ММС делятся на несколько типов [24, 73], представленных на рисунке 1.4.



а – полимерная матрица вокруг МНЧ («МНЧ@полимер»); б – МНЧ распределены диффузно в объёме матрицы («МНЧ+полимер»); в – МНЧ вокруг полимерной матрицы («полимер@МНЧ»); г – МНЧ вокруг полимерной матрицы, покрытые дополнительным слоем полимера («полимер@МНЧ@полимер»); д – капсула

Рисунок 1.4 – Типы полимерных магнитных микросфер

Включение ММС в полимерную матрицу осуществляется четырьмя способами: 1) объединением готовых компонентов, 2) синтезом МНЧ в/на готовой по-

лимерной матрице, 3) синтезом полимерной матрицы в присутствии готовых МНЧ и 4) одновременным синтезом матрицы и МНЧ [24]. Объединение готовых компонентов, как правило, представляет сорбцию МНЧ на поверхности полимерных микросфер: однократную или многократную, осуществляемую методом послойного осаждения (LbL). При этом получают ММС «полимер@МНЧ», которые затем, как правило, покрывают дополнительным слоем полимера, формируя ММС «полимер@МНЧ@полимер» [24]. Синтез МНЧ в присутствии готовой полимерной матрицы может осуществляться как на её поверхности [24], так и в порах [24, 25, 60]. При этом получают ММС «полимер@МНЧ» и «МНЧ+полимер», соответственно. Способом соосаждения оксидов железа в пористой полистирольной матрице получают широко известные коммерческие микросферы Dynabeads™ по способу Угельстада [60]. При одновременном синтезе МНЧ и матрицы наночастицы формируются в растворе полимера и становятся центрами его сорбции, в результате получают ММС «МНЧ@полимер» [24]. Синтезом полимерной матрицы из мономеров или полимеров в присутствии готовых МНЧ получают ММС всех типов (рисунок 1.4).

Эмульсионные способы широко применяются для синтеза ММС [24, 25, 36, 74-79]. Обычно в эмульсиях получают микросферы «полимер@МНЧ» и «МНЧ+полимер» [24, 25]. В частности, если эмульсия Пикеринга стабилизирована МНЧ, то после формирования полимерной матрицы получают микросферы, покрытые слоем МНЧ [24].

Особенно удобен для получения ММС способ «эмульсия/дисперсия», так как содержащиеся в капле ДФ включения становятся частью микросферы. Если эмульгированная жидкость содержит взвесь МНЧ, либо МНЧ формируют слой на поверхности микрокапель, то получают магнитные микросферы [24, 25]. Данным способом из гидрофильных полимеров, таких, как полисахариды и белки, получают биосовместимые и биodeградебельные магнитные композиты [36, 47, 74-79]. Если эмульсионный способ применится для синтеза немагнитных микросфер, например, на основе хитозана [29, 30] и поливинилового спирта [30] – то представляет интерес придание таким микросферам магнитной функции путём добавления гидрофильных МНЧ в раствор полимера перед его эмульгированием.

В водной среде ММС из гидрофильных полимеров способны набухать, то есть имеют гелевую природу [24, 36, 76]. Это существенно отличает их от ММС из гидрофобных полимеров, таких, как полистирол. Данный процесс количественно характеризуют индексом набухания – разницей в массе набухших и высушенных микросфер, отнесённой к массе набухших [14]. Контролируемое набухание и растворение используется как один из методов релизинга – освобождения клеток от связавшихся с ними микросфер [25, 37]. Чтобы управлять индексом набухания и исключить растворение гелевых микросфер, полимеры подвергают перекрёстной сшивке – ковалентной или ионной [24, 25].

В качестве реагента для ковалентной сшивки широко применяют глутаральдегид. Он эффективно сшивает полиамины [80, с. 266], белки, например, желатин, и некоторые полиспирты, например, поливиниловый [81]. Для инактивации непрореагировавших при сшивке карбонильных групп глутаральдегида применяют боргидрид натрия [80]. В случае сшитых полиаминов боргидрид обеспечивает также восстановление оснований Шиффа до аминов, в результате чего полимерная матрица становится более устойчивой к гидролизу [80, с. 231]. Образующийся в реакции тетраборатанион служит дополнительным сшивающим агентом по отношению к ПВС [82]. В неполярные среды, например, жидкие парафины [29] или кукурузное масло [30], глутаральдегид обычно вносят в виде раствора в толуоле [29, 30, 83].

Для ионной сшивки альгиновой кислоты и пектина в составе микросфер обычно применяют хлорид кальция [26, 27].

1.3 Свойства и применение иммуномагнитных микросфер

Иммуномагнитная сепарация (ИМС) является частным случаем магнитной аффинной сепарации [69] и основана на селективном связывании антител [19, 20, 69, 84, 85] или их фрагментов [19, 86-90], иммобилизованных на поверхности магнитных частиц (МЧ), с антигенами сепарируемых объектов. Вместе со связавшимися их объектами (молекулами, частицами или клетками) МЧ улавливаются магнитом, а супернатант удаляется [19, 20, 69, 84, 85] (рисунок 1.5). Несколько циклов ресуспендирования магнитного осадка в свежей среде и повторного осаждения позволяют улучшить чистоту выделенной фракции [25, 70] за счёт отмывки от неспецифически связавшихся объектов.



Рисунок 1.5 – Схема иммуномагнитной сепарации микроорганизмов [20]

Различают позитивную и негативную ИМС. При позитивной целевыми являются объекты, связавшие МЧ, а при негативной – не связавшие, остающиеся в супернатанте [70, 84]. Современные наборы для позитивной сепарации предусматривают освобождение выделенных объектов от микросфер и/или антител для уменьшения побочных эффектов, так называемый релизинг [19, 25, 91]. Он обеспечивается ферментоллизом линкера, которым аффинная молекула прикреплена к микросфере [19, 25], или конкурентным замещением аффинной молекулы неаффинной [19], или уменьшением avidности связывания за счёт распада комплекса аффинных молекул на мономеры [19], или частичным растворением магнитного носителя при добавлении хелатирующего агента [37] или изменении температуры [21].

Существуют прямой и непрямой методы ИМС. При прямом объекты взаимодействуют с МЧ, несущими антитела, а при непрямом – вначале связываются с антителами, а затем – с МЧ, несущими молекулы с аффинитетом к антителам [70, 85]. Непрямой метод эффективнее в случаях, когда антитела имеют низкий аффинитет к антигену, или количество молекул антигена на поверхности клетки невелико, или они малодоступны для антител [85]. Этот метод рекомендован также в случае, когда необходимо применить смесь антител разной специфичности (так называемый коктейль), однако он требует большего расхода антител по сравнению с прямым [70].

Применяемые для ИМС магнитные сепараторы делятся на два основных типа: объёмные и проточные [69]. В объёмных образец помещается в поле внешнего магнита и осаждение МЧ происходит на стенке или дне посуды. В проточных образец пропускается через колонку с магнитным материалом, таким, как тонкая стальная проволока, находящимся в поле внешнего магнита и локально усиливающим его [92] либо через микроканалы, проходящие вблизи магнита [92, 93]. Проточные сепараторы называются также высокоградиентными (градиент напряжённости магнитного поля более 100 Т/м) тогда как объёмные – низкоградиентными (до 100 Т/м) [92].

Известная с 1970-х [25], ИМС получила широкое распространение в 1980-е после того, как Дж. Угельстад [60] разработал метод синтеза монодисперсных полистироловых микросфер и магнитных композитов на их основе, которые были коммерциализованы как Dynabeads™ [94].

В настоящее время ИМС широко применяется в медицине, биологии и биотехнологии. Она позволяет получать биомолекулы, такие как ферменты и нуклеиновые кислоты, с меньшими потерями, чем колоночная хроматография [69]. Метод ИМС используется также для концентрирования патогенных микроорганизмов, которое облегчает их обнаружение в клинической лабораторной диагностике, при контроле качества продуктов и мониторинге окружающей среды [20, 25, 70]. С помощью ИМС в крови обнаруживают редкие клеточные популяции, такие,

как циркулирующие опухолевые клетки [25, 71, 95, 96]. В трансплантологии, регенеративной медицине, тканевой инженерии методом ИМС получают стволовые клетки и очищают трансплантируемый материал от лейкоцитов и других нежелательных фракций [25, 70, 93]. Способом ИМС получают очищенные на 95% и более клеточные фракции, при этом производительность может превышать 10^{10} клеток в час [25].

Размер иммуномагнитных носителей влияет на время их осаждения магнитным полем и седиментации, а также на взаимодействие с клетками [25, 97]. При ИМС в качестве носителей аффинных молекул применяются композитные частицы, размер которых составляет от 50 нм до 10 мкм [69]. Носители размером до 0,2 мкм, как правило, представляют собой отдельные МНЧ или их флоккулы, покрытые слоями полимеров [25, 70]. Носители размером от 0,5 мкм обычно имеют полимерную матрицу сферической формы, в которую инкорпорированы МНЧ [25, 70]. Как правило, МНЧ составляют 10 – 40 % объёма микросферы [25].

Преимуществами носителей размером до 0,2 мкм по сравнению с более крупными являются:

- бóльшая удельная площадь поверхности, которая позволяет сепарировать бóльшие количества биомолекул в расчёте на единицу массы магнитного носителя [92];
- более длительное время седиментации, которое позволяет инкубировать образец без перемешивания [25, 92];
- незначительное влияние связавшихся частиц на характеристики светорассеяния клеток, что важно при исследовании последних методом проточной цитофлуориметрии [98].
- возможность идентификации связывания носителей с антигеном способом иммуномагнитного ослабления отклика на переменное внешнее магнитное поле [17, 18, 99].

Преимуществом носителей размером от 0,2 до 1 мкм по сравнению с более мелкими является бóльший магнитный момент, который позволяет применять для осаждения частиц низкоградиентные сепараторы [25, 70, 92].

Преимуществами носителей размером от 1 мкм по сравнению с более мелкими являются:

- неспособность поглощаться клетками, кроме фагоцитов [25, 97], что важно для исключения побочных эффектов при культивировании клеток, полученных позитивной сепарацией.
- значительная разность гидродинамических сил, действующих на клетку и прикреплённую к ней микросферу при наличии градиента скорости течения среды: это позволяет путём интенсивного перемешивания отмывать клетки от неспецифически адгезированных к ним МЧ, увеличивая тем самым селективность сепарации [25].

Монодисперсность ММС не является необходимым условием эффективной ИМС, особенно при сепарации объектов, в несколько раз превышающих микросферы по размеру, таких как клетки. Как правило, с клеткой связывается больше одной ММС, так что даже при одинаковом размере микросфер количество связанного магнитного материала различается. Соответственно, разной оказывается действующая на объект со стороны магнитного поля сила, пропорциональная сумме магнитных моментов МНЧ в составе связанных ММС [100]. С практической точки зрения важны минимальный и максимальный размеры ММС в суспензии. Минимальный размер определяет время полного осаждения ММС и связавших их клеток магнитом (лимитированное скоростью осаждения клетки, связавшей одну самую мелкую микросферу) [100]. Для обеспечения осаждения клетки диаметром 10 мкм из пробирки диаметром 10 мм в течение 10 минут этот размер составляет приблизительно 1 мкм и 3 мкм в случае ММС, содержащих 10,0 и 1,0 объёмных процентов магнетита, соответственно [100]. Ограничение по максимальному размеру обусловлено тем, что крупные микросферы в отсутствие перемешивания седиментируют намного быстрее клеток, и это существенно уменьшает для них вероятность провзаимодействовать с клеткой-мишенью. Кроме того, избыточный размер микросфер подразумевает нерациональное расходование материалов. Самые распространённые размеры микросфер для иммуномагнитной сепарации от 1 до 5 мкм [70], ММС крупнее 10 мкм применяются редко [69].

В настоящее время субмикронные носители для иммуномагнитной сепарации выпускаются под коммерческими названиями «MACS» (изготовитель «Miltenyi Biotec», Германия) [101], «CytoSinct» («GenScript Biotech», США) [102], «MojoSort» («BioLegend», США) [103], «Qbeads» («MagQu», Тайвань) [104] и другими. Иммуномагнитные микросферы размером 1-5 мкм поставляются под названиями «Dynabeads» («Thermo Fisher Scientific», США) [105], «ProMag» («Bangs Laboratories», США) [106] «AbraMag» («Eurofins Technologies», Венгрия) [107] и другими. Компания «CD Bioparticles» (США) [108] выпускает носители для магнитной сепарации размером от 15 нм до 200 мкм. Состав большинства доступных на рынке иммуномагнитных микросфер является коммерческой тайной, но, как правило, включает кроме полимерной матрицы следующие компоненты: магнитные наночастицы, гидрофильную оболочку и аффинные биомолекулы, иммобилизованные на оболочке [25, 69, 108].

Магнитные наночастицы в составе микросфер для ИМС должны обладать высокой магнитной восприимчивостью в сочетании с отсутствием заметной остаточной намагниченности [24, 109]. Магнитная восприимчивость ММС необходима для их эффективного осаждения магнитным полем. Отсутствие остаточной намагниченности исключает агрегацию микросфер во время инкубации и позволяет легко ресуспендировать их после удаления магнита. Высокая магнитная вос-

приемчивость без остаточной намагниченности называется суперпарамагнетизмом (рисунок 1.6).

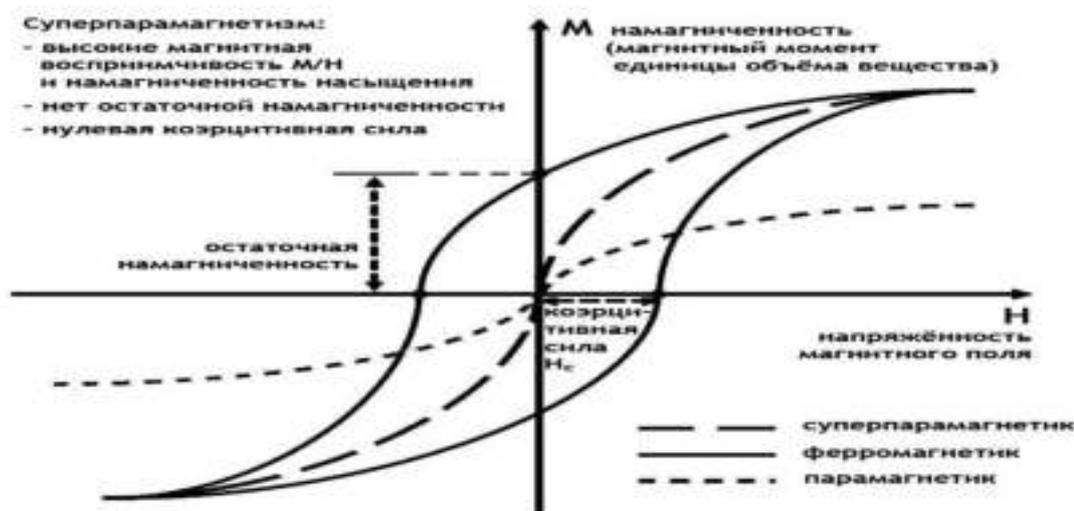


Рисунок 1.6 – Вид кривых намагничивания парамагнитных, суперпарамагнитных и ферромагнитных материалов [109]

Суперпарамагнетизм – разновидность ферромагнетизма – проявляется, когда размер кристаллов ферромагнитного материала настолько мал, что коллективный магнитный момент атомов подвержен температурным флуктуациям [25, 110]. Известно, что суперпарамагнитными являются оксиды железа – магнетит $\text{FeO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$ и маггемит $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ – в форме наночастиц [24, 25, 109]. Суперпарамагнитные частицы однодоменны, но обратное утверждение не всегда справедливо: размер наночастиц, при котором проявляется суперпарамагнетизм, значительно меньше критического диаметра D_c , при превышении которого однодоменная структура становится энергетически невыгодна (рисунок 1.7). Для магнетита и маггемита D_c составляет соответственно 128 нм и 166 нм, тогда как суперпарамагнитные свойства оксиды железа проявляют при размере частиц до 15 нм [24].

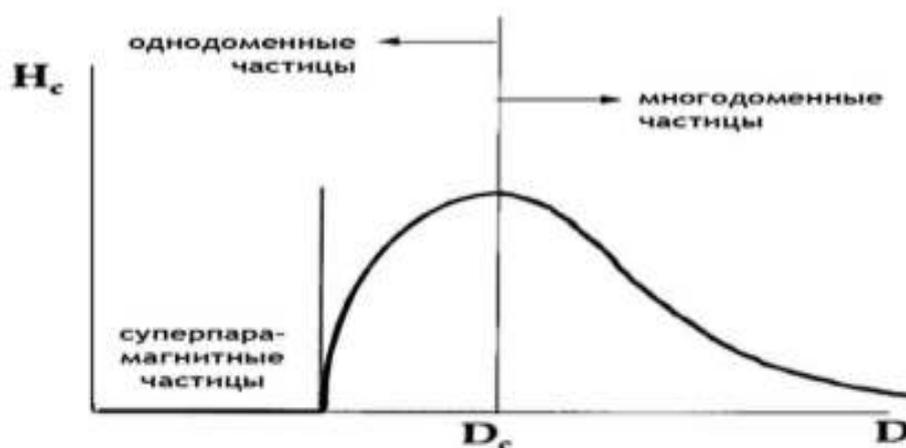


Рисунок 1.7 – Вид зависимости коэрцитивной силы H_c от диаметра магнитной частицы [110]

Наночастицы магнетита и маггемита стабильны и малотоксичны, они широко применяются для придания магнитных свойств композитным частицам, в частности, для биомедицинских приложений [25].

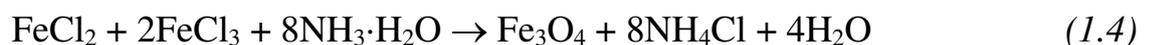
Суперпарамагнитны также наночастицы железа, кобальта, никеля, ферритов общего состава $MeO \cdot Fe_2O_3$, где Me: Co, Ni, Mg, Zn, Mn и др. Металлические наночастицы обладают более высокой магнитной восприимчивостью, чем наночастицы оксидов металлов [24, 25]. Однако они подвержены окислению, при котором их магнитные свойства ухудшаются [24]. Применение ферритов Co и Ni в составе материалов, контактирующих с клетками и организмами, ограничено токсичностью этих металлов [25].

В синтезе магнитных наночастиц (МНЧ) существуют две группы подходов, условно обозначаемые как «сверху вниз» и «снизу вверх» [25].

Синтез «сверху вниз» предполагает фрагментацию материалов и включает травление, например, фотолитографию [25, 111], абразивную обработку [25], помол [25, 112], воздействие на материал лазерным или электронным лучом [25, 113]. Получаемые этими способами частицы обычно крупнее, чем необходимо для проявления суперпарамагнитных свойств: более 100 нм при фотолитографии [111] и 20-50 нм при помолу [112]. При лазерной абляции железной поверхности в бидистиллированной воде получают суперпарамагнитные оксидные МНЧ с примесью ферромагнитных из-за широкого распределения по размеру (5-30 нм) [113].

Синтез «снизу вверх» предполагает сборку наночастиц из «строительных блоков», таких, как атомы, молекулы и кластеры. К этой группе относятся методы, в которых применяются соосаждение [24, 25, 114-120], термическое разложение металлоорганических соединений (МОС) [25, 114, 121-123] и автоклавирование водных и/или спиртовых растворов органических и неорганических соединений металлов (гидротермальный синтез) [25, 124-127].

Наиболее распространённым способом получения МНЧ является соосаждение. Классический синтез магнетита из хлоридов железа (II и III) проводится в растворе аммиака [115] в соответствии с уравнением реакции (1.4).



Кроме наночастиц оксидов железа, соосаждением получают суперпарамагнитные частицы ферритов различного состава и морфологии в растворе [116], золь-гель методами [117] и распылительной сушкой [118].

Осуществление реакций соосаждения в микроэмульсиях даёт дополнительные возможности по управлению размером частиц. При этом количество веществ, участвующих в формировании одной частицы и, соответственно, размер частиц определяется объёмом капель дисперсной фазы и концентрацией реагентов в ней

[114]. Пример – получение частиц магнетита при смешивании микроэмульсий, в одной из которых дисперсная водная фаза представляет раствор FeCl_2 и FeCl_3 в мольном соотношении 1:2, а в другой – раствор NaOH . Этим способом получены МНЧ порядка 15 нм с узким распределением по размеру [119].

Пример получения МНЧ при термическом разложении МОС – синтез монодисперсных наночастиц MeFe_2O_4 (где $\text{Me} = \text{Fe}, \text{Co}, \text{Mn}$) в результате высокотемпературной (200 °С) реакции ацетилацетонатов металлов с 1,2-гексадекандиолом в присутствии стабилизаторов: олеиновой кислоты и олеиламина. Размер получаемых частиц варьируется от 3,0 до 20,0 нм, в зависимости от условий синтеза [121]. В рамках этого метода получаемые частицы могут служить зародышами для синтеза более крупных [121, 123], в том числе с различным составом слоёв [123]. При термическом разложении МОС получают также металлические МНЧ различных форм: сферические, дискообразные, игольчатые [114].

Пример гидротермального синтеза МНЧ – опубликованный в журнале «Nature» [124] способ получения разнообразных нанокристаллов, в том числе магнитных, в автоклаве (температура до 200 °С) в трёхфазной системе, включающей твёрдые линолеаты металлов и две жидкие фазы: этанол-линолеовую и этанол-водную. Гидротермальный способ применяется также для управляемого укрупнения частиц, полученных методом соосаждения [125, 126].

При синтезе МНЧ «снизу вверх» для контроля размера и агрегации частиц применяются стабилизаторы, обеспечивающие их электростатическое или стерическое отталкивание [25, 114]. Стабилизаторами служат анионы, например, цитрат [128], жирные кислоты [24, 114], а также полимеры: декстран [24, 129], целлюлоза [120], поливиниловый спирт [114, 129], альгинат [24], сополимеры и блок-сополимеры различного состава [24]. Реакции соосаждения могут протекать в растворе или в геле [24].

Связанный с поверхностью МНЧ слой стабилизатора способен как уменьшать [25, 130], так и увеличивать магнитный момент частицы [25, 131], причём эффект может быть значительным [131]. Вероятно, он обусловлен влиянием вновь образованных связей (особенно ковалентных) на спин-кантинг и сопряжение спинов атомов поверхностного слоя МНЧ [130, 131].

Альтернативой использованию стабилизаторов является синтез МНЧ в пористой матрице: в этом случае размер частиц ограничивается величиной её пор [24, 60]. Примером является синтез магнетита методом соосаждения в пористых полистирольных микросферах [60].

Авторы обзорных работ [25, 114], анализируя преимущества и недостатки основных методов синтеза МНЧ «снизу вверх», отмечают, что с точки зрения баланса производительности и контроля размера и формы частиц лучшим из существующих является метод термического разложения металлоорганики (таблица 1.1).

Таблица 1.1 – Сравнение различных методов синтеза МНЧ по условиям, качеству продукта и производительности [114]

Метод	Условия	Время реакции	Растворитель	Узкое распределение частиц по размеру	Производительность
Соосаждение	20-90 °С	< 1 ч	Вода	+	+++
Соосаждение в микроэмульсии	20-50 °С	> 1 ч	Органический	++	+
Термическое разложение	100-320 °С, атмосфера инертного газа	>> 1 ч	Органический	+++	+++
Гидротермальный синтез	220 °С, высокое давление	>> 1 ч	Вода, этанол	+++	++

Однако для применения МНЧ кроме их формы, размера и монодисперсности важен ещё один фактор – состояние поверхности. Синтез частиц методом термического разложения МОС происходит в неполярных растворителях, при этом применяются стерические стабилизаторы – жирные кислоты. Сорбированные на частицах, они затрудняют модификацию их поверхности [25]. Поэтому для получения МНЧ с гидрофильной поверхностью предпочтителен синтез в водной среде.

Кроме искусственно полученных, для иммуномагнитной сепарации применяют природные МНЧ – магнитосомы бактерий рода *Magnetospirillum* [89, 90, 132-135]. Из генетически модифицированных штаммов выделены магнитосомы с экспонированным на поверхности стафилококковым белком А, способные связываться с F_c-фрагментами антител и таким образом представляющие готовый носитель для иммуномагнитной сепарации [135], неспецифическое связывание которого с клетками, однако, исследовано недостаточно.

Оболочка иммуномагнитных микросфер необходима для предотвращения их агрегации в водной среде и для минимизации неспецифического связывания с биологическими объектами, а также для предотвращения инактивации биомолекул, таких, как ферменты, при контакте с оксидами железа [70]. Для уменьшения неспецифического связывания частиц с клетками применяются гидрофильные нейтральные полимеры, такие как полиэтиленгликоль [70, 136], поливиниловый спирт [136] и полисахариды (декстран) [136, 137]. Для ковалентной иммобилизации лигандов, ответственных за селективность связывания ММС, а также для сшивки полимеров оболочки в их состав могут быть введены карбоксильные [80, с. 101], аминные [80, с. 114], тиольные [80, с. 67] или эпоксидные группы [80, с. 373]. Так, декстран карбоксилируют, обрабатывая бромуксусной [138] или

хлоруксусной [80, с. 113] кислотами. Количество заряженных групп не должно быть избыточным во избежание потери полимером способности блокировать неспецифическую адгезию клеток, причём наличие в составе гидрофильной поверхности аминогрупп в большей степени способствует адгезии, чем присутствие карбоксильных [139].

При наличии оболочки ММС разных типов, представленных выше на рисунке 1.4, функционально идентичны, так как их связывание с объектами определяется составом поверхности, а поведение в магнитном поле – свойствами и количеством магнитных наночастиц [25, 100], а не их распределением.

Молекулы, обеспечивающие специфическое связывание микросфер с мишенями, например, антитела, обычно иммобилизуются на поверхности ММС ковалентно либо за счёт аффинного взаимодействия. Для ковалентной иммобилизации применяются сшивающие агенты. Некоторые из них обеспечивают непосредственную, без дополнительных атомов, связь между двумя молекулами, и называются агентами «нулевой длины». Примером является 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (EDC). Как и другие N-замещённые карбодиимиды, он взаимодействует с карбоксильными группами поверхности микросфер; получаемые при этом активные интермедиаты реагируют с аминогруппами белков, формируя пептидную связь [25; 80, с. 216]. 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. 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 [80, с. 596].

Бифункциональные сшивающие агенты имеют две активные группы, разделённые линкерной цепочкой. В гомобифункциональных агентах активные группы одинаковы, примером являются диальдегиды, такие как глутаральдегид, обеспечивающие сшивку белка с частицей за счёт формирования «мостика» между аминогруппами [80, с. 166]. В гетеробифункциональных сшивающих агентах активные группы неодинаковые. Наличие групп, активных в различных условиях среды (например, при разных pH) позволяет осуществлять иммобилизацию в две стадии. Как и при двухстадийной конъюгация агентами «нулевой длины», это позволяет избежать кластеризации сшиваемых молекул [80, с. 276].

С целью аффинной иммобилизации антител они биотинилируются, а на поверхности ММС ковалентно конъюгируется биотинсвязывающий белок, например, авидин или стрептавидин [80, с. 822].

Флуоресцентные иммуномагнитные микросферы. Наиболее распространённые полистироловые ММС для иммуномагнитной сепарации обладают автофлуоресценцией, которая представляет проблему для таких приложений, как им-

мунофлуоресцентный анализ (ИФЛА) сорбированных на микросферах объектов, создавая «паразитный» фон и ухудшая соотношение сигнал/шум [140, 141]. Уменьшения автофлуоресценции полистироловых ММС разных изготовителей на 90 – 99 % удаётся добиться лазерным освещением в течение 15 минут, приводящим к выцветанию флуорохромов. Это в 3 раза повышает предел чувствительности ИФЛА с применением ММС [141]. Однако обработка больших партий микросфер данным способом проблематична и затратна. Ведутся поиски составов ММС, обладающих минимальной автофлуоресценцией без обработки лазером. Автофлуоресценция полидиметилсилоксановых ММС, полученных Б. Эвансом с соавторами [140], в 100 раз меньше, чем полистироловых производства Invitrogen.

Для других приложений флуоресценция ММС желательна. При сэндвич-методе ИФЛА определяемый объект иммобилизуется на подложке, несущей антигена, и метится иммунофлуоресцентными частицами, также несущими антитела, обычно той же специфичности, что и конъюгированные с подложкой (рисунок 1.8). При этом порядок связывания объекта: вначале с подложкой, затем с частицами, или наоборот – не важен. Это позволяет применять микросферы с комбинированной функциональностью (флуоресцентной и магнитной) как для концентрирования определяемых объектов с помощью магнита, так и для их детектирования. В отличие от обычного ИФЛА, при сэндвич-ИФЛА не связавшиеся с объектами микросферы не создают фона, так как не сорбируются на подложке и удаляются при отмывке [142].

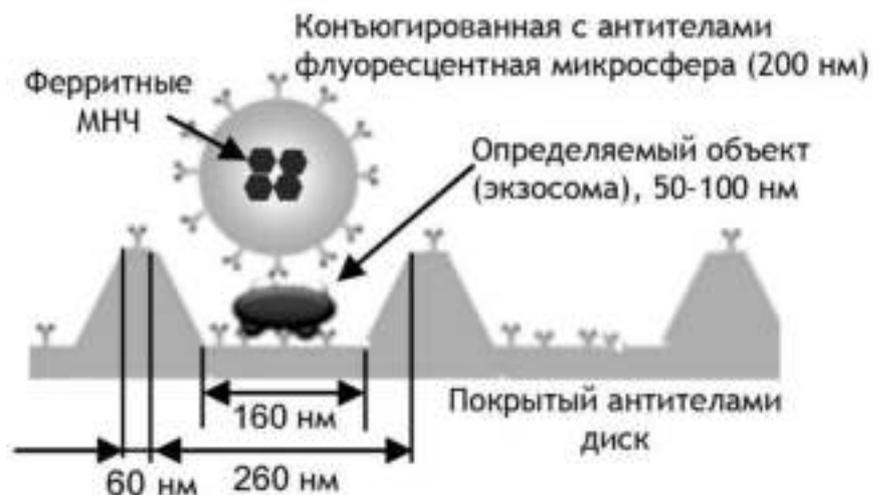


Рисунок 1.8 – Способ определения экзосом в биологических жидкостях с магнитным концентрированием и сэндвич-иммунофлуоресцентным анализом образца [142]

Другим примером применения флуоресцентных ММС является таргетированная магнитным полем доставка лекарств, инкорпорированных в магнитные носи-

тели. Флуоресценция носителей позволяет отследить их распределение в организме в разные сроки после введения [143, 144].

Таким образом, включение флуоресцентной метки в состав магнитных микросфер расширяет область их применения. В свою очередь, включение магнитных наночастиц в состав флуоресцентных микросфер способно расширить их функции. Одним из применений немагнитных флуоресцентных микросфер является оценка фагоцитоза [145]. Если для той же задачи использовать флуоресцентные ММС, появляется возможность упростить анализ, сконцентрировав образец и избавившись от ненужных клеток (например, эритроцитов).

Флуоресцентные ММС с воспроизводимыми, хорошо прогнозируемыми спектральными свойствами могут быть получены введением в состав магнитных микросфер флуоресцентных красителей [142, 144] или квантовых точек [71, 143]. Флуоресценция некоторых меток существенно зависит от окружения, например, от pH [146-148]. Это позволяет применять их не только для визуализации объектов, но для получения информации о составе среды.

Для количественной оценки флуоресценции в настоящее время наряду с методами спектрофлуориметрии и микроспектрофлуориметрии [148] применяется анализ изображений, полученных с применением светофильтров, позволяющих выделить сигналы отдельных флуорохромов [149]. Кроме того, используется колориметрический анализ цветных изображений [147, 150-153]. Этот метод существенно увеличивает доступность тестов с применением флуорохромов, в частности, за счёт использования камер смартфонов в качестве регистрирующих устройств [147, 151-153].

1.4 Выводы к главе 1

Способ «эмульсия/дисперсия» удобен для формирования композитных микросфер, так как содержащиеся в каплях дисперсной фазы включения становятся частью микросферы. Данным способом из водных растворов природных и синтетических гидрофильных полимеров, в том числе хитозана, альгиновой кислоты, пектина, поивинилового спирта (ПВС), желатина, получают гелевые микросферы, достоинствами которых являются биосовместимость и биodeградебельность. Для получения устойчивых эмульсий водных растворов полимеров в качестве дисперсионной среды широко применяют изооктан с добавками Span 85 и Tween 85. При добавлении магнитных наночастиц (МНЧ) в эмульгируемый раствор полимера микросферы получают магнитными. В качестве МНЧ целесообразно применение наночастиц магнетита ввиду их суперпарамагнитных свойств и малой токсичности. Пропуская эмульсию через капилляр, теоретически можно

обеспечить узкое распределение капель её дисперсной фазы по размеру: большинство из них будет различаться по диаметру менее, чем в 1,5 раза. Необходимо исследовать эмульгирование данным способом содержащих МНЧ водных растворов полимеров в изооктане с добавками Span 85 и Tween 85 для определения условий получения эмульсий с диаметром капель 2-10 мкм, исходя из того, что диаметр ММС для объёмного сепаратора должен составить 1-5 мкм и в ходе сшивки возможно уплотнение геля и уменьшение размера микросферы по сравнению с размером капли.

При синтезе микросфер эмульсия кроме раствора полимера должна содержать сшивающий агент: для сшивки альгиновой кислоты и пектина применяют хлорид кальция, а для сшивки хитозана, ПВС и желатина – глутаральдегид. Хлорид кальция и другие соли в эмульгируемых в неполярных растворителях с добавками ПАВ водных растворах могут влиять на коалесценцию эмульсий. Поэтому необходимо исследовать влияние концентраций хлорида кальция и натрия на агрегативную устойчивость эмульсий водных растворов хлорида кальция и глутаральдегида в изооктане с добавками Span 85 и Tween 85.

Для применения гелевых магнитных микросфер (ММС) в иммуномагнитной сепарации необходимо минимизировать их неспецифическую адгезию на клетках и обеспечить селективное связывание с ними. Уменьшению неспецифической адгезии способствует оболочка микросфер из ПВС или декстрана. При её создании состав полимера модифицируется: декстран карбоксилируют бромуксусной кислотой и иммобилизуют с помощью 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC), ПВС сшивают с помощью глутаральдегида. Поэтому необходимо изучить влияние оболочки на неспецифическое связывание ММС с клетками. Для селективного связывания микросфер с клетками целесообразно модифицировать их авидином с помощью EDC, что обеспечит возможность конъюгации с ними различных биотинилированных антител и таким образом «настройку» специфичности. Необходимо на модельных объектах (например, лейкоцитах) изучить неспецифическое и специфическое связывание с клетками ММС, модифицированных авидином и антителами, и оценить эффективность иммуномагнитной сепарации клеток.

Комбинирование флуоресцентной и магнитной меток расширяет область применения микросфер, позволяя проводить сепарацию и визуализацию биологических объектов с помощью одних и тех же ММС. В то же время автофлуоресценция ограничивает применение ММС в иммунофлуоресцентном анализе. Необходимо исследовать применимость флуоресцентно меченых ММС для сепарации фагоцитов и оценки фагоцитоза, предварительно оценив их автофлуоресценцию.

ГЛАВА 2

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Магнитные микросферы (ММС) получали способом «эмульсия/дисперсия» из магнитных жидкостей (МЖ) – водных растворов гидрофильных полимеров, содержащих наночастицы магнетита или феррита железа-кобальта. В качестве полимерной основы МЖ и получаемых из них микросфер применяли альгиновую кислоту, пектин, хитозан, поливиниловый спирт (ПВС) и высокомолекулярную фракцию желатина. Для ионной сшивки альгиновой кислоты и пектина использовали хлорид кальция, а для ковалентной сшивки хитозана, ПВС и желатина – глутаральдегид. В качестве дисперсионной среды для эмульгирования МЖ и растворов сшивающих реагентов применяли изооктан с добавками Span 85 и Tween 85 (IST). Растворы сшивающих реагентов эмульгировали способом ультразвуковой обработки, а МЖ – путём ультразвуковой обработки или пипетирования. С целью оптимизации методики пипетирования исследовали влияние диаметра наконечника, частоты и времени на выход фракций капель различного размера. Поверхность микросфер модифицировали карбоксиметилдекстраном, лизином, ПВС, дрожжевым лизатом, а также аффинными биомолекулами – авидином и антителами, после чего оценивали неспецифическое и специфическое связывание ММС с лейкоцитами. Для визуализации микросфер в их состав включали флуоресцентные красители – производные 2-аминопиримидина.

2.1 Получение магнитных наночастиц

Суперпарамагнитные наночастицы магнетита, имеющие средний размер 10,0 – 15,0 нм, получали соосаждением солей железа [154]. Смешивали 180 мкл раствора FeSO_4 0,36 М подкисленного и 320 мкл раствора FeCl_3 0,37 М; добавляли полученный раствор в пробирку с 200 мкл 25% раствора NH_3 на вортексе; инкубировали 15 минут при 60 °С; осаждали магнитом, трижды отмывали 2 мл дистиллированной воды.

Ферромагнитные наночастицы магнетита (средний размер $\geq 60,0$ нм) получали путём осаждения аммиаком оксидов и гидроксидов железа с последующим окислением: раствор, содержащий 111,2 г $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 21,6 г $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ в 1 л воды, смешивали с 500 мл 8,5% водного раствора аммиака. Образовавшуюся суспензию нагревали до 70 °С, добавляли 40,0 г NaOH и 4,3 г NaNO_3 и поднимали температуру на 10 °С в час до 100 °С, после чего отмывали и высушивали.

Наночастицы феррита железа-кобальта $\text{Co}^{\text{II}}_x\text{Fe}^{\text{II}}_{1-x}\text{Fe}^{\text{III}}_2\text{O}_4$ (размер $55,0 \pm 20,0$ нм, содержание Co $\approx 1,5\%$) получали синтезом, включающим первоначальное осаждение аммиаком оксидов и гидроксидов металлов и последующее окисление образующихся частиц. Водный раствор, содержащий 111,2 г $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 21,6 г $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ и 5,6 г $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ в 1 л, вливали при интенсивном перемешивании в 500 мл 8,5 % аммиака. Образовавшуюся суспензию нагревали до 70°C , после чего добавляли 40 г NaOH и 4,3 г NaNO_3 и плавно, в течение трех часов, поднимали температуру до 100°C со скоростью около $10^\circ\text{C}/\text{час}$. Затем частицы отмывали и термообработывали при 100°C .

Значения основных магнитных параметров МНЧ определяли на вибромагнитометре универсальной измерительной системы «Liquid Helium Free High Field Measurement System» («Cryogenic LTD», Великобритания).

2.2 Получение магнитных жидкостей

В качестве полимерной основы магнитных жидкостей (МЖ) использовали следующие гидрофильные полимеры.

Альгиновая кислота – полианионный гетерополисахарид, линейная молекула которого состоит из остатков D-маннуровой и L-гулуриновой кислот, соединённых связью $\beta\text{-}1 \rightarrow 4$ (рисунок 2.1), производства «Sigma» (Германия) со средней молекулярной массой 240 кДа.

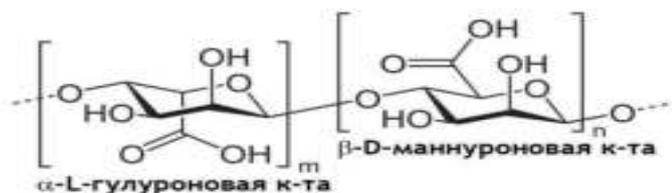


Рисунок 2.1 – Структурная формула альгиновой кислоты

Пектин цитрусовый – полианионный полисахарид с главной цепью, состоящей не менее чем на 74 % из $1\text{-}4$ -связанных остатков $\alpha\text{-D-galacturonic acid}$ (рисунок 2.2), производства «Sigma» (Германия), с молекулярной массой 100 – 140 кДа и степенью этерификации не менее 70 %.

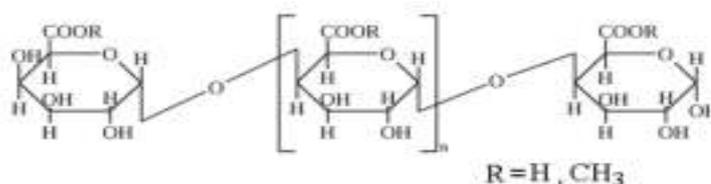


Рисунок 2.2 – Структурная формула пектина

Хитозан – продукт деацелирования хитина, поликатионный линейный полисахарид, молекула которого состоит из β -(1-4)-связанных остатков D-глюкозамина и N-ацетил-D-глюкозамина (рисунок 2.3), производства «Sigma» (Германия) с молекулярной массой 300-400 кДа и степенью деацелирования >75%.

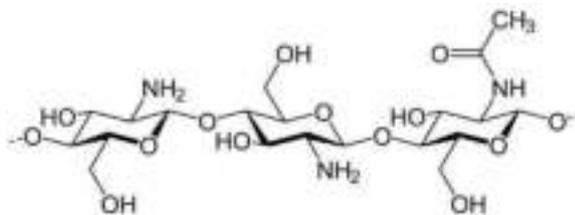


Рисунок 2.3 – Структурная формула хитозана

Желатин пищевой – продукт частичного гидролиза белка коллагена, производства ОАО «Можелит» (Беларусь), из которого получали высокомолекулярную фракцию путём преципитации ацетоном и перерастворения в воде [155].

Поливиниловый спирт (ПВС) – водорастворимый полимер, продукт гидролиза поливинилацетата, производства ЗАО «База № 1 Химреактивов» (Россия), характеризующийся динамической вязкостью 4% водного раствора 10-12 мПа·с и массовой долей ацетатных групп 1,1 – 1,9 %.

Для получения МЖ к осадку магнитных частиц добавляли раствор полимера и обрабатывали на ультразвуковом погружном диспергаторе 22 кГц, 100 Вт до кипения. Использовали следующие составы МЖ:

- 20,0 г/л альгиновой кислоты, рН 7; 2,6 – 3,9 г/л магнетита $\leq 15,0$ нм; массовое соотношение магнитных наночастиц и полимера m_M/m_{Π} 0,13 – 0,20;
- 30,0 г/л пектина, рН 7; 3,9 г/л магнетита $\leq 15,0$ нм; m_M/m_{Π} 0,13;
- 40,0 г/л высокомолекулярной фракции желатина, рН 9; 3,9 г/л магнетита $\leq 15,0$ нм; m_M/m_{Π} 0,10;
- 1,8-10,0 г/л хитозана 300 – 400 кДа (Sigma кат. № 419419) в уксусной кислоте 10,0 об.%; 0,91 – 3,25 г/л магнетита $\leq 15,0$ нм; m_M/m_{Π} 0,09 – 0,93;
- 7,5 г/л хитозана 300 – 400 кДа в уксусной кислоте 10,0 об.%; 3,25 г/л магнетита $\geq 60,0$ нм; m_M/m_{Π} 0,43;
- 7,5 г/л хитозана 300 – 400 кДа в уксусной кислоте 10,0 об.%_v 3,25 г/л феррита железа-кобальта 40,0-60,0 нм; m_M/m_{Π} 0,43;
- 25,0 – 100,0 г/л ПВС в уксусной кислоте 10,0 об.%; 2,6 – 3,9 г/л магнетита $\leq 15,0$ нм; m_M/m_{Π} 0,026 – 0,16.

Концентрации полимеров варьировали, исходя из необходимости получить микросферы диаметром не более 5 мкм, т.к. ММС именно такого размера применяются для магнитной сепарации клеток [70]. Максимальная концентрация хитозана (300-400 кДа) была лимитирована вязкостью раствора, т.к. жидкости, в которых его содержится от 15,0 г/л, имеют динамическую вязкость от 232 мПа·с, которая затрудняет их дозирование пипеткой и перемешивание. Динамическую вяз-

кость растворов полимеров исследовали вискозиметром Гёшлера типа ВН (ГДР), рассчитывая по формуле (2.1).

$$\eta = K (\rho_{ш} - \rho_{ж}) / v , \quad (2.1)$$

где η - динамическая вязкость, Па·с; K – константа вискозиметра, $\text{м}^3 \cdot \text{с}^{-2}$; $\rho_{ш}$ и $\rho_{ж}$ – плотности соответственно шарика и жидкости, $\text{кг} \cdot \text{м}^{-3}$; v – установившаяся скорость падения шарика, м/с.

Установившуюся скорость регистрировали в нижней половине трубки вискозиметра, применяя видеосъёмку 30 кадров в секунду с последующей раскадровкой. Константу вискозиметра $4,79 \cdot 10^{-7} \text{ м}^3 \cdot \text{с}^{-2}$ определили по стандарту: 4% раствор ПВС марки 11/2 в дистиллированной воде, плотность 1001 кг/м^3 , динамическая вязкость $11,0 \pm 1,0 \text{ мПа} \cdot \text{с}$. С учётом того, что плотность стального шарика 7780 кг/м^3 , а плотность исследовавшихся растворов $\approx 1000 \text{ кг/м}^3$, получили итоговую формулу для расчёта динамической вязкости (2.2).

$$\eta = 3,25 \cdot 10^{-3} / v \quad (2.2)$$

Содержание магнитных наночастиц варьировали с целью получить из МЖ микросферы, не выпадающие в осадок в течение как минимум 5 минут и осаждаемые магнитом за время не более 1 минуты, что достаточно для процедур магнитной сепарации клеток [25, 70].

2.3 Получение эмульсий магнитных жидкостей

Для приготовления дисперсионной среды IST использовали следующие реагенты.

Изооктан эталонный (2,2,4-триметилпентан) – углеводородная жидкость, плотность $0,69 \text{ г/л}$, кинематическая вязкость $0,7246 \text{ мм}^2/\text{с}$, температура кипения $99,3 \text{ }^\circ\text{C}$, производства ЗАО «Экос-1» (Россия).

Span 85 (сорбитан триолеат) – неионное ПАВ, производства «Merck» (Германия).

Tween 85 (полиоксиэтиленсорбитан триолеат) – неионное гидрофильное ПАВ, производства «Fluka» (Германия).

Массовое соотношение Span 85 и Tween 85 в изооктане составляло 1,9:1, как в работах [26, 27], а содержание Span 85 варьировали от 1,4 % до 2,8 %. Концентрации ПАВ увеличивали по сравнению с описанными в литературе, чтобы повысить агрегативную устойчивость эмульсий.

Для определения условий получения эмульсий МЖ, пригодных для формирования микросфер, исследовали эмульгирование содержащих наночастицы маг-

нетита водных растворов полимеров в IST способами ультразвуковой обработки и пипетирования. Предполагали, что для получения микросфер диаметром 1 – 5 мкм (как у коммерческих аналогов) капли магнитной жидкости должны иметь размер 2 – 10 мкм, так как в ходе сшивки возможно уплотнение геля.

Для ультразвуковой обработки эмульсий МЖ применяли погружной ультразвуковой диспергатор (22 кГц, 100 Вт). Пипетирование с частотой 3-12 Гц проводили с помощью установки, изображённой на рисунке 2.4.



1 – пипетка 200 мкл, 2 – сменный наконечник, 3 – пробирка с образцом, 4 – водяной термостат, 5 – мешалка «RW16 basic» («ИКА», Германия), 6 – эксцентрик с шариковым подшипником, закреплённый в патроне мешалки

Рисунок 2.4 – Установка для получения эмульсий магнитных жидкостей и микросфер

С целью оптимизации методики пипетирования искали аналитические закономерности влияния диаметра наконечника, частоты и времени на выход фракций капель различного размера. В качестве примера МЖ использовали водный раствор хитозана 7,5 г/л, содержащий 3,25 г/л магнетита, динамической вязкостью 32,6 мПа·с при 20 °С. Сменные конические полипропиленовые наконечники имели внутренний диаметр у среза 0,35, 0,8 или 1,4 мм. Для определения частоты применяли видеосъёмку 30 кадров в секунду с последующей раскадровкой. Эффективный объём цикла, зависящий от сопротивления течению жидкости в наконечнике, оценивали, отмечая по нижнему краю мениска минимальный и максимальный уровни жидкости в наконечнике в процессе пипетирования и взвешивая соответствующий объём воды.

Эмульсии МЖ наблюдали в камере Горяева на оптическом микроскопе «Микро МБ» (ОАО «Планар», Беларусь), оснащённом цветной цифровой камерой «BR3150LC» («ЕС Экспертс», Россия). Для анализа изображений капель использовали программное обеспечение ImageJ [156]. Обработываемые снимки содержали не менее 300 капель на образец. Статистическую обработку данных проводили в Microsoft Excel. Массовую долю фракции дисперсной фазы эмульсии рассчитывали как долю суммарного объёма капель данной фракции от общего объёма капель на изображении. Для оценки полидисперсности использовали индекс полидисперсности, вычисляемый по формуле (1.2).

2.4 Вывод кинетических уравнений для массовой доли фракции капель дисперсной фазы эмульсии

На рисунке 2.5 изображена схема установки, общий вид которой представлен на рисунке 2.4.

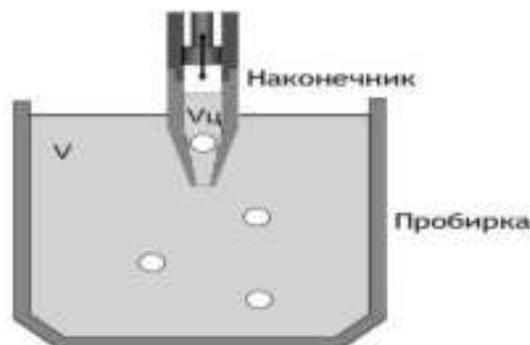


Рисунок 2.5 – Схема установки для эмульгирования магнитных жидкостей

Пусть в общем объёме эмульсии (V) равномерно распределено количество капель (q_0) исходного диаметра, который больше критического d_k , т.е. при попадании в объём, обрабатываемый за цикл ($V_{ц}$), любая капля будет раздроблена, как

описано в [67]. Если q_0 достаточно велико, чтобы количества капель в объёмах V и V_u были пропорциональны данным объёмам, то в первый цикл попадут и будут раздроблены $q_0(V_u/V)$ капель. Нераздробленными после первого цикла останется количество капель q_1 , рассчитываемое по формуле (2.3), после второго – q_2 , определяемое по формуле (2.4), после i -го – q_i , вычисляемое согласно (2.5).

$$q_1 = q_0(1 - V_u/V) \quad (2.3)$$

$$q_2 = q_1(1 - V_u/V) = q_0(1 - V_u/V)^2 \quad (2.4)$$

$$q_i = q_0(1 - V_u/V)^i \quad (2.5)$$

Поскольку количество циклов определяется по формуле (2.6), можем преобразовать формулу (2.5) в (2.7) и тождественную ей (2.8).

$$i = Nt, \quad (2.6)$$

$$q_t = q_0(1 - V_u/V)^{Nt}, \quad (2.7)$$

$$q_t = q_0 e^{\ln(1 - V_u/V)Nt}, \quad (2.8)$$

где N – частота, t – время пипетирования, q_t – количество нераздробленных капель по истечении времени t пипетирования.

Переходя от количества капель к их концентрации путём деления на общий объём V (константа), получаем из (2.8) уравнение (2.9)

$$c_t = c_0 e^{\ln(1 - V_u/V)Nt}, \quad (2.9)$$

где c_t – текущая концентрация нераздробленных капель.

Приняв постоянную $-k$ согласно выражению (2.10), приходим к формуле (2.11), которая соответствует классическому виду уравнения процесса 1-го порядка [157, с. 45]. Тождественна ей формула (2.12).

$$\ln(1 - V_u/V)N = -k \quad (2.10)$$

$$c_t = c_0 e^{-kt} \quad (2.11)$$

$$c_t/c_0 = e^{-kt}, \quad (2.12)$$

где c_t/c_0 – текущая концентрация нераздробленных капель относительно исходной.

Так как концентрация нераздробленных капель относительно исходной равна их количеству относительно исходного q_t/q_0 , которое в свою очередь равно массовой доле нераздробленных капель $m_{(\geq dk)}/m$, где $m_{(\geq dk)}$ – общая масса нераз-

дробленных капель (то есть имеющих диаметр не меньше критического), m – масса дисперсной фазы – можем записать выражение (2.12) в виде (2.13).

$$m_{(\geq d_k)}/m = e^{-kt} \quad (2.13)$$

Поскольку на практике условия дробления капель неодинаковы: в разные фазы цикла в разных местах наконечника существуют зоны с различными градиентами скорости течения среды, и не все капли, попавшие в цикл, проходят одни и те же зоны – не существует единого значения критического диаметра. Переходя от критического диаметра d_k к произвольному диаметру d , запишем формулу (2.13) в виде (2.14).

$$m_{(\geq d)}/m = e^{-kt} \quad , \quad (2.14)$$

где $m_{(\geq d)}$ – общая масса капель, имеющих диаметр не меньше d .

При этом необходимо иметь в виду, что выражение для k (2.15) будет отличаться от вида (2.10) коэффициентом p , характеризующим отличную от 1 вероятность дробления попавшей в цикл капли до продуктов диаметром меньше d .

$$-k = \ln(1 - pV_d/V)N \quad (2.15)$$

Представляя дробление капель как многостадийный процесс, для прогнозирования времени наибольшего выхода целевой фракции необходимо исследовать кинетику дробления капель разного размера, определить соответствующие k и подставить в формулу (2.16) для времени наибольшего выхода промежуточного продукта в цепи последовательных процессов [157, с. 64], где k_2 – константа скорости дробления фракции капель данного размера; k_1 – константа скорости её образования, то есть дробления фракции, размер капель которой в 1,26 раза больше данного (так как при дроблении пополам диаметр исходной капли в 1,26 раза больше, чем у образующихся).

$$t_{max} = \ln(k_2/k_1)/(k_2 - k_1) \quad (2.16)$$

Значение k_1 может быть приблизительно вычислено методом линейной интерполяции между ближайшими известными значениями констант дробления фракций.

2.5 Получение эмульсий сшивающих реагентов

Для определения условий получения эмульсий сшивающих реагентов, предназначенных для взаимодействия с эмульсиями магнитных жидкостей (МЖ) с целью формирования микросфер, исследовали эмульгирование водных растворов хлорида кальция и глутаральдегида в изооктане с добавками Span 85 и

Tween 85 (IST). Кроме того, исследовали эмульгирование в IST водного раствора хлорида натрия – соли, которая не является сшивающим агентом, но может влиять на коалесценцию эмульсии и таким образом – на её агрегативную устойчивость, изменяя ионную силу дисперсной фазы [51, 52].

Для эмульгирования в IST водных растворов NaCl, CaCl₂, глутаральдегида применяли погружной ультразвуковой диспергатор (22 кГц, 100 Вт). Мутность эмульсий оценивали по боковому светорассеянию на спектрофлуориметре «СМ 2203» («Solar», Беларусь) или визуально, сравнивая со стандартом 20 единиц мутности формазина (ЕМФ), который в полипропиленовой пробирке неотличим от дистиллированной воды. Критерием нанодисперсности считали прозрачность эмульсии. Отсутствие видимой опалесценции свидетельствует о том, что размер капель водной фазы меньше 100 нм [158]. Данный критерий был подтверждён микроскопией эмульсий в камере Горяева, не выявившей в визуально прозрачных эмульсиях капель, размер которых позволяла бы определить разрешающая способность микроскопа (0,2 мкм).

Получению наноэмульсий вместо микроэмульсий придавали значение с учётом того, что чем меньше размер капель – тем больше удельная поверхность и диффузионный перенос массы сшивающего агента через неё. Кроме того, если имеет место коалесценция, то в случае слияния многих мелких капель, содержащих реагент «А» (например, глутаральдегид) с каждой из крупных капель, содержащих реагент «Б» (например, хитозан) в результирующей капле статистически ожидаемо приблизительно одинаковое соотношение реагентов, в отличие от случая, когда оба реагента содержатся в каплях крупного размера, между которыми происходят менее многочисленные акты слияния (например, 2 капли «А» с одной каплей «Б» или наоборот). Достаточным временем стабильности наноэмульсии считали 5 минут: за это время в условиях эксперимента капли водных растворов хитозана и поливинилового спирта, взвешенные в IST, отверждались в микросферы в присутствии эмульгированного в той же среде 25% водного раствора глутаральдегида.

2.6 Получение магнитных микросфер

Магнитные микросферы (ММС) получали из капель эмульгированных магнитных жидкостей (МЖ) путём сшивки содержащихся в них полимеров. Для ионной сшивки пектина и альгиновой кислоты применяли хлорид кальция, а для ковалентной перекрёстной сшивки желатина, хитозана и ПВС – глутаральдегид.

Глутаральдегид – диальдегид, который сшивает полимеры (в том числе желатин и хитозан) по аминогруппам с образованием оснований Шиффа, которые

могут быть восстановлены цианборгидридом или боргидридом натрия во вторичные амины (рисунок 2.6), в результате чего продукты сшивки становятся более устойчивы к гидролизу [80, с. 134]. Также реагирует с гидроксигруппами поливинилового спирта с образованием ацеталей (рисунок 2.7, а) [81]. Использовали 50% водный раствор глутаральдегида производства «Sigma» (Германия). Непро-реагировавшие альдегидные группы восстанавливали в гидроксильные боргидридом натрия [80, с. 174]. Один из продуктов гидролиза боргидрида – тетраборатанион [159] – мог принимать участие в сшивке ПВС (рисунок 2.7, б) [82].

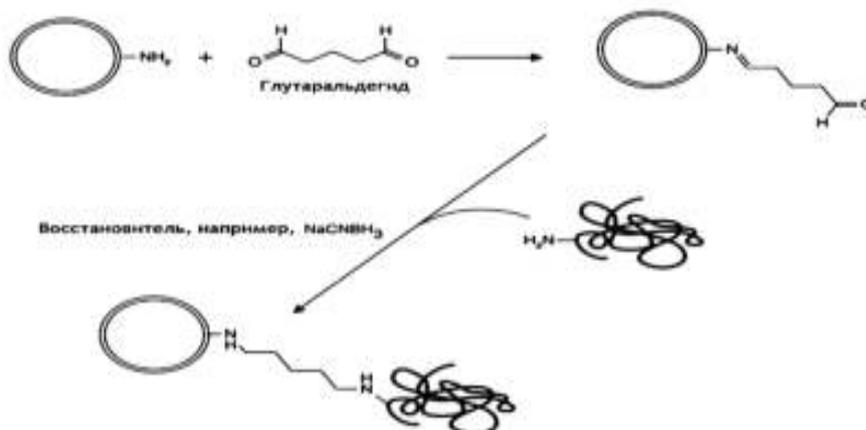
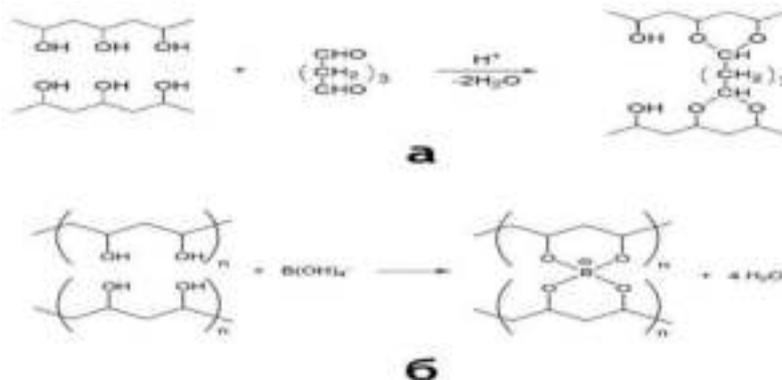


Рисунок 2.6 – Схема сшивки глутаральдегидом объектов, несущих аминогруппы [80, с. 891]



а - глутаральдегидом, б – тетрагидроборатанионом

Рисунок 2.7 – Схема перекрёстной сшивки молекул поливинилового спирта

Для получения MMC путём ионной сшивки альгинатную или пектиновую МЖ эмульгировали в изооктане с добавками 1,5 % Tween 85 и 2,8 % Span 85 (IST) пипетированием или ультразвуковым диспергатором, добавляли равный объём полученной с помощью ультразвукового диспергатора эмульсии (1 объёмная часть CaCl_2 1 М в 16 объёмных частях IST), перемешивали 20 минут при комнатной температуре. Полученные MMC осаждали магнитом и отмывали 1 раз 96% этанолом и 2 раза дистиллированной водой.

Для получения ММС путём ковалентной сшивки готовили эмульсию желатиновой или хитозановой или поливинилспиртовой МЖ в IST; добавляли равный объём эмульсии, полученной с помощью ультразвукового диспергатора из смеси: 1 объёмная часть раствора глутаральдегида 275 г/л и CaCl_2 1 М на 16 объёмных частей IST; пипетировали: желатин 30 минут при комнатной температуре; хитозан 30 минут при 70 °С; ПВС 1 ч при 60 °С. Желатиновые ММС отмывали раствором глутаральдегида 55 г/л в 96% этаноле; инкубировали 12 часов при комнатной температуре в растворе 183 г/л глутаральдегида, 0,34 М NaCl, 0,13 М фосфатов натрия $\text{Na}_x\text{H}_{3-x}\text{PO}_4$, pH 7; трижды отмывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ) 0,15 М NaCl 0,02 М $\text{Na}_x\text{H}_{3-x}\text{PO}_4$, pH 7,4. Хитозановые ММС отмывали раствором глутаральдегида 55 г/л в этаноле, инкубировали 30 минут при 70 °С в растворе 183 г/л глутаральдегида, 0,34 М NaCl, 0,13 М $\text{Na}_x\text{H}_{3-x}\text{PO}_4$, pH 7 и трижды отмывали ФСБ. Поливинилспиртовые ММС трижды отмывали дистиллированной водой (если не требовалась дальнейшая модификация поверхности) или 1 раз раствором глутаральдегида 55 г/л в этаноле (выдержка 2 минуты при 60 °С) и 3 раза дистиллированной водой.

Микросферы наблюдали в камере Горяева на оптическом микроскопе «Микро МБ» (ОАО «Планар», Беларусь), оснащённом цветной цифровой камерой «BR3150LC» («ЕС Экспертс», Россия). Микроскопию проводили в светлом поле с конденсором, настроенным по Кёллеру, или в режиме косо́го освещения.

Форму микросфер изучали на сканирующих электронных микроскопах «S4800» («Hitachi», Япония) или «JSM 6000» («JEOL», Япония), на котором исследовали также элементный состав поверхности ММС в режиме низкого вакуума без напыления.

Морфологию субмикронных магнитных частиц изучали на просвечивающем электронном микроскопе «ЭМ-125» (СССР) при энергии электронов 60 кэВ.

Для анализа изображений использовали программное обеспечение ImageJ [156]. Статистическую обработку данных проводили в Microsoft Excel. Для оценки полидисперсности использовали индекс полидисперсности, вычисляемый по формуле (1.2). Соотношение объёмов капель и сформированных из них микросфер рассчитывали как соотношение усреднённых объёмов не менее 100 объектов того и другого типов, относящихся к фракции с диаметром не менее 90-й перцентиля, с учётом того, что мелкие фракции микросфер теряются при многократных отмывках в процессе синтеза.

Дзета-потенциал ММС определяли методом динамического светорассеяния при электрофорезе в U-образной кювете на приборе «ZetaSizer Nano-ZS» («Malvern», Великобритания) в режиме автоматического выбора напряжения.

Инфракрасные спектры микросфер получали на ИК-спектрометре с преобразованием Фурье «Tensor 27» («Bruker», США), материал был запрессован в таблетку KBr.

2.7 Получение флуоресцентных магнитных микросфер

Флуоресцентные красители – производные 2-аминопиримидина 4,4'-(1E,1'E)-2,2'-(2-аминопиримидин-4,6-диил) бис(этен-2,1-диил) бис(N,N-диметилфениламин) (АПМ) и 4,4'-(1E,1'E)-2,2'-(2-аминопиримидин-4,6-диил) бис(этен-2,1-диил) бис(N,N-диэтилфениламин) (АПЭ) – были синтезированы (рисунок 2.8) [160] и предоставлены лабораторией органических композиционных материалов Института химии новых материалов НАН Беларуси.

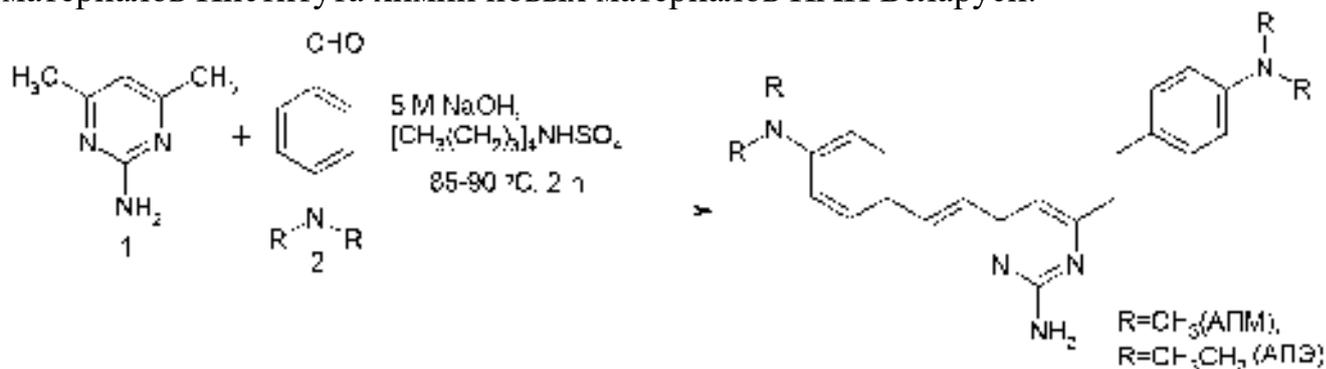
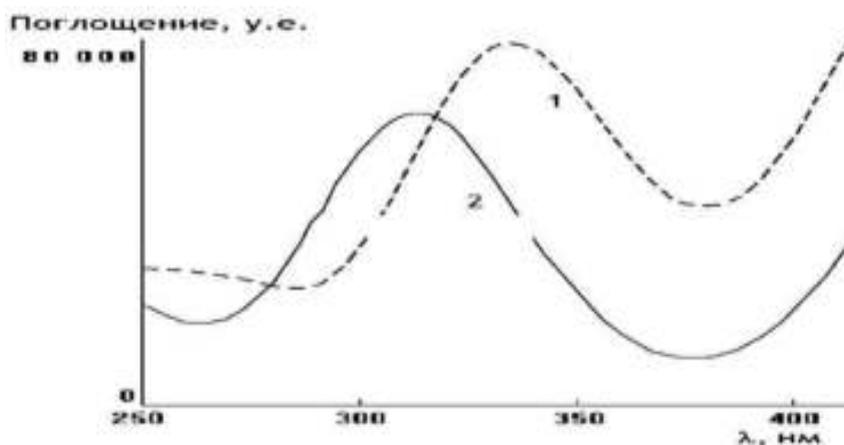


Рисунок 2.8 – Схема синтеза флуоресцирующих 2-аминопиримидин-бис-этен-бис-диалкилфениламинов

В лаборатории «Материалы и технологии жидкокристаллических устройств» ИХНМ НАН Беларуси с помощью пакета квантово-химических программ Gaussian 03 [161] было спрогнозировано влияние протонной таутомерии на оптические спектры поглощения АПМ и АПЭ. Расчёт позволил ожидать наличие одного из максимумов вблизи 340 нм (область практически важная благодаря близости к пику 334 нм спектра ртутной лампы) и его сдвиг в коротковолновую область при протонировании молекулы, сопутствующем закислению среды (рисунок 2.9).



1 – нейтральная молекула, 2 – протонированная форма

Рисунок 2.9 – Расчётные спектры поглощения АПЭ в области до 400 нм

Включение 4,4'-(1E,1'E)-2,2'-(2-аминопиримидин-4,6-диил) бис(этен-2,1-диил) бис(N,N-диметилфениламина) (АПМ) и 4,4'-(1E,1'E)-2,2'-(2-аминопиримидин-4,6-диил) бис(этен-2,1-диил) бис(N,N-диэтилфениламина) (АПЭ) в состав поливинилспиртовых ММС проводили двумя способами: добавляя 50 мкл насыщенного раствора красителя в этаноле в 200 мкл магнитной жидкости перед эмульгированием и сшивкой либо используя для приготовления эмульсии среду IST, предварительно насыщенную красителем.

Для получения ММС, меченных квантовыми точками, микросферы из сшитых глутаральдегидом хитозана или поливинилового спирта дважды отмывали дистиллированной водой, инкубировали 5 минут в водном растворе аммиака 25%, отмывали этанолом 96%, ресуспендировали в 100 мкл тетраэтоксисилана, содержащего 5 г/л квантовых точек CdSe/ZnS (PlasmaChem кат. № PL-QD-O-560). Микропробирку инкубировали 5 минут в ультразвуковой ванне, затем добавляли 1,5 мл этанола, перемешивали. Микросферы осаждали магнитом, трижды отмывали этанолом, дважды дистиллированной водой и ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) 0,15 М рН 7,4.

Флуоресценцию микросфер наблюдали в камере Горяева на оптическом микроскопе «Микро МБ» (ОАО «Планар», Беларусь) с каналом возбуждения флуоресценции на основе ртутной лампы сверхвысокого давления НВО 100W/2 («Osram», Германия), оснащённом цветной цифровой камерой «BR3150LC» («ЕС Экспертс», Россия) и волноводом для передачи сигнала на микроспектрофлуориметр. Оптические спектры и интенсивность флуоресценции микросфер исследовали с помощью микроспектрофлуориметра «STS-VIS» («Ocean Optics», США). В зелёной и красной областях спектры записывали отдельно из-за необходимости смены светофильтров микроскопа.

Колориметрические исследования флуоресценции микросфер проводили путём анализа их изображений, записанных в виде графического файла с глубиной кодировки 8 бит (256 уровней яркости) для каждого из трёх цветовых каналов – красного (R), зелёного (G) и синего (B). Интенсивности флуоресценции некоторых объектов различались в десятки раз и не могли быть точно оценены на одном и том же снимке из-за недостаточности динамического диапазона камеры и глубины кодировки. Для колориметрического сравнения таких объектов их снимки делали при разных выдержках камеры. Предварительно с помощью контрольной съёмки флуоресцентных микросфер, содержащих акридиновый оранжевый, было установлено, что зависимость яркости изображения (за вычетом фона) от выдержки линейна (рисунок 2.10).

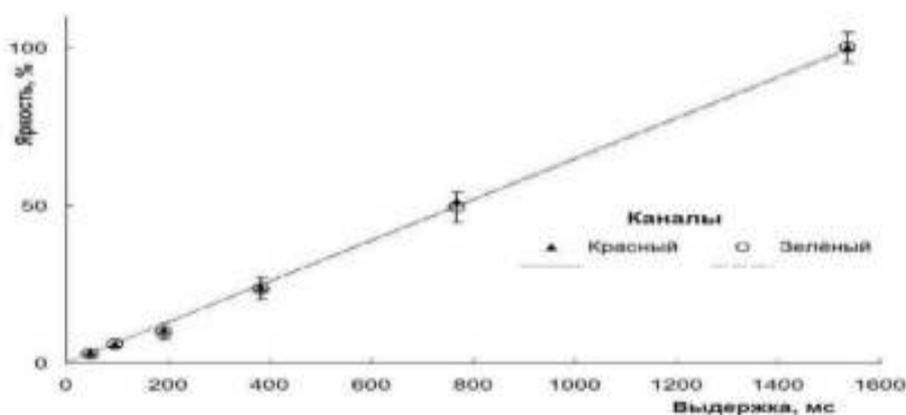


Рисунок 2.10 – Зависимость средней яркости изображений микросфер, содержащих краситель акридиновый оранжевый, от выдержки цифровой камеры «BR3150LC»

Для анализа изображений использовали программное обеспечение ImageJ [156]. Получали маску изображения, включающую пиксели, яркость которых по исследуемому каналу выше порогового (фоновое) значения, после чего вычисляли среднюю яркость в пределах маски, за вычетом средней яркости фона (рисунок 2.11). Статистическую обработку данных проводили в Microsoft Excel.

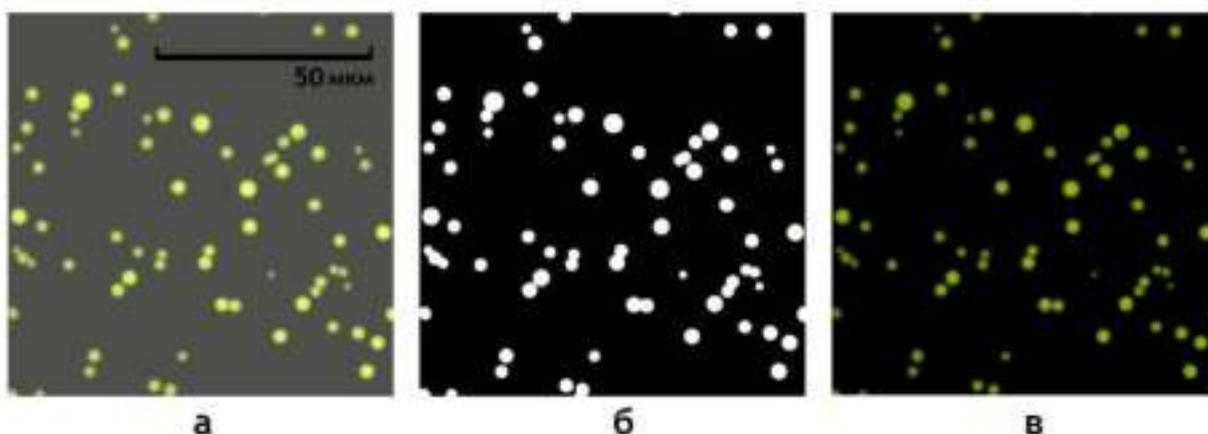


Рисунок 2.11 – Цифровое изображение флуоресцентных микросфер (а), его маска (б) и маскированное изображение за вычетом яркости фона (в)

Оптические спектры возбуждения и флуоресценции растворов флуорохромов в фосфатном буфере исследовали на спектрофлуориметре-спектрофотометре «СМ 2203» («Solar», Беларусь) при величине щелей монохроматора 5 нм.

2.8 Модификации поверхности микросфер

Модификация микросфер карбоксиметилдекстраном (КМД). Карбоксилирование декстрана (60 кДа) проводили в растворе бромуксусной кислоты 0,125 М и NaOH 2 М с перемешиванием в течение 8 ч. Доводили рН до 3,0, диа-

лизовали и высушивали. Для характеристики КМД определяли дзета-потенциал покрытых им наночастиц CdSe/ZnS (PlasmaChem кат. № PL-QD-O-560). В 500 мкл MES-буфера – 0,1 М р-ра 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты в воде, рН 5, растворяли 1 мг КМД и 2 мг 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимида (EDC). К полученному раствору добавляли 250 мкл суспензии хитозановых или поливинилспиртовых магнитных микросфер (ММС) в MES-буфере 0,1 М рН 5; инкубировали с перемешиванием 2 ч при 37 °С, отмывали дистиллированной водой и ФСБ рН 7,4.

Модификация микросфер глицином. Непосредственно после сшивки глутаральдегидом ММС инкубировали 30 минут при 60 °С в растворе глицина 2,5 г/л, NaCl 0,5 М, фосфаты натрия 0,2 М, при рН 7 или 9, либо в растворе глицина 5 г/л и уксусной кислоты 10 об.% при рН 2, затем трижды отмывали дистиллированной водой.

Модификация микросфер ПВС. Непосредственно после сшивки глутаральдегидом ММС ресуспендировали в водном растворе ПВС 5 г/л и уксусной кислоты 10 об.%, обрабатывали УЗ 22 кГц 100Вт до кипения, перемешивали 45 минут при 60 °С и трижды отмывали дистиллированной водой.

Модификация микросфер ПВС и глицином. Непосредственно после сшивки глутаральдегидом ММС суспендировали в водном растворе ПВС 5 г/л, глицина 5 г/л и уксусной кислоты 10 об.% (рН 2), обрабатывали УЗ 22 кГц 100Вт до кипения, перемешивали 45 минут при 60 °С и трижды отмывали дистиллированной водой.

Обработка пероксидом водорода. ММС суспендировали в водном растворе, содержащем 10 об.% уксусной кислоты и 4,0 об.% или 15,0 об.% H_2O_2 , перемешивали 45 минут при 70 °С, дважды отмывали дистиллированной водой и один раз – буфером, содержащим 0,5 М NaCl и 0,2 М фосфатов натрия $Na_xH_{3-x}PO_4$, рН 9. Известно [162], что при 70 °С катализируемая кислотой реакция окисления пероксидом водорода альдегидных групп в карбоксильные протекает медленно (выход порядка нескольких процентов в течение 2 ч), что и обусловило выбор данного температурного режима для частичного окисления –СНО в –СООН.

Обработка боргидридом натрия. Для конверсии непрореагировавших альдегидных групп в спиртовые, а оснований Шиффа (продуктов сшивки) – во вторичные амины проводили 2 цикла по 20 минут обработки $NaBH_4$ 10 мг/мл в буфере, содержащем 0,5 М NaCl и 0,2 М фосфатов натрия $Na_xH_{3-x}PO_4$, рН 9, при 60 °С. В конце первого цикла суспензию обрабатывали на погружном ультразвуковом диспергаторе 22 кГц 50Вт в течение 15 с. Восстановленные боргидридом ММС трижды отмывали ФСБ и ресуспендировали в ФСБ. В случае поливинилспиртовых микросфер обработка боргидридом натрия кроме инактивации альдегидных групп обеспечивает дополнительную сшивку полимера остатком борной кислоты (рисунок 2.4, б).

Иммобилизация авидина. Влияние условий обработки микросфер 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимидом (EDC) и N-гидроксисукцинимидом (NHS) на иммобилизацию авидина (производства Sigma) изучали на поливинилспиртовых ММС и микросферах Magnosphere™ 300 Carboxyl. 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 часов.

- двухстадийным, при котором микросферы обрабатывали раствором EDC 20 г/л и NHS 10 г/л в MES-буфере в течение 15 минут, дважды отмывали, инкубировали 2,5 часа в MES-буфере, содержащем 250 мг/л авидина.

После инкубации с авидином микросферы трижды отмывали 0,15 М (рН 7,4) ФСБ с добавкой 5 г/л бычьего сывороточного альбумина (БСА). Для обнаружения авидина, иммобилизованного на ММС, их обрабатывали раствором биотин-4-флуоресцеина 1 мг/л в ФСБ. На микрофотографиях сравнивали флуоресценцию модифицированных и немодифицированных авидином микросфер, обработанных таким же раствором биотин-4-флуоресцеина.

Получение лизата клеточных стенок дрожжей. В 2 мл микропробирку помещали 50 мг сухих пекарских дрожжей (*S. cerevisiae*), добавляли 1 мл дистиллированной воды, перемешивали. Для удаления содержимого клеток суспензию обрабатывали погружным УЗ-диспергатором (22 кГц, 100 Вт) на охлаждающей водяной бане; при закипании давали остыть; общая продолжительность обработки 2 минуты. Осаждали на центрифуге, удаляли супернатант, дважды отмывали 90% муравьиной кислотой. Ресуспендировали в 1 мл муравьиной кислоты, обрабатывали УЗ-диспергатором 22 кГц на охлаждающей водяной бане до получения прозрачной, слегка опалесцирующей жидкости. Мощность УЗ выбиралась такой, чтобы температура обрабатываемой суспензии была ≈ 98 °С.

Модификация микросфер дрожжевым лизатом. Поливинилспиртовые ММС получали аналогично п.2.5, но в магнитную жидкость, содержащую 25 г/л ПВС, добавляли 10 об.% дрожжевого лизата в 90% муравьиной кислоте. Непосредственно после получения ММС инкубировали в растворе, содержащем 9 объёмных частей воды и 1 – дрожжевого лизата в 90% муравьиной кислоте, после чего дважды отмывали дистиллированной водой и один раз – буфером, содержащим 0,5 М NaCl и 0,2 М фосфатов натрия $\text{Na}_x\text{H}_{3-x}\text{PO}_4$, рН 9. Затем ММС обрабатывали NaNH_4 , как описано выше. Разработан лабораторный технологический регламент на получение микросфер, модифицированных дрожжевым лизатом (Приложение А).

2.9 Биологические испытания

Мононуклеарные клетки периферической крови (МПК) получали центрифугированием крови, стабилизированной этилендиаминтетраацетатом натрия ($\text{Na}_2\text{ЭДТА}$), на гистопаке производства «Sigma» (Германия) плотностью 1,077 г/л.

Неспецифическая адгезия ММС к клеткам. Мононуклеарные клетки периферической крови (МПК) отмывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ) pH 7,4 с добавкой 10^{-5} М красителя Hoechst-3342 для витального окрашивания ядер, затем – ФСБ pH 7,4 без красителя и сепарационной средой состава: ФСБ pH 7,4 с добавками 5 г/л бычьего сывороточного альбумина (БСА) и 2 мМ $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$. Суспензии ММС и МПК в сепарационной среде объединяли, обеспечивая соотношение ММС:МПК 10:1, инкубировали 20 минут при 4°C, перемешивая каждые 5 минут, и проводили 3 цикла магнитной сепарации, каждый раз удаляя супернатант и ресуспендируя осадок в свежей сепарационной среде. Клетки в осадке идентифицировали по синей флуоресценции ядер при освещении в ультрафиолетовой области спектра на люминесцентном микроскопе «Микро МБ» (ОАО «Планар», Беларусь) с каналом возбуждения флуоресценции на основе ртутной лампы сверхвысокого давления НВО 100W/2 («Osram», Германия), оснащённом цветной цифровой камерой «BR3150LC» («ЕС Экспертс», Россия). Количество повторностей опытов по сепарации клеток составляло не менее 3 для каждого состава оболочки микросфер.

Иммуномагнитную сепарацию лимфоцитов CD8⁺ из суспензии МПК осуществляли в среде, которая представляла собой ФСБ с добавками 5,0 г/л БСА и 2,0 мМ этилендиаминтетраацетата натрия. Магнитные микросферы инкубировали 15 минут с биотинилированными антителами анти-CD8, взятыми в количестве 2,00 или 6,25 или 12,50 мкг на 10^9 микросфер, после чего трижды отмывали. Микросферы, «нагруженные» анти-CD8, смешивали с клетками в соотношении 10:1, инкубировали 20 минут, осторожно перемешивая каждые 5 минут, и осаждали на магните. В исходной суспензии и супернатантах клетки окрашивали меченными фикоэритрином антителами CD8 и исследовали на проточном цитофлуориметре «FC500» («Beckman Coulter», США), различая популяции с низкой (менее $1 \cdot 10^3$ у.е.), средней (от $1 \cdot 10^3$ до $2 \cdot 10^4$ у.е.) и высокой (более $2 \cdot 10^4$ у.е.) интенсивностями флуоресценции фикоэритрина. Жизнеспособность клеток определяли по окрашиванию ядер флуорохромами Hoechst-33342 и йодистым пропидием [163]. 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 и исходной суспензиях. Удаление целевой популяции из 1-го супернатанта вычисляли делением разности между долями CD8⁺ в исходной суспензии и в 1-м супернатанте на

долю CD8⁺ в исходной суспензии. Общее количество образцов крови при исследовании магнитной сепарации лимфоцитов CD8⁺ составило 36 в ходе клинических испытаний микросфер на трёх базах.

Оценка фагоцитарной активности нейтрофилов. Сравнивали результаты, полученные с применением ММС и инактивированных нагреванием пекарских дрожжей. Использовали метод Горчакова [164] с увеличенным временем инкубации. Клетки крови, разведённой в 2 раза ФСБ (рН 7,4), осаждали центрифугированием. С поверхности полученного осадка отбирали фракцию, богатую лейкоцитами. В круглодонной микропробирке смешивали 100 мкл отобранной фракции, 100 мкл аутологичной плазмы и 100 мкл 1,0% суспензии инактивированных нагреванием 30 минут при 60 °С пекарских дрожжей либо ММС в среде RPMI-1640. Пробирку центрифугировали 5 мин при 1000 об./мин и помещали в CO₂-инкубатор (37 °С, концентрация CO₂ 5 %). Содержимое пробирки ресуспендировали через 120 минут и в случае дрожжей окрашивали акридиновым оранжевым (АО) 10⁻⁴ М; отбирали аликвоту в камеру Горяева и исследовали на оптическом микроскопе «Микро МБ» (ОАО «Планар», Беларусь) с каналом возбуждения флуоресценции на основе ртутной лампы сверхвысокого давления «НВО 100W/2» («Osram», Германия), оснащённом цветной цифровой камерой «BR3150LC» («ЕС Экспертс», Россия). В каждом образце исследовали 50 нейтрофилов, оценивая количество поглощенных ММС или дрожжевых клеток с зелёной (непереваренные, n_з) и красной (перевариваемые, n_к) флуоресценцией. В случае дрожжей рассчитывали фагоцитарный индекс по формуле (2.17) и фагоцитарное число по формуле (2.18) [164].

$$\Phi И = N_{нф\delta} / N_{нф} \quad , \quad (2.17)$$

$$\Phi Ч = N_{\delta} / N_{нф} \quad , \quad (2.18)$$

где $\Phi И$ – фагоцитарный индекс; $\Phi Ч$ – фагоцитарное число; $N_{нф}$ – общее количество нейтрофилов; $N_{нф\delta}$ – количество нейтрофилов, содержащих не менее 1 поглощённой дрожжевой клетки; N_{δ} – общее количество поглощённых дрожжевых клеток

В случае микросфер $\Phi И$ и $\Phi Ч$ рассчитывали аналогично, но вместо дрожжевых клеток считали поглощённые нейтрофилами ММС. Кроме того, рассчитывали соотношение яркостей красного и зелёного каналов (G/R) изображений микросфер. Было исследовано 3 образца крови, каждый с применением как дрожжей, так и ММС.

2.10 Выводы к главе 2

Методики эмульгирования магнитных жидкостей и получения микросфер характеризуются единообразием, что позволяет осуществлять однофакторные эксперименты, в каждом случае достоверно прослеживая зависимость свойств получаемых эмульсий и микросфер от варьируемого параметра. Варьируемыми параметрами являются: типы и концентрации полимеров и магнитных частиц в магнитных жидкостях, концентрации ПАВ в дисперсионной среде, концентрации солей в растворах сшивающих реагентов, внутренний диаметр наконечника пипетки, частота и время пипетирования, составы и способы модификации оболочки микросфер, концентрация антители во время обработки ими микросфер.

Методика синтеза суперпарамагнитных наночастиц магнетита отмасштабирована в сторону уменьшения для воспроизводимого обеспечения каждого опыта свежей партией магнитных наночастиц (МНЧ), что исключало их необратимую агрегацию (слёживание) при хранении. Методики получения ферромагнитных частиц более сложны и менее воспроизводимы, чем суперпарамагнитных, однако воспроизводимость экспериментов обеспечена получением крупных партий МНЧ, так что во всех опытах каждый тип ферромагнитных частиц брался из одной и той же партии. [1-А, 9-А]

Исходя из схемы установки для пипетирования эмульсий и представления об эмульгировании как о многостадийном дроблении капель дисперсной фазы (ДФ), математически доказано, что процесс эмульгирования должен подчиняться кинетическому уравнению первого порядка. Это позволяет прогнозировать время наибольшего выхода целевой фракции капель ДФ, исходя из экспериментально установленных кинетических констант. [8-А]

Для исследования процесса эмульгирования, морфологии микросфер и их флуоресценции в работе широко применяется оптическая микроскопия и современные методы анализа изображений. Комплексное исследование свойств микросфер включает также сканирующую и просвечивающую электронную микроскопию, магнитометрию, ИК- спектрометрию с преобразованием Фурье, определение дзета-потенциала, биологические испытания.

Применявшийся комплекс методик получения и исследования эмульсий и микросфер является достаточным для решения задач, поставленных в рамках данной диссертационной работы.

ГЛАВА 3

ЭМУЛЬГИРОВАНИЕ МАГНИТНЫХ ЖИДКОСТЕЙ, ВОДНЫХ РАСТВОРОВ ГЛУТАРАЛЬДЕГИДА И ХЛОРИДОВ НАТРИЯ И КАЛЬЦИЯ В ИЗООКТАНЕ С ДОБАВКАМИ SPAN 85 И TWEEN 85

При пипетировании в изооктане с добавками Span 85 и Tween 85 (IST) магнетитсодержащих водных растворов альгиновой кислоты 20,0 г/л, или пектина 30,0 г/л, или высокомолекулярной фракции желатина 40,0 г/л, или хитозана 7,5 г/л, или поливинилового спирта (ПВС) 25,0-100,0 г/л получаются капли от 2,0 до 20,0 мкм, при диспергировании ультразвуком – от 0,1 до 0,4 мкм. С учётом требуемого для получения микросфер диаметра капель магнитной жидкости (МЖ) 2 – 10 мкм, в качестве способа эмульгирования выбрали пипетирование.

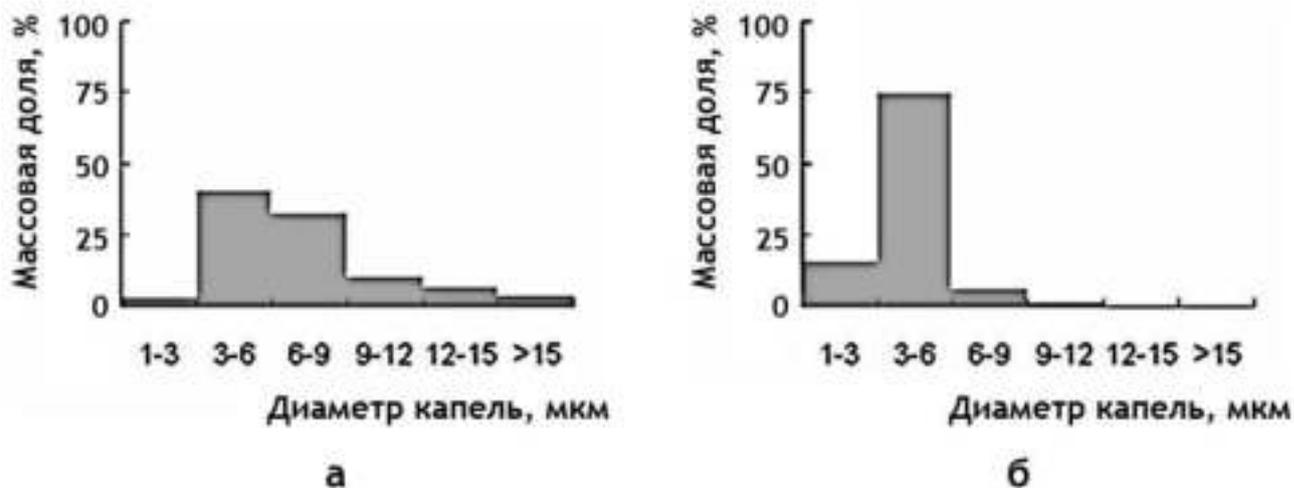
3.1 Влияние пипетирования на размер капель магнитной жидкости

При пипетировании в IST водного раствора хитозана 7,5 г/л, содержащего 3,25 г/л магнетита (динамическая вязкость раствора 32,6 мПа·с при 20 °С, общий объём эмульсии 4,1 мл, объёмное соотношение полярной и неполярной фаз 1:7,2, концентрация Span 85 2,8% и Tween 85 1,5 %), средний диаметр капель и индекс полидисперсности (ИПД) уменьшаются со временем пипетирования (таблица 3.1). При различных сочетаниях диаметра наконечника (0,35–1,40 мм), частоты (6 или 12 Гц) и времени пипетирования (2–15 минут) медиана диаметра капель (d_{50}) находится в интервале 2,7–3,8 мкм, а пятая перцентиль (d_5) – 1,7–2,2 мкм. Зависящая от выборки погрешность определения d_5 и d_{50} в данных опытах не превышала 0,1 мкм.

Таблица 3.1 – Средний диаметр ($d_{cp.}$) и индекс полидисперсности (ИПД) капель эмульсии магнетитсодержащего раствора хитозана 7,5 г/л в IST при различных сочетаниях диаметра наконечника, частоты и времени пипетирования

Диаметр наконечника / частота	Время, мин				
	2	5	10	15	30
	$d_{cp.}$ / ИПД				
0,80 мм / 6 Гц	5,5 / 1,05	5,1 / 0,60	4,3 / 0,35	4,0 / 0,26	3,7 / 0,15
0,80 мм / 12 Гц	4,2 / 0,17	3,7 / 0,18	3,6 / 0,13	3,2 / 0,10	–
0,35 мм / 12 Гц	–	4,1 / 0,40	4,2 / 0,22	–	–
1,40 мм / 12 Гц	–	4,1 / 0,37	3,5 / 0,33	–	–

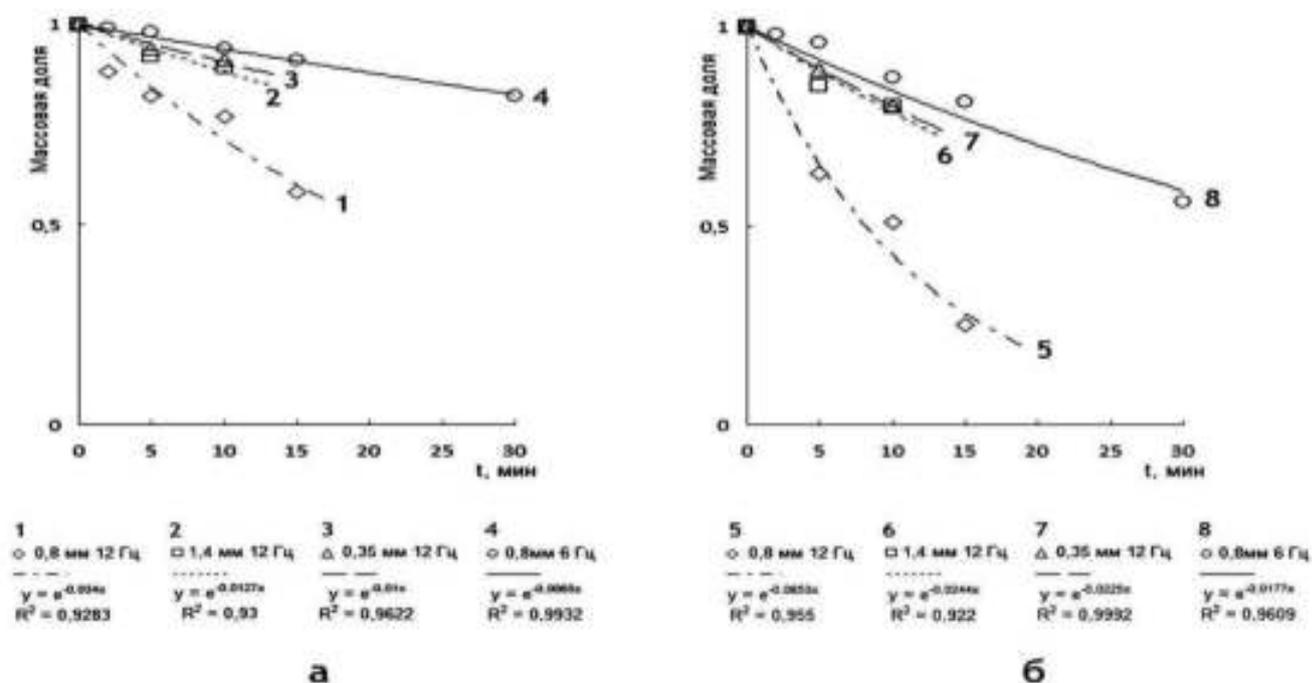
Массовая доля фракции капель размером до $2d_5$ увеличивается со временем, достигая более 90 % от общей массы ДФ (рисунок 3.1). Таким образом, от условий пипетирования зависит не минимальный размер формирующихся капель, а время превращения ДФ в капли размера, близкого к минимальному. Уменьшение доли крупных капель приводит к уменьшению ИПД.



Время пипетирования: а – 2 минуты, б – 15 минут

Рисунок 3.1 – Массовые доли фракций капель в эмульсии магнетитсодержащего раствора хитозана 7,5 г/л в IST после пипетирования (наконечник 0,8 мм, 12 Гц)

При осторожном перемешивании полученных эмульсий в течение 2 часов средний размер капель не изменяется, то есть коалесценции не наблюдается. Таким образом, время агрегативного разрушения исследуемых эмульсий многократно больше, чем время их приготовления, а значит, в данной системе вкладом коалесценции в изменение размера капель в ходе эмульгирования можно пренебречь. В таком случае процесс дробления капель должен подчиняться кинетическому уравнению 1-го порядка (2.14). Определённые в эксперименте зависимости массовых долей фракций капель диаметром не менее 3, 4, 5, 6, 7 мкм от времени при разных диаметрах наконечников и частотах пипетирования были аппроксимированы кривыми вида $y = e^{-kx}$ по методу наименьших квадратов (примеры для фракций не менее 4 и 5 мкм на рисунке 3.2).



а – капли не меньше 4 мкм, б – капли не меньше 5 мкм

Рисунок 3.2 – Кинетика убывания массовой доли капель диаметром не меньше d в дисперсной фазе эмульсии магнетитсодержащего раствора хитозана 7,5 г/л в IST при различных условиях пипетирования

Вычисленные таким образом значения k и соответствующие им значения периодов полупревращения фракций в капли меньшего размера $\tau = \ln(2)/k$ представлены в таблице 3.2. Зависящая от выборки погрешность расчёта не превышала 5 %.

Таблица 3.2 – Константы скорости и периоды полупревращения фракций эмульсии магнетитсодержащего раствора хитозана 7,5 г/л в IST

Диаметр наконечника / частота	Фракция, мкм				
	≥3,0	≥4,0	≥5,0	≥6,0	≥7,0
	$k \cdot 10^3, \text{ мин}^{-1} / \tau, \text{ мин}$				
0,80 мм / 6 Гц	2,5 / 290,0	6,5 / 106,5	18,0 / 38,5	35,5 / 19,5	60,0 / 11,5
0,80 мм / 12 Гц	11,5 / 61,5	34,0 / 20,5	85,5 / 8,0	156,5 / 4,5	224,0 / 3,0
0,35 мм / 12 Гц	4,5 / 150,5	10,0 / 69,5	22,5 / 31,0	43,5 / 16,0	76,5 / 9,0
1,40 мм / 12 Гц	7,0 / 99,0	12,5 / 54,5	24,5 / 28,5	36,5 / 19,0	56,0 / 12,5

Рассчитанные согласно формуле (2.16) времена наибольшего выхода фракций представлены в таблице 3.3. Во фракцию объединялись капли, различающиеся по объёму не более чем в 2 раза (по диаметру в 1,26 раза), в соответствии с

представлением о делении капель на две примерно равные части в процессе диспергирования [67].

Таблица 3.3 – Расчётные времена наибольшего массового выхода фракций эмульсии магнетитсодержащего раствора хитозана 7,5 г/л в IST

Диаметр наконечника / частота	Фракция, мкм			
	3,0 – 3,8	4,0 – 5,0	5,0 – 6,3	6,0 – 7,6
	t _{max} , МИН			
0,80 мм / 6 Гц	265,0	87,0	35,0	19,0
0,80 мм / 12 Гц	53,0	17,5	8,0	5,0
0,35 мм / 12 Гц	154,5	63,5	28,0	15,0
1,40 мм / 12 Гц	110,5	55,0	30,5	20,0

3.2 Влияние скорости течения среды на кинетику дробления капель

В уравнении (2.15) вероятность p дробления капли, попавшей в цикл, должна зависеть от градиентов скорости течения среды через наконечник и от диаметра капли, согласно [67]. Зависимость от градиента скорости означает зависимость от максимальной, а значит, и средней скорости течения ($v_{cp.}$), которая вычисляется по формуле (3.1).

$$v_{cp.} = 2 \cdot V_{ц} \cdot N / (\pi \cdot D^2 / 4) \quad , \quad (3.1)$$

где $V_{ц}$ – объём, обрабатываемый за цикл, N – частота пипетирования, D – внутренний диаметр наконечника у среза.

С наконечником диаметром 1,4 мм при частоте 12 Гц $V_{ц} = 138$ мкл, $v_{cp.} = 2,15$ м/с; с наконечником диаметром 0,8 мм при частоте 6 Гц – соответственно 130 мкл и 3,11 м/с; с тем же наконечником при частоте 12 Гц – 104 мкл и 4,97 м/с; с наконечником диаметром 0,35 мм при частоте 12 Гц – 22 мкл и 5,49 м/с. Таким образом, уменьшение диаметра наконечника с 0,8 мм до 0,35 мм приводило к увеличению средней скорости течения лишь на 10 %, но при этом объём цикла уменьшался в 4,7 раза. Это приводило к существенному уменьшению производительности диспергирования (таблица 3.2).

На рисунке 3.3 изображены зависимости $p(v_{cp.})$ для различных фракций ДФ, аппроксимированные степенными кривыми вида $y = ax^n$ по методу наименьших квадратов.

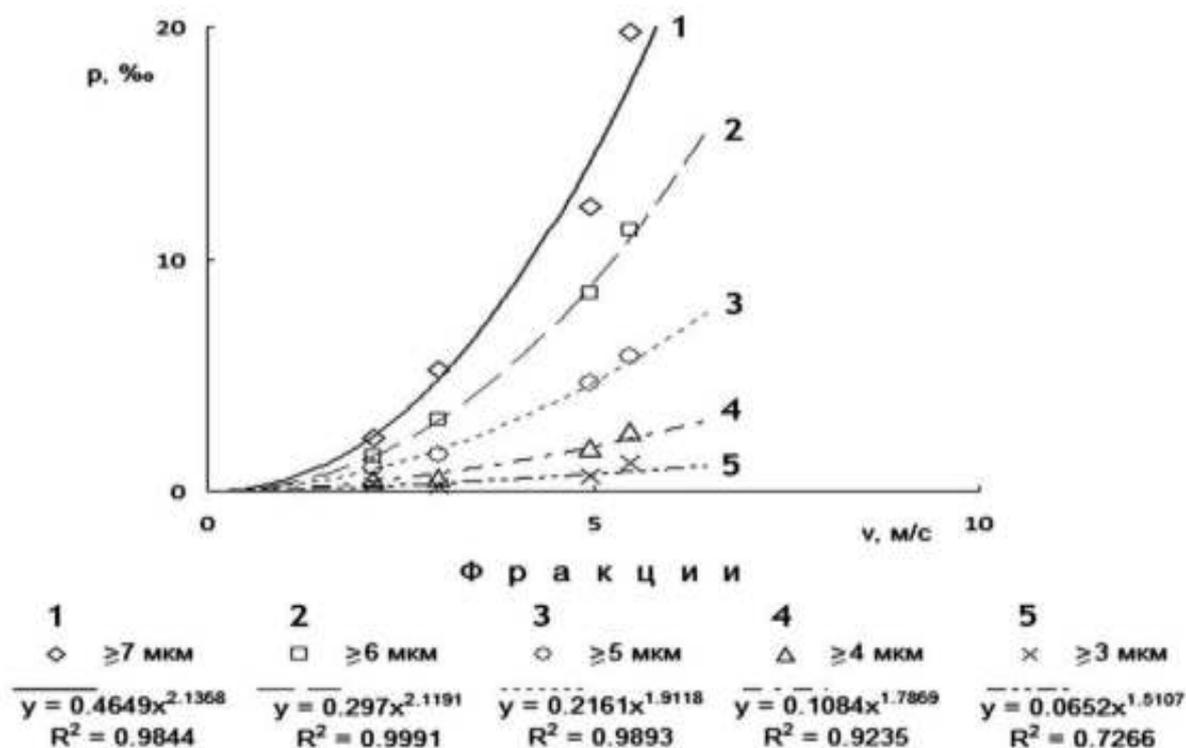


Рисунок 3.3 – Зависимость вероятности дробления капель магнетитсодержащего раствора хитозана 7,5 г/л в IST в течение 1 цикла пипетирования от средней скорости течения жидкости через наконечник

Величины p рассчитаны на основе приведённых в таблице 3.2 значений k . Из формулы (2.15) следует выражение для расчёта p (3.2).

$$p = (1 - e^{-k/(N \cdot 60)}) V_{\text{ш}}/V \quad , \quad (3.2)$$

где $V_{\text{ш}}/V$ – доля объёма эмульсии, обрабатываемой за 1 цикл, 60 – коэффициент перевода частоты N из Гц в мин⁻¹, в соответствии с выбранной размерностью k .

Для фракций капель диаметром от 5, 6 и 7 мкм зависимость $p(v_{\text{ср.}})$ приблизительно квадратичная: усреднённый показатель степени 2,06. Для фракций диаметром от 3 и 4 мкм аппроксимация ненадёжная: коэффициент детерминации $R^2 < 0,95$.

Считая, что p пропорциональна $v_{\text{ср.}}^2$ и, кроме того, должна зависеть от диаметра капель d , исследовали зависимость $p/v_{\text{ср.}}^2(d)$. Для этого значения $p/v_{\text{ср.}}^2$, полученные при разных условиях пипетирования, были усреднены для каждой из фракций капель диаметром от 3, 4, 5, 6, 7 мкм и представлены на графике (рисунок 3.4, а). Полученная на графике зависимость $p/v_{\text{ср.}}^2(d)$ была аппроксимирована кривой вида $y = ax^n$ по методу наименьших квадратов.

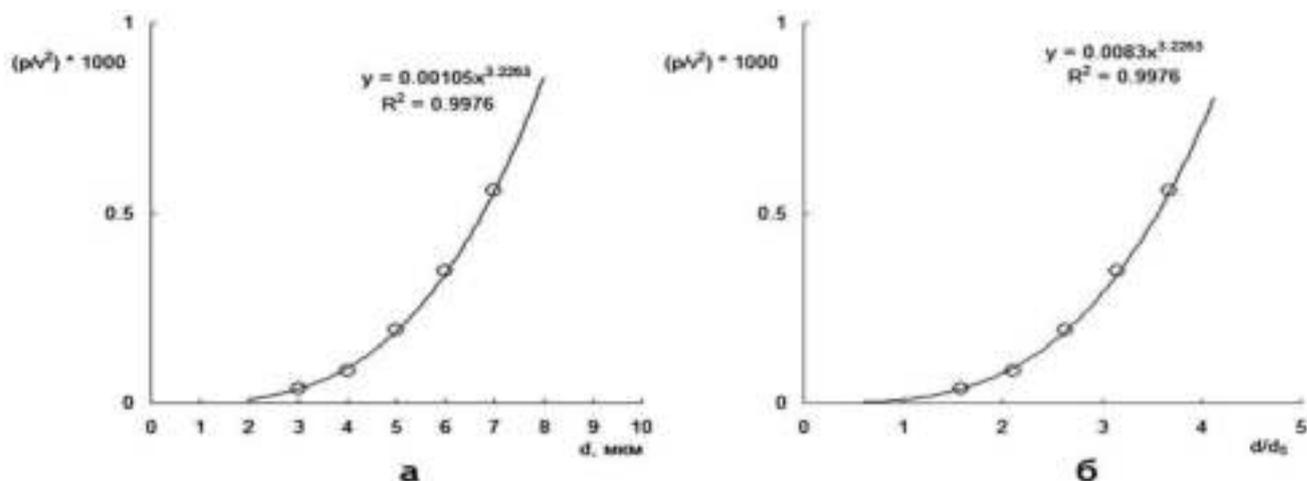


Рисунок 3.4 – Зависимость вероятности дробления капель магнетитсодержащего раствора хитозана 7,5 г/л в IST в течение 1 цикла пипетирования, нормированной на квадрат средней скорости течения жидкости, от диаметра капель: абсолютного (а) и относительного (б).

С учётом вычисленных значений показателя степени n и коэффициента a , можно записать формулы (3.3) и (3.4).

$$p/v_{cp.}^2 = 1,05 \cdot 10^{-6} d^{3,2} \quad (3.3)$$

$$p = 1,05 \cdot 10^{-6} d^{3,2} v_{cp.}^2 \quad (3.4)$$

Тогда исходя из (2.15) получаем для расчёта константы скорости убывания массовой доли фракции капель размером не меньше заданного формулу (3.5).

$$-k, \text{ мин}^{-1} = N \cdot \ln(1 - 1,05 \cdot 10^{-6} \cdot d^{3,2} \cdot v_{cp.}^2 \cdot V_{ц}/V) \quad (3.5)$$

где N – частота пипетирования, мин^{-1} ; d – заданный минимальный диаметр капель фракции, $\mu\text{м}$; $v_{cp.}$ – средняя скорость течения эмульсии через наконечник, м/с .

Вместо абсолютного диаметра по оси x может быть отложен относительный d/d_5 , где d_5 – 5-я перцентиль диаметра (рисунок 3.4, б). Капли диаметром до d_5 условно недробимы в данной установке, с учётом малой величины обнаруженных в эксперименте различий d_5 при разных условиях и временах пипетирования. Иными словами, d_5 предположительно меньше критического диаметра капли для зоны наконечника с самым высоким градиентом скорости течения среды. Использование диаметра капель, выраженного не в абсолютных единицах, а в диаметрах, близких к критическому, гипотетически расширяет применимость формулы на системы с разными соотношениями вязкого трения и поверхностного натяжения на границе фаз, влияющими на критический диаметр капель [67]. При переходе от абсолютного диаметра к относительному в выражении вида $y=ax^n$ для аппроксимирующей кривой меняется только коэффициент a (рисунок 3.4, б). Соответственно, уравнение (3.5) приобретает вид (3.6).

$$-k, \text{ мин}^{-1} = N \cdot \ln(1 - 8,3 \cdot 10^{-6} \cdot (d/d_5)^{3,2} \cdot v_{cp}^2 \cdot V_u/V), \quad (3.6)$$

где d_5 – 5-я перцентиль диаметра капель, определённая в серии опытов (условно соответствующая критическому диаметру капель).

Таким образом, при заданной частоте пипетирования максимальная константа скорости дробления капель соответствует максимуму произведения $v_{cp}^2 \cdot V_u$. Вычисление данного произведения при частоте 12 Гц для линейно интерполированных значений v_{cp} и V_u , соответствующих взятым с шагом 0,1 мм значениям диаметра наконечника в промежутке между 0,4 и 1,4 мм, не выявило иного максимума, чем экспериментально определённый при диаметре 0,8 мм. В результате для экспериментов по получению микросфер был выбран наиболее производительный среди исследованных режим пипетирования: наконечник 0,8 мм, частота 12 Гц. В данном режиме в течение 5 – 10 минут удаётся получить эмульсию МЖ на основе водного раствора хитозана 7,5 г/л со средним диаметром капель 3,6 – 3,7 мкм и узким распределением их по размеру, ИПД между 0,1 и 0,2. Большую часть массы ДФ в такой эмульсии составляют капли диаметром 5,0 – 7,0 мкм, количественно преобладают капли менее 5,0 мкм.

3.3 Влияние концентраций CaCl_2 и NaCl на агрегативную устойчивость наноэмульсий их водных растворов

В эмульсиях водных растворов CaCl_2 в IST, получаемых в результате ультразвуковой обработки, объёмная доля ДФ, при которой не происходит заметной коалесценции в течение 5 минут, увеличивается с увеличением в ней концентрации хлорида кальция, а так же концентраций ПАВ в дисперсионной среде (таблица 3.4).

Таблица 3.4 – Концентрации компонентов для получения прозрачных (<20 ЕМФ) эмульсий водных растворов CaCl_2 в IST, не мутнеющих в течение 5 и более минут

[CaCl_2], М	[Tween 85], %	[Span 85], %	Доля водной фазы, об. %
0,25	1,5	2,8	2,4
0,5	1,5	2,8	4,0
1,0	1,5	2,8	6,3
1,0	0,75	1,4	4,5

В изооктане с добавками 2,8% Span 85 и 1,5% Tween 85 прозрачную эмульсию, содержащую 2,0 об. % водного раствора хлорида кальция, удаётся получить уже при концентрации CaCl_2 0,1 М. Однако она мутнеет менее чем за минуту. Это свидетельствует о том, что электролиты увеличивают именно агрегативную

устойчивость эмульсий, а не только влияют на процесс дробления микрокапель, зависящий от поверхностного натяжения на границе раздела фаз [49, 67].

Сравнение эмульсий водных растворов хлоридов натрия (концентрация 1,0 и 2,0 М) и кальция (0,25, 0,5 и 1,0 М) в IST позволяет заключить, что максимальная доля водной фазы, при которой эмульсия не мутнеет в течение 5 минут и более, линейно увеличивается от 1,9 об.% до 6,2 об.% по мере увеличения ионной силы от $1 \cdot 10^{-4}$ до 3,0 моль/л (рисунок 3.5).

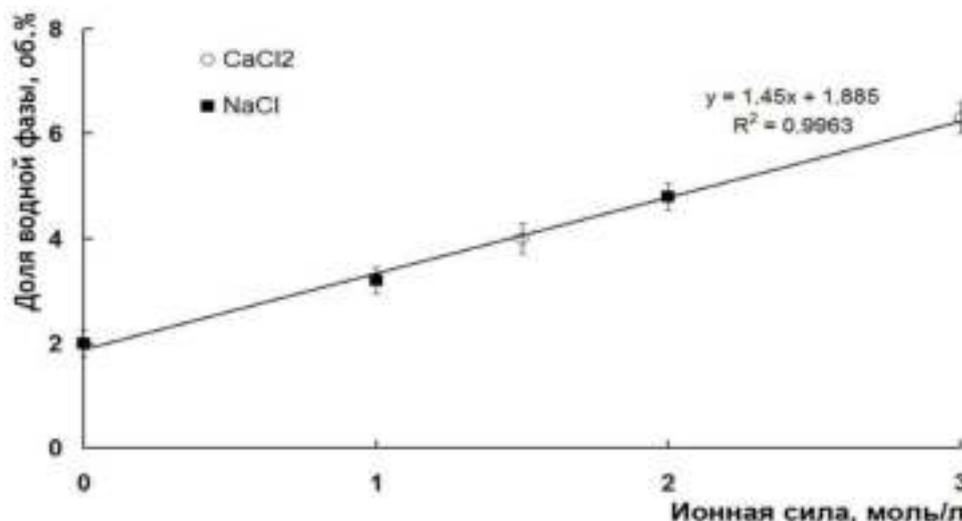


Рисунок 3.5 – Зависимость максимальной объемной доли водной фазы от её ионной силы в прозрачных эмульсиях (<20 ЕМФ) водных растворов NaCl и CaCl₂ в IST.

3.4 Использование CaCl₂ для стабилизации эмульсий водных растворов глутаральдегида

Агрегативная устойчивость эмульсий, в которых дисперсная фаза составляет 2 об.% и представлена водным раствором, содержащим хлорид кальция и 275,0 г/л глутаральдегида, в IST увеличивается вместе с концентрацией CaCl₂. В эмульсии, в которой доля водной фазы составляет 2 об.%, при концентрации CaCl₂ 0,01 М опалесценция присутствует сразу, а при 0,1 М и 1 М появляется через 15 – 30 секунд и 7 – 10 минут, соответственно. Водный раствор 275 г/л глутаральдегида и 1 М CaCl₂ удаётся диспергировать в IST до эмульсии, остающейся прозрачной (<20 ЕМФ) не менее 5 минут, при доле водной фазы не более 7,7 об.%.

Максимальная концентрация глутаральдегида в полученных эмульсиях составляет 21,2 г/л. Широко применяемый метод внесения глутаральдегида в неполярную фазу эмульсии в смеси с толуолом [29, 30, 83] позволяет достигать его концентраций не более 6,3 г/л, так как насыщающая концентрация глутаральдегида в толуоле 33,0 г/л [83], а вносимое количество толуольной смеси составляет не более 19 % объёма неполярной фазы [29].

3.5 Выводы к главе 3

Установлены закономерности эмульгирования водного раствора хитозана 7,5 г/л, содержащего наночастицы магнетита, с динамической вязкостью 32,6 мПа·с при 20 °С, в изооктане с добавками Span 85 и Tween 85 (IST). Показано, что частота пипетирования и диаметр наконечника не влияют на минимальный размер формирующихся капель (1,7 – 2,2 мкм), но влияют на время превращения дисперсной фазы (ДФ) в капли размера, близкого к минимальному. Влияние частоты реализуется не только через кратность диспергирующего воздействия в единицу времени, но и через скорость течения эмульсии и объём цикла пипетирования, с увеличением которых время, необходимое для диспергирования, уменьшается. На упомянутые показатели влияет также диаметр наконечника: его уменьшение увеличивает среднюю скорость течения, но уменьшает объём цикла. При заданной частоте пипетирования наиболее быстрое эмульгирование достигается с наконечником, который обеспечивает максимальную величину $V_{ц} \cdot v_{cp}^2$, где $V_{ц}$ – объём эмульсии, обрабатываемой за цикл, v_{cp} – средняя скорость течения эмульсии через срез наконечника. Оптимальным с точки зрения производительности является сочетание наконечника 0,8 мм и частоты 12 Гц (максимальной для применявшейся установки). При таком сочетании в случае, когда $V_{ц}$ составляет 1/39 объёма эмульсии, оптимальное время для максимального массового выхода фракции капель 4-5 мкм – около 18 минут. Через 5-10 минут пипетирования получается эмульсия со средним размером капель $\approx 3,5$ мкм и индексом полидисперсности (ИПД) между 0,1 и 0,2. Хотя большая часть массы ДФ в такой эмульсии представлена каплями размером 5-7 мкм, количественно преобладают капли диаметром менее 5 мкм. При дальнейшем пипетировании продолжает уменьшаться ИПД за счёт снижения количества крупных капель. [4-А, 8-А, 10-А]

В приготовленной ультразвуковым диспергированием (22 кГц, 100 Вт) эмульсии водных растворов NaCl и CaCl₂ в IST максимальная объёмная доля водной фазы, при которой эмульсия не мутнеет в течение 5 минут и более, линейно увеличивается в 3,2 раза с ростом ионной силы от 0,0001 до 3,0 моль/л. Добавление хлорида кальция в раствор глутаральдегида увеличивает стабильность его наноэмульсий в IST. Получены стабильные в течение 5 минут и более наноэмульсии, в которых концентрация глутаральдегида составляет 21,2 г/л, то есть в 3,4 раза больше, чем достигаемая при внесении глутаральдегида в изооктан виде раствора в толуоле. [6-А, 12-А]

ГЛАВА 4

СВОЙСТВА МАГНИТНЫХ МИКРОСФЕР И МОДИФИКАЦИЯ ИХ ПОВЕРХНОСТИ ДЛЯ ИММУНОМАГНИТНОЙ СЕПАРАЦИИ КЛЕТОК

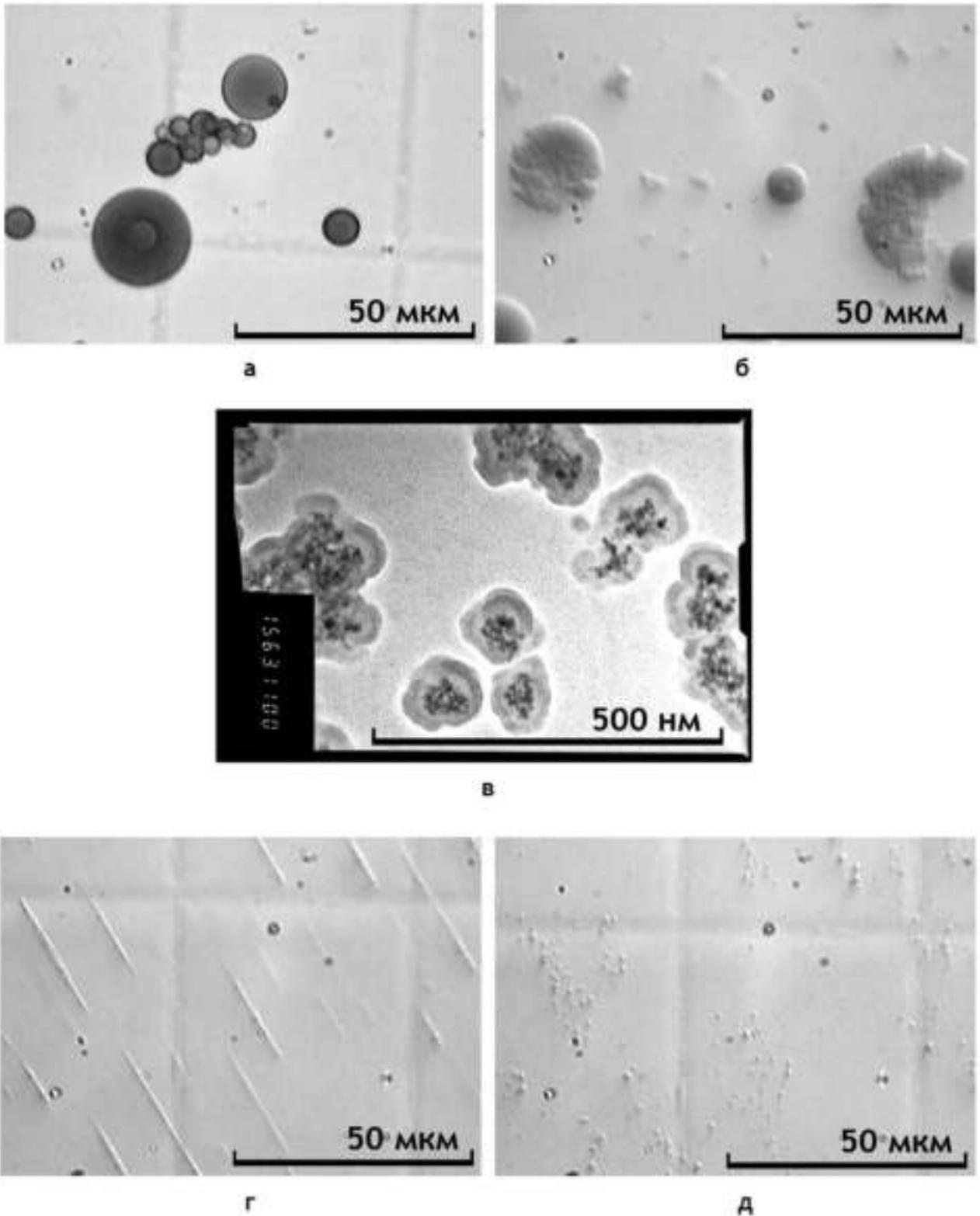
Разработанные и описанные в главе 3 способы получения эмульсий магнитных жидкостей и водных растворов сшивающих агентов в изооктане с добавками ПАВ позволили синтезировать магнитные микросферы (ММС) размером меньше 10 мкм из всех применявшихся в исследовании гидрофильных полимеров: альгиновой кислоты, пектина, желатина, хитозана и поливинилового спирта (ПВС).

Общим для разных методик синтеза является то, что распределение ММС по размеру более узкое, чем капле эмульсий, из которых они получают. Это происходит вследствие потерь ММС размером меньше 1 мкм при многократных отмывках, в каждой из которых супернатант удаляется вместе с микросферами, не успевшими осесть в течение 1 минуты. С учётом данного факта, при оценке уменьшения объёма микросфер по сравнению с каплями растворов полимеров, из которых они образуются, сопоставляли не средние размеры, а 90-е перцентили.

Для различных типов микросфер исследовали: стабильность в физиологическом растворе (0,15 М NaCl) или фосфатно-солевом буфере (ФСБ): 0,15 М NaCl, рН 7,4; устойчивость к воздействию ультразвука (22 кГц, 100 Вт), применяемого для дезагрегации осадка; магнитную восприимчивость; морфологию. Для микросфер, удовлетворяющих критерию стабильности в ФСБ, исследовали также зависимость размера от концентрации полимера в магнитной жидкости и способы модификации поверхности для обеспечения низкой неспецифической адгезии к лейкоцитам и регулируемой за счёт аффинных белков (авидин, антитела) и антигенов (дрожжевой лизат) специфической адгезии. Микросферы на основе поливинилового спирта были модифицированы также флуоресцентными рН-чувствительными красителями для визуализации под микроскопом в фагосомах после поглощения нейтрофилами и локальной оценки рН.

4.1 Микросферы на основе альгиновой кислоты и пектина

Из приготовленных пипетированием эмульсий магнетитсодержащих водных растворов альгиновой кислоты в результате желирования хлоридом кальция получены ММС (рисунок 4.1, а), а из приготовленных УЗ-диспергированием – субмикронные МЧ (рисунок 4.1, в).

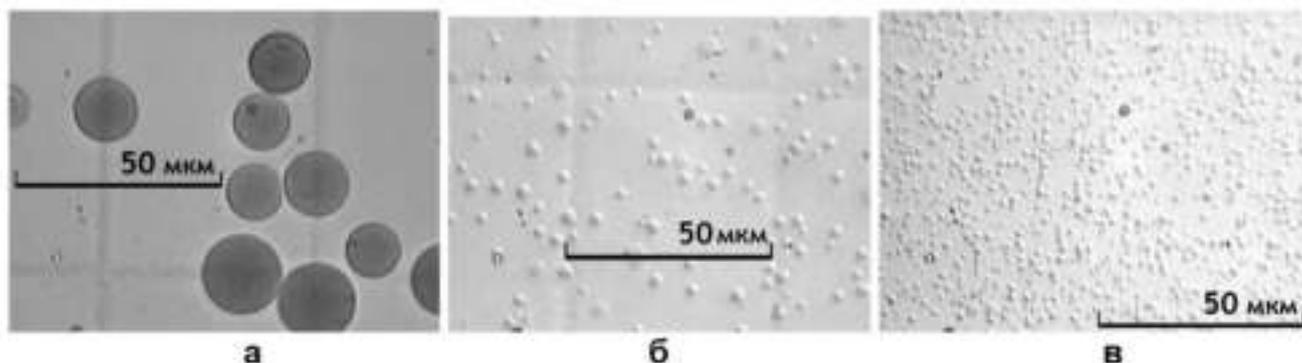


а – из эмульсии, полученной пипетированием; **б** – они же после обработки ультразвуком;
в – из эмульсии, полученной ультразвуковым диспергированием; **г** – они же в поле магнита; **д** – они же после удаления магнита.

а, б, г, д – оптические изображения, **в** – изображение ТЭМ

Рисунок 4.1 – Магнитные микросферы и частицы с полимерной матрицей из альгиновой кислоты, сшитой ионами Ca^{2+}

Аналогично получены ММС из эмульсий магнетитсодержащих водных растворов пектина (рисунок 4.2). Из эмульсии с индексом полидисперсности (ИПД) от 0,1 до 0,2 вследствие потерь ММС размером меньше 1 мкм при отмывках получается суспензия с ИПД до 0,1, в которой более 90 % микросфер отличаются по размеру не более, чем в 2 раза. Седиментационным фракционированием удаётся сократить ИПД до 0,03 (рисунок 4.2).



Седиментационные фракции: а - 20 минут, б – 2-4 ч; в – 8-16 ч

Рисунок 4.2 – Магнитные микросферы с полимерной матрицей из пектина, сшитого ионами Ca^{2+} (оптические изображения)

Диаметр микросфер меньше, чем капле, из которых они формируются: в случае водного раствора пектина 30,0 г/л ММС диаметром 10,0 мкм получаются из капель размером 21,5 мкм, соотношение объёмов составляет $9,5 \pm 0,5$.

Альгинатные и пектиновые микросферы, содержащие наночастицы магнетита, реагируют на магнитное поле: движутся к магниту, выстраиваясь в цепочки (рисунок 4.1, г). После снятия магнитного поля происходит дезагрегация микросфер (рисунок 4.1, д), что указывает на отсутствие остаточной намагниченности.

При УЗ-обработке ионно сшитых альгинатных ММС погружным диспергатором 22 кГц, 50 Вт в течение 1 минуты в дистиллированной воде на охлаждающей водяной бане происходило разрушение $53,0 \pm 10,0$ % микросфер (рисунок 4.1 б), а при такой же обработке пектиновых ММС – $86,0 \pm 8,0$ %.

Сшитые Ca^{2+} ММС при многократных отмывках дистиллированной водой или водным раствором NaCl 0,15 М увеличиваются в объёме и постепенно растворяются, что сопровождается коричневым окрашиванием среды вышедшими из них наночастицами магнетита. Это свидетельствует о том, что они отдают ионы кальция в среду и находятся с ней в равновесии по Ca^{2+} . Однако присутствие ионов кальция в среде нежелательно в процедурах магнитной сепарации, т.к. двухвалентные катионы способны вызывать агрегацию объектов, несущих на по-

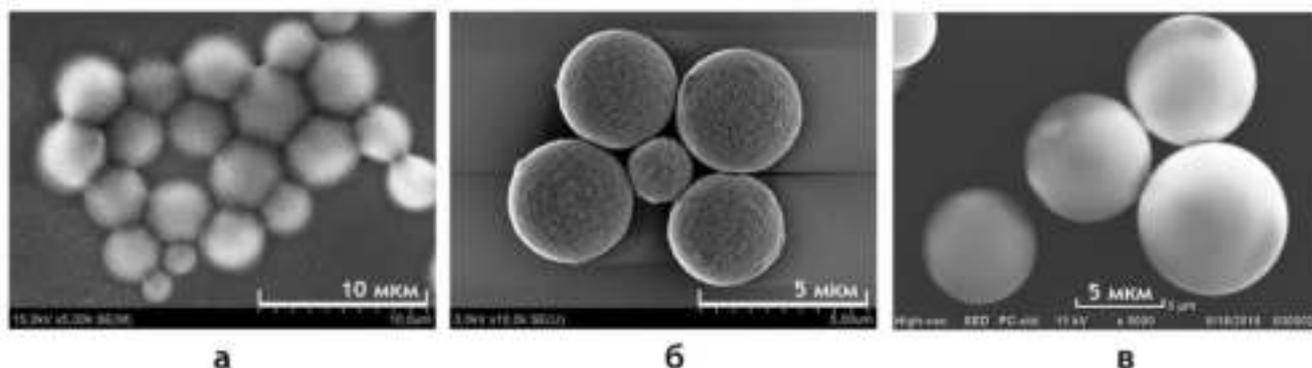
верхности анионы – в частности, биологических клеток [165]. Был сделан вывод, что ионно сшитые Ca^{2+} ММС непригодны для магнитной сепарации клеток.

4.2 Микросферы на основе желатина, хитозана и поливинилового спирта

Из эмульсий магнетитсодержащих растворов желатина, хитозана и ПВС в результате сшивки глутаральдегидом, для стабилизации эмульсий которого применялся хлорид кальция, получены ММС (рисунок 4.3). Как и в случае ионно сшитых микросфер, из эмульсии с ИПД от 0,1 до 0,2 вследствие потерь ММС размером меньше 1 мкм при отмывках получается суспензия с ИПД менее 0,1.

При высушивании желатиновых микросфер происходит их уменьшение в размере и потеря сферической формы (рисунок 4.3, а). В процессе синтеза происходит потеря части магнетита, что приводит к коричневому окрашиванию среды.

Хитозановые и поливинилспиртовые микросферы при высушивании остаются сферическими и не изменяют размер. После высушивания хитозановые имеют шероховатую поверхность (размер неровностей ≈ 50 нм, рисунок 4.3, б), а поливинилспиртовые – гладкую (рисунок 4.3, в).



а – желатиновые; б – хитозановые; в - поливинилспиртовые

Рисунок 4.3 – Магнитные микросферы с полимерной матрицей из гидрофильных полимеров, сшитых глутаральдегидом (СЭМ-изображения)

Размер микросфер, получаемых из эмульсий, приготовленных в одинаковых условиях (диаметр наконечника 0,8 мм, частота пипетирования 12 Гц, температура 65 °С, время пипетирования 5 минут), увеличивается с увеличением концентрации полимеров (таблица 4.1).

Таблица 4.1 – Размеры желатиновых, хитозановых и поливинилспиртовых микросфер, полученных из магнитных жидкостей с разными концентрациями полимеров

Полимер	Концентрация, г/л	Средний диаметр, мкм / ИПД
Желатин	25	не получены (склеиваются при сшивке)
	50	$8,7 \pm 1,0 / 0,05$
	100	$13,1 \pm 1,3 / 0,04$
Хитозан	1,8	$4,2 \pm 0,5 / 1,1$
	3,7	$2,4 \pm 0,2 / 0,05$
	7,5	$3,1 \pm 0,3 / 0,06$
ПВС	25	$2,8 \pm 0,3 / 0,03$
	50	$4,6 \pm 0,3 / 0,05$
	100	$15,0 \pm 2,1 / 0,1$

Исключение составляют хитозановые микросферы. Средний размер частиц, полученных при концентрации хитозана 1,8 г/л, больше, чем при более высоких концентрациях. Это объясняется тем, что при концентрации хитозана 1,8 г/л формировались разные типы частиц (рисунок 4.4). Некоторые были плотными сферическими (рисунок 4.4, частица 1), другие имели линзообразную форму и/или отличались меньшим лучепреломлением (рисунок 4.4, частица 2), свидетельствующим об их меньшей плотности по сравнению с компактными микросферами. Их средний размер больше, чем у частиц с высоким лучепреломлением.

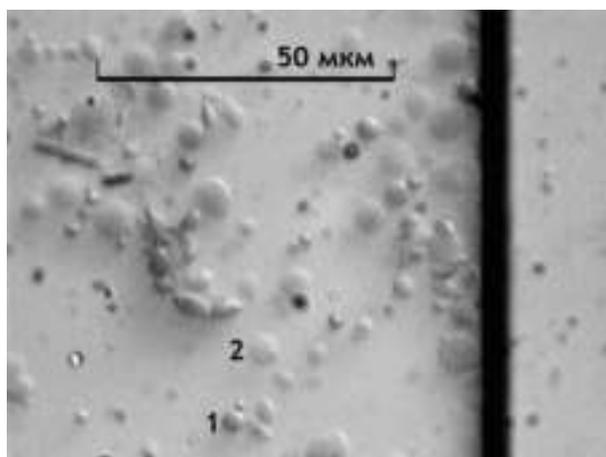


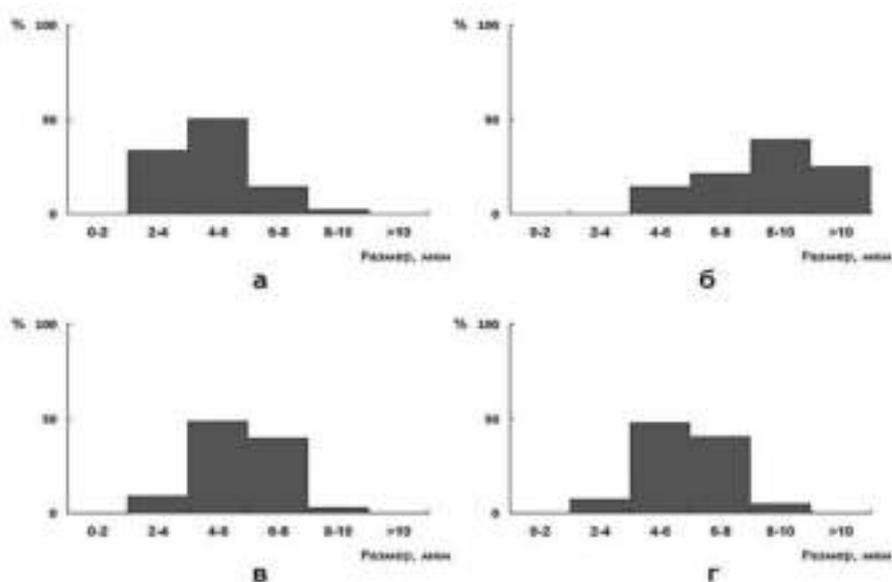
Рисунок 4.4 – Магнитные частицы, полученные из эмульсии магнитной жидкости с концентрацией хитозана 1,8 г/л

Предположительно линзообразные частицы представляют собой микрокапсулы. Вероятно, после сшивки хитозана у границы раздела водной и масляной фаз оставшийся свободный полимер не желируется по всему объёму капли, а прикрепляется изнутри к образовавшейся оболочке, при этом компактизация частицы происходит в меньшей степени, чем в случае микросферы.

Диаметр ММС меньше, чем капля, из которых они формируются. Из капля водного раствора хитозана 7,5 г/л диаметром 8,7 мкм получаются микросферы 3,8 мкм, а из капля ПВС 50,0 г/л размером 20,5 мкм - микросферы 7,5 мкм. Соотношение объёмов капли и микросферы составляет $12,0 \pm 2,0$ и $20,5 \pm 1,0$, соответственно. Таким образом, при сшивке гель претерпевает уплотнение (синерезис). Более значительное уплотнение сшитых глутаральдегидом поливинилспиртовых микросфер по сравнению с хитозановыми согласуется с данными о пористости последних.

При УЗ-обработке 22 кГц, 100 Вт в течение 1 минуты разрушаются менее 5,0 % поливинилспиртовых и хитозановых ММС, тогда как желатиновые не разрушаются. В то же время при УЗ-обработке 22 кГц, 50 Вт в течение 1 минуты наблюдается разрушение лишь единичных поливинилспиртовых и хитозановых ММС, поэтому при синтезе и модификации микросфер УЗ-обработку для их дезагрегации проводили мощностью 50 Вт в течение 30 с.

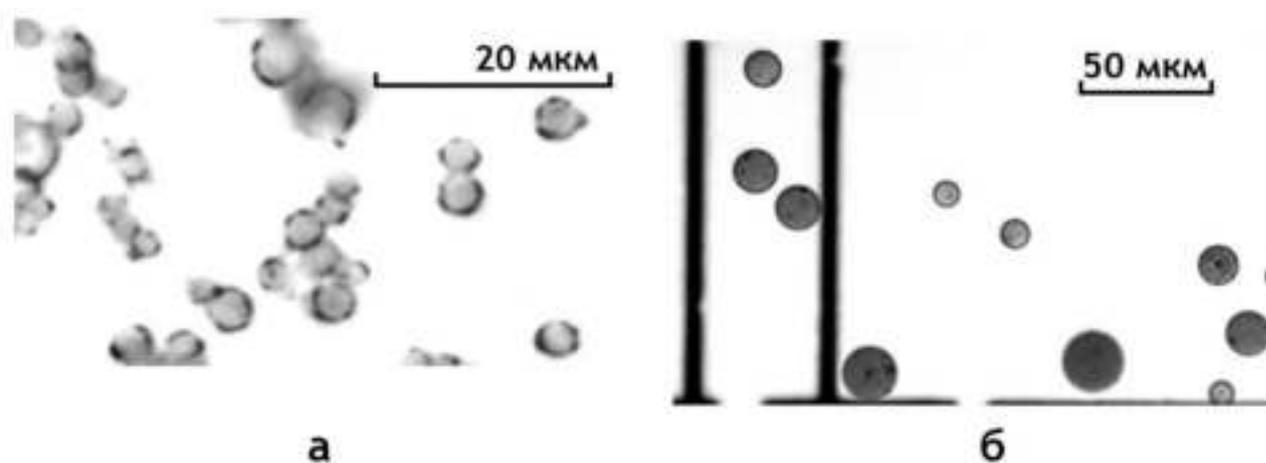
При хранении в ФСБ (рН 7,4) желатиновые микросферы набухают, за 2 месяца их средний размер увеличивается с $4,5 \pm 1,5$ мкм до $8,5 \pm 2,0$ мкм (рисунок 4.5, а, б). Микросферы того же состава, обработанные боргидридом натрия после сшивки, при хранении в ФСБ в течение 6 месяцев не набухают (рисунок 4.5, в, г). Это свидетельствует о том, что обработка боргидридом необходима не только для инактивации свободных альдегидных групп в составе микросфер, но и для предотвращения гидролиза продукта, сшитого по аминок группам.



**а, б – необработанные NaBH₄; в, г – обработанные NaBH₄;
а, в – непосредственно после синтеза; б – через 2 месяца; г – через 6 месяцев.**

**Рисунок 4.5 – Распределение по размеру желатиновых ММС,
сшитых глутаральдегидом**

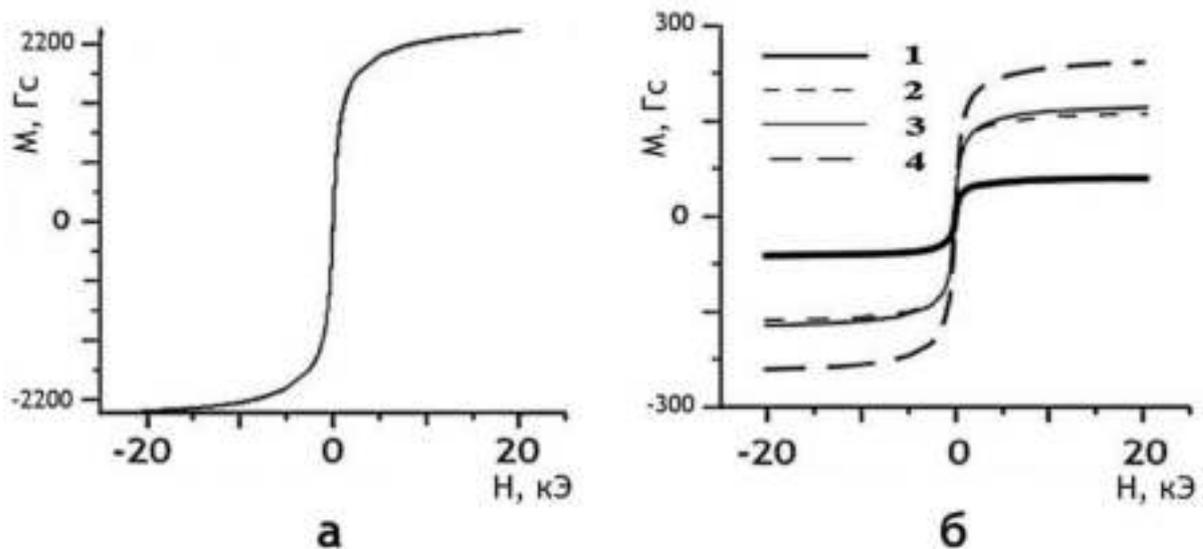
Сшитые глутаральдегидом и обработанные боргидридом натрия хитозановые и поливинилспиртовые ММС не изменяют размер и не окрашивают среду соединениями железа при хранении в ФСБ (рН 7,4) при комнатной температуре в течение 2 лет. В составе микросфер по крайней мере часть наночастиц магнетита находится в агрегатах размером от 0,1 до 2 мкм (рисунок 4.6). В хитозановых микросферах агрегаты магнитных наночастиц расположены преимущественно на поверхности (рисунок 4.6, а). Определённый сканирующей электронной микроскопией элементный состав поверхности высушенных хитозановых ММС, синтезированных из МЖ с массовым соотношением магнетит/полимер $m_M/m_P = 0,43$: С $87,0 \pm 1,3 \%$, N $3,8 \pm 0,4 \%$, O $6,9 \pm 0,7 \%$, Fe $2,3 \pm 0,1 \%$; поливинилспиртовых, синтезированных из МЖ с $m_M/m_P = 0,05$: С $92,6 \pm 3,7 \%$, N $1,6 \pm 0,4 \%$, O $6,1 \pm 2,7 \%$, Fe $0,4 \pm 0,1 \%$.



а – хитозановые; б - поливинилспиртовые

Рисунок 4.6 – Магнитные микросферы с полимерной матрицей из гидрофильных полимеров, сшитых глутаральдегидом (оптические изображения)

Несмотря на агрегацию магнитных наночастиц, формы кривых намагниченности ММС (рисунок 4.7, б) и свободных наночастиц магнетита (рисунок 4.7, а) аналогичны, а максимальные значения намагниченности микросфер увеличиваются с ростом содержания магнетита. При комнатной температуре для ММС характерны высокая, до 255,0 Гс, максимальная намагниченность и незначительная, меньше 1,0 Гс, остаточная намагниченность, то есть они суперпарамагнитны.



Массовое соотношение магнетит/полимер в магнитной жидкости, из которой синтезированы микросферы: 1 – 0,12; 2, 3 – 0,23 (при синтезе образца 3 применялось центрифугирование вместо магнитной декантации с целью уменьшения агрегации магнетита); 4 – 0,43

Рисунок 4.7 – Кривые намагничивания наночастиц магнетита размером до 15 нм (а) и содержащих такие же МНЧ хитозановых микросфер (б)

Хитозановые микросферы, синтезированные из МЖ с массовым соотношением магнетит/полимер (m_m/m_p) не менее 0,34, подвержены агрегации в течение 2-5 минут. Синтезированные из МЖ с m_m/m_p 0,43 хитозановые ММС после ресуспендирования выпадают в осадок в течение менее 5 минут. Это меньше, чем время инкубации клеток с микросферами в процедурах иммуномагнитной сепарации. Увеличить время агрегации и седиментации до 5 минут и более удаётся, ограничив m_m/m_p до 0,17.

Поливинилспиртовые ММС из МЖ с концентрацией магнетита от 3,25 г/л и больше не удаётся получить из-за необратимой агрегации (слипания) на стадии сшивки.

ММС, синтезированные из МЖ, содержащих ферромагнитный магнетит (размер МНЧ от 60,0 нм) или феррит железа-кобальта (средний размер МНЧ около 55 нм), проявляют ферромагнитные свойства. В частности, они обладают остаточной намагниченностью и в течение нескольких секунд после перемешивания агрегируют в кольцеподобные структуры (рисунок 4.8).

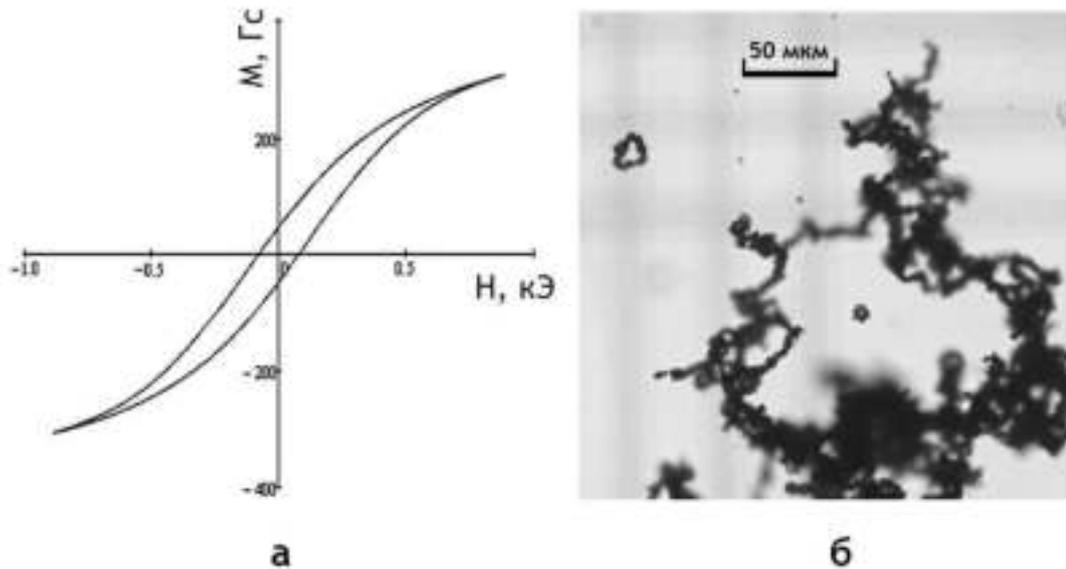
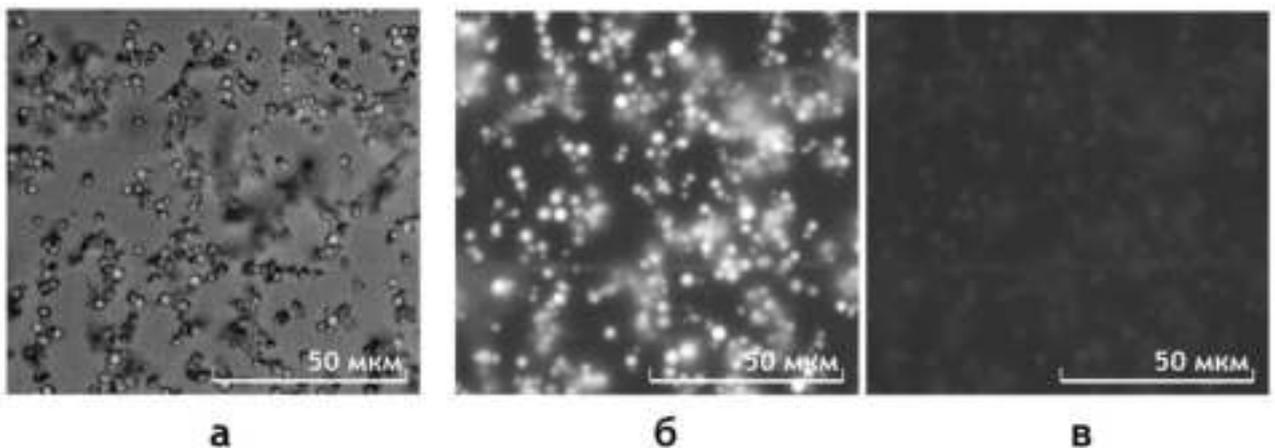


Рисунок 4.8 – Кривая намагничивания наночастиц магнетита размером от 60 нм (а) и оптическое изображение содержащих их хитозановых микросфер, синтезированных из магнитной жидкости с массовым соотношением магнетит/полимер 0,43 (б)

При возбуждении фиолетовым или синим светом микросферы с полимерной матрицей из сшитого глутаральдегидом хитозана обладают яркой зелёной автофлуоресценцией, заметной даже в светлом поле (рисунок 4.9, а). При микроскопии в режиме эпифлуоресценции (лампа НВО 100 Вт, объектив 20х с апертурой 0,40, светофильтр 380-490 нм) происходило их выцветание с уменьшением средней яркости на $92,0 \pm 3,0 \%$ за первые 2 минуты (рисунок 4.9, б,в).



**а – светлое поле + эпифлуоресценция, б, в – эпифлуоресценция.
а, б – через 5 с, в – через 120 с после начала освещения.**

Рисунок 4.9 – Автофлуоресценция хитозановых ММС

Микросферы с полимерной матрицей из сшитого глутаральдегидом ПВС яркой автофлуоресценцией не обладают, что облегчает управление их спектральными свойствами путём введения флуорохромов в состав полимерной матрицы.

При помещении хитозановых и поливинилспиртовых ММС после отмывки 96% этанолом в тетраэтоксисилан, содержащий квантовые точки CdSe/ZnS, получают микросферы, флуоресценция которых носит ободочный характер (сосредоточена по периметру, рисунок 4.10), что подтверждает наличие вокруг ММС меченной квантовыми точками полисилоксановой оболочки. Факт её формирования в безводной среде, возможно, свидетельствует о наличии воды в составе микросфер.

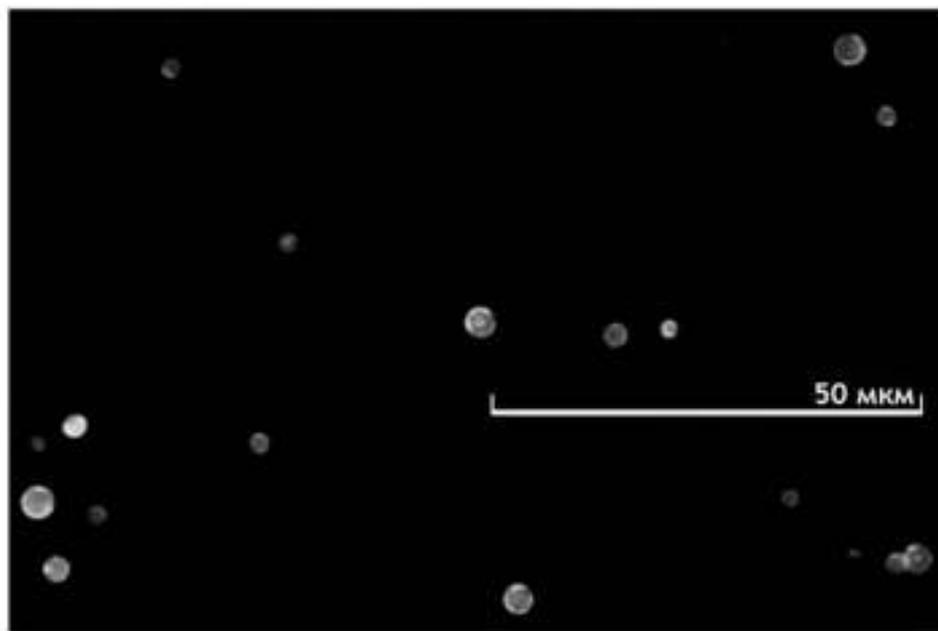


Рисунок 4.10 – Флуоресценция поливинилспиртовых магнитных микросфер с полисилоксановой оболочкой

4.3 Модификация поверхности микросфер для иммуномагнитной сепарации клеток

Сшитые глутаральдегидом и восстановленные боргидридом натрия желатиновые и хитозановые ММС без покрытия характеризуются высоким неспецифическим связыванием с мононуклеарными клетками периферической крови (МПК): в осадке присутствуют более 1000 МПК на 1 млн. ММС. Это характерно для частиц, несущих на поверхности значительное количество заряженных групп, особенно катионных [137, 139]. Неспецифическое связывание поливинилспиртовых

ММС на порядок меньше, чем хитозановых: соответственно 340 и 5600 клеток на 1 млн. микросфер (таблица 4.2).

Таблица 4.2 – Количество неспецифически связанных моноклеарных клеток периферической крови, приходящееся на 10^6 магнитных микросфер в осадке после магнитной сепарации

Полимер ядра	ММС		Количество МПК на 10^6 ММС
	Полимер оболочки	Модификация оболочки	
Желатин	-	-	9100 ± 2500
Хитозан	-	-	5600 ± 1250
	ПВС	-	1400 ± 370
	КМД	-	3600 ± 130
ПВС	-	-	340 ± 60
		глицин в присутствии CH_3COOH (pH 2)	5600 ± 620
		глицин при pH 7	1000 ± 110
		глицин при pH 9	7700 ± 2350
	ПВС	-	210 ± 25
		глицин в присутствии CH_3COOH (pH 2)	250 ± 70
		H_2O_2 (15,0 %)	280 ± 30
		H_2O_2 (4,0 %)	210 ± 35
Magnosphere™ MS300/Carboxyl			490 ± 95

При обработке хитозановых микросфер КМД их неспецифическое связывание с МПК уменьшается в 1,6 раза, с 5600 до 3600 клеток на 1 млн. микросфер (таблица 4.2). Сравнение дзета-потенциала покрытых КМД наночастиц ($\zeta = -4,3 \pm 0,5$ В при pH 7) с данными, приведёнными в работе [166], позволяет предположить, что применявшийся КМД имеет степень карбоксилирования менее 10 %.

В результате обработки ПВС неспецифическое связывание хитозановых ММС с МПК уменьшается в 4,0 раза с 5600 до 1400 клеток на 1 млн. микросфер, но остаётся в 4,1 раза больше, чем у поливинилспиртовых ММС (таблица 4.2). Можно предположить, что применявшаяся методика обработки не обеспечивает полного покрытия микросфер ПВС либо уже после формирования покрытия происходит появление участков хитозановых цепей на поверхности обработанных ММС в результате диффузии полимеров. Известно [167], что даже для сшитых полимеров характерна определённая степень диффузии; этим объясняется, в частности, зависимое от времени упрочнение плёнок, сформированных из латексных микросфер.

Модификация поливинилспиртовых ММС глицином (для обеспечения наличия карбоксильных групп на поверхности микросфер) увеличивает неспецифическое связывание (таблица 4.2). Обработка глицином при рН 7 меньше влияет на связывание ММС с МПК, чем при рН 2 и 9. Известно, что при рН 7 и более преобладающая реакция альдегидов с аминокислотами – образование оснований Шиффа, которое интенсивнее протекает при рН 9, чем при рН 7 [80, с. 232]. Повышенное связывание ММС, обработанных при рН 9, с МПК, возможно, обусловлено тем, что они несут на поверхности больше иммобилизованного глицина (и, соответственно, карбоксильных групп). Кислая среда способствует гидролизу ацеталей, формирование которых лежит в основе сшивки ПВС глутаральдегидом [168]: с уменьшением рН ниже 6 скорость гидролиза возрастает примерно в 10 раз на каждую единицу рН [169]. Гидролиз, кроме разрыхления ММС, может вести к появлению на их поверхности дополнительных свободных альдегидных групп, а также образованию свободного ГА (включая полимерные формы) [170] и растворимых форм модифицированного глутаральдегидом ПВС. Как следствие возможно протекание целого ряда побочных реакций, которые могут быть ответственны за повышенное связывание с МПК микросфер, модифицированных глицином в присутствии уксусной кислоты.

Обработка поливинилспиртовых ММС дополнительным количеством ПВС, предпринятая после удаления из среды глутаральдегида перед восстановлением боргидридом натрия с целью уменьшения количества свободных альдегидных групп, приводит к уменьшению неспецифической адгезии ММС к МПК в 1,6 раза, с 340 до 210 клеток на 1 млн. микросфер (таблица 4.2).

Совместная обработка поливинилспиртовых ММС ПВС и глицином, предпринятая непосредственно после сшивки для уменьшения количества свободных альдегидных групп и внедрения в состав поверхности микросфер групп –СООН, приводит к увеличению неспецифического связывания в 1,2 раза по сравнению с ММС, обработанными ПВС без глицина, с 210 до 250 клеток на 1 млн. микросфер (таблица 4.2).

В результате обработки H_2O_2 с целью конверсии части альдегидных групп в карбоксильные [162] неспецифическое связывание поливинилспиртовых ММС с МПК увеличивается в 1,3 раза при использовании водного раствора, содержащего 15,0 % H_2O_2 и 10 об.% уксусной кислоты, и не изменяется существенно при 4,0 % H_2O_2 (таблица 4.2). Этот факт может отражать различие в количестве образующихся на поверхности ММС карбоксильных групп. Известно, что наличие заряженных групп на гидрофильных поверхностях способствует неспецифической сорбции клеток [139, 171]. В частности, адгезия эндотелиальных клеток к поливинилацетатным плёнкам растёт с увеличением количества групп –СООН на единице поверхности [171].

Увеличение количества карбоксильных групп подтверждается ИК-спектрами микросфер, нормированными по пику поглощения 2940 см^{-1} , соответствующему валентным колебаниям С-Н связей [81, 172-176] (рисунок 4.11). В результате обработки пероксидом водорода увеличивается интенсивность поглощения около 3400 см^{-1} (область валентных колебаний связей О-Н в гидроксильных группах, участвующих во внутри- и межмолекулярных водородных связях [81, 172-174, 176]) и в интервале $1550\text{-}1650\text{ см}^{-1}$ (область антисимметричных валентных колебаний в карбоксильном анионе [172]).

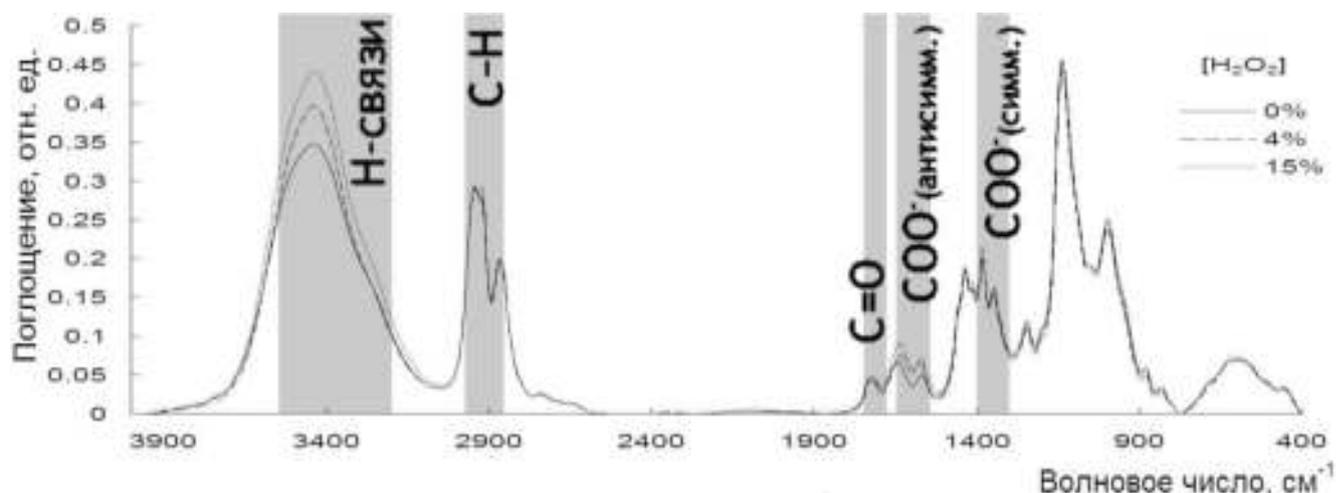


Рисунок 4.11 – ИК-спектры сшитых глутаральдегидом поливинилспиртовых микросфер, обработанных различными концентрациями H_2O_2 .

Поливинилспиртовые микросферы, покрытые после сшивки оболочкой ПВС и обработанные боргидридом натрия, обладают наименьшим неспецифическим связыванием среди протестированных образцов (таблица 4.2). Они были функционализированы авидином для ИМС. Интенсивность флуоресценции (за вычетом автофлуоресценции) меченных биотин-4-флуоресцеином микросфер после иммобилизации авидина двухстадийным способом на $90,0 \pm 2,0\%$ больше, чем после иммобилизации одностадийным. В дальнейшем для иммобилизации авидина применялся двухстадийный способ. На микросферах, обработанных 4% пероксидом водорода и модифицированных авидином по двухстадийному способу, интенсивность флуоресценции (рассчитанная с вычетом контроля) биотин-4-флуоресцеина на $102,0 \pm 15,0\%$ больше, чем на микросферах, не подвергавшихся обработке H_2O_2 . По-видимому, это объясняется существенным увеличением количества карбоксильных групп на поверхности микросфер вместо карбонильных.

Таким образом, обработка поливинилспиртовых микросфер 4,0 % раствором H_2O_2 в 10% уксусной кислоте (4% H_2O_2) существенно увеличивает количество групп на их поверхности, участвующих в иммобилизации авидина, но не оказывает существенного влияния на неспецифическое связывание ММС с МПК: оно остаётся в 2,2 раза меньше, чем у предназначенных для магнитной сепарации биологических материалов коммерческих микросфер Magnosphere™

MS300/Carboxyl (таблица 4.2). Дзета-потенциал поливинилспиртовых ММС, модифицированных 4% H_2O_2 , от -3,35 до +3,70 мВ, то есть поверхность практически электронейтральна.

4.4 Выводы к главе 4

Разработан новый способ получения микросфер, включающий ультразвуковое диспергирование водного раствора глутаральдегида в изооктане с добавками Span 85 и Tween 85 (IST) и смешивание полученной эмульсии с эмульсией водного раствора желатина или хитозана или поливинилового спирта (ПВС) в среде того же состава, отличающийся тем, что в раствор глутаральдегида для получения более стабильной эмульсии добавлен хлорид кальция. Данным способом на основе желатина, хитозана и ПВС получены партии магнитных микросфер (ММС), имеющих средний диаметр от 2,8 до 15,0 мкм, ИПД от 0,03 до 0,10. [4-А, 5-А, 7-А, 12-А]

Сшитые Ca^{2+} альгинатные и пектиновые ММС набухают и растворяются при многократных отмывках в средах, не содержащих двухвалентных катионов (в частности, фосфатно-солевом буфере), и поэтому неприменимы для иммуномагнитной сепарации. Ковалентно сшитые глутаральдегидом и обработанные боргидридом натрия желатиновые, хитозановые и поливинилспиртовые ММС не гидролизуются в фосфатно-солевом буфере рН 7,4 при комнатной температуре (сроки наблюдения от 6 месяцев до 2 лет) и устойчивы к ультразвуку. Поливинилспиртовые микросферы способны также выдерживать нагрев до 180 °С в течение 30 минут без видимых под микроскопом изменений. [4-А, 7-А]

Магнитные свойства микросфер определяются свойствами магнитных наночастиц (МНЧ), входящих в их состав. При добавлении в водный раствор полимера МНЧ магнетита размером больше 60 нм или феррита железа-кобальта 40 – 60 нм микросферы получают ферромагнитными, а при добавлении МНЧ магнетита до 15 нм – суперпарамагнитными. Микросферы, содержащие суперпарамагнитные частицы, не проявляют остаточной намагниченности, несмотря на агрегацию частиц в их составе. Для получения ММС диаметром около 5 мкм из эмульгированного в IST водного раствора ПВС, содержащего суперпарамагнитные наночастицы магнетита, оптимальными являются концентрация магнетита в дисперсной фазе не более 3,25 г/л и концентрация ПВС 50 мг/мл при условии, что применяется ПВС, динамическая вязкость 4 % водного раствора которого составляет ≈ 11 мПа·с. [1-А, 4-А, 7-А, 9-А]

Покрытие ПВС уменьшает неспецифическую адгезию хитозановых ММС к МПК эффективнее, чем покрытие КМД со степенью карбоксилирования до 10 %.

Наименьшим среди изученных образцов неспецифическим связыванием с МПК (1 клетка на 4800 ± 600 микросфер) обладали поливинилспиртовые ММС, покрытые оболочкой ПВС с массовой долей ацетатных групп 1,1 – 1,9 %. Обработка их в процессе синтеза водным раствором, содержащим 4,0 % пероксида водорода и 10 об.% уксусной кислоты (4% H_2O_2) в 2 раза увеличивает количество сайтов, доступных для иммобилизации авидина с применением 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимида (EDC), но не оказывает существенного влияния на неспецифическое связывание с МПК. Дзета-потенциал поливинилспиртовых ММС, модифицированных 4% H_2O_2 , от -3,35 до +3,70 мВ, то есть поверхность практически электронейтральна. [2-А, 6-А]

ГЛАВА 5

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ПОЛУЧЕННЫХ МАГНИТНЫХ МИКРОСФЕР

Магнитные микросферы (ММС) на основе сшитого глутаральдегидом поливинилового спирта (ПВС) были функционализированы авидином, биотинилированными антителами, дрожжевыми антигенами, рН-чувствительными флуорохромами и применены для магнитной сепарации лейкоцитов, определения рН среды при микроскопии, оценки фагоцитарной активности нейтрофилов, а также для обеспечения зазора между стёклами в жидкокристаллических устройствах.

5.1 Иммуномагнитная сепарация лейкоцитов

Поливинилспиртовые ММС, покрытые дополнительным слоем ПВС, обработанные последовательно водными раствором, содержащим 4,0 % пероксида водорода и 10 об.% уксусной кислоты (4% H_2O_2) и буферным раствором боргидрида натрия 10 мг/мл, модифицированные авидином и несущие биотинилированные антитела анти-CD8, в суспензии мононуклеарных клеток периферической крови (МПК) селективно связываются с клетками CD8⁺, формируя характерные розетки (рисунок 5.1).

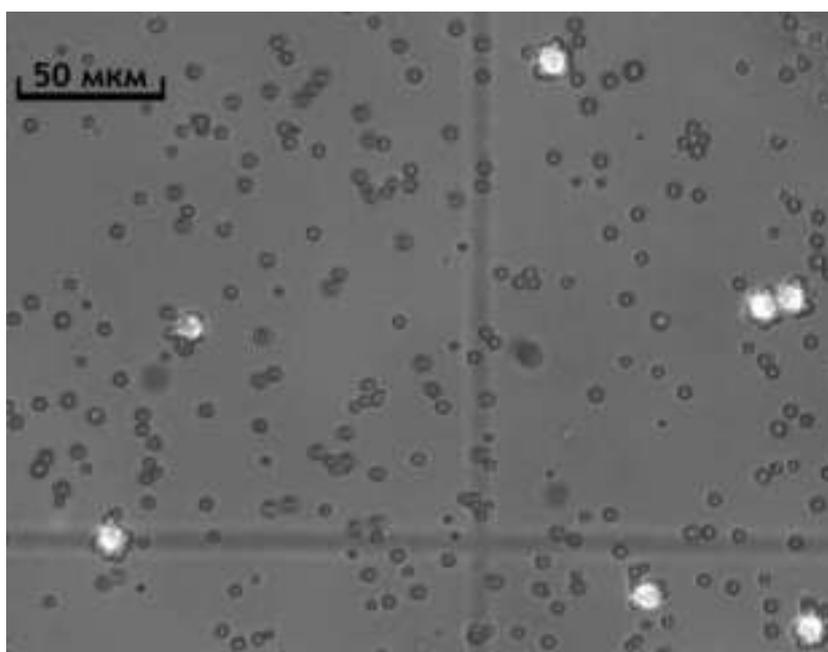
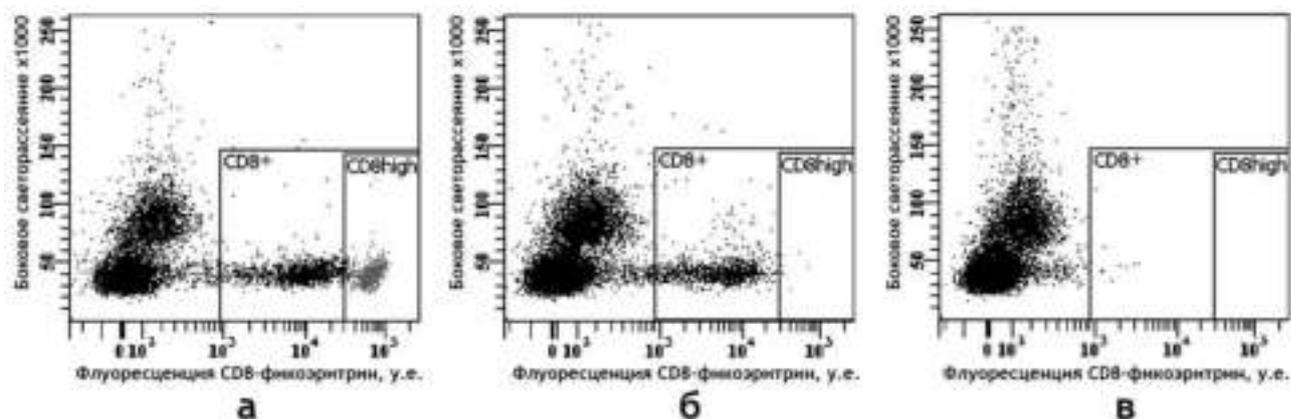


Рисунок 5.1 – Микрофотография ресуспензированного осадка после магнитной сепарации клеток CD8⁺ из суспензии мононуклеаров периферической крови. Клетки окрашены флуоресцентными антителами анти-CD8.

ММС, обработанные 2,0 мкг анти-CD8 на 10^9 микросфер, извлекают из суспензии МПК 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 (рисунок 5.2).



а – исходная суспензия МПК; **б** – супернатант после магнитной сепарации (2,0 мкг анти-CD8 на 10^9 микросфер); **в** – супернатант после магнитной сепарации (6,25 мкг анти-CD8 на 10^9 микросфер).

Рисунок 5.2 – Данные проточной цитофлуориметрии по удалению клеток CD 8⁺ из суспензии мононуклеарных клеток периферической крови иммуномагнитными микросферами с различным количеством антител

Во втором случае специфичность сепарации составляет $94,0 \pm 5,0$ %, выход CD8⁺ $85,0 \pm 11,0$ %, удаление CD8⁺ из 1-го супернатанта $97,0 \pm 3,0$ %, жизнеспособность клеток в осадке $98,0 \pm 2,0$ %. При сепарации микросферами, обработанными 12,5 мкг анти-CD8 на 10^9 ММС, жизнеспособность клеток в осадке была $89,0 \pm 4,0$ %, т.е. иммобилизация избыточного количества антител на ММС отрицательно влияет на жизнеспособность контактирующих с ними клеток.

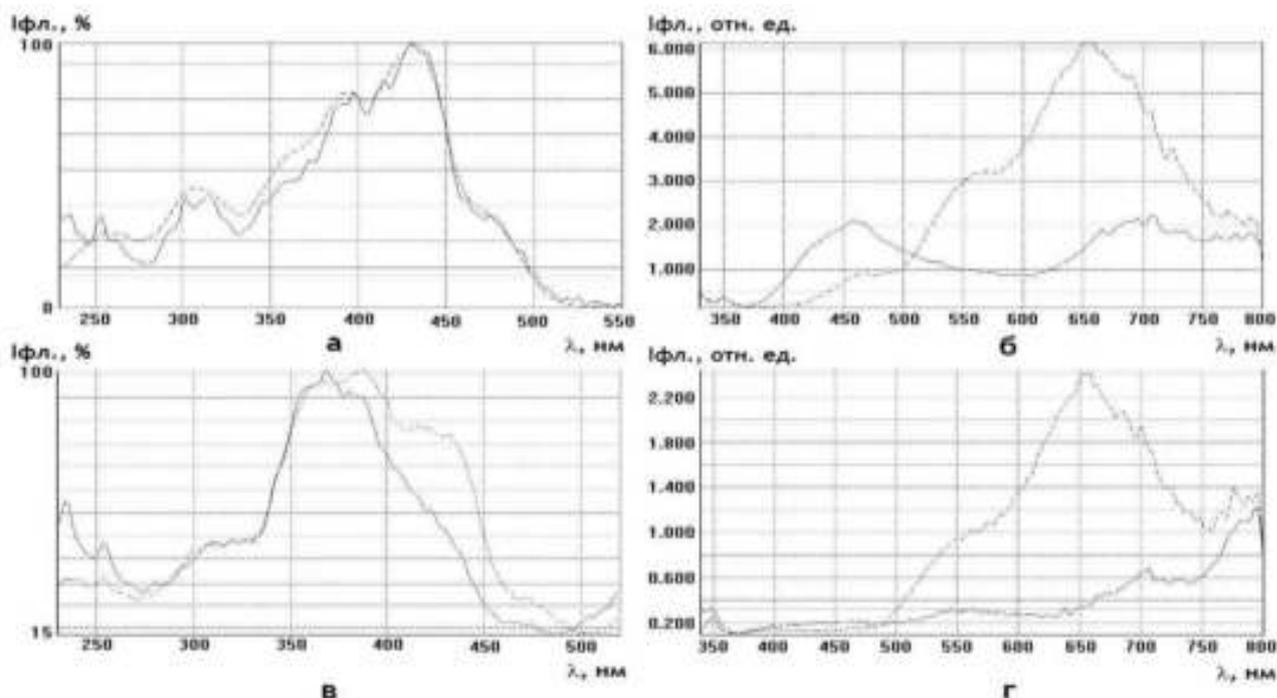
При сепарации CD8⁺ из суспензии МПК с помощью коммерческих микросфер MagCollect™ Streptavidin Ferrofluid специфичность составляет $93,0 \pm 2,0$ %. Таким образом, поливинилспиртовые ММС, модифицированные авидином и анти-CD8, обеспечивают сепарацию клеток CD8⁺ из суспензии МПК с такой же специфичностью, как и коммерческие микросферы.

По результатам экспериментов разработана инструкция по применению поливинилспиртовых ММС, модифицированных авидином и антителами, для иммуномагнитной сепарации лейкоцитов. Показатели сепарации подтверждены клиническими испытаниями на базах РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии (Минский р-н, д. Боровляны), УЗ «9-я городская клиническая больница» (Минск) и Белорусской медицинской академии последипломного образования (Приложение Б), после чего микросферы были зарегистрированы Минздравом Республики Беларусь (Приложение В) и опытные их партии были реализованы (Приложение Г).

5.2 Определение рН среды

При введении 4,4'-(1E,1'E)-2,2'-(2-аминопиримидин-4,6-диил) бис(этен-2,1-диил)бис(N,N-диметилфениламина) (АПМ) и 4,4'-(1E,1'E)-2,2'-(2-аминопиримидин-4,6-диил)бис(этен-2,1-диил)бис(N,N-диэтилфениламина) (АПЭ) в поливинилспиртовые ММС путём насыщения флуорохромами дисперсионной среды яркость изображений микросфер превышает фоновую в 10,5 и 8,4 раза в случае АПМ и АПЭ, соответственно. При введении тех же красителей в магнитную жидкость, из которой получают ММС, яркость микросфер превышает фоновую соответственно в 2,3 и 1,6 раза. Эти данные свидетельствуют о перераспределении АПМ и АПЭ между фазами эмульсии в ходе синтеза ММС.

Флуорохромы АПМ и АПЭ рН-чувствительны. В 0,1 М фосфатном буфере при росте рН с 5 до 8 для АПЭ характерно увеличение соотношений между значениями интенсивности флуоресценции ($I_{\text{фл.}}$) при 370 и 430 нм на спектре возбуждения с 1,2 до 2,1, а также при 550 и 655 нм на спектре флуоресценции с 0,4 до 0,9 (рисунок 5.3, в, г). Для АПМ при таком же изменении рН характерно увеличение соотношения между значениями $I_{\text{фл.}}$ при 455 и 650 нм на спектре флуоресценции с 0,13 до 1,3 (рисунок 5.3, б), тогда как спектр возбуждения изменяется незначительно (рисунок 5.3, а).

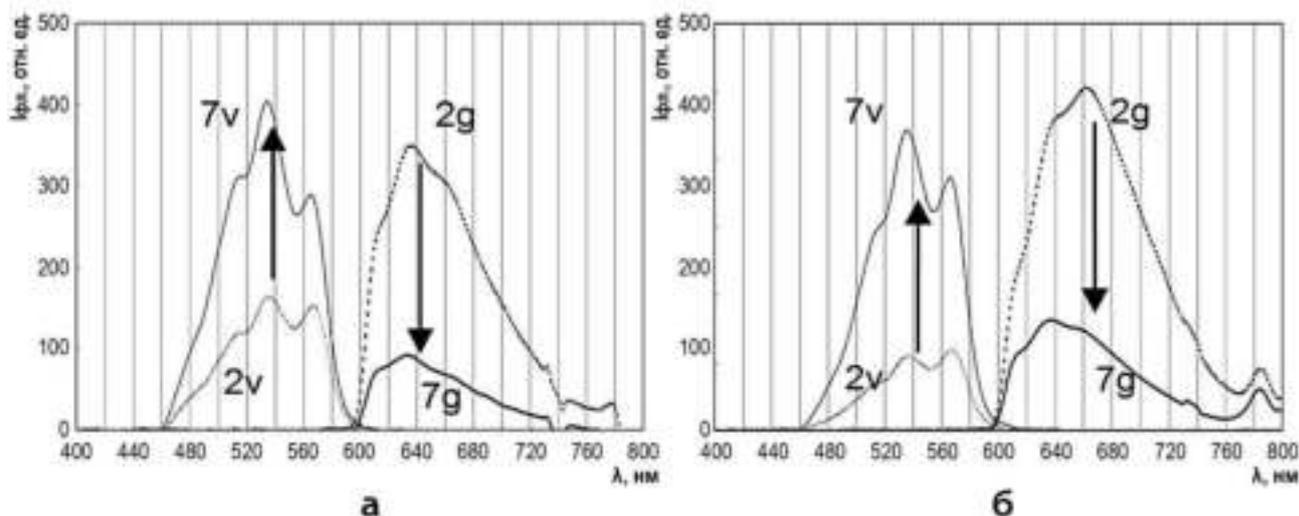


а, в – спектры возбуждения, нормированные по максимальной интенсивности (λ регистрации 550 нм); б,г – спектры флуоресценции (λ возбуждения 310 нм).

Сплошные линии – рН 5, прерывистые – рН 7.

Рисунок 5.3 – Оптические спектры АПМ (а,б) и АПЭ (в, г) в фосфатном буфере при различных рН

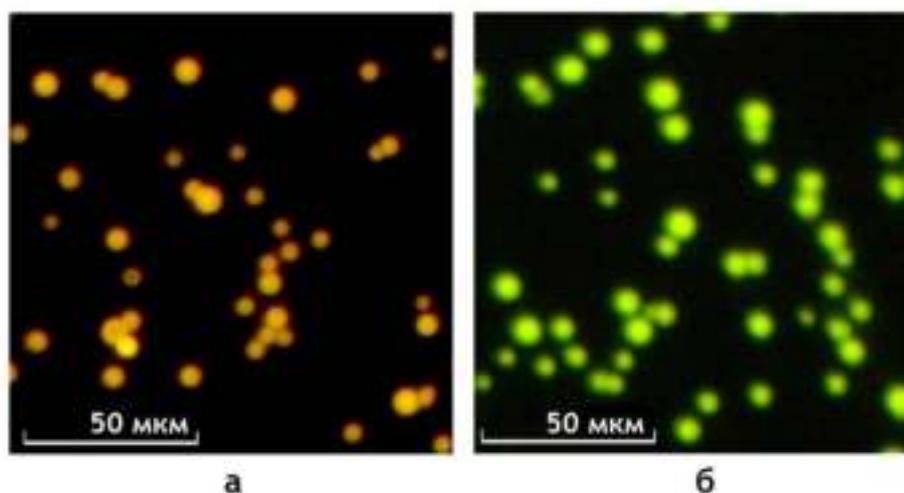
На спектрах флуоресценции микросфер, окрашенных АПМ и АПЭ, соотношение между $I_{\text{фл.}}$ в коротковолновой (480-580 нм) и длинноволновой (600-720 нм) областях также увеличивается с ростом рН среды (рисунок 5.4). При рН 2 преобладает красный компонент флуоресценции (620-720 нм), а при рН 7 – зелёный (500-570 нм).



Флуорохромы: а – АПМ; б – АПЭ. Обозначения: 2, 7 – значения рН; v, g – спектры, полученные при возбуждении флуоресценции фиолетовым (400-440 нм) и зелёным светом (525-570 нм), соответственно.

Рисунок 5.4 – Спектры флуоресценции микросфер, меченных 2-аминопиримидин-бис-этен-бис-диалкилфениламинами

Изменение цвета флуоресценции происходит равномерно по всему объёму микросферы (рисунок 5.5), что свидетельствует о проницаемости полимерной матрицы из сшитого глутаральдегидом ПВС для протонов.



а – уксусная кислота 10%, рН 2; б – ФСБ, рН 7,4.

Рисунок 5.5 – Флуоресценция микросфер, содержащих АПМ, в кислой (а) и нейтральной (б) средах при возбуждении фиолетово-синим светом (380-490 нм)

В то же время при хранении ММС в течение 180 суток не происходит обнаружимой потери флуорохромов. Вероятно, АПМ и АПЭ связаны с полимерной матрицей микросфер ковалентно, не исключено, что через аминогруппу остатка 2-аминопиримидина, прореагировавшую с карбонильной группой в процессе сшивки ПВС глутаральдегидом.

Исследование свойств меченных АПМ и АПЭ поливинилспиртовых ММС позволило разработать способ оценки локального рН среды, основанный на изменении соотношения яркостей зелёной и красной компонент флуоресценции данных флуорохромов. Это рН-чувствительное изменение регистрировалось по соотношению яркостей зелёного (G) и красного (R) каналов цифровых изображений микросфер, полученных при возбуждении светом 400-440 нм и 525-570 нм, соответственно. Калибровочные кривые G/R были построены для микросфер в 0,2М фосфатном буфере в интервале рН 4-9 с шагом 1; они близки для АПМ и АПЭ (рисунок 5.6).

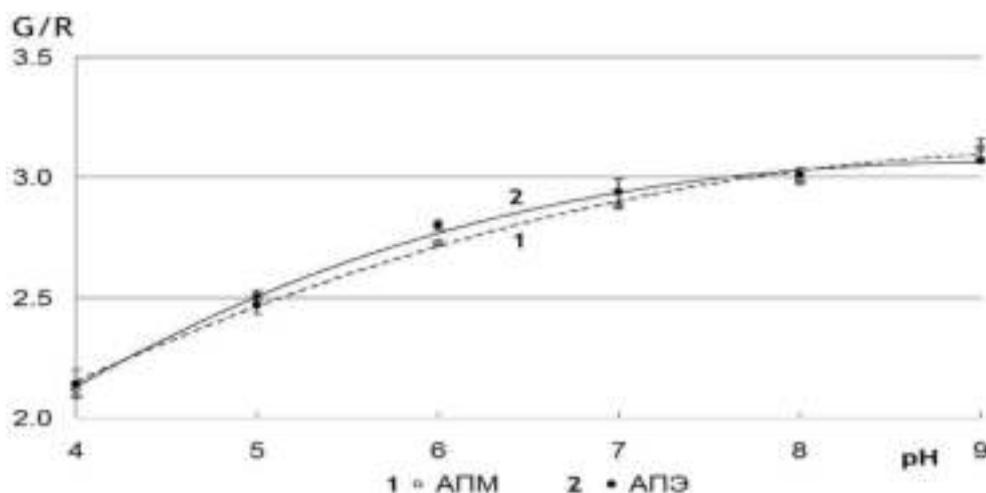


Рисунок 5.6 – Зависимость соотношения G- и R- составляющих изображений АПМ- и АПЭ-содержащих микросфер от рН

Разработанный способ применим для определения рН в микрообъёмах, например, в фагосомах клеток. В интервале рН 4-7 соотношение G/R возрастает с 2,10 до 2,90 (на 35,8 %) и с 2,15 до 2,95 (на 37,4 %) для ММС, содержащих АПМ и АПЭ, соответственно. Для коммерческого зонда LysoSensor™ Yellow/Blue [177] известно, что в том же интервале рН соотношение яркостей флуоресценции в синей и зелёной областях уменьшается на 48,3 % [148] – таким образом, методика определения локального рН с помощью ММС, содержащих АПМ и АПЭ, сопоставима по чувствительности с методикой, в которой используется LysoSensor Yellow/Blue. При этом в интервале рН 6-7 методика с применением АПМ или АПЭ чувствительнее, чем с применением LysoSensor Yellow/Blue: изменение соотношений соответственно на 5,0 % и 0,01 %.

При микроскопии в камере Горяева в режиме эпифлуоресценции (лампа НВО 100 Вт, объектив 20х с апертурой 0,40, синий светофильтр) в течение 2 минут происходило выцветание ММС с уменьшением интенсивности флуоресценции на $85,0 \pm 3,5 \%$ и $81,0 \pm 3,5 \%$ соответственно для АПМ и АПЭ (рисунок 5.7).

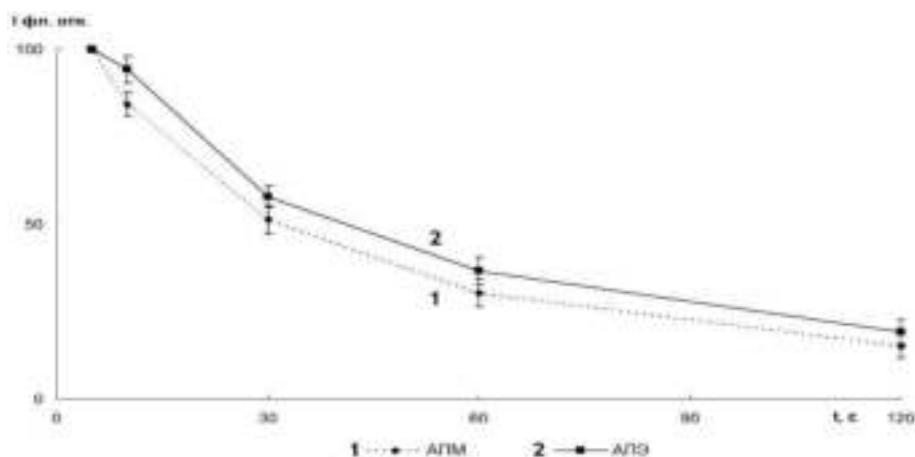


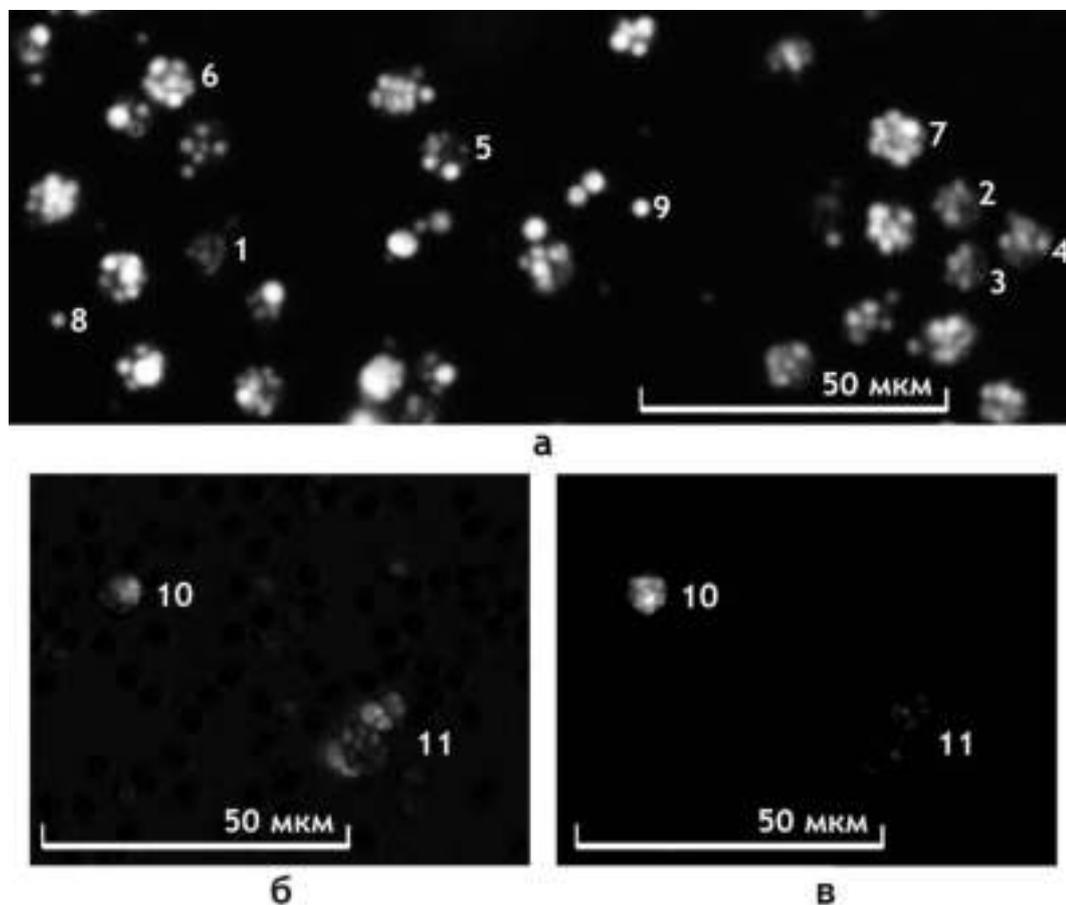
Рисунок 5.7 – Зависимость флуоресценции микросфер, содержащих АПМ (1) и АПЭ (2), от времени

Однако соотношение G/R после 1 минуты освещения практически не изменялось у АПМ ($3,56 \pm 0,10$ до освещения и $3,60 \pm 0,10$ после) и незначительно изменялось у АПЭ (соответственно $3,55 \pm 0,15$ и $3,80 \pm 0,15$). Таким образом, светозависимое выцветание практически не влияет на рН-чувствительность флуоресценции данных флуорохромов, особенно АПМ.

5.3 Оценка фагоцитарной активности нейтрофилов

Модифицированные лизатом дрожжевых стенок поливинилспиртовые магнитные микросферы (ММС), в отличие от немодифицированных, в присутствии сыворотки крови эффективно фагоцитируются нейтрофилами и обеспечивают магнитную сепарацию последних. При сравнении с фагоцитозом дрожжей фагоцитарные индексы совпадают ($99,0 \pm 1,0 \%$), а фагоцитарные числа близки: $7,5 \pm 2,5$ и $6,5 \pm 2,0$ соответственно для ММС и дрожжей, разница недостоверна ($p > 0,1$). Больше количество поглощённых ММС на 1 клетку по сравнению с количеством дрожжей прогнозируемо с учётом того, что средний размер применявшихся микросфер меньше, чем дрожжевых клеток.

По истечении 2 часов инкубации с нейтрофилами микросфер, окрашенных АПМ, в клетках, содержащих до 5 ММС (рисунок 5.8, объекты 1 – 5), интенсивность флуоресценции ($I_{фл}$) некоторых поглощённых микросфер уменьшается на 20-25 % по сравнению со свободными (рисунок 5.8, объекты 8, 9).



а – фагоцитоз ММС, зелёный фильтр;

б, в – фагоцитоз дрожжей: б- зелёный фильтр, в – красный.

Рисунок 5.8 – Фагоцитоз нейтрофилами окрашенных АПМ ММС и дрожжей (флуоресцентные оптические изображения после 2 часов инкубации)

В то же время в клетках, содержащих 7 и более микросфер (рисунок 5.8, объекты 6, 7), уменьшения $I_{фл}$ не происходит. При фагоцитозе дрожжей наблюдается аналогичная картина: перевариваемые дрожжевые клетки, отличающиеся по красной флуоресценции акридинового оранжевого (рисунок 5.8, объект 10), содержатся преимущественно в нейтрофилах, поглотивших до 5 дрожжей. На основании этого было предположено, что выцветание АПМ в составе фагоцитированных микросфер характеризует его разрушение под действием тех же факторов, которые участвуют в повреждении и переваривание дрожжей, например, активных форм кислорода и NO^{\bullet} -радикалов.

5.4 Обеспечение зазоров в жидкокристаллических ячейках

Микросферы на основе шитого глутаральдегидом поливинилового спирта способны выдерживать нагревание до 180 °С в течение 30 минут без видимых под микроскопом изменений (рисунок 5.9).

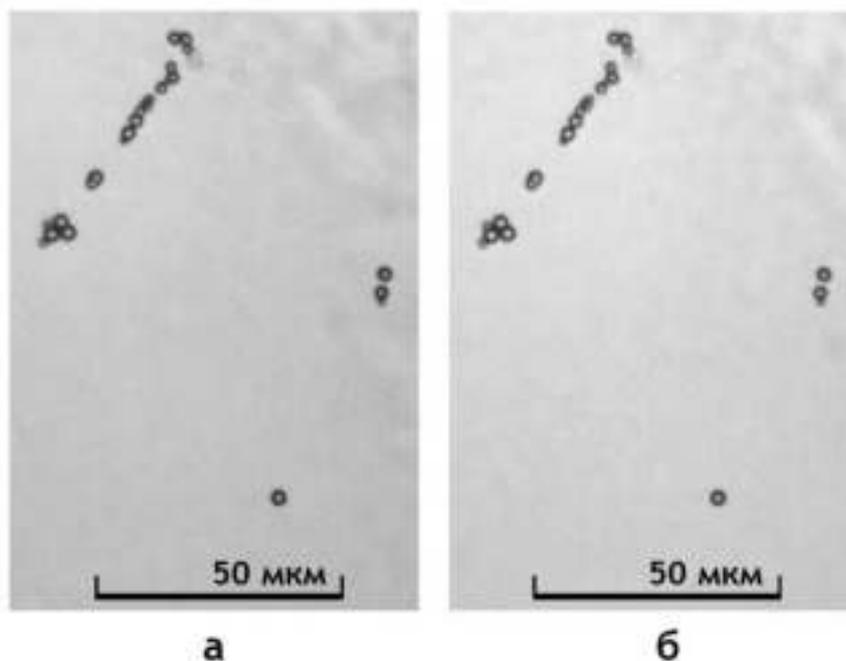


Рисунок 5.9 – Поливинилспиртовые микросферы до (а) и после (б) нагревания до 180 °С в течение 30 минут

Термостойкость в сочетании с узким распределением по размеру позволили применить их в качестве разделителей (спейсеров), обеспечивающих зазор 4,5 – 5,0 мкм в жидкокристаллических ячейках между стёклами, для соединения которых применяется смола, полимеризуемая при $170,0 \pm 10,0$ °С. Было установлено, что величина зазора зависит от прижимного усилия, таким образом, при 160,0 – 180,0 °С микросферы обладают пластичностью и упругостью, достаточными для выполнения функции спейсеров (Приложение Д).

5.5 Выводы к главе 5

Разработан способ иммуномагнитной сепарации лейкоцитов с применением поливинилспиртовых магнитных микросфер (ММС). Микросферы, модифицированные авидином и анти-CD8, обеспечивают сепарацию клеток CD8⁺ из суспензии мононуклеаров периферической крови с показателями: специфичность

94,2 ± 4,5 %, выход CD8+ 84,8 ± 11,0 %, удаление CD8+ из 1-го супернатанта 96,5 ± 3,6 %, жизнеспособность клеток в осадке 97,9 ± 2,3 %. Продемонстрирована возможность разделять популяции клеток с высокой и низкой экспрессией одного и того же антигена: ММС, обработанные 2,0 мкг анти-CD8 на 10⁹ микросфер, извлекают из суспензии мононуклеаров только клетки с высокой экспрессией CD8, а обработанные 6,25 анти-CD8 на 10⁹ микросфер – также клетки с низкой экспрессией CD8. Иммунизация избыточного количества антител на ММС отрицательно влияет на жизнеспособность контактирующих с ними клеток. Эффективность сепарации подтверждена клиническими испытаниями (Приложение Б). [6-А]

Разработан новый способ оценки локального pH среды, основанный на регистрации соотношения красной и зелёной флуоресценции pH-чувствительных флуорохромов 4,4'-(1E,1'E)-2,2'-(2-аминопиримидин-4,6-диил)бис(этен-2,1-диил)бис(N,N-диметилфениламина) (АПМ) или 4,4'-(1E,1'E)-2,2'-(2-аминопиримидин-4,6-диил)бис(этен-2,1-диил)бис(N,N-диэтил-фениламина) (АПЭ) в сшитых глутаральдегидом поливинилспиртовых микросферах. В интервале pH 6-7 данный способ чувствительнее, чем с применением красителя LysoSensor Yellow/Blue: изменение соотношения яркостей зелёной и красной флуоресценции соответственно 5,0 % и 0,01 %. Изменение цвета флуоресценции происходит равномерно по всему объёму каждой микросферы, что свидетельствует о проницаемости сшитого глутаральдегидом ПВС для протонов. [3-А, 11-А]

Установлено, что лизат клеточных стенок *S. cerevisiae*, полученный из сухих пекарских дрожжей ультразвуковой обработкой в муравьиной кислоте, придаёт ММС на основе сшитого глутаральдегидом ПВС антигенность, обеспечивающую их фагоцитоз нейтрофилами и магнитную сепарацию фагоцитов. [5-А]

При нагревании до 160,0 – 180,0 °С микросферы на основе сшитого глутаральдегидом ПВС обладают достаточными стабильностью, пластичностью и упругостью для применения их в качестве разделителей для обеспечения зазоров между пластинами, соединяемыми термополимеризуемыми смолами (приложение Д).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. Установлены закономерности эмульгирования водного раствора хитозана 7,5 г/л, содержащего наночастицы магнетита, с динамической вязкостью 32,6 мПа·с при 20 °С, в изооктане с добавками Span 85 и Tween 85 (IST). Показано, что минимальный размер формирующихся капель (1,7 – 2,2 мкм) не зависит от частоты пипетирования и внутреннего диаметра наконечника пипетки, а время превращения дисперсной фазы (ДФ) в капли размера, близкого к минимальному, уменьшается с увеличением объема обрабатываемой за цикл эмульсии и средней скорости её течения через наконечник. Установлено, что эмульсия с индексом полидисперсности (ИПД) между 0,1 и 0,2 образуется через 5 – 10 минут при пипетировании наконечником 0,8 мм с частотой 12 Гц, когда за цикл обрабатывается 1/39 объема эмульсии. [4-А, 8-А, 10-А]

2. В приготовленной ультразвуковым диспергированием эмульсии водных растворов NaCl и CaCl₂ в IST максимальная объемная доля водной фазы, при которой эмульсия не мутнеет в течение 5 минут, линейно увеличивается от 1,9 до 6,2 % по мере роста ионной силы от $1 \cdot 10^{-4}$ до 3,0 моль/л. Добавление хлорида кальция в раствор глутаральдегида позволяет получить в IST не коалесцирующие в течение 5 минут наноэмульсии, содержащие до 21,2 г/л глутаральдегида, тогда как его максимальная концентрация в изооктане при традиционном способе добавления в виде насыщенного раствора в толуоле не больше 6,3 г/л. [6-А, 12-А]

Разработан новый способ синтеза магнитных микросфер (ММС), который основан на смешивании приготовленных в IST наноэмульсий водного раствора глутаральдегида и микроэмульсий водных растворов желатина, хитозана или поливинилового спирта (ПВС), содержащих наночастицы магнетита или феррита железа-кобальта. На основе желатина, хитозана и ПВС получены партии ММС, имеющих средний диаметр от 3,0 до 15,0 мкм, ИПД от 0,03 до 0,10. Суперпарамагнитные микросферы образуются при добавлении в водный раствор полимера наночастиц магнетита размером до 15,0 нм, а ферромагнитные – магнетита размером больше 60 нм или феррита железа-кобальта 40 – 60 нм. [1-А, 4-А, 5-А, 7-А, 9-А, 12-А]

3. Установлено, что оболочка из ПВС с массовой долей ацетатных групп 1,0 – 2,0 % уменьшает неспецифическую адгезию микросфер на основе сшитых глутаральдегидом хитозана и ПВС к мононуклеарным клеткам периферической крови (МПК): количество неспецифически связанных клеток на миллион ММС уменьшается с 5,5 до 1,3 тысяч в случае хитозановых и с 340 до 210 в случае по-

ливинилспиртовых микросфер. Обработка ММС с оболочкой из ПВС водным раствором, содержащим 4,0 % пероксида водорода и 10 об.% уксусной кислоты (4% H_2O_2) в 2 раза увеличивает количество сайтов, доступных для иммобилизации авидина с применением 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимида (EDC), и не оказывает существенного влияния на неспецифическую адгезию микросфер к МПК. Дзета-потенциал поливинилспиртовых ММС, модифицированных 4% H_2O_2 , от -3,35 до +3,70 мВ, то есть поверхность практически электронейтральна. [2-А, 6-А]

Установлено, что ММС на основе сшитого глутаральдегидом ПВС с оболочкой из ПВС, обработанные 4% H_2O_2 и боргидридом натрия, после иммобилизации авидина и биотинилированных антител к антигену CD8 обеспечивают иммуномагнитную сепарацию клеток CD8⁺ из суспензии МПК: специфичность $94,0 \pm 5,0$ %, выход CD8⁺ $85,0 \pm 11,0$ %, удаление CD8⁺ из 1-го супернатанта $97,0 \pm 3,0$ %, жизнеспособность клеток в осадке $98,0 \pm 2,0$ %. Показано разделение популяций клеток с высокой и низкой экспрессией одного и того же антигена: ММС, обработанные 2,0 мкг анти-CD8 на 10^9 микросфер, извлекают из суспензии МПК только клетки с высокой экспрессией CD8, а обработанные 6,25 анти-CD8 на 10^9 микросфер – также и клетки с низкой экспрессией CD8. Установлено, что лизат клеточных стенок *S. cerevisiae*, полученный из сухих пекарских дрожжей ультразвуковой обработкой в муравьиной кислоте, придаёт ММС на основе сшитого глутаральдегидом ПВС антигенность, обеспечивающую их фагоцитоз нейтрофилами и магнитную сепарацию фагоцитов. [5-А, 6-А]

4. Введение в состав ММС на основе сшитого глутаральдегидом ПВС флуоресцентных красителей 4,4'-(1E,1'E)-2,2'-(2-амино-пиримидин-4,6-диил) бис(этен-2,1-диил)бис(N,N-диметилфениламина) (АПМ) или 4,4'-(1E,1'E)-2,2'-(2-аминопиримидин-4,6-диил)бис(этен-2,1-диил)бис(N,N-диэтил-фениламина) (АПЭ) путём насыщения среды IST, применяемой при синтезе микросфер, позволило визуализировать ММС под микроскопом в режиме эпифлуоресценции, в том числе внутри фагоцитировавших их нейтрофилов. [3-А, 5-А, 11-А]

Разработан новый способ оценки локального pH среды, основанный на измерении соотношения яркостей зелёной (G) и красной (R) компонент флуоресценции меченных АПМ и АПЭ микросфер. Установлено, что изменение цвета флуоресценции происходит равномерно по всему объёму каждой микросферы, что свидетельствует о проницаемости сшитого глутаральдегидом ПВС для протонов. [3-А, 11-А]

Рекомендации по практическому использованию полученных результатов

Опытные партии ММС на основе сшитого глутаральдегидом хитозана приобретены РНПЦ эпидемиологии и микробиологии и использованы в составе наборов для определения патогенных хламидий в биологических жидкостях. Эффективность магнитной сепарации лейкоцитов с применением ММС на основе сшитого глутаральдегидом поливинилового спирта, функционализированных авидином, подтверждена клиническими испытаниями на базах РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии (Минский р-н, д. Боровляны), УЗ «9-я городская клиническая больница» (Минск) и Белорусской медицинской академии последипломного образования. Опытные партии приобретены Белорусским государственным медицинским университетом, Институтом физиологии НАН Беларуси, Институтом генетики и цитологии НАН Беларуси. Микросферы с полимерной матрицей из сшитого глутаральдегидом поливинилового спирта успешно испытаны на производственной базе УП «Дисплей» (Минск) в качестве разделителей (спейсеров) в жидкокристаллических устройствах (ЖКУ) отображения информации.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК**Список использованных источников**

1. A review on microspheres as a novel controlled drug delivery system / M.S. Samanta [et al.] // *Asian J. Pharm. Clin. Res.* – 2021. – Vol. 14, № 4. – P. 3-11.
2. Microspheres as controlled drug delivery system: an updated review / S. Saini [et al.] // *IJSPR.* – 2018. – Vol. 9, № 5. – P. 1760-1768.
3. Merck. Fluorescent Estapor® Microspheres [Electronic resource]. – Mode of access: https://www.merckmillipore.com/INTL/en/products/ivd-oem-materials-reagents/polymeric-microspheres-and-magnetic-beads/estapor-fluorescent-microspheres/LTqb.qB.YacAAAE_1gR3.Lxj.nav. – Date of access: 27.10.2022.
4. Development of PA6/GO microspheres with good processability for SLS 3D printing / Bozhen Wu [et al.] // *Polym. Eng. Sci.* – 2022. – Vol. 62, № 5. – P. 1700-1709.
5. Polymer Design for 3D Printing Elastomers: Recent Advances in Structure, Properties, and Printing / J. Herzberger [et al.] // *Prog. Polym. Sci.* – 2019. – Vol. 97. – Article 101144, P. 1-132.
6. Elastic photonic microbeads as building blocks for mechanochromic materials / G.H. Lee [et al.] // *ACS Appl. Polym. Mater.* – 2020. – Vol. 2. – P. 706–714.
7. EPRUI Biotech Co. LTD. Polymer Spacers [Electronic resource]. – Mode of access: <https://www.epruibiotech.com/product/polymer-spacer>. – Date of access: 26.10.2022.
8. EPRUI Biotech Co. LTD. HPLC Packing Material [Electronic resource]. – Mode of access: <https://www.epruibiotech.com/hplc-packing-material>. – Date of access: 27.10.2022.
9. New insights into the formulation and polymerization of Pickering emulsions stabilized by natural organic particles / H. Dupont [et al.] // *Macromolecules.* – 2021. – Vol. 54, № 11. – P. 4945–4970.
10. Lee, J. Wastewater treatment by polymeric microspheres: a review / J. Lee, R. Patel // *Polymers.* – 2022. – Vol. 14. – Article 1890, P. 1-37.
11. Pickering emulsion strategy to control surface wettability of polymer microspheres for oil–water separation / Y. Bai [et al.] // *Appl. Surf. Sci.* – 2021. – Vol. 566. – Article 150742, P. 1-9.
12. Color changing Pickering emulsions stabilized by polysiloxane microspheres bearing phenolphthalein groups / Y. Wei [et al.] // *RSC Adv.* – 2015. – Vol. 88. – P. 71824-71829.
13. Water-in-oil Pickering emulsions stabilized by hydrophobized protein microspheres / H. Jiang [et al.] // *Langmuir.* – 2022. – Vol. 38, № 40. – P. 12273-12280

14. Das, M.K. Microsphere a drug delivery system – a review / M.K. Das, A.B. Ahmed, D. Saha // *Int. J. Curr. Pharm. Res.* – 2019. – Vol. 11, № 4. – P. 34-41.
15. An overview of the production methods for core–shell microspheres for parenteral controlled drug delivery / R.S. van der Kooij [et al.] // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* – 2022. – Vol. 170. – P. 24–42.
16. Chitosan microbeads produced by a one-step scalable stirred emulsification: a promising process for cell therapy applications / Y. Alinejad [et al.] // *ACS Biomater. Sci. Eng.* – 2020. – Vol. 6, № 1. – P. 288–297. DOI: 10.1021/acsbiomaterials.9b01638.
17. Evidence of plasma biomarkers indicating high risk of dementia in cognitively normal subjects / M.-C. Pai [et al.] // *Sci. Rep.* – 2022. – Vol. 12. – Article 1192, P. 1-7.
18. Validation of assaying carcinoembryonic antigen in human serum by using immunomagnetic reduction / P.-L. Wei [et al.] // *Sci. Rep.* – 2018. – Vol. 8. – Article 10002, P. 1-11.
19. Frenea-Robin, M. Basic Principles and Recent Advances in Magnetic Cell Separation / M. Frenea-Robin, J. Marchalot // *Magnetochemistry.* – 2022. – Vol. 8. – Article 11, P. 1-45.
20. Immunomagnetic separation: An effective pretreatment technology for isolation and enrichment in food microorganisms detection / Z. Wang [et al.] // *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* – 2020. – Vol. 19, № 6. – P. 3802-3824.
21. Temperature-responsive magnetic nanoparticles for enabling affinity separation of extracellular vesicles / R. Jauregui [et al.] // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* – 2018. – Vol. 10, № 40. – P. 33847–33856.
22. Review and current status of emulsion/dispersion technology using an internal gelation process for the design of alginate particles / C.P. Reis [et al.] // *J. Microencapsulation.* – 2006. – Vol. 23, № 3. – P. 245–257.
23. Preparation of monodisperse polystyrene microspheres with different functional groups using soap-free emulsion polymerization / B. Yang [et al.] // *Colloid. Polym. Sci.* – 2021. – Vol. 299. – P. 1095–1102.
24. Magnetic polymer beads: Recent trends and developments in synthetic design and applications / O. Philippova [et al.] // *Eur. Polym. J.* – 2011. – Vol. 47. – P. 542–559.
25. 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, № 1. – Article 016601, P. 1-38.
26. Synthesis, characterization, and application of composite alginate microspheres with magnetic and fluorescent functionalities / J. Liu [et al.] // *J. Appl. Polym. Sci.* – 2009. – Vol. 113. – P. 4042–4051.

27. 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 // *Biosens. Bioelectron.* – 2005. – Vol. 21. – P. 212–216.

28. Magnetic chitosan/sodium alginate gel bead as a novel composite adsorbent for Cu(II) removal from aqueous solution / H.-Ch. Tao [et al.] // *Environ. Geochem. Health.* – 2019. – Vol. 41. – P.297–308.

29. Formulation and evaluation of glutaraldehyde-crosslinked chitosan microparticles for the delivery of ibuprofen / K.C. Ofokansi [et al.] // *Trop. J. Pharm. Res.* – 2013. – Vol. 12, № 1. – P. 19-25.

30. 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. – P. 549–561.

31. Electrosprayed genipin cross-linked alginate–chitosan microcarriers for ex vivo expansion of mesenchymal stem cells / C.-Y. Chui [et al.] // *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* – 2018. – Volume 00. – P. 1–12.

32. Genipin-crosslinked fibrin seeded with oxidized alginate microbeads as a novel composite biomaterial strategy for intervertebral disc cell therapy / C.J. Panebianco [et al.] // *Biomaterials.* – 2022. – Vol. 287. – Article 121641, P. 1-11.

33. Baimark, Y. Preparation of polysaccharide-based microspheres by a water-in-oil emulsion solvent diffusion method for drug carriers / Y. Baimark, Y. Srisuwan // *Int. J. Polym. Sci.* – 2013. – Vol. 201. – Article 761870, P. 1-6.

34. Andoyo R. Acid gelation of whey protein microbeads of different sizes / R. Andoyo, F. Guyomarc'h, M.-H. Famelart // *Dairy Sci. Technol.* – 2016. – Vol. 96. – P. 213–225.

35. Concepts for developing physical gels of chitosan and of chitosan derivatives / P. Sacco [et al.] // *Gels.* – 2018. – Vol. 4. – Article 67, P. 1-29.

36. Preparation and characterization of antibacterial magnetic-/pH-sensitive alginate/Ag/Fe₃O₄ hydrogel beads for controlled drug release / B. Rashidzadeh [et al.] // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2020. – Vol. 154. – P. 134-141.

37. Methods and compositions for activation or expansion of T lymphocytes: pat. WO 2017/053562 / S.H. Kevlahan, A. Ball, G. Qin, S.B. Wells, N.J. Jesuraj. – Publ. date 30.03.2017.

38. Synergistic anti-inflammatory and osteogenic n-HA/resveratrol/chitosan composite microspheres for osteoporotic bone regeneration / L. Li [et al.] // *Bioact. Mater.* – 2021. – Vol. 6. – P. 1255–1266.

39. Emulsion hydrogel microbeads encapsulating extractants prepared by O/W/O double Pickering emulsions for the recovery of Cu(II) from water / S. Yuan [et al.] // *Colloids Surf., A.* – 2021. – Vol. 625. – Article 126932, P. 1-10.

40. Monodisperse water-in-oil-in-water emulsions generation for synthesising alginate hydrogel microspheres via locally hydrophobic modification to PMMA microchannels / D. Li [et al.] // *Sens. Actuators, B.* – 2018. – Vol. 255, № 1. – P. 1048-1056.
41. Pichot, R. O/W emulsions stabilised by both low molecular weight surfactants and colloidal particles: the effect of surfactant type and concentration / R. Pichot, F. Spyropoulos, I.T. Norton // *J. Colloid Interface Sci.* – 2010. – Vol. 352. – P. 128–135.
42. Pasquali, R.C. The Studies on Hydrophilic-Lipophilic Balance (HLB): Sixty Years after William C. Griffin's Pioneer Work (1949-2009) / R.C. Pasquali, N. Sacco, C. Bregni // *Lat. Am. J. Pharm.* – 2009. – Vol. 28, № 2. – P. 313-317.
43. An efficient method to determine the Hydrophile-Lipophile Balance of surfactants using the phase inversion temperature deviation of CiEj/n-octane/water emulsions / M. Nollet [et al.] // *Int. J. Cosmet. Sci.* – 2019. – Vol. 41, № 2. – P. 99-108.
44. Bos, M.A. Interfacial rheological properties of adsorbed protein layers and surfactants: a review / M.A. Bos, T. van Vliet // *Adv. Colloid Interface Sci.* – 2001. – Vol. 91. – P. 437-471.
45. Effects of ionic strength on the surface tension and nonequilibrium interfacial characteristics of poly(sodium styrenesulfonate)/dodecyltrimethylammonium bromide mixtures / Á. Ábrahám [et al.] // *Langmuir.* – 2014. – Vol. 30. – P. 4970–4979.
46. Interfacial tension of oil/water emulsions with mixed non-ionic surfactants: comparison between experiments and molecular simulations / P. Posocco [et al.] // *RSC Adv.* – 2016. – Vol. 6. – P. 4723-4729.
47. Saleh, K.I. Preparation and Evaluation of Theophylline Loaded Bovine Serum Albumin Microspheres / K.I. Saleh, M.A. Ibrahim, T.M. Faris // *Bull. Pharm. Sci., Assiut University.* – 2009. – Vol. 32, № 1. – P. 65-84.
48. An overview of micro- and nanoemulsions as vehicles for essential oils: formulation, preparation and stability / L. Pavoni [et al.] // *Nanomaterials.* – 2020. – Vol. 10. – Article 135, P. 1-24.
49. Schroën, K. The importance of interfacial tension in emulsification: connecting scaling relations used in large scale preparation with microfluidic measurement methods / K. Schroën, J. de Ruiter, C. Berton-Carabin // *ChemEngineering.* – 2020. – Vol. 4. – Article 63, P. 1-22.
50. Lu, D. Mixed composition films of Spans and Tween 80 at the air-water interface / D. Lu, D.G. Rhodes // *Langmuir.* – 2000. – Vol. 16, № 21. – P. 8107-8112.
51. 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, № 26. – P. 10329-10333.
52. The effect of ionic strength and hardness of water on the non-ionic surfactant-enhanced remediation of perchloroethylene contamination / E.-S. Kim [et al.] // *J. Hazard. Mater.* – 2005. – Vol. B119. – P. 195–203.

53. An overview of Pickering emulsions: solid-particle materials, classification, morphology, and applications / Y. Yang [et al.] // *Front. Pharmacol.* – 2017. – Vol. 8. – Article 287, P. 1-20.
54. Khare, P. Influence of rheology of dispersion media in the preparation of polymeric microspheres through emulsification method / P. Khare, S.K. Jain // *AAPS PharmSciTech.* – 2009. – Vol. 10, № 4. – P. 1295-1300.
55. Preparation of uniformly-sized alginate microspheres using the novel combined methods of microchannel emulsification and external gelation / A.M. Chuah [et al.] // *Colloids Surf., A.* – 2009. – Vol. 351, № 1–3. – P. 9-17.
56. Uniform polymer microspheres: monodispersity criteria, methods of formation and applications / J.C. De La Vega [et al.] // *Nanomedicine.* – 2013. – Vol. 8, № 2. – P. 265–285.
57. *Basic Fundamentals of Drug Delivery* / R.K. Tekade [et al.]; ed.: R.K. Tekade. – Academic Press, 2019. – 792 p.
58. Physical characterization of nanoparticle size and surface modification using particle scattering diffusometry / K.N. Clayton [et al.] // *Biomicrofluidics.* – 2016. – Vol. 10. – Article 054107, P. 1-14.
59. With polymer photoclicks to fluorescent microspheres / J.P. Hooker [et al.] // *Mater. Horiz.* – 2019. – Vol. 6, № 2. – P. 356-363.
60. Monodisperse magnetic polymer particles. New biochemical and biomedical applications / J. Ugelstad [et al.] // *Blood Purif.* – 1993. – Vol. 11, № 6. – P. 349-369.
61. Bai, F. Synthesis of narrow or monodisperse poly(divinylbenzene) microspheres by distillation-precipitation polymerization / F. Bai, X. Yang, W. Huang // *Macromolecules.* – 2004. – Vol. 37. – P. 9746–9752.
62. Preparation of monodisperse poly(ST-co-PETEA) microspheres by precipitation polymerization using ethanol as solvent / H. Jiang [et al.] // *Polym. Adv. Technol.* – 2010. – Vol. 22, № 12. – P. 1555–1562.
63. Monodisperse polystyrene microspheres prepared by dispersion polymerization with microwave irradiation / Z.-S. Xu // *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* – 2005. – Vol. 43, № 11. – P. 2368–2376.
64. 3D-printed microfluidics and potential biomedical applications / P. Prabhakar [et al.] // *Front. Nanotechnol.* – 2021. – Vol. 3. – Article 609355. – P. 1-16.
65. Production of sub-10 micrometre cellulose microbeads using isoporous membranes / E.E. Ekanem [et al.] // *JMS Letters.* – 2022. – Vol. 2. – Article 100024, P. 1-5.
66. Creating monodisperse polymer microspheres using membrane emulsification / S. R. Thies [et al.] // *J. Appl. Polym. Sci.* – 2017. – Vol. 134. – Article 44593, P. 1-9.
67. Barai, N. Breakup modes of fluid drops in confined shear flows / N. Barai, N. Mandal // *Phys. Fluids.* – 2016. – Vol. 28. – Article 073302, P. 1-18.

68. Magnetic hydrophilic methacrylate-based polymer microspheres designed for polymerase chain reactions applications / A. Španová [et al.] // *J. Chromatogr. B.* – 2004. – Vol. 800. – P. 27-32.
69. Safarik, I. Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides / I. Safarik, M. Safarikova // *Biomagn. Res. Technol.* – 2004. – Vol. 2. – Article 7, P. 1-17.
70. Safarikova, M. The Application of Magnetic Techniques in Biosciences / M. Safarikova, I. Safarik // *Magn. Electr. Sep.* – 2001. – Vol. 10. – P. 223-252.
71. Immunoengineered magnetic-quantum dot nanobead system for the isolation and detection of circulating tumor cells / P. Zhang [et al.] // *J. Nanobiotechnol.* – 2021. – Vol. 19. – Article 116, P. 1-12.
72. PLGA-Based Composites for Various Biomedical Applications / C.V. Rocha [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – Vol. 23. – Article 2034, P. 1-33.
73. Nurumbetov, G. A simple microfluidic device for fabrication of double emulsion droplets and polymer microcapsules / G. Nurumbetov, N. Ballard, S.A.F. Bon // *Polym. Chem.* – 2012. – Vol. 3. – P. 1043–1047.
74. Namiri, M. Methods for Isolation of Bone Marrow Stem Cells: Comparative Analysis / M. Namiri, H. Baharvand, N. Aghdami // *Cell J. (Yakhteh).* – 2011. – Vol. 12, № 4. – P. 439-446.
75. Protein and Polysaccharide-Based Magnetic Composite Materials for Medical Applications / E.J. Bealer [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – Vol. 21, № 1. – Article 186, P. 1-25.
76. Jeddi, M.K. Magnetic nano carboxymethyl cellulose-alginate/chitosan hydrogel beads as biodegradable devices for controlled drug delivery / M.K. Jeddi, M. Mahkam // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2019. – Vol. 135, №15. – P. 829-838.
77. Lemos, Th.S.A. Magnetic microspheres based on pectin coated by chitosan towards smart drug release / Th.S.A. Lemos, J.F. de Souza, A.R. Fajardo // *Carbohydr. Polym.* – 2021. – Vol.265. – Article 118013, P. 1-10.
78. Gelatin-based microspheres crosslinked with glutaraldehyde and rutin oriented to cosmetics / F. Graziola [et al.] // *Braz. J. Pharm. Sci.* – 2016. – Vol. 52, № 4. – P. 603-612.
79. Farhangi, M. Biodegradable Gelatin Microspheres as Controlled Release Intraarticular Delivery System: The Effect of Formulation Variables / M. Farhangi, S. Dadashzadeh, N. Bolourchian // *Indian J. Pharm. Sci.* – 2017. – Vol. 79, № 1. – P. 105-112.
80. Hermanson, G.T. Bioconjugate Techniques / G.T. Hermanson. – 2nd Edition. – Elsevier, 2008. – 1202 p.
81. FTIR spectroscopy characterization of poly (vinyl alcohol) hydrogel with different hydrolysis degree and chemically crosslinked with glutaraldehyde / H.S. Mansur [et al.] // *Mater. Sci. Eng., C.* – 2008. – Vol. 28, № 4. – P. 539-548.

82. Complex of polyvinyl alcohol with boric acid: Structure and use / Yu. Prosanov [et al.] // *Mater. Today Commun.* – 2018. – Vol. 14. – P. 77-81. DOI: 10.1016/j.mtcomm.2017.12.012.

83. 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, № 3. – P. 15-25.

84. Zhang, Y. Fundamentals of affinity cell separations / Y. Zhang, V. Lyons, D. Pappas // *Electrophoresis.* – 2018. – Vol. 39, № 5-6. – P. 732-741.

85. Field-assisted extraction of cells, particles and macromolecules / R. Karumanchi [et al.] // *Trends Biotechnol.* – 2002. – Vol. 20, № 2. – P. 72-78.

86. Selection and characterization of CSFV-specific single-domain antibodies and their application along with immunomagnetic nanobeads and quantum dots / S. Yang [et al.] // *BioMed Res. Int.* – 2020. – Vol. 2020. – Article 3201630, P. 1-11.

87. Recombinant antibodies and their use for food immunoanalysis / R. Peltonmaa [et al.] // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2022. – Vol. 414. – P. 193–217.

88. Pyruvate dehydrogenase complex-enzyme 2, a new target for *Listeria* spp. detection identified using combined phage display technologies / G.M.S.G. Moreira [et al.] // *Sci. Rep.* – 2020. – Vol. 10. – Article 15267, P. 1-16.

89. Strong and oriented conjugation of nanobodies onto magnetosomes for the development of a rapid immunomagnetic assay for the environmental detection of tetrabromobisphenol-A / J. He [et al.] // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2018. – Vol. 410. – P. 6633–6642.

90. Construction of immunomagnetic particles with high stability in stringent conditions by site-directed immobilization of multivalent nanobodies onto bacterial magnetic particles for the environmental detection of tetrabromobisphenol-A / J. He [et al.] // *Anal. Chem.* – 2020. – Vol. 92, № 1. – P. 1114–1121.

91. Immunomagnetic separation is a suitable method for electrophysiology and ion channel pharmacology studies on T cells / G. Tajti [et al.] // *Channels.* – 2021. – Vol. 15, № 1. – P. 53-66.

92. Leong, S.S. Working principle and application of magnetic separation for biomedical diagnostic at high- and low-field gradients / S.S. Leong, S.P. Yeap, J. Lim // *Interface Focus.* – 2016. – Vol.6, № 6. – Article 20160048, P. 1-16.

93. Immunomagnetic microfluidic integrated system for potency-based multiple separation of heterogeneous stem cells with high throughput capabilities / B. Kang [et al.] // *Biosens. Bioelectron.* – 2021. – Vol. 194. – Article 113576, P. 1-11.

94. Magnetic nanoparticles in biology and medicine: past, present, and future trends / D.D. Stueber [et al.] // *Pharmaceutics.* – 2021. – Vol. 13. – Article 943, P. 1-26.

95. Immunomagnetic capture and multiplexed surface marker detection of circulating tumor cells with magnetic multicolor surface-enhanced raman scattering nanotags / R.E. Wilson Jr. [et al.] // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. – 2020. – Vol. 12, № 42. – P. 47220-47232.

96. Enhanced and high-purity enrichment of circulating tumor cells based on immunomagnetic nanospheres / X.-Y. Ma [et al.] // *ACS Appl. Nano Mater.* – 2018. – Vol. 1, № 8. – P. 4019–4027.

97. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin-and caveolae-mediated endocytosis / J. Rejman [et al.] // *Biochem. J.* – 2004. – Vol. 377. – P. 159–169.

98. Grutzkau, A. Small but mighty: how the macs-technology based on nanosized superparamagnetic particles has helped to analyze the immune system within the last 20 years / A. Grutzkau, A. Radbruch // *Cytometry A*. – 2010. – Vol. 77A. – P. 643-647.

99. Investigation of the number of tests required for assaying plasma biomarkers associated with Alzheimer's disease using immunomagnetic reduction / H.-C. Liu [et al.] // *Neurol. Ther.* – 2021. – Vol. 10. – P. 1015–1028.

100. Kashevsky, S.B. Analytical model of batch magnetophoretic separation / S.B. Kashevsky, B.E. Kashevsky // *Phys. Rev.* – 2013. – Vol. E 87. – Article 062308, P. 1-8.

101. Magnetic cell separation [Electronic resource]. – Mode of access: <https://www.miltenyibiotec.com/US-en/resources/macshandbook/macshandbook/cell-separation/magnetic-cell-separation.html>. – Date of access: 11.04.2022.

102. CytoSinct™ Magnetic Cell Separation [Electronic resource]. – Mode of access: <https://www.genscript.com/cell-separation.html>. – Date of access: 11.04.2022.

103. MojoSort™ Streptavidin Nanobeads [Electronic resource]. – Mode of access: <https://www.biolegend.com/en-us/products/mojosort-streptavidin-nanobeads-11877>. – Date of access: 11.04.2022.

104. Magnetic beads [Electronic resource]. – Mode of access: <https://www.magqu.com/node/18>. – Date of access: 11.04.2022.

105. Dynabeads magnetic beads [Electronic resource]. – Mode of access: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/BID/brochures/dynabeads-magnetic-beads-brochure.pdf>. – Date of access: 11.04.2022.

106. ProMag® HP Magnetic Microspheres [Electronic resource]. – Mode of access: <https://www.bangslabs.com/sites/default/files/imce/docs/PDS%20743%20Web.pdf>. – Date of access: 11.04.2022.

107. Magnetic Beads [Electronic resource]. – Mode of access: <https://abraxiss.eurofins-technologies.com/home/products/magnetic-beads/magnetic-beads>. – Date of access: 11.04.2022.

108. Active Magnetic Particles [Electronic resource]. – Mode of access: <https://www.cd-bioparticles.com/product/active-magnetic-particles-list-20.html>. – Date of access: 11.04.2022.

109. Magnetic nanoparticles for environmental and biomedical applications: A review / L. Mohammed [et al.] // *Particuology*. – 2017. – Vol. 30. – P. 1-14.

110. Leslie-Pelecky, D.L. Magnetic Properties of Nanostructured Materials / D.L. Leslie-Pelecky, R.D. Rieke // *Chem. Mater.* – 1996. – Vol. 8. – P. 1770-1783.

111. Scalable, shape-specific, top-down fabrication methods for the synthesis of engineered colloidal particles / T.J. Merkel [et al.] // *Langmuir*. – 2010. – Vol. 26, № 16. – P. 13086–13096.

112. Synthesis of magnetite nanoparticles by top-down approach from a high purity ore / G. Priyadarshana [et al.] // *J. Nanomater.* – 2015. – Vol. 2015. – Article 317312, P. 1-9.

113. Top-down synthesis of multifunctional iron oxide nanoparticles for macrophage labelling and manipulation / V. Amendola [et al.] // *J. Mater. Chem.* – 2011. – Vol. 21. – P. 3803–3813.

114. Lu, A.H. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application / A.H. Lu, E.L. Salabas, F. Schüth // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2007. – Vol. 46. – P. 1222–1244.

115. Синтез магнитных наночастиц оксида железа для применения в иммуноанализе / А.В. Петракова [и др.] // *Научное обозрение. Химические науки*. – 2014. – № 1. – С. 28-29.

116. One-step synthesis of long term stable superparamagnetic colloid of zinc ferrite nanorods in water / A. Kmita [et al.] // *Materials*. – 2019. – Vol. 12. – Article 1048, P. 1-17.

117. Azam, A. Synthesis of zinc ferrite nanoparticles by sol-gel method and their characterisation / A. Azam, M. Chaman, A.H. Naqvi // *Int. J. Nanoparticles*. – 2009. – Vol. 2. – P. 388-393.

118. Influence of synthesis methods on structural and magnetic characteristics of Mg–Zn-ferrite nanopowders / E. Petrova [et al.] // *J. Magn. Magn. Mater.* – 2019. – Vol. 473, № 1. – P. 85-91. DOI: 10.1016/j.jmmm.2018.09.128.

119. Gupta, A.K. Surface-modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: preparation, characterization, and cytotoxicity studies / A.K. Gupta, S. Wells // *IEEE Trans. Nanobioscience*. – 2004. – Vol. 3, № 1. – P. 66-73.

120. Magnetic modified cellulose nanocrystals fabricated using ultrasound-coprecipitation: characterization and application as pickering emulsion stabilizers / X. Hu [et al.] // *LWT*. – 2021. – Vol. 148. – Article 111680, P. 1-9.

121. Monodisperse MFe₂O₄(M)Fe, Co, Mn) nanoparticles / S. Sun [et al.] // *J. Am. Chem. Soc.* – 2004. – Vol. 126. – P. 273-279.

122. Unravelling the thermal decomposition parameters for the synthesis of anisotropic iron oxide nanoparticles / G. Cotin [et al.] // *Nanomaterials*. – 2018. – Vol. 8. – Article 881, P. 1-16.

123. Room temperature blocked magnetic nanoparticles based on ferrite promoted by a three-step thermal decomposition process / K. Sartori [et al.] // *J. Am. Chem. Soc.* – 2019. – Vol. 141, № 25. – P. 9783–9787.

124. A general strategy for nanocrystal synthesis / X. Wang [et al.] // *Nature*. – 2005. – Vol. 437. – P. 121–124.

125. Magnetizable metal oxides: pat. GB717269A / Azfa AG Fuer Photofabrikation. – Publ. date 27.10.1954.

126. Magnetic nanoparticles with high specific absorption rate at low alternating magnetic field / K. Kekalo [et al.] // *Nano Life*. – 2015. – Vol. 5, № 2. – Article 1550002, P. 1-6.

127. Shape tuning of magnetite nanoparticles obtained by hydrothermal synthesis: effect of temperature / N. Torres-Gómez [et al.] // *J. Nanomater.* – 2019. – Vol. 2019. – Article 7921273, P. 1-16.

128. Simple rapid stabilization method through citric acid modification for magnetite nanoparticles / M.A. Dheyab [et al.] // *Sci. Rep.* – 2020. – Vol. 10. – Article 10793, P. 1-8.

129. Structural and magnetic properties of nanoscale iron oxide particles synthesized in the presence of dextran or polyvinyl alcohol / H. Pardoe [et al.] // *J. Magn. Magn. Mater.* – 2001. – Vol. 225, № 1-2. – P. 41-46.

130. Coupling agent effect on magnetic properties of functionalized magnetite-based nanoparticles / T.J. Daou [et al.] // *Chem. Mater.* – 2008. – Vol. 20. – P. 5869–5875.

131. Functionalization-induced improvement in magnetic properties of Fe₃O₄ nanoparticles for biomedical applications / D.K. Nagesha [et al.] // *J. Appl. Phys.* – 2009. – Vol. 105. – Article 07B317, P. 1-4.

132. Magnetotactic bacteria and magnetosomes: basic properties and applications / K.G. Gareev [et al.] // *Magnetochemistry*. – 2021. – Vol. 7. – Article 86, P. 1-22.

133. Bacterial magnetosome and its potential application / L. Yan [et al.] // *Microbiol. Res.* – 2017. – Vol. 203. – P. 19–28.

134. Improved methods for mass production of magnetosomes and applications: a review / A. Basit [et al.] // *Microb. Cell Fact.* – 2020. – Vol. 19. – Article 197, P. 1-11.

135. Engineered magnetosomes fused to functional molecule (protein A) provide a highly effective alternative to commercial immunomagnetic beads / J. Xu [et al.] // *J. Nanobiotechnol.* – 2019. – Vol. 17. – Article 37, P. 1-11.

136. Salmaso, S. Stealth properties to improve therapeutic efficacy of drug nanocarriers / S. Salmaso, P. Caliceti // *J. Drug Deliv.* – 2013. – Vol. 2013. – Article 374252, P. 1-20.

137. A biotechnological perspective on the application of iron oxide magnetic colloids modified with polysaccharides / A.M.G.C. Dias [et al.] // *Biotechnol. Adv.* – 2011. – Vol. 29. – P.142–155.

138. Lee, S. Dextran-gold nanoparticle hybrid material for biomolecule immobilization and detection / S. Lee, V.H. Pérez-Luna // *Anal. Chem.* – 2005. – Vol. 77, № 22. – P. 7204-7211.

139. Self-assembled monolayers with different terminating groups as model substrates for cell adhesion studies / N. Faucheux [et al.] // *Biomaterials.* – 2004. – Vol. 25. – P. 2721–2730.

140. High-permeability functionalized silicone magnetic microspheres with low autofluorescence for biomedical applications / B.A. Evans [et al.] // *Mater. Sci. Eng., C.* – 2016. – Vol. 62. – P. 860–869.

141. Improving the sensitivity of fluorescence-based immunoassays by photobleaching the autofluorescence of magnetic beads / S. Roth [et al.] // *Small.* – 2019. – Vol. 15, № 3. – Article e1803751, P. 1-9.

142. Application of high-performance magnetic nanobeads to biological sensing devices / Y. Kabe [et al.] // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2019. – Vol. 411, № 9. – P. 1825-1837.

143. Preparation and characterization of magnetic fluorescent microspheres for delivery of kaempferol / Zhang [et al.] // *Adv. Perform. Mater.* – 2017. – Vol. 32, № 3. – P. 125-130.

144. Enhanced fluorescent intensity of magnetic-fluorescent bifunctional PLGA microspheres based on Janus electrospaying for bioapplication / K/ Li [et al.] // *Sci. Rep.* – 2018.– Vol.8, Article 17117, P.1-11.

145. Kayman Chemical: Phagocytosis assay kit (IgG FITC) [Electronic resource]. – Mode of access: <https://www.caymanchem.com/pdfs/500290.pdf>. – Date of access: 17.01.2022.

146. Di Costanzo L. Visual pH sensors: from a chemical perspective to new bio-engineered materials / L. Di Costanzo, B. Panunzi // *Molecules.* – 2021. – Vol. 26. – Article 2952, P. 1-22.

147. Smartphone-based portable device for rapid and sensitive pH detection by fluorescent carbon dots / H. Ehtesabi [et al.] // *Sens. Actuators, A.* – 2021. – Vol. 332. – Article 113057, P. 1-10.

148. Development of dextran nanoparticles for stabilizing delicate proteins / F. Wu [et al.] // *Nanoscale Res. Lett.* – 2013. – Vol. 8, № 1. – P. 197-204.

149. Systems pathology by multiplexed immunohistochemistry and whole-slide digital image analysis / S. Blom [et al.] // *Sci. Rep.* – 2017. – Vol. 7. – Article 15580, P. 1-13.

150. RGB-color intensiometric indicators visualize spatiotemporal dynamics of ATP in single cells / S. Arai [et al.] // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* – 2018. – Vol. 57, № 34. – P. 10873–10878.

151. Priye, A. Colorimetric-luminance readout for quantitative analysis of fluorescence signals with a smartphone CMOS sensor / A. Priye, C.S. Ball, R.J. Meagher // *Anal. Chem.* – 2018. – Vol. 90, № 21. – P. 12385–12389.

152. Assessment of a smartphone-based loop-mediated isothermal amplification assay for detection of SARS-CoV-2 and influenza viruses / D.M. Heithoff [et al.] // *JAMA Network Open.* – 2022. – Vol. 5, № 1. – Article e2145669, P. 1-12.

153. Recent trends in smartphone-based detection for biomedical applications: a review / S. Banik [et al.] // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2021. – Vol. 413. – P. 2389–2406.

154. Influence of Co amount on the efficiency of energy absorption of Fe–Co ferrite nanoparticles / K.A. Kekalo [et al.] // *J. Magn. Magn. Mater.* – 2009. – Vol. 321. – P. 1514–1516.

155. Gelatin nanoparticles by two step desolvation – a new preparation method, surface modifications and cell uptake / C.J. Coester [et al.] // *J. Microencapsul.* – 2000. – Vol. 17, № 2. – P. 187-193.

156. ImageJ: Image processing and analysis in Java [Electronic resource]. – Mode of access: <https://imagej.nih.gov/ij>. – Date of access: 31.07.2020.

157. Романовский, Б.В. Основы химической кинетики / Б.В. Романовский. – Москва: Экзамен, 2006. – 415 с.

158. CO₂-responsive TX-100 emulsion for selective synthesis of 1D or 3D gold / J. Zhang [et al.] // *Soft Matter.* – 2010. – Vol. 6. – P. 6200–6205.

159. Hydrogen generation by both acidic and catalytic hydrolysis of sodium borohydride / O.V. Netskina [et al.] // *Catal. Sustain. Energy.* – 2018. – Vol. 5. – P. 41–48.

160. Synthesis and photophysical properties of novel pyrimidine-based two-photon absorption chromophores / B. Liu [et al.] // *Tetrahedron Lett.* – 2007. – Vol. 48, № 34. – P. 5958–5962.

161. Gaussian 03, Revision D 01 / ред. М. J. Frisch. – Gaussian, Inc., Wallingford CT., 2004. – 592 p.

162. Hydrogen peroxide oxidation of aldehydes to carboxylic acids: an organic solvent-, halide- and metal-free procedure / K. Sato [et al.] // *Tetrahedron Lett.* – 2000. – Vol. 41, № 9. – P. 1439-1442.

163. Экспериментальная оценка возможности адгезии и роста мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани на пропиленовом сетчатом имплантате, применяемом для герниопластики / В.Г. Богдан [и др.] // *Медицинский журнал.* – 2009. – № 1. – С. 29-32.

164. Метод комплексной оценки фагоцитарной активности нейтрофилов крови. Инструкция по применению / А.М. Горчаков [и др.]. – Минск, 2003. – 15 с.

165. Cell separation: terminology and practical considerations / M.J. Tomlinson [et al.] // *J. Tissue Eng.* – 2013. – Vol. 4, № 1. – P. 1-14.
166. Effect of surface charge on the colloidal stability and in vitro uptake of carboxymethyl dextran-coated iron oxide nanoparticles / V. Ayala [et al.] // *J. Nanopart. Res.* – 2013. – Vol. 15, № 8. – Article 1874, P. 1-14. DOI: 10.1007/s11051-013-1874-0.
167. Tamai, T. Effect of crosslinking on polymer diffusion in poly(butyl methacrylate-co-butyl acrylate) latex films / T. Tamai, P. Pinenq, M.A. Winnik // *Macromolecules.* – 1999. – Vol. 32. – P. 6102–6110.
168. Polyvinyl alcohol-glutaraldehyde network as a support for protein immobilisation / A.M. Araujo [et al.] // *Biotechnol. Tech.* – 1997. – Vol. 11. – P. 67–70.
169. Gillies E.R. Acetals as pH-sensitive linkages for drug delivery / E.R. Gillies, A.P. Goodwin, J.M.J. Fréchet // *Bioconjug. Chem.* – 2004. – Vol. 15, № 6. – P. 1254-1263.
170. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking / I. Migneault [et al.] // *Biotechniques.* – 2004. – Vol. 37, № 5. – P. 790-796, 798-802.
171. Surface chemistry and polymer film thickness effects on endothelial cell adhesion and proliferation / D. Bhattacharyya [et al.] // *J. Biomed. Mater. Res., A.* – 2010. – Vol. 94, № 2. – P. 640-648.
172. Тарасевич, Б.Н. ИК спектры основных классов органических соединений. Справочные материалы. / Б.Н. Тарасевич. – Москва: МГУ, 2012. – 55 с.
173. Physically cross-linked gels of pva with natural polymers as matrices for manuka honey release in wound-care applications / A.M.N. Santos [et al.] // *Materials.* – 2019. – Vol. 12. – Article 559, P. 1-22.
174. Preparation and properties of glutaraldehyde crosslinked poly(vinylalcohol) membrane with gradient structure / Z. Zhang [et al.] // *J. Polym. Res.* – 2020. – Vol. 27. – Article 228, P. 1-7.
175. Synthesis, characterization and evaluation of the antibiofouling potential of some metal and metal oxide nanoparticles / L. Blanco-Covián [et al.] // *Appl. Sci.* – 2020. – Vol. 10. – Article 5864, P. 1-16.
176. Crosslinked PVA/SSA proton exchange membranes: correlation between physiochemical properties and free volume determined by positron annihilation spectroscopy / M.M. Gomaa [et al.] // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2018. – Vol. 20. – P. 28287-28299.
177. LysoSensor™ Yellow/Blue DND-160 [Electronic resource]. – Mode of access: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/L7545> – Date of access: 14.04.2022.

Список публикаций соискателя

1-А. Iron-cobalt ferrite nanoparticles – biocompatibility and distribution after intravenous administration to rat / K. Laznev, D. Tzerkovsky, K. Kekalo, G. Zhavnerko, V. Agabekov // IEEE Trans. Magn. – 2013. – Vol. 49, № 1. – P. 425-428.

2-А. Лазнев, К.В. Связывание гелевых магнитных микросфер с моноклеарными клетками крови / К.В. Лазнев, В.Е. Агабеков // Доклады НАН Беларуси. – 2016. – Т.60, № 2. – С. 67-72.

3-А. Поливинилспиртовые магнитные микросферы, содержащие 2-аминопиримидин-бис-этен-бис-диалкилфениламины в качестве флуоресцентных индикаторов рН / К.В. Лазнев, Ж.В. Игнатович, И.Н. Кухто, В.Е. Агабеков // Доклады НАН Беларуси. – 2018. – Т.62, №5. – С. 563-568.

4-А. Лазнев, К.В. Получение и свойства магнитных микросфер на основе гидрофильных полимеров / К.В. Лазнев, Е.Е. Шумская, В.Е. Агабеков // Известия Национальной академии наук Беларуси, Серия химических наук. – 2020. – Т. 56, № 2. – С. 135-142.

5-А. Лазнев, К.В. Функционализированные дрожжевым лизатом микросферы из сшитого глутаральдегидом поливинилового спирта / К.В. Лазнев, Ж.В. Игнатович, В.Е. Агабеков // Доклады НАН Беларуси. – 2020. – Т.64, №3. – С. 287-292.

6-А. Лазнев, К.В. Микросферы из сшитого глутаральдегидом поливинилового спирта для иммуномагнитной сепарации клеток / К. В. Лазнев, В. Е. Агабеков // Известия Национальной академии наук Беларуси, Серия химических наук. – 2020. – Т. 56, № 4. – С. 391-398.

7-А. Ермоленко, Е.М. Гидрогелевые магнитные микросферы: применение для иммуномагнитной сепарации клеток. / Е.М. Ермоленко, Ж.А. Ибрагимова, Е.В. Ходосовская, С.Е. Семерихина, Т.С. Колесникова, К.В. Лазнев, Г.К. Жавнерко, Б.Э. Кашевский, В.Е. Агабеков // БГМУ: 90 лет в авангарде медицинской науки и практики: сборник научных трудов, выпуск 2 / БГМУ, под общей редакцией А.В. Сикорского, О.К. Кулага. – Минск, 2012. – С. 89-93.

8-А. 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 междунар. научн. конф., Минск, 1–4 декабря 2016 г.: В 2-х частях. – Минск, 2017. – Часть 2. – С. 388-393.

9-А. Iron-Cobalt Ferrite Nanoparticles – Biocompatibility And Distribution after Intravenous Administration to Rat / K. Laznev, D. Tzerkovsky, K. Kekalo, G. Zhavnerko, V. Agabekov // 9th International Conference on the Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers: Talk and Poster Abstracts, Minneapolis, USA, May 22-26, 2012. – Minneapolis, 2012. – P. 150.

10-А. Кутузов, М.Д. Влияние параметров эмульгирования на размер и полидисперсность капель эмульсии раствора высокомолекулярного хитозана / М.Д. Кутузов, К.В. Лазнев, М.Ю. Рощина // Молодежь в науке – 2016: материалы междунар. научн. конф., Минск, 1–4 декабря 2016 г. – Минск, 2016. – С. 303.

11-А. Лазнев, К.В. Поливинилспиртовые микросферы, содержащие магнетит и рН-чувствительные флуорохромы / К.В. Лазнев, Ж.В. Игнатович, В.Е. Агабеков // V научная конференция армянского химического общества: материалы междунар. научн. конф., Ереван, 3-7 октября 2017 г. – Ереван, 2017. – С. 76.

12-А. Способ получения биополимерных микросфер: пат. ВУ 21009 / К.В. Лазнев, Г.К. Жавнерко, А.А. Квасюк, В.Е. Агабеков. – Оpubл. 30.04.2017.

ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ИНСТИТУТ ХИМИИ НОВЫХ МАТЕРИАЛОВ НАН БЕЛАРУСИ»

УТВЕРЖДАЮ

 Директор Института
 химии новых материалов
 НАН Беларуси
 академик
 В.А. Агабеков
 «30» января 2019 г.

ЛАБОРАТОРНЫЙ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ РЕГЛАМЕНТ
 на получение опытной партии поливинилспиртовых магнитных
 микросфер, модифицированных дрожжевым лизатом

(ГПНИ «Конвергенция-2020», задание 3.05 подзадание 4)

СОГЛАСОВАНО

Гл. инженер ИХИМ НАНБ


 В.Ф. Похоменко
 «30» января 2019 г.

Инженер по ТБ ИХИМ НАНБ


 Н.А. Кубракова
 «30» января 2019 г.

РАЗРАБОТАНО

н.с. лаб. органических композицион-
 ных материалов


 К.В. Лазнев
 «30» января 2019 г.

зав. лаб. органических композицион-
 ных материалов, к.х.н.


 Ж.В. Игнатович
 «30» января 2019 г.

Срок действия регламента до 31 декабря 2022 г.

Минск 2019

1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОЦЕССА

Настоящий регламент составлен на опытную партию микросфер из сшитого глутаральдегидом поливинилового спирта (ПВС), модифицированных дрожжевым лизатом, содержащих наночастицы магнетита, опционно содержащих флуоресцентные красители.

Микросферы получают эмульгированием раствора поливинилового спирта (ПВС) в неполярном растворителе с добавками ПАВ с последующей обработкой глутаральдегидом, приводящей к перекрёстной сшивке молекул ПВС (рис. 1) и преобразованию микрокапель эмульсии в гелевые микросферы.

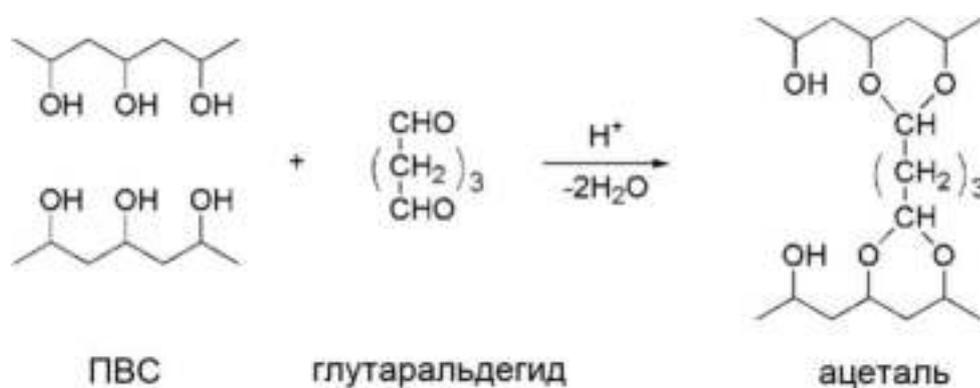


Рисунок 1 – сшивка ПВС глутаральдегидом

Для придания микросферам антигенных свойств, необходимых для оценки фагоцитоза, в раствор ПВС добавляется лизат клеточных стенок дрожжей *Sacc. cerevisiae* в муравьиной кислоте.

Для придания микросферам магнитной восприимчивости, необходимой для магнитной сепарации, в раствор ПВС добавляются наночастицы магнетита.

В состав микросфер могут быть введены флуоресцентные красители для их визуализации методом люминесцентной микроскопии и подсчёта методом проточной флуориметрии.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗГОТОВЛЯЕМОЙ ПРОДУКЦИИ

Внешний вид: отстоявшаяся суспензия – коричневый осадок в бесцветной прозрачной жидкости; после взбалтывания – коричневая непрозрачная суспензия.

Технические требования:

- Средний размер 2-4 мкм.
- Индекс полидисперсности $\leq 0,1$
- Время осаждения на магните в микропробирке < 1 минуты
- Время гравитационного осаждения в микропробирке > 2 минут
- При пипетировании осадок должен диспергироваться до индивидуальных микросфер, наличие агрегатов не допускается.

Область применения: микросферы могут быть использованы в составе наборов для оценки фагоцитоза, а также для магнитной сепарации фагоцитов.

Упаковка: сосуды с завинчивающимися крышками.

Маркировка: на каждый сосуд должна быть наклеена этикетка, содержащая следующую информацию:

- наименование организации-изготовителя
- наименование продукции
- объём осадка микросфер
- дата изготовления
- срок годности и условия хранения

Условия хранения: в тёмном месте. При наличии в среде 0,2% азида натрия продукт устойчив не менее 2 лет при температуре 2-8 °С. При -20 °С срок хранения не ограничен.

Транспортирование: всеми видами транспорта в соответствии с правилами перевозки грузов, действующими на данном виде транспорта.

3 ХАРАКТЕРИСТИКА СЫРЬЯ И МАТЕРИАЛОВ

- Поливиниловый спирт ГОСТ 10779-97, марка 11-2
- Железо (II) сернокислое 7-водное ХЧ ГОСТ 6981-94
- Железо (III) хлористое 6-водное ХЧ ГОСТ 4147-74
- Кальций хлористый ГОСТ 450-77
- Натрий хлористый ХЧ ГОСТ 4233-77
- Натрий фосфорнокислый однозамещённый 2-водный ХЧ ГОСТ 245-76
- Натрий фосфорнокислый 12-водный ХЧ ГОСТ 9337-79
- Натрия азид ЧДА ГОСТ 84-1420-77
- Аммиак водный 25% ОСЧ ГОСТ 24147-80
- Муравьиная кислота Ч ГОСТ 5848-73
- Глутаровый альдегид водный 50% или 25% ОСЧ ТУ 6-09-37-1125-91
- Натрия боргидрид 95% ТУ 1-92-162-90 марка А
- Tween 85 Fluka кат. № 93783 или аналогичный
- Span 85 Merck кат. № 8.40124 или аналогичный
- Изооктан эталонный ГОСТ 12433-83
- Спирт этиловый 96% ГОСТ 18300-87
- Пробирки полипропиленовые ТУ ВУ 691148740.002-2010
- Наконечники полипропиленовые ТУ ВУ 691148740.005-2010

4 ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА

4.1 ПОЛУЧЕНИЕ ДРОЖЖЕВОГО ЛИЗАТА

4.1.1 В круглодонную микропробирку 2 мл поместить 50 мг сухих пекарских дрожжей (*S. cerevisiae*), добавить 1 мл дистиллированной воды, перемешать, поместить пробирку на водяную баню комнатной температуры, обрабатывать содержимое пестиковым генератором ультразвука (УЗ) 100 Вт, при закипании давать остыть. Общая продолжительность обработки 2 минуты. При обработке происходит разрушение клеток дрожжей и выход содержимого в среду, что в дальнейшем позволяет отделить материал клеточных стенок от внутриклеточного содержимого путём отмывок.

4.1.2 Осадить на центрифуге, удалить супернатант, дважды отмыть (ресуспендировать, осадить на центрифуге, удалить супернатант) муравьиной кислотой. Ресуспендировать в 1 мл муравьиной кислоты, обрабатывать на охлаждающей водяной бане УЗ 100 Вт при температуре, близкой к температуре кипения. При закипании – прекращать обработку, давать остыть. Обработку продолжать до получения прозрачной, слегка опалесцирующей жидкости (происходит частичный гидролиз и растворение материала клеточных стенок).

4.2 ПОЛУЧЕНИЕ МАГНЕТИТА

4.2.1 Приготовить р-р FeSO_4 0,36М подкисленный: к 500 мг $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ добавить дист. воды до 5 мл, подкислить H_2SO_4 (4 капли). Хранить в холодильнике.

4.2.2 Приготовить р-р FeCl_3 0,37М: к 900 мг $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ добавить дист. воды до 9 мл.

4.2.3 Смешать 180 мкл р-ра FeSO_4 (п.4.2.1) и 320 мкл р-ра FeCl_3 (п.4.2.2) . Использовать свежим.

4.2.4 Налить в 2-мл эппендорф 200 мкл 25% р-ра NH_3 . Нагреть р-р NH_3 (в закрытом эппендорфе) и 0,5 мл р-ра солей железа (п.4.2.3) при 60 °С в течение 30 с, поместить эппендорф с р-ром NH_3 на вортекс, быстро добавить пипеткой 0,5 мл солей железа, перемешивать 15 секунд. Инкубировать при 60 °С 15 минут. Осадить магнитом, удалить супернатант, трижды отмыть дистиллированной водой, ресуспендировать в 0,5 мл дистиллированной воды. Объём получаемого осадка ≈ 80 мкл.

4.3 ПОЛУЧЕНИЕ МАГНИТНОЙ ЖИДКОСТИ

4.3.1 Растворить 500 мг ПВС ГОСТ 10779-97, марка 11-2 в 5 мл дист. воды при 90 °С. Хранить в холодильнике.

4.3.2 Добавить в эппендорф 20 мкл дист. воды, отметить поверхность рисккой. Добавить количество суспензии магнетита (п.4.2.4), содержащее 20 мкл осадка (оценка после осаждения на магните). Удалить супернатант.

4.3.3 К 20 мкл магнетита добавить 100 мкл дрожжевого лизата (п.4.1.2), 650 мкл дист. воды, 250 мкл р-ра ПВС 10% (п.4.3.1). При необходимости добавить раствор(ы) гидрофильных флуорохромов (до 10% объёма смеси). Тщательно перемешать ультразвуком (УЗ) 100 Вт (довести до кипения). Должна получиться вязкая оптически плотная коричневая магнитная жидкость (МЖ) без видимых взвешенных частиц.

4.4 ПОЛУЧЕНИЕ МАГНИТНЫХ МИКРОСФЕР

4.4.1 Приготовить р-р CaCl_2 2М: 1,1 г на 5 мл дист. воды. Хранить в плотно закрытой таре.

4.4.2 Приготовить 5 М р-р NaCl : 2,9 г NaCl на 10 мл дист. воды. Приготовить р-р Na_3PO_4 1М: 7600 мг $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ на 20 мл дист. воды. Хранить в холодильнике. Перед применением нагреть и перемешивать до растворения кристаллов. Приготовить р-р NaH_2PO_4 1М: 3120 мг $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ на 20 мл дист. воды. Хранить в холодильнике. Перед применением нагреть и перемешивать до растворения кристаллов. Приготовить фосфатный буфер 1 М рН 9: добавлять 1 М р-р Na_3PO_4 в 1 М р-р NaH_2PO_4 до рН 9. Хранить в холодильнике. Перед применением нагреть и перемешивать до растворения кристаллов. Приготовить фосфатно-солевой буфер (ФСБ) рН9: смешать 1 мл NaCl 5 М, 2 мл фосфатного буфера 1 М рН 9, 7 мл дист. воды. Хранить в холодильнике.

4.4.3 Растворить 905 мг Tween 85 в 5 г изооктана.

4.4.4 Растворить 1020 мг Span 85 в 4,5 г изооктана.

4.4.5 В 10-мл полипропиленовой пробирке смешать 360 мкл р-ра Tween85 (п.4.4.3), 540 мкл р-ра Span85 (п.4.4.3), 2700 мкл изооктана. При необходимости добавить гидрофобные флуо-

рохромы. Добавить 1000 мкл МЖ (п.4.3.3), пипетировать мех. пипеткой (12 Гц) на водяной бане 65 °С 5 минут.

4.4.6 Смешать 225 мкл CaCl_2 2М (п.4.4.1) и 225 мкл глутаральдегида (ГА) 50%. Использовать свежим.

4.4.7 В 50-мл полипропиленовой пробирке смешать 1080 мкл р-ра Tween85 (п.4.4.3), 1620 мкл р-ра Span85 (п.4.4.4), 8100 мкл изооктана, добавить 550 мкл р-ра $\text{CaCl}_2/\text{ГА}$ (п. 4.4.6), обработать УЗ 100 Вт до прозрачной эмульсии (≈ 1 мин), охладить и обработать повторно.

4.4.8 Добавить эмульсию МЖ (п.4.4.5) в эмульсию $\text{CaCl}_2/\text{ГА}$ (п.4.4.7), пипетировать (5 Гц) на водяной бане 65 °С 50 минут. При образовании агрегатов – удалить их.

4.4.9 Осадить полученные микросферы магнитом (в несколько порций), отмыть 3 мл этанола, дважды отмыть 2 мл дист. воды, добавить 1800 мкл дист. воды и 200 мкл дрожжевого лизата (п.4.1.2), обработать УЗ 50 Вт 30 с, пипетировать (2 Гц) на водяной бане 65 °С 50 минут.

4.4.10 Дважды отмыть 2 мл дист. воды, ресуспендировать в 2 мл ФСБ pH 9 (п.4.4.2), перенести в пробирку с 20 мг NaNH_4 , перемешать, инкубировать на водяной бане при 60 °С 20 минут, пипетируя каждые 5 минут. Обработать УЗ 50 Вт 30 с, дважды отмыть забуференном фосфатами физиологическом (0,15М NaCl) растворе (ЗФР), ресуспендировать в ЗФР с добавкой NaN_3 0,2%. В результате получают ≈ 50 мкл микросфер (объем влажного осадка).

5 ЭНЕРГООБЕСПЕЧЕНИЕ ПРОЦЕССА

Энергообеспечение необходимо для: водяной бани (500 Вт), генератора ультразвука (100 Вт), механического привода пипетки (50 Вт), вортекса (20 Вт).

6 НОРМЫ РАСХОДА ОСНОВНЫХ ВИДОВ СЫРЬЯ, МАТЕРИАЛОВ И ЭНЕРГОРЕСУРСОВ

Таблица 1

	Наименование сырья	Нормы расхода /50 мкл осадка
1	Поливиниловый спирт	25 мг
2	Железо (II) сернокислое 7-водное ХЧ	5 мг
3	Железо (III) хлористое 6-водное	8 мг
4	Кальций хлористый	50 мг
5	Натрий хлористый	60 мг
6	Натрий фосфорнокислый однозамещённый 2-водный	60 мг
7	Натрий фосфорнокислый 12-водный	100 мг
8	Натрия азид	20 мг
9	Аммиак водный 25%	50 мкл
10	Муравьиная кислота	5 мл
11	Глутаровый альдегид водный 50%	225 мкл
12	Натрия боргидрид	20 мг
13	Tween 85	190 мг
14	Span 85	320 мг
15	Изооктан эталонный	15 мл
16	Спирт этиловый	3 мл
17	Дрожжи пекарские сухие	15 мг

**7 НОРМЫ ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО РЕЖИМА, КОНТРОЛЬ И УПРАВЛЕНИЕ
ТЕХНОЛОГИЧЕСКИМ ПРОЦЕССОМ**

Таблица 2

	Наименование операции	Объём реакционной смеси, мкл	Давление	Температура, °С	Другие показатели, время
	1	2	3	4	5
1	Разрушение клеток дрожжей (п.4.1.1)	1000	атм.	≈100 (контроль по кипению)	УЗ 100 Вт, 2 минуты
2	Получение дрожжевого лизата (п.4.1.2)	1000	атм.	≈100 (контроль по кипению)	УЗ 100 Вт, 5-15 минут (прекращение по достижении прозрачности)
3	Получение магнетита (п.4.2.4)	700	атм.	60	вортекс, 15 с
4	Созревание магнетита (п.4.2.4)	700	атм.	60	15 минут
5	Получение магнитной жидкости (п.4.3.3)	1000	атм.	нагрев от комн. до 100	УЗ 100 Вт, ≈30 с (прекращение по закипании)
6	Эмульгирование магнитной жидкости (п.4.4.5)	4600	атм.	65	пипетирование 12 Гц, 5 минут
7	Эмульгирование раствора глутаральдегида (п.4.4.7)	14350	атм.	нагрев от комн. до ≈99	УЗ 100 Вт, ≈1 минута (прекращение по достижении прозрачности)
8	Сшивка магнитной эмульсии (п.4.4.8)	18950	атм.	65	пипетирование 5 Гц, 50 минут

	1	2	3	4	5
9	Диспергирование микросфер в дрожжевом лизате (п.4.4.9)	2000	атм.	<100	УЗ 50 Вт, 30 с
10	Обработка дрожжевым лизатом (п.4.4.9)	2000	атм.	65	пипетирование 2 Гц, 50 минут
11	Восстановление боргидридом (п.4.4.10)	2000	атм.	60	пипетирование каждые 5 минут, всего 20 минут
12	Диспергирование после восстановления боргидридом (п.4.4.10)	2000	атм.	<100	УЗ 50 Вт, 30 с

8 МАТЕРИАЛЬНЫЙ БАЛАНС

Таблица 3

	Наименование сырья/продукта	Взято		Получено	
		мг	%	мг	%
1	Поливиниловый спирт	25			
2	Железо (II) сернокислое 7-водное ХЧ	5			
3	Железо (III) хлористое 6-водное	8			
4	Кальций хлористый	50			
5	Натрий хлористый	60			
6	Натрий фосфорнокислый одно-замещённый 2-водный	60			
7	Натрий фосфорнокислый 12-водный	100			
8	Натрия азид	20			
9	Аммиак водный 25%	45			
10	Муравьиная кислота	6 000			
11	Глутаровый альдегид водный 50%	255			
12	Натрия боргидрид	20			
13	Tween 85	190			
14	Span 85	320			
15	Изооктан эталонный	10 400			
16	Спирт этиловый	2 400			
17	Дрожжи пекарские сухие	15			
18	Дист. вода	150 000			
19	Микросферы			50	
20	Среда для микросфер			1050	
21	Жидкие отходы (органические)			11 165	
22	Жидкие отходы (водные)			57 693	
23	Водяной пар			100 000	
	ИТОГО	169 958	100	169 958	100

9 ОХРАНА ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Отходы органических растворителей сливаются в отдельную ёмкость, хранятся и утилизируются по нормам, действующим в учреждении.

Отходы водных растворов сливаются в канализацию.

Твёрдые отходы (одноразовая посуда) вывозятся на свалку.

Испарения разбавляются воздухом в вытяжном шкафу и выбрасываются в атмосферу.

10 ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ, ПРОТИВОПОЖАРНЫЕ МЕРОПРИЯТИЯ И ОХРАНА ТРУДА

Производство микросфер следует осуществлять в соответствии с правилами ГОСТ 12.1.005-88, СанПиН от 13.07.2010 № 93 и СанПиН от 31.12.2008 № 240.

При производстве микросфер в атмосферу могут выделяться летучие вещества, представленные в таблице 4.

Таблица 4

Вещество	ПДК, мг/м ³	Класс опасности
Муравьиная кислота	1	2
Глутаровый альдегид	5	3
Аммиак	20	4
Изооктан	300	4

Производственные помещения должны быть оборудованы приточно-вытяжной вентиляцией по ГОСТ 12.4.021-75, обеспечивающей состояние воздушной среды по ГОСТ 12.1.005-88 и СанПиН от 31.12.2008 № 240, освещением – по ТКП 45-2.04-153-2009, водопроводной системой и канализацией – по СНиП 2.04.01-85.

Электробезопасность персонала должна быть обеспечена согласно ГОСТ 12.1.030-81 и СанПиН от 21.06.2010 № 69.

Противопожарное состояние производственных помещений должно соответствовать ГОСТ 12.1.004-91, помещения должны быть оснащены противопожарными средствами по ГОСТ 12.4.009-83, работы должны проводиться с соблюдением ППБ РБ 1.01-94.

В случае попадания реакционных смесей или суспензии микросфер в глаза, на слизистые или кожу – смыть большим количеством воды.

11 РЕКОМЕНДАЦИИ ПО АВТОМАТИЗАЦИИ И МЕХАНИЗАЦИИ ВЕДЕНИЯ ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО РЕЖИМА ПРОИЗВОДСТВА

В работе используется водяной термостат.

Дозирование жидких реактивов производится полуавтоматическими дозаторами, выставляемыми на требуемые объёмы.

Механический привод пипетки должен иметь отметки, соответствующие режимам 12 Гц и 5 Гц.

Программа и методика клинического испытания магнитных микросфер ТУ ВУ 100289145.020

Приложение 4

УТВЕРЖДАЮ



Директор Центра детской
онкологии, гематологии
и иммунологии
Алейникова О.В.
2015 г.

АКТ № 1

проведения приемочных клинических испытаний Микросфер магнитных
«MCC-4.12-avidin» ТУ ВУ 100289145.020 (проект) производства ИХИМ НАН Беларуси

Серия 141022, 141023 номер 141022/2, 141023/3, 141023/4

составлен Центр детской онкологии, гематологии и иммунологии
(наименование организации, проводящей испытания)

1. В период с 08.11.2014 по 19.01.2015 комиссией в составе:
председателя комиссии Белуцкий А.И., Алейникова О.В.

членов комиссии: Мисевич Н.В., Ермаков Т.И.,
Григорьев М.В., Мисевич Н.В.

на основании: направление РУП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении»
№ 7.121792 от «22» августа 2014 г. и приказа № 1-16/90 от «4» ноября 2014 г.

по Центр детской онкологии, гематологии и иммунологии
(наименование организации, проводившей испытания)

проведены приемочные клинические испытания Микросфер магнитных «MCC-4.12-
avidin» ТУ ВУ 100289145.020 (проект) производства ИХИМ НАН Беларуси.

2. Для проведения испытаний были предоставлены образцы № 141022/2, 141023/3, 141023/4
выпуска 2014 г. и документация в составе: ТУ ВУ 100289145.020 (проект), инструкция по
применению, программа приемочных клинических испытаний.

3. Комиссия рассмотрела протоколы приемочных медицинских испытаний и установила: ис-
пытываемое изделие соответствует требованиям программы медицинских испытаний.

4. Заключение комиссии Представленное изделие соответствует требованиям ТУ, позволя-
ет проводить иммуномагнитную сепарацию с показателями, достаточными для применения в
ряде приложений практической медицины, его серийный выпуск целесообразен.

5. Рекомендации комиссии: 1) Дополнить инструкцию по применению: указать, что жизнеспособность выделенных клеток может снижаться при избыточной плотности иммобилизации антигенов на микросферах.

Приложения: протоколы испытаний; программа испытаний.

Председатель комиссии

[Подпись]
(личная подпись)

Алейникова О.В.
(расшифровка подписи)

Члены комиссии:

[Подписи]

Мисевич Н.В.,
Ермаков Т.И.,
Григорьев М.В.

13.01.2015 2015 г.



АКТ № 1

проведения приемочных клинических испытаний Микрофер магнитных «MCC-4.12-avidin» ТУ ВУ 100289145.020 (проект) производства ИХНМ НАН Беларуси

серия 141022 номер 141022/3, составлен УЗ, 9-я корпусная климатическая база
 (наименование организации, проводящей испытание)
 141023

1. В период с 12.11.2014 г. по 11.12.2014 г. комиссией в составе:

председателя комиссии и.о. зав. лабораторией «Исследования биологических объектов»
 (должность, фамилия, инициалы) С.А. Коурова

членов комиссии: старшего научного сотрудника Сидоровской В.О.;
 (должность, фамилия, инициалы)

научного сотрудника Петровской С.Т.;
лаборанта в О/О Шустовской А.В.

на основании направления РЦНИЗ № 7.219/01 «2» от 28.08.2004 г. и приказа № 543
 от «12» 11 2004 г. по УЗ, 9-я корпусная климатическая база
 (наименование организации, проводящей испытание)

проведены приемочные клинические испытания Микрофер магнитных «MCC-4.12-avidin» ТУ ВУ 100289145.020 (проект) производства ИХНМ НАН Беларуси.

2. Для проведения испытаний были предоставлены образцы № 141022/3 выпуска 2014 г.
 и документация в составе: ТУ ВУ 100289145.020 (проект), инструкции по применению,
 программа приемочных клинических испытаний.

3. Комиссия рассмотрела протоколы приемочных медицинских испытаний и установила: испытываемое изделие соответствует требованиям программы медицинских испытаний.
 (соответствует или не соответствует)

4. Заключение комиссии Представленное изделие соответствует
требованиям ТУ, позволяет проводить клинические испытания с
различными вариантами клеток крови с высокой экспрессией
 (дается оценка результатов испытания изделия, значения изделия для орнатической медицины и рекомендации
 о целесообразности применения изделия в медицинской практике и серийного выпуска)

5. Рекомендации комиссии: Применение изделия возможно в научно-
практических и клинико-диагностических целях Серийной
комиссии изделий «Микрофер магнитных»
 (указываются замечания или предложения по улучшению изделия; в случае несоответствия изделия необходимым требованиям комиссия предлагает пути устранения выявленных недостатков)

Приложения: протоколы испытаний; программа испытаний.

Председатель комиссии

[Подпись]
 (личная подпись)

С.А. Коурова
 (расшифровка подписи)

Члены комиссии:

[Подпись]
[Подпись]

В.В. Сидоровская
С.Т. Петровская
А.В. Шустовская

«6» января 2015 г.

АКТ № 1

проведения приемочных клинических испытаний Микросфер магнитных

«MCC-4.12-avidin» ТУ ВУ 100289145.020 (проект) производства ИХНМ НАН Беларуси

Серия 141022, 141023 номер 141022/1, 141023/1, 141023/2 составлен ГУО БелМАПО
(наименование организации, проводившей испытания)1. В период с 03.11.2014г. по 18.12.2014г. комиссией в составе:
председателя комиссии Иванчик Г.И.членов комиссии: Юркевич М.Ю.
Куленич С.С.на основании направления РЦЭИЗ № 7.121 793 от 22 августа 2014 г. и приказа № 118-АХ от 06 октября 2014 г. по ГУО БелМАПО

(наименование организации, проводившей испытания)

проведены приемочные клинические испытания Микросфер магнитных «MCC-4.12-avidin» ТУ ВУ 100289145.020 (проект) производства ИХНМ НАН Беларуси.

2. Для проведения испытаний были предоставлены образцы № 141022/1, 141023/1, 141023/2 выпуска 2014 г. и документация в составе: ТУ ВУ 100289145.020 (проект), инструкция по применению, программа приемочных клинических испытаний.3. Комиссия рассмотрела протоколы приемочных медицинских испытаний и установила: испытываемое изделие соответствует требованиям программы медицинских испытаний.4. Заключение комиссии Представленное изделие соответствует требованиям ТУ, позволяет проводить иммуномагнитную сепарацию с показателями, достаточными для применения в ряде приложений практической медицины, его серийный выпуск целесообразен.5. Рекомендации комиссии: 1) Дополнить инструкцию по применению: указать, что жизнеспособность выделенных клеток и процент выхода клеток с низкой экспрессией антигена зависят от плотности иммобилизации антигенов на микросферах; 2) рассмотреть возможность закрепления в ТУ для показателей «специфичность» и «удаление целевой популяции из 1-го супернатанта значений $\geq 90\%$, достигнутых в ходе испытания.

Приложения: протоколы испытаний; программа испытаний.

Председатель комиссии

Иванчик Г.И.

Члены комиссии:

Юркевич М.Ю.
Куленич С.С.Иванчик Г.И. 2014 г.


МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
РЕГИСТРАЦИОННОЕ УДОСТОВЕРЕНИЕ

№ ИМ-7.102381

Настоящее удостоверение выдано
ГНУ Институт химии новых материалов Национальной академии наук Беларуси
УНП:100289145, БЕЛАРУСЬ

и является подтверждением того, что Министерством здравоохранения Республики Беларусь зарегистрированы
Микросферы магнитные МСС-4.12-avidin, ТУ ВУ 100289145.020-2015

Тип: **изделия медицинского назначения**

Изготовитель: **ГНУ Институт химии новых материалов Национальной академии наук Беларуси УНП:100289145, БЕЛАРУСЬ**

и разрешены к производству, реализации и медицинскому применению на территории Республики Беларусь
В соответствии с инструкцией по использованию с обязательным лабораторным контролем на стерильность каждой последующей партии

Регистрационный номер: **Мн-7.117158-1305**

Регистрационное удостоверение не является обязательством к закупке данных изделий медицинского назначения.

Дата государственной регистрации: **16.02.2015 г.** Действительно до: **16.02.2020 г.**

Заместитель Министра  **И.Г. Лосицкий**
Луговская СВ

№ 0018082

СПРАВКА

о реализации опытных партий
магнитных микросфер

- 1) 2016 год были реализованы Микросферы магнитные "МСС-4.12-avidin" ТУ100189145.020-2015 на сумму 590,40 (пятьсот девяносто белорусских рублей 40 копеек), в том числе:
- ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси» 1 (одна) упаковка на сумму 98,40 (девяносто восемь белорусских рублей 40 копеек)
 - ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси» 1 (одна) упаковка на сумму 98,40 (девяносто восемь белорусских рублей 40 копеек)
 - УО «Белорусский государственный медицинский университет» 2 (два) комплекта на сумму 393,60 (триста девяносто три белорусских рубля 60 копеек)
- 2) 2019 год были реализованы Микросферы магнитные "МГМ-18" ТУ100189145.025-2018 на сумму 1 566,90 (одна тысяча пятьсот шестьдесят шесть белорусских рублей 90 копеек), в том числе:
- ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии» 2 (две) упаковки по 2мл. на сумму 1 566,90 (одна тысяча пятьсот шестьдесят шесть белорусских рублей 90 копеек).
- 3) 2020 год были реализованы Микросферы магнитные "МГМ-18" ТУ100189145.025-2018 на сумму 800,00 (восемьсот белорусских рублей 00 копеек), в том числе:
- ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии» 1 (одна) упаковка по 2мл. на сумму 800,00 (восемьсот белорусских рублей 00 копеек).

Итого общий объем реализации составил 2 957,30 (две тысячи девятьсот пятьдесят семь белорусских рублей 30 копеек)

Директор Института

Главный бухгалтер



Рогачев А.А.

Бабко П.А.

Навукова - вытворчае
унітарнае прадпрыемства
"ДЫСПЛЕЙ"

Беларусь, 220005, г. Мінск, вул. Гікало, 5

18.07.2022 №89

На № _____ от _____



Научно - производственное
унитарное предприятие
"ДИСПЛЕЙ"

Беларусь, 220005, г. Минск, ул. Гикало, 5
Телефоны: +375(17) 331-5980, 232-8859
Факс: +375(17) 331-5980
E-mail: lcd@display.by
URL: http://www.display.by



Директору
ГНУ «Институт химии новых
Материалов НАН Беларуси»
д.т.н., члкор. Рогачеву А.А.

В результате испытаний образцов поливинилспиртовых микросфер, ТУ ВУ 100289145.020-2015 (далее микросфер), переданных ИХНМ НАН Беларуси, установлено следующее:

Микросферы могут быть использованы в качестве спейсеров, обеспечивающий необходимую толщину слоя жидкого кристалла в ЖК-устройствах.

Метод воздушного распыления обеспечивает достаточную равномерность распределения микросфер по поверхности подложки без возникновения оптических дефектов и не оказывает влияния на ориентацию слоя жидкого кристалла в ячейке.

Микросферы обеспечивают зазор ячейки 4,5 - 5 мкм, необходимый для твист-нематических ЖК устройств, рассчитанных на оптическую ЖК-моду в первом минимуме Могена, что позволяет снизить рабочую толщину слоя жидкого кристалла с 7-10 микрон до 4 – 6 микрон. В свою очередь это приводит к экономии дорогостоящего ЖК-материала, улучшению быстродействия и оптических характеристик по сравнению с устройствами, рассчитанными на ЖК-моду второго минимума Могена, изготавливаемыми в настоящее время.

Температурная устойчивость микросфер обеспечивает возможность склейки ЖК-устройств в технологических режимах предприятия (160 – 180° С, давление 0,8 – 1,2 kgf/cm²).

Микросферы производства ИХНМ применимы как альтернатива спейсерам Licristar 50 производства Merck (Германия).

Для практического применения необходимо отработать технологический процесс производства микросфер различных калиброванных диаметров в диапазоне 5-7 мкм в количествах, обеспечивающих возможность применения в серийном производстве.

Директор

Г. В. Козак

Исполнено _____ В Дело № _____
Исходный №, Дата
Сохранено: Документ 4

Входящий № _____