

Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева

На правах рукописи

Моргачёва Анастасия Александровна

**Гидрогели на основе модифицированного
поливинилового спирта и модифицированного 2-
гидроксиэтилкрахмала**

02.00.06 –Высокомолекулярные соединения

Диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук

Научный руководитель
доктор химических наук,
Артюхов А.А.

Москва – 2018

1 Введение	4
2 Литературный обзор	6
2.1. Гидрогели – основные понятия	6
2.1.1 Физические гидрогели	7
2.1.2 Химические гидрогели	9
2.2 Вода в гидрогелях	12
2.3 Структура пористых полимерных материалов	14
2.4 Принципы криотропного гелеобразования	17
2.5 Полимерные гидрогели на основе поливинилового спирта	20
2.5.1. Физическая сшивка в растворах поливинилового спирта.	21
2.5.3 Радиационная сшивка в растворах поливинилового спирта	24
2.5.4 Применение полимерных гидрогелей на основе поливинилового спирта.	24
2.6 Полимерные гидрогели на основе крахмала и его производных	26
3 Обсуждение результатов	31
3.1 Исследование процесса получения модифицированного поливинилового спирта (м-ПВС)	32
3.1.1 Изучение закономерностей протекания процесса модификации ПВС	32
3.1.2 Математическая модель процесса модификации ПВС.	42
3.1.2.1 Дисперсионный анализ	43
3.1.2.2 Регрессионный анализ.	44
3.1.3 Физико-механическая характеристика образцов модифицированного ПВС	48
3.2 Исследование процесса получения модифицированного гидроксиэтилированного крахмала (м-ГЭК)	53
3.2.1 Изучение закономерностей протекания процесса модификации ГЭК	53
3.2.2 Математическая модель процесса модификации ПВС	66
3.2.2.1 Дисперсионный анализ	66
3.2.2.2 Регрессионный анализ	67
3.2.3 Физико-механическая характеристика образцов модифицированного ГЭК	72
3.3.2 Изучение процессов гелеобразования, протекающих в криоусловиях	85
3.3.2.1 Изучение закономерностей процессов гелеобразования, протекающих в криоусловиях.	85
3.3.2.2 Изучение пористости полимерных гидрогелей, полученных в криоусловиях	92
3.3.2.3 Изучение равновесной набухаемости гидрогелей, полученных в криоусловиях	101
3.3.2.4 Ферментативный гидролиз полимерных гидрогелей, полученных в криоусловиях	106
3.4 Изучение биосовместимости полимерных гидрогелей на основе м-ПВС и м-ГЭК	108
3.4.1 Изучение токсичности полимерных гидрогелей	108

3.4.2 Изучение влияния состава образцов макропористых гидрогелей на скорость их биодеструкции	117
4 Экспериментальная часть	119
4.1 Характеристика исходных веществ	119
4.2 Исследование процесса гелеобразования в растворах м-ПВС и м-ГЭК	119
4.2.1 Модификация исходных полимеров	119
4.2.2 Анализ строения модифицированных полимеров	120
4.2.3 Синтез полимерных гидрогелей на основе м-ПВС и м-ГЭК	121
4.2.3.1 Синтез полимерных гидрогелей при положительных температурах.	121
4.2.3.2 Синтез полимерных гидрогелей в воднозамороженных системах	121
4.2.4 Исследование морфологии поверхности полимерных гидрогелей.	122
4.3 Изучение биосовместимости полимерных гидрогелей	123
4.3.1 Изучение цитотоксичности экспериментальных образцов гидрогелевых материалов	123
4.3.2 Определение гемотоксического действия экспериментальных образцов гидрогелевых материалов	125
4.3.3 Определение раздражающего действия образцов гидрогелевых материалов	126
4.3.4 Исследование сенсibiliзирующего действия	128
4.3.5 Исследование острого общетоксического действия	130
4.3.6 Исследование подострого и хронического общетоксического действия	130
5 Выводы	132
6 Список литературы	133

1 Введение

Актуальность работы. Развитие новых технологий в медицине предполагает разработку полимерных материалов, отличающихся высокой биосовместимостью и биodeградируемостью. Перспективным типом таких материалов являются полимерные гидрогели на основе широкого спектра как природных, так и синтетических полимеров. Уникальные физико-химические характеристикам гидрогелей и их высокая биосовместимость делают такие полимерные системы незаменимыми в ряде отраслей, связанных с медициной.

Хорошо зарекомендовали себя гидрогелевые материалы на основе ненасыщенных производных поливинилового спирта, разработанные ранее в Учебно-научном центре «Биоматериалы» Российского химико-технологического университета. Однако достаточно низкая скорость биodeградации данных материалов ограничивает область их применения.

В силу этого в данной работе были получены полимерные гидрогели на основе ненасыщенных производных поливинилового спирта и 2 - гидроксипропилированного крахмала, характеризующиеся, в том числе контролируемой скоростью биodeградации.

Цель и задачи исследования. Целью исследования являлось получение анизотропных гидрогелевых материалов, сформированных на базе системы - модифицированного поливинилового спирта и модифицированного 2-гидроксипропилированного крахмала, обладающих регулируемой скоростью биodeградации. Задачами исследования являлись:

- разработка метода синтеза гидрогелевых материалов на основе модифицированного поливинилового спирта и модифицированного 2-гидроксипропилированного крахмала;
- изучение влияния технологических факторов на процесс модификации полимеров и определение оптимальных параметров синтеза;
- изучение процесса гелеобразования модифицированных полимеров и композиций на их основе. Определение доминирующих технологических факторов, обеспечивающих получение систем с требуемыми свойствами;

- исследование пористости, набухаемости и морфологии получаемых гидрогелей;
- санитарно-химические и токсикологические исследования экспериментальных образцов разрабатываемых гидрогелевых материалов.

Научная новизна. В работе впервые были синтезированы образцы гидрогелей, сформированных на основе ненасыщенных производных поливинилового спирта и 2-гидроксиэтилкрахмала.

Выявлено влияние технологических факторов на процесс модификации полимеров глицидилметакрилатом, формирование гидрогелей и их физико-химические свойства.

Определена взаимосвязь между составом полученных полимерных гидрогелей, их структурой, скоростью биodeградации, характером взаимодействия с клеточными культурами и внутренними средами организма.

Практическая значимость работы. Были синтезированы новые гидрогелевые системы, сформированные на основе модифицированного поливинилового спирта и модифицированного 2-гидроксиэтилкрахмала, обладающие высокой термической стабильностью и биосовместимостью. Разработаны методы модификации исходных полимеров.

Полученные полимерные системы характеризуются низким уровнем токсичности, что расширяет спектр их использования в качестве основы для изделий медицинского назначения, контактирующих с кровью и внутренними средами организма.

2 Литературный обзор

Последнее время особое внимание уделяется биоматериалам с определенными контролируемыми характеристиками [1-6]. Полимерные изделия, используемые в медицине, должны обладать рядом специфических свойств, позволяющих использовать их в длительном контакте с живыми тканями.

Значительные успехи были достигнуты в разработке, синтезе и использовании гидрогелей, что обусловлено рядом их уникальных качеств. Способность абсорбировать большое количество жидкости и изменять свойства в зависимости от состава окружающей среды и внешних условий определили их дальнейшее использование в тканевой инженерии, для доставки лекарств, в бионанотехнологии и ряде иных отраслей науки [7].

2.1. Гидрогели – основные понятия

Первые гидрогели биомедицинского назначения были получены в 1955 году на основе 2-гидроксиэтилметакрилата Лим и Вихтерле [8,9]. Позднее Яаннас с коллегами модифицировали такие гидрогели природными веществами (коллаген и акулий хрящ) с целью создания повязок для оптимального лечения ожогов [10].

Гидрогели представляют собой трехмерные полимерные сетки, образованные с помощью, электростатической или ковалентной сшивки из гидрофильных мономеров.

Гидрогели могут быть классифицированы следующим образом:

- аморфные, полукристаллические, водородно-связанные;
- ионные (заряженные) или нейтральные;
- физически или химически сшитые;
- синтетические и натуральные [11,12]

В результате наличия упругой сети, вода эффективно заполняет внутрипоровое пространство полимерных гидрогелей. Соответственно,

гидрогель легко изменяет свои размеры и форму в ответ на воздействие окружающей среды, и это является одной из его основных характеристик. [13]

Количество воды в полимерной матрице может составлять от 20 до 99 масс. % [14]. Гидрогели, содержащие более 95% воды, называют суперабсорбентами.

Для использования полимерных гидрогелевых материалов в медицине, должны быть выполнены необходимые условия:

- материал не должен индуцировать иммунный ответ (исключать сильное воспаление и оказывать незначительное влияние на окружающей ткани и клетки);
- гидрогель должен оставаться биоактивным;
- материал не должен образовывать токсичных продуктов распада в физиологических условиях (температуре 37 ° C и pH = 7,4);
- в процессе регенерации ткани, продукты деградации должны быть легко выведены из организма;

2.1.1 Физические гидрогели

К физическим «обратимым» гидрогелям, относят системы, в которых молекулы полимера в сетке удерживаются за счет межмолекулярного взаимодействия или вторичных сил (ионной, водородной связи или гидрофобных сил). Они не являются однородными, так как кластеры, образуемые межмолекулярными или гидрофобными / ионно-связанными областями, создают неоднородности в структуре. Все эти взаимодействия, благодаря которым образуются физические гидрогели, являются обратимыми. Разрушение структуры может произойти при изменении условий: ионная сила, pH, температура, направленная сила, добавление растворенных веществ.

Наиболее часто встречающиеся методы получения физических гидрогелей представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Методы получения физических гидрогелей

	Примеры и описание метода получения
Ионное взаимодействие	<p>Гидрогели, называемые «ионотропными», могут образовываться при присоединении полиэлектролита с поливалентными ионами противоположного заряда. Наиболее частым примером, используемым в литературе, являются сшивка альгината, состоящего из остатков глюкуроновой кислоты и маннуриновой кислоты, сшивающихся с помощью ионов кальция. [15-19]. Так же к ним можно отнести гидрогели на основе хитозана [20- 22], декстрана [23], сшитые за счет взаимодействия с ионами калия.</p> <p>В дополнение можно сказать, что наличие ионных групп в полимере не обязательно для формирования гидрогеля. К примеру, декстран, в котором отсутствуют ионные группы, образует гидрогель в присутствии ионов калия. К сожалению, данный гель не является стабильным в воде и поэтому не может быть использован в процесс доставки лекарственных средств.</p>
Кристаллизация	<p>Сшивка за счет кристаллизации гомополимерной системы. Водный раствор поливинилового спирта при хранении в комнатных условиях образуют гель с низкой механической прочностью. Если подвергнуть данные растворы повторному процессу замораживания - оттаивания, то возможно получение высокоэластичных гелей [24,25]. Образование сшитой структуры обусловлено образованием кристаллитов, которые выступают в качестве сшивающих объектов. Данные системы стабильны в течение полугода.</p> <p>Сшивка за счет образования стереокомплекса. Полимеры L-молочной кислоты и D-молочной кислоты являются частично кристаллическими материалами. Формирование стереокомплексов идет характерно для высокомолекулярных полимеров – с температурой плавления примерно 230°C [26]. В литературе, указывается, что в физиологических условиях такие гидрогели полностью деградируют [27,28]. Время деградации варьируется от 1 до 7 дней.</p>

окончание таблицы 1

С помощью амфифильных частей и привитых сополимеров	<p>Амфифильные части, и привитые сополимеры могут самообразовывать в воде структуры [29]. Мицеллы образуются при низких концентрациях в воде, а при более высоких концентрациях образуются термообратимые гели. Физически сшитые гидрогели в основном получают из мультиблочных сополимеров или привитых сополимеров [30,31].</p> <p>В другом случае, они могут быть получены за счет водорастворимых полимерных боковых связей. Примером могут являться полисахариды, к которым прикреплены гидрофобные фрагменты [32-34].</p>
Водородные связи	<p>Примером такого гидрогеля является карбоксиметилцеллюлоза, формирующие водородные связи в процессе диспергирования в 0,1 М HCl. Условием получения гидрогелей является снижения pH водного раствора полимера. Механизм включает в себя замену натрия на водород в кислотном растворе для стимулирования создания водородных связей (рис 2). Данные процессы приводят к образованию эластичного гидрогеля. [35-37]</p>
Белковые взаимодействия	<p>Главное преимущество данного метода состоит в том, что физические и химические свойства материала можно контролировать с помощью поддержания строгой упорядоченности аминокислот в синтетических последовательности ДНК [38,39]. К примеру, гидрогель проластин, на основе последовательных блоков «шелка» и «эластина», в котором нерастворимые сегменты шелка упорядочены линейно водородными связями в нити или пластины [40,41]. Так же гидрогели могут быть получены путем взаимодействия «антиген - антитело» в взаимопроникающих полимерных сетках [42,43].</p>

2.1.2 Химические гидрогели

В том случае, когда химические связи между полимерами имеют ковалентную природу, гидрогели принято называть «стабильными» химическими. Данный вид взаимодействия гораздо сильнее, чем нековалентные, и обеспечивает значительную механическую устойчивость материала [44].

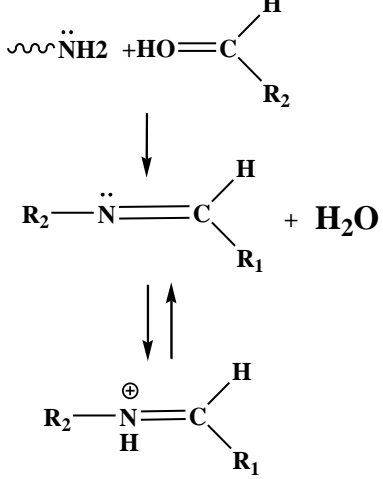
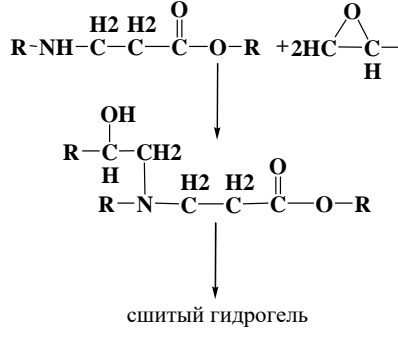
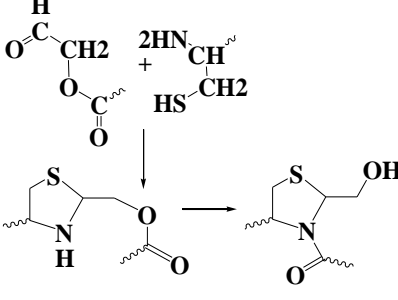
Химические гидрогели могут быть получены путем сшивки водорастворимых полимеров или путем конверсии гидрофобных полимеров в гидрофильные полимеры с участием сшивающего агента. Они достигают равновесного набухания в водных растворах, которое в основном зависит от плотности сшивки (M_c). Химические гидрогели не гомогенны, так как, они содержат области низкого набухания воды и высокой плотности сшивки (кластеры), которые распределены внутри областей с высокой степенью набухания и низкой плотностью сшивки. В некоторых случаях, в зависимости от состава растворителя, температуры и концентрации твердых веществ во время гелеобразования могут образовываться макропоры, «пустоты» [45].

Химически сшитые гидрогели синтезируют с помощью реакций: 1) радикальной полимеризации, 2) полиприсоединения и поликонденсации, 3) радиационной полимеризации [46].

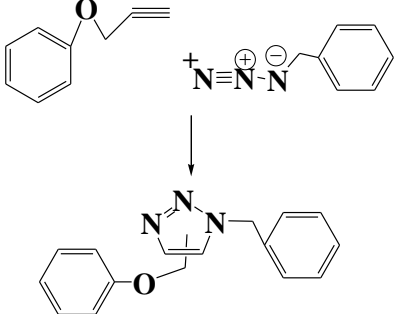
В свободно-радикальной полимеризации химическая сшивка образуется за счет полимеризацией мономеров с низкой молекулярной массой или разветвленной структурой, в присутствии сшивающего агента. Растворитель, используемый для этих реакций, как правило, вода, но также возможно использование метанола, этанола, бензилового спирта. Условием использования последних является их замена водой после формирования сетчатой структуры. [47]

Инъекционные гидрогели так же могут быть получены с помощью реакций между функциональными группами, водорастворимых мономеров. Типичные реакции представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Реакции сшивки между функциональными группами

Химическая реакция	Типичные функциональные группы	Механизм	Преимущества и ограничение
Образование основания Шиффа	Аминная Ангидридная		<p>1) Легкое включение и сшивка аминокислотных пептидов и протеинов.</p> <p>2) Альдегиды могут вызвать побочные реакции в организме. Такие гидрогели, как правило, нестабильны при низком pH [(48-55)59-66]</p>
Реакция присоединения Михаэля	Акриловая Аминная	<p>1 Стадия</p> $2\text{HC}=\overset{\text{O}}{\underset{\text{H}}{\text{C}}}-\text{C}-\text{O}-\text{R} + \text{R}-\text{NH}_2$ <p>2 Стадия</p>  <p>сшитый гидрогель</p>	<p>1) Простота в контроле свойств веществ, мягкие условия протекания реакции.</p> <p>2) Не вступившие в реакцию тиоловые группы могут влиять на жизнедеятельность клеток. [(56-61)67-72]</p>
Пептидная сшивка	N-терминальный цистеин Альдегидная		<p>1) Высокая специфичность субстрата, эффективная сшивка.</p> <p>2) Сложные процедуры синтеза пептидов из-за защиты и снятия защиты [(62)73]</p>

окончание таблицы 2

«клик» химия	Азидная Алкиновая		1)Эффективность. 2)Использование меди в качестве катализатора. [(63-67)74-78]
--------------	----------------------	--	---

2.2 Вода в гидрогелях

Вода является основным компонентом гидрогелей (более 90% от их веса в набухшем состоянии). При применении гидрогелей в контакте с тканями организма и клеточными культурами, она не только обеспечивает влажную среду, но также контролирует проникновение питательных веществ в клетки. Как правило, вода внутри гидрогелевых матриц могут быть классифицирована, как показано на рисунке 1 [68,69]:

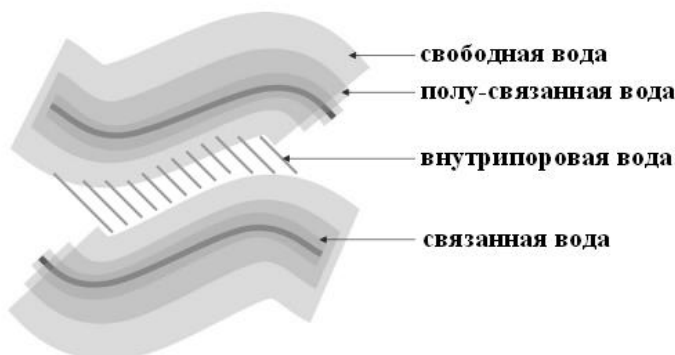


Рисунок 1 - Различные типы воды в гидрогелях

- вода в наружном слое, называется свободной водой, и может быть легко удалена в мягких условиях
- внутрипоровая вода, которая не присоединена к сети гидрогелей, но физически в ловушке между полимерными цепями.
- связанная вода, которая связана с полимерной цепью за счет гидрофильных групп или с помощью водородных связей, может быть разделена только при очень высоких температурах

- полусвязанная вода, с промежуточными свойствами между связанной и свободной водой [70].

Свободная и внутриводная вода может быть удалена из гидрогелей центрифугированием и механическим сжатием. Все типы воды в гидрогели могут быть определены с помощью ДСК.

Высушенные гидрогели набухают в воде, при этом заметно увеличиваясь в размерах, по сравнению с исходным образцом. Количество поглощенной воды, как правило, выражается в EWS равновесная набухаемость (1):

$$EWS = \frac{W_w}{W_t} \times 100\% \quad (1)$$

, где W_w это вес воды в геле и W_t - общий вес набухшего геля. [71,72]

Данное свойство является наиболее характерным для гидрогелей и придает им уникальные свойства и потенциальные возможности для дальнейшего применения в биомедицинской области.

Набухаемость гидрогелей довольно сложный процесс, состоящий из 3 этапов:

1) На первом этапе молекулы воды встраиваются в матрицу гидрогеля, и происходит гидратирование гидрофильных групп, как наиболее полярных. Идет возникновение первично связанной воды.

2) На втором этапе идет взаимодействие гидрофобные группы с водой и, соответственно, образование вторично связанной воды. В итоге после второго этапа образуется общая связанная вода.

3) На третьем этапе, поглощается дополнительное количество воды, называемой свободной водой. Вода всасывается до равновесного набухания уровня. Ограничением движущей осмотической силе является ковалентные или физические поперечные связи. Свободная вода заполняет пространство между цепями и макропорами (пустотами).

Общее количество поглощенной воды зависит от температуры, от конкретного взаимодействия между молекулами воды и полимерных цепей.

Это может быть описано теорией Флори-Хаггинса. Свободная энергия смешения (ΔG_m) полимерных цепей и молекул воды выражается формулой (2).

$$\Delta G_m = kT[n_w \ln \varphi_w + \ln(1 - \varphi_w) + \chi n_w (1 - \varphi_w)] \quad (2)$$

, где: χ - взаимодействие молекул воды и полимера, n_w — это количество молекул, и φ_w - объем воды [73].

Есть ряд методов для оценки относительного количества свободной и связанной воды, как доли от общего содержания воды. Основными являются использование малых молекулярных зондов, DSC, и ЯМР. [74,75]

2.3 Структура пористых полимерных материалов

Как известно [76], свойство материала зависит от его надмолекулярной структуры. Под этим термином понимают «способ упаковки макромолекул в пространстве выделяемых элементов, размеры и форму таких элементов, и их взаимное расположение в пространстве».

Пористые гидрогели представляют собой дисперсную систему, состоящую из ячеек-пор, взаимосвязь которых осуществляется через фазу полимерного каркаса.

Размеры пустот, образованных в сети, колеблются от 10 нм до 10 микрометров. По данной характеристике поры можно разделить на две группы: микропоры (от 0,001 до 0,1 мкм) и макропор (более чем 0,1 мкм). Пористые материалы могут быть с: закрытопористой структурой (изолированные внутри матрицы), открытопористой структурой (системой сквозных пор связывает наружную поверхность материала [77]), системой несквозных пор (имеет контакт с открытой внутренней или внешней поверхности через одно отверстие). Представлены на Рисунке 2.



Рисунок 2 - Схематическое изображение различных тип пор

Для описания пористой структуры используется ряд характеристик:

Распределение пор по размерам.

Функция, характеризующая число пор разного размера и их изменение от содержания. Даная величина описывается радиусом корреляции ξ (3). Этот структурный параметр определен как линейное расстояние между двумя соседними узлами сшивки (рисунок 3).

$$\xi = v_{2,s}^{-\frac{1}{3}} (\bar{r}_0^2)^{\frac{1}{2}} \quad (3)$$

, где $(\bar{r}_0^2)^{\frac{1}{2}}$ среднеквадратичное расстояние между концами двух соседних узлов цепи в набухшем состоянии.

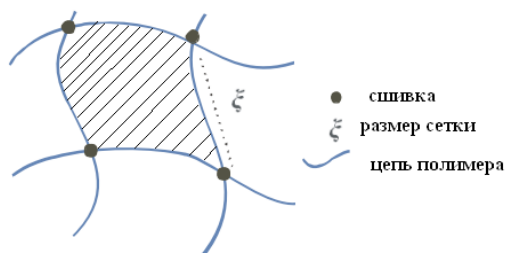


Рисунок 3- Размер пор в набухшем состоянии.

Этот параметр зависит от степени сшивки, химической структуры мономера и внешние факторы (температура, рН и ионная сила раствора) .

Пористость.

Определяет общее число пустот, определяется соотношением (4) [78,79]:

$$G = \frac{V_g}{V_g + V_B} = \frac{V_{tg}}{V_0} \quad (4)$$

, где V_g - объем всех пустот, V_0 – объем образца, V_B – объем полимера

Степень пористости также будет иметь существенное влияние на механические свойства, жесткость уменьшается по мере увеличения пористости. [80]

При морфологических исследованиях, пористость определяется из соотношения площади занятой эквивалентными ячейками к анализируемой площади образца.

Координационное число.

Характеризует число пор, которые находятся вблизи данной поры. Обычно это число изменяется от 4-х до 12-ти.

На сегодняшний день существует несколько основных методов [81,82] для создания пористых полимерных гидрогелей:

- Формирование пористой структуры окупанием в раствор, с дальнейшим промыванием частиц. Принцип метода заключается в заполнении пресс-формы порообразующего материала и растворенного полимера. После выпаривания растворителя и растворение порообразователя. Недостатки данного способа является природы растворителя, в котором растворяют полимер. Обычно применяют токсичные органические растворители. Загрязнения трудно устраняются. Альтернативные порогена материалы: сахар, [83], парафин [84] и желатин, [85].
- Полимерные пористые материалы могут быть получены путем лиофильной сушки. На стадии замерзания, полимерный раствор замораживают до определенной температуры, при которой все материалы в твердом состоянии. На втором этапе, растворитель удаляют путем приложения давления ниже, чем давление равновесного пара замороженного растворителя. Когда растворитель полностью сублимируется, образуется пористая структура [86,87]. Гидрогель,

формируемый с помощью этого метода, чрезвычайно чувствительны к кинетике процесса термической закалки.

- Газоформирование (вспенивание). В процессе вспенивания газа идет формирование биоразлагаемых полимеров под давлением. Процесс идет при высоких давлениях газа с пенообразователями, такими, как CO_2 [88], азот [89], или фтороформ [90]. Это приводит к образованию и росту газовых пузырьков в полимере. Основным недостатком является то, что процесс может дать структуру с несвязанными порами и внешней непористой поверхностью [91].
- Электроформование. Данный метод основан на впрыскивание растворенного полимера в воздух особым инъекционным устройством. Напротив инжектора, электрически заряженные пластины собирает разряженной материала так, что нетканый материал будет формироваться из очень тонких волокон. Часто используется для формирования полимерных волокон на производстве. [92]

2.4 Принципы криотропного гелеобразования

Криотропное гелеобразование было изучено в качестве «зеленого» процессе синтеза трехмерных (3D) гидрофильных структуры с системой сквозных пор [93]. «Криогели» – это сверхмакропористые гидрогели, образующиеся при минусовой температуре путем полимеризации мономеров или криогелеобразованием олигомеров без использования токсичных органических растворителей и с контролируемыми текстурными, структурными и впитывающими характеристиками [94, 95]. Такие материалы обеспечивают: необходимую площадь поверхности, достаточную для крепления и пролиферации клеток; улучшенную передачу кислорода, питательных веществ и удаления продуктов метаболизма [96]. Новые кровеносные сосуды могут распространяться в них, в процессе ангиогенеза, значительно быстрее, чем в непористых гидрогелях [97]. Преимуществом криотехнологии является то, что данный метод позволяет избежать

необходимости удаления порообразователя. Для устранения проблем связанных с цитотоксичностью, в качестве порообразователя используются замороженные кристаллы воды.

Таблица 3 Параметры, влияющие на физические свойства гидрогелей

Параметры	Описание
Степень и тип сшивки	Основные пути образования - химическая или физическая сшивка. Химически сшитые гидрогели, обычно обладают большим размером пор. В то же время в физически сшитых криогелях отсутствуют непрореагировавшие сшивающие агенты, которые могут повлиять на жизнеспособность клеток.
Состав раствора	Низкомолекулярные полимеры ведут к образованию больших пор, по сравнению с растворами высокомолекулярных полимеров. В случае изменения концентрации полимера в растворе, более высокие ее значения приводят к уменьшению среднего размера пор.
Температура гелеобразования	При более низких температурах, растворитель кристаллизуется быстрее, в результате чего увеличивается рост числа более мелких кристаллов растворителя.
Скорость замораживания	Высокая (низкая) скорость замораживания воды приводит к образованию мелких (менее упорядоченных) или более крупных (более упорядоченных) кристаллов льда. При низкой скорости замораживания, образуются большие кристаллы льда, которые могут разрушить стенки пор, клеточных мембран и т.д.
Криоконцентрация	Происходит «выталкивание» растворенного вещества в жидкую фазу, с постепенным уменьшением температура замерзания [98]. Она увеличивает скорость желирования, что делает более эффективным криотропное гелеобразование при оптимальных условиях [99].

Как правило, раствор для гелеобразования охлаждают до температуры между минус 5 и минус 25°C [100]. Свойства образующихся полимерных матриц (Таблица 3) зависят от исходной концентрации мономеров, их физико-химических свойств [101] и условий замораживания [102].

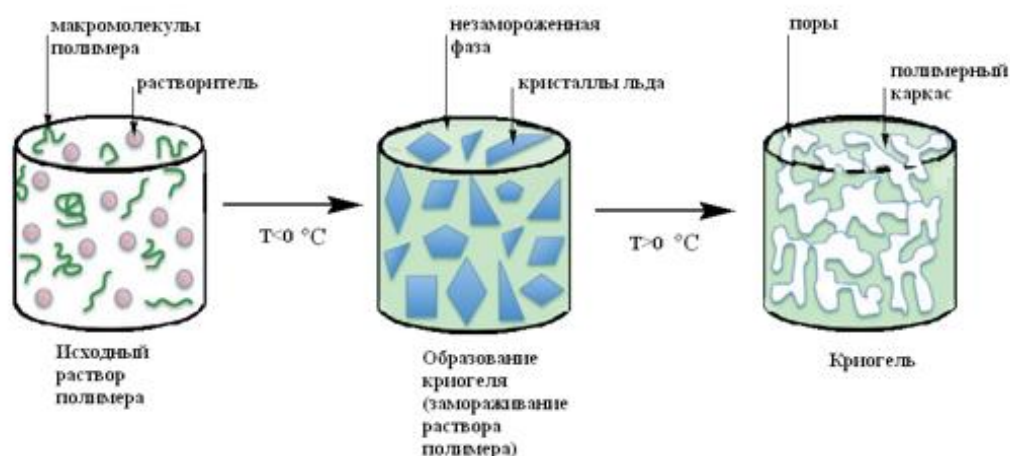


Рисунок 4 Этапы процесса образования криогелей

Основными этапами криотропного гелеобразования являются (Рисунок 4):

Замораживание.

Во время этого процесса, олигомеры (мономеры) растворяют в растворителе, с последующим добавлением сшивающих агентов. Затем смесь инкубируют при минусовых температурах, до температуры ниже температуры кристаллизации растворителя. [103]

Кристаллизация

В данных условиях большая часть растворителя кристаллизуется, оставшаяся же часть раствора концентрируется в жидком виде. Концентрация мономеров называется криоконцентрация. Следует учитывать так же присутствие дополнительных веществ в растворе. Когда водный раствор замораживают, кристаллы льда растут и растворенные молекулы удаляются из них. Поскольку примеси имеют очень низкую растворимость в кристаллах льда, полученный градиент концентрации растворенного вещества увеличивается по мере приближения к краю льда. Это увеличение концентрации снижает температуру плавления раствора, в результате чего формируется зона структурного переохлаждения и это может нарушить плоскую границу раздела фаз.

Рост кристаллов.

Происходит рост кристаллов растворителя до тех пор, пока передний край не соприкасается с другой кристаллической стенкой. Они вытесняют мономеры в межкристальное пространство, где концентрированный раствор остается незамерзшим даже при минус 30°C. Полимеризация или сшивка мономеров приводит к образованию макропористой стенки [104]. Рост ледяных кристалликов может вызвать значительное давление на образованные стенки пор. Таким образом, эти стенки, как правило, сравнительно тонкие. Если количество воды значительно выше, чем мономера, то криогель может быть макропористым или супермакропористым (пористость до ~ 99%)[105].

Формирование криогеля

Удаление порообразователя осуществляется путем нагревания гидрогеля до температуры выше точки замерзания растворителя. При растворении кристаллов растворителя, происходит гидратация сетки и постепенно формируется система связанных сквозных пор. При полном растворении, то есть при полном протекании процесса гидратации, поры в криогеля округляются, несмотря на острые края кристаллов растворителя, за счет поверхностного натяжения на границе фаз (жидкость / стенка поры).

В литературе приводится большое количество вариантов использования данных материалов [106-110]. В частности, криогели на основе натриевой соли карагинана и желатина были использованы для интеграции костной ткани [111-118].

2.5 Полимерные гидрогели на основе поливинилового спирта

Поливиниловый спирт – водорастворимый, синтетический, частично кристаллический полимер, содержащий функциональные гидроксильные группы [119,120]. Кристаллическая фаза полимера состоит из ламелярных структур, размером 10-20 нм, которые связаны друг с другом посредством неупорядоченных полимерных цепей, которые образуют аморфную полимерную фазу. Степень кристалличности является важной структурной характеристикой, которая определяет свойства полимера [121,122]. ПВС растворим в полярных и гидрофильных растворителях, таких как вода,

диметилсульфоксид (ДМСО), этиленгликоль (ЭГ), и N-метилпирролидон (NMP) [123-125].

Важной особенностью поливинилового спирта является способность к образованию в его растворах криогелей – гетерофазных макропористых полимерных гелей кристаллизационного типа, образующихся в результате криотропного гелеобразования. Гидрогели, полученные на основе ПВС, соответствуют одной из наиболее широко изученных систем в биотехнологии. Физико-химические свойства в большей степени зависят от способов сшивки.

2.5.1. Физическая сшивка в растворах поливинилового спирта.

Научный и прикладной интерес представляют физические (обратимые) криогели поливинилового спирта, приготовленные как на основе индивидуальных растворов этого полимера, так и из систем, содержащих различные растворимые низкомолекулярные добавки (мочевина, гуанидин гидрохлорид [126] и т. д.). Они, в большинстве случаев, формируются при коагуляции с последующей коалесценцией, при снижении температуры или увеличении концентрации растворов полимеров. В последнее время разными исследователями были изучены физические гидрогели, полученные методом «замораживания – оттаивания» [127,128]. Когда раствор ПВС, на начальном этапе, подвергается замораживанию, чистый растворитель кристаллизуется, в то время как растворенный полимер пребывает в жидком виде [129]. С увеличением количества циклов данного метода, количество и стабильность кристаллических блоков увеличиваются. Формирование структуры сшивки идет на основе: кристаллизация, формирования водородных связей, разделения фаз жидкость-жидкость, формирования ковалентных связей [130].

Привлекательным данный метод является по причине того, что сравнительно стабильные гидрогели могут быть легко получены без использования реагентов необходимых для химического сшивания (сшивающих агентов, органических растворителей, катализаторов и др.). [131,132]. В результате образуются стабильные гидрогели, за счет сильного

«полимер – полимер» взаимодействия. Впервые, работы по данной теме, были опубликованы Пепесом [133] в 1975 г. В этой работе, водные растворы ПВС (концентрацией 2,5 -15 мас%) были заморожены при минус 20 °С и разморожены при комнатной температуре, в результате чего были сформированы кристаллические структуры. Они были охарактеризованы с помощью измерения мутности образцов. Stasko с соавторами [134] для получения гидрогелей с помощью данного метода, использовал ПВС, молекулярной массы 130 000 гр / моль. Водные растворы поливинилового спирта с высокой молекулярной массой (145 000 гр / моль и более) характеризуются высокой вязкостью, а с меньшей – от 25 000 до 88 000 гр/моль, не образуют стабильных гелей. Содержание поливинилового спирта находилось в пределах от 15 до 20 масс%. Растворы с меньшей концентрацией - образовывали неравномерносшитый гидрогели, в то время как вязкость более концентрированных растворов являлась слишком высокой [135].

2.5.2. Химическая сшивка в растворах поливинилового спирта

Химические гидрогели поливинилового спирта получают посредством использования сшивающих агентов: глутаральдегида, формальдегида, ацетальдегида (в присутствии серной кислоты, уксусной кислоты, или метанола). Образование гидрогелей в растворе можно рассматривать как золь-гель переход, где золь фаза, содержащая разбавленные реагенты (т.е., полимер и молекулы сшивающего агента), преобразуется в гелевую фазу [136].

В литературе приведены многочисленные данные об используемых сшивающих агентах. К примеру, в работах [137,138] для получения гидрогелей в качестве сшивающего агента был использован глутаральдегид (Рисунок 5).

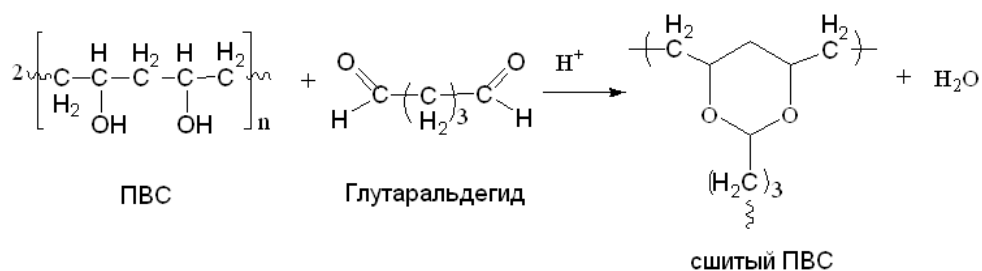


Рисунок 5- Получение гидрогеля на основе ПВС с использованием глутаральдегида

В работе Руиза [139] были получены гидрогели поливинилового спирта, сшитого этилендиаминтетрауксусным диангидридом (EDTAD) (Рисунок 6).

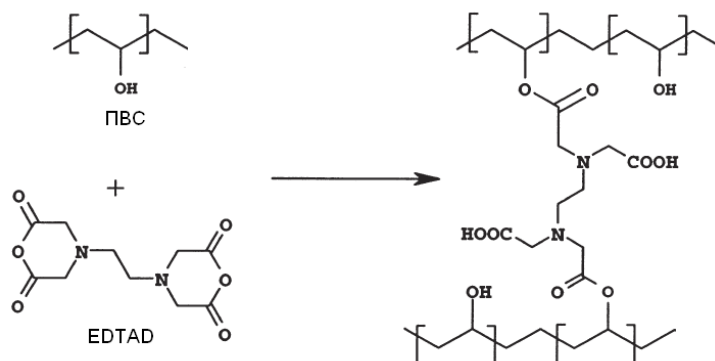


Рисунок 6 - Получение гидрогелей на основе ПВС с использованием EDTAD.

В качестве растворителя чаще всего выступал диметилсульфоксид [140].

Химическая универсальность ПВС в основном заключается в присутствии гидроксильных групп в основной цепи, которая подвергается химической модификации [141]. В соответствии с этим, его свойства могут быть изменены в зависимости от предполагаемого применения [142].

В последнее время множество исследовательских работ описывает применение соединений, модифицирующих гидроксильную группу поливинилового спирта, с последующим получением гидрогелей [143-148]. Такой метод состоит из двух этапов:

1. Модификация ПВС (добавление двойных связей в макромолекулы)

2. Полимеризация этих двойных связей и формирование трехмерной сети [149].

К примеру, были предложены модификации: акрилатом и метакрилатом [150-156].

2.5.3 Радиационная сшивка в растворах поливинилового спирта

Ряд источников описывают использование для получения гидрогелей на основе поливинилового спирта электронное и гамма-излучения [157,158].

Схема процесса сшивки представлена на Рисунок 7.

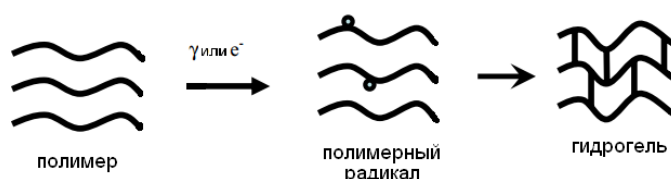


Рисунок 7 - Схема процесса гелеобразования в условиях γ - или e^- -облучения

Процесс гелеобразования зависит от степени полимеризации и от концентрации полимера в растворе. Так в работе [159,160] исследовалось получение гидрогелей на основе систем: поливиниловый спирт – крахмал, поливиниловый спирта- α -циклодекстрина. В обоих случаях получались системы, обладающие хорошей механической прочностью, адсорбционными и эластическими свойствами.

Процессы с использованием жесткого излучения обладают целым рядом преимуществ, таких как: легкость управления процессом; возможность присоединения сформированных гидрогелей и стерилизации в одном технологическом этапе; отсутствие необходимости добавлять сшивающие агенты или инициаторы [161].

2.5.4 Применение полимерных гидрогелей на основе поливинилового спирта.

Для успешного практического применения полимерных гидрогелевых

материалов очень важной задачей является приближение их свойств к свойствам живых тканей [162,163]. Материалы на основе поливинилового спирта отвечают этому требованию и находят широкое применение в качестве материалов биотехнологического и биомедицинского назначения [164-166]. В таблице 4 представлены основные области применения гидрогелей на основе поливинилового спирта.

Таблица 4 - Применение гидрогелей на основе ПВС в биомедицине и биотехнологии

Материал	Тип продукта	Форма использования	Контакт с тканью
Наружного применения	Контактные линзы [167-170]	Сформированный гидрогель	Непосредственное применение на тканях глаза
Имплантируемые изделия	Гидрофильные покрытия (катетеры, провода и т.д.) [171,172]	Полимерные защитные покрытия	Долгосрочное, взаимодействие непосредственно с кровью и внутренними средами организма
	Сосудистый эмболизирующий материал [173-176]	Микросферы гидрогеля	
	Тканевый противоспаечный барьер [177,178]	Гидрогель	
	Материал для замещения хрящевой ткани [179-186]	Сформированный гидрогель	

Наиболее широкое использование гидрогелей отмечается в малоинвазивной медицине [186-190]. Схематическое изображение инъекций гидрогеля показано на рисунке 10.

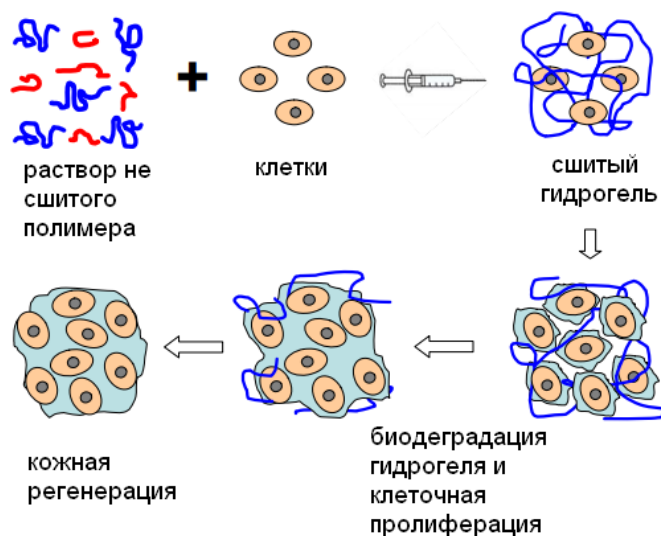


Рисунок 8 - Схема инъекции гидрогеля с последующей биodeградацией

Клетки выделяют из небольшой биопсии, размножают и помещают в раствор несшитого полимера, которые по мере инъекции шприцом сшиваются. Гидрогель обеспечивает начальную структурную поддержку и позволяет сохранить клетки в дефектной зоне. Данный биоматериал легко биodeградирует в процессе образования клеток. Эта стратегия позволяет врачу совершить операцию минимально инвазивным образом. [191]

2.6 Полимерные гидрогели на основе крахмала и его производных

Крахмал занимает видное положение в группе природных полимеров [192,193]. Он является основным пищевым источником углеводов. Данный полисахарид накапливается в растениях, и хранится в виде гранул в хлоропластах зеленых листьев и амилопластах семян, бобовых, клубнях [194].

Это гомополимер, состоящий из глюкопиранозных единиц, которые связаны друг с другом двумя различными формами, линейной формой - амилоза и сильно разветвленной - амилопектин (Рисунок 9) [195-198].

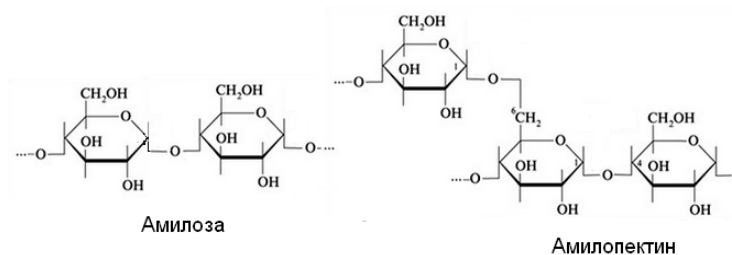


Рисунок 9 - Схема строения амилозы и амилопектина

При использовании природного крахмала, как правило, не формируются стабильные гидрогели. Поэтому чаще всего прибегают к химической модификации крахмала, с последующей сшивкой. Химическая модификация крахмала обычно включает образование сложного эфира, этерификацию или окисление гидроксильных групп глюкопиранозных единиц [199].

Часть гидроксильных групп, содержащихся в крахмальной цепи, чувствительна к реакции с полифункциональными соединениями (глутаральдегид (GA), эпихлоргидрин (ECH)). Это приводит к ковалентному сшиванию крахмала [200-202]. Недавно, для регенерации суставного хряща, были разработаны гидрогели на основе смеси хитозан/крахмал [203,204]. Получаемые твердые текстурированные гели обеспечивают желаемую механическую прочность изделия. Образующие продукты распада не являются токсичными и потребляются клетками. Яшимура [205..304] синтезировал гидрогели, на основе крахмала и янтарного ангидрида, с использованием 4-диметиламинопиридин в качестве катализатора этерификации.

Также описано получение гидрогелей с использованием крахмала для модификации которого использовался глицидилметакрилат (GMA) [206,207].

Помимо этого, большой интерес привлекают гидрогелевые системы на основе смесей крахмала с биоразлагаемых синтетическими полимерми, например поливинилового спиртом [208-210].

Так в работе Панга [211] описаны в процессе получения гидрогели на основе крахмала и ПВС, полученные с использованием в качестве сшивающего агента малеиновой кислоты (МА). В исследованиях Кумара [212] крахмал

модифицировали янтарным ангидридом, а затем вшивали смеси с ПВС эпихлоргидрином. В работах [213-215] описаны физико-механические, морфологические и термические свойства композиций крахмала и поливинилового спирта. Тудораши [216] в своей работе получал материалы на основе поливинилового спирта и крахмала, в присутствии мочевины и глицерина. При этом прочность на разрыв возрастала с увеличением концентрации ПВС и уменьшалась с увеличением количества глицерина и мочевины в смеси. Хиао [217] получал физически сшитые крахмал/ПВС гидрогели с контролируемой длиной цепи. Поливиниловый спирт (ПВА) был привит к крахмалу с помощью радикальной сополимеризации. Полученные гидрогели обладали достаточной прочностью и прозрачностью [218,219].

Одним из наиболее широко распространенных производных крахмала, нашедших применение в медико-биологических областях, является гидроксиэтилкрахмал.

Гидроксиэтилированный крахмал (ГЭК) - модифицированный природный полисахарид (производное амилопектина). В организме человека и животных, он быстро гидролизуется с помощью амилазы и выводится почками. Процесс модификации способствует замедлению метаболической деградации и приводит к повышению растворимости.

Замещение в макромолекуле идет в основном в положении С2, С3, С6 [220]. Гидроксиэтилированный крахмал в промышленности получают по реакции этиленоксида с крахмалом в щелочной среде с использованием катализатора (рисунок 10) [221].

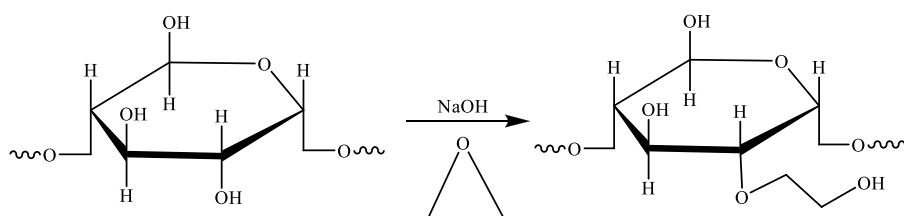


Рисунок 10 - Схема получение 2- гидроксиэтилкрахмалла

Раствор ГЭК характеризуется [222,223]: концентрацией (низкая: 3%; средний: 6%; высокий: 10%) ; молярной степенью замещения (низкая: 0,4;

средняя: 0,5; высокая: 0,62 и 0,7); средняя молекулярная масса [низкий: 70 кДа; среднего :от 130 до 260 кДа; высокого:> 450 кДа.

Основным параметром при модификации биополимера является степень замещения (DS) (5):

$$DS = \frac{Gs}{Gt} \quad (5)$$

, где Gs - отношение количества замещенных глюкозных остатков, Gt - общее число глюкопиранозных остатков

Молекулярное замещение (MS) - среднее количество гидроксиэтильных групп (W_H) на глюкопиранозный остатка (6):

$$MS = \frac{W_H}{1 - W_H} \times \frac{162}{44} \quad (6)$$

ГЭК являются полидисперсной системой. В таких системах массы частиц могут быть описаны с помощью: средневесовой молекулярной массы (M_w) и среднечисловой (M_n). Соотношение M_w / M_n показывает степень полидисперсности системы [224]. Данные для 3 марок указаны в таблице 5.

Таблица 5 - Характеристика ГЭК различных марок

Характеристики	HES 70/0,5	HES 130/0,4	HES 200/0,5
Концентрация (%)	6	6	6
Объемная эффективность(%)	80-90	100	100
Объемный эффект (ч)	1-2	3-4	3-4
Средняя молекулярная масса (M _w)	70000	130000	200000

Окончание таблицы 5

Молярная степень замещения (MS)	0,5	0,4	0,5
Соотношение C2 / C6	4:1	9:1	6:1
Макс. Доза (мл · кг ⁻¹)	33	33-50	33

Гидроксиэтил крахмал (HES) обычно используются в клинической практике в качестве кровезаменителя [225-227]. Так же широко используется при лечении гиповолемии, инфузионной терапии, лечение злокачественных опухолей [228-232]. Фармокинетические исследования показывают, что период полувыведения пентакрахмалов (10% ГЭК 200 / 0,5) короче на 3,5 ч, чем гекакрахмалов (6% ГЭК 200 / 0.62).[233-235].

Способность ГЭК к сшиванию в воде в мягких условиях (комнатная температура, физиологический pH), возможность транспортировать в заданную зону гидрофильные (пептиды, нуклеиновые кислоты) соединения [236] определяют его перспективность для получения медицинских гидрогелей.

В литературе [237] описывается синтез фотосшиваемых и водорастворимых образцов гидроксиэтилкрахмал/гидроксиэтилметакрилат-крахмала (HES/HEMA) с различной степенью замещения (DS). Полученные на их основе гидрогели было предложено использовать в качестве материалов с контролируемым высвобождением лекарственного препарата [238]. Также описывается синтез посредством фотополимеризации гидрогелей на основе модифицированных метакрильными группами полиэтиленгликоля и гидроксиэтилкрахмала [239]. Добавление ГЭК в структурную сеть ПВС значительно повлияло на его: молекулярную структуру, термическую, механическую, и морфологические свойства [240,241].

Также описаны [242] гидрогелевые мембраны на основе смеси ПВС-ГЭК, полученные методом «замораживание-оттаивание».

3 Обсуждение результатов

Гидрогелями, как это упоминалось выше, называют сшитые гидрофильные полимерные сетки, способные к набуханию в воде. Сшивка макромолекул может осуществляться путем образования ковалентных, ионных и водородных связей, а также за счет Ван-дер-ваальсовых взаимодействий. Данные материалы представляют значительный интерес для применения в медицине, благодаря способности имитировать живые ткани, не вызывая при этом развития выраженного воспалительного процесса. Это позволяет обеспечить первоначальную структурную поддержку поврежденных тканей и сохранить клетки в дефектной зоне. Гидрогель легко биodeградирует в процессе образования клеток, что позволяет врачам совершить операцию минимально инвазивным образом.

Ранее в работах [243-246] посредством радикальной сшивки в воднозамороженных системах были получены макропористые гидрогели на основе акрированного поливинилового спирта. Основным недостатком этих материалов является достаточно низкая скорость биodeградации.

Получение материалов с контролируемым временем биodeградации может быть достигнуто посредством введения в композицию водорастворимого природного полимера, способного к ферментативной биodeструкции, например, гидроксиэтилкрахмала (ГЭК).

Для реализации возможности сшивки по свободно-радикальному механизму в боковые цепи исходного ГЭК также вводились группы, содержащие кратные связи и способные образовывать пространственную трехмерную сетку химических связей.

В работе были синтезированы макропористые криотропные полимерные гидрогели на основе системы – модифицированного поливинилового спирта (м-поливиниловый спирт, м-ПВС) модифицированного м-гидроксиэтилированного крахмала (м-гидроксиэтилированный крахмал, м-ГЭК) (Рисунок 11).

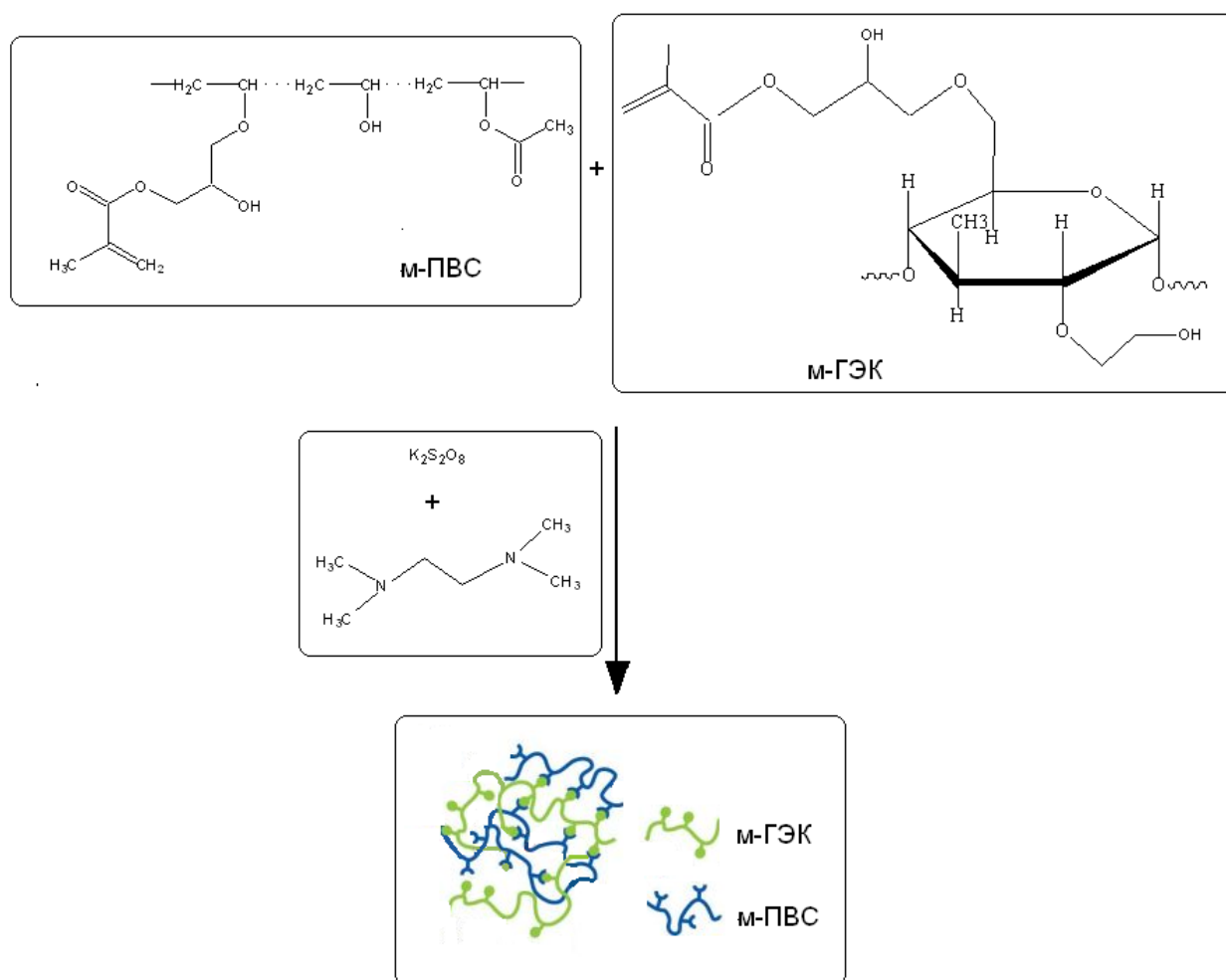


Рисунок 11 - Получение гидрогелей на основе системы м-поливиниловый спирт/м-гидроксиэтилированный крахмал

3.1 Исследование процесса получения модифицированного поливинилового спирта (м-ПВС)

3.1.1 Изучение закономерностей протекания процесса модификации ПВС

На первом этапе данной работы был исследован процесс модификации исходного ПВС и оценены факторы, влияющие на формирования м-ПВС.

Модификация поливинилового спирта глицидилметакрилатом осуществляли в растворе диметилсульфоксида. В качестве катализатора была использована серная кислота, концентрация которой составляла 0,1%.

Реакции проводили при следующих условиях:

- температура $80 \div 100$ °С
- концентрация ПВС в реакционной смеси $4 \div 7$ масс. %,
- мольное соотношение реагентов [ГМА]/[ПВС] - $1/10$; $1/13$; $1/20$; $1/50$ моль/осн-моль

Целесообразность использования при модификации поливинилового спирта в качестве реакционной среды ДМСО определялась его меньшей токсичностью по сравнению с ДМФА и отсутствием в этом случае необходимости тщательной очистки продукта реакции от токсичных продуктов.

Исследовался температурный интервал проведения процесса модификации, обеспечивающий высокую контролируемую скорость протекания реакции и максимальный выход готового продукта. Было установлено, что нижний температурный предел ограничивается снижением растворимости поливинилового спирта в диметилсульфоксиде (менее $75 \div 80$ °С), верхний же – сшивкой модифицированного полимера, либо осмолением реакционной системы (более 110 °С). На основании этого, реакцию модификации проводили при температуре от 80 до 100 °С. Данный температурный интервал является оптимальным, поскольку позволяет существенно сократить расход растворителей и упрощает аппаратное оформление данного процесса.

Анализ строения получаемых продуктов модификации осуществлялось методами ИК- и ЯМР ^1H -спектроскопии.

В литературе упоминается что, при кислотно-катализируемом взаимодействии эпоксидов и спиртов образуются алкоксиспирты, содержащие парные функциональные группы, прикрепленные к двум смежным атомам углерода [247]. На рисунке 12 представлена ожидаемая структура сополимера .

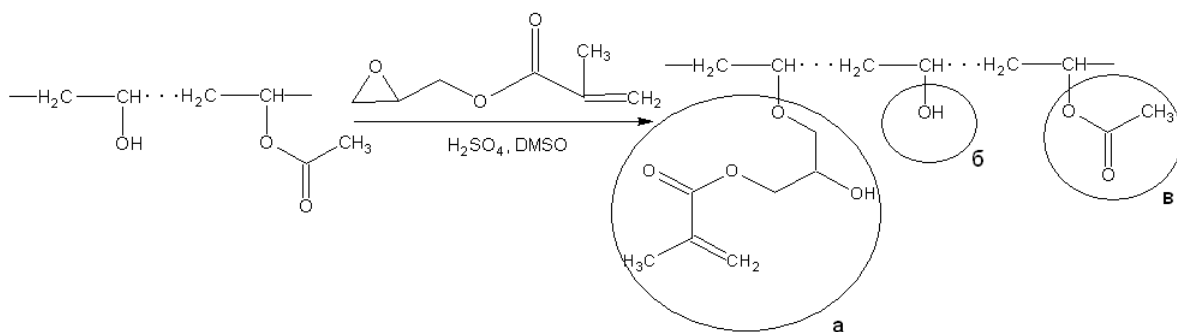


Рисунок 12 - Процесс получения м-ПВС. Структура сополимера: метакрилатные группы (а), непрореагировавшие гидроксильные группы (б) и ацетатные группы (в)

Замещение части гидроксильных групп на метакрилатные группы подтверждается данными ИК - спектроскопии образцов исходного поливинилового спирта и продукта его взаимодействия с ГМА (рисунки 13 и 15).

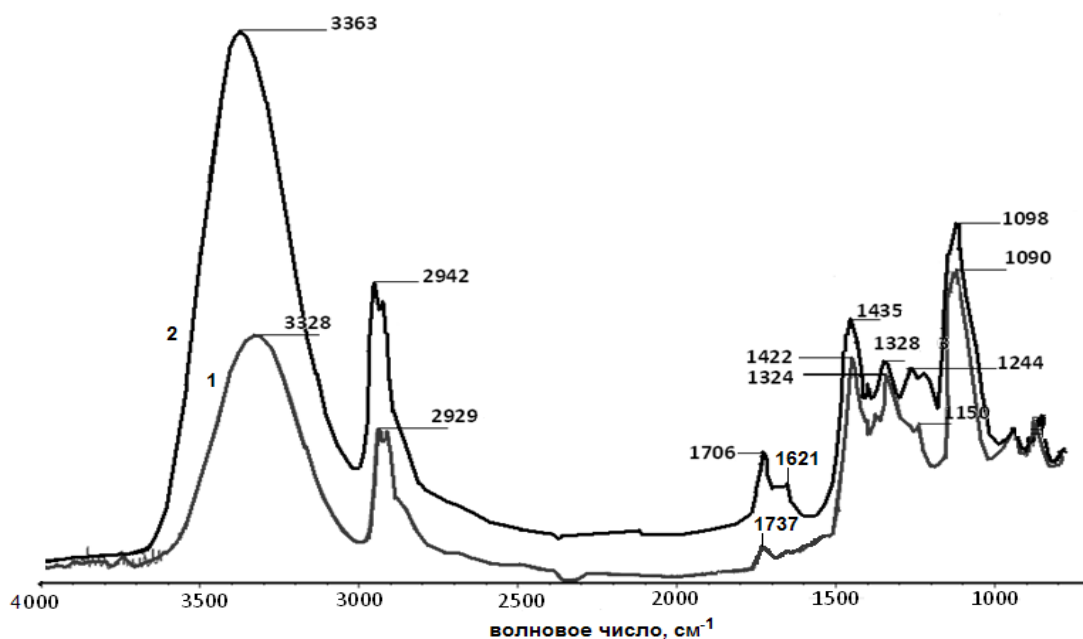


Рисунок 13 - ИК НПВО спектры: 1 – исх. ПВС (марки ВФ-17, Mw- 75000 Да); 2 – модифицированный ПВС (марки ВФ-17, Mw- 75000 Да);

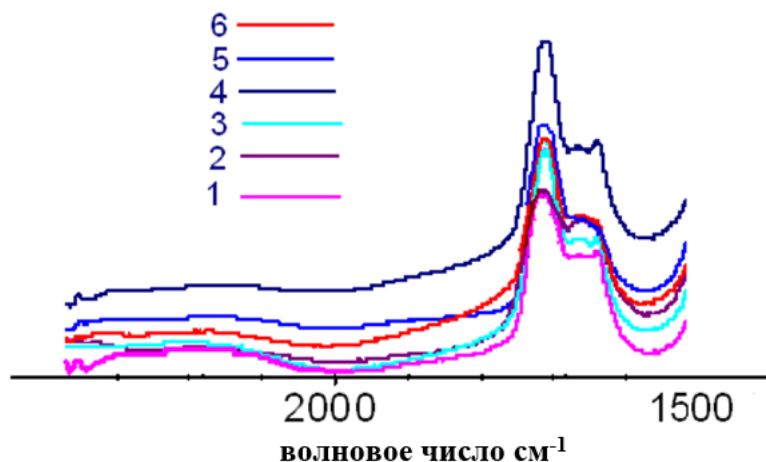


Рисунок 14 - ИК НПВО спектры модифицированный ПВХ (1 - 6 часов от начала реакции снизу вверх, соответственно)

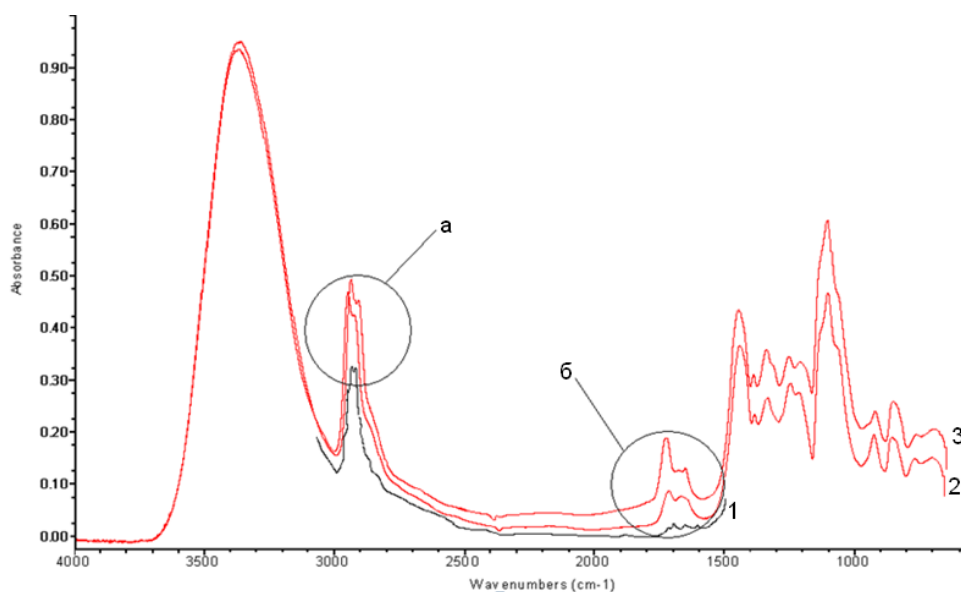


Рисунок 15 - ИК НПВО спектры: 1 - м- ПВХ (марки ВФ-14 , Mw- 50000) ; 2 – м-ПВХ (марки ВФ-14, Mw- 75000) ; 3 – м-ПВХ (марки ВФ-24, Mw- 110000). Валентные колебания С-Н связей (а), валентные колебания С=О связей (б)

Появление двух новых полос поглощения с волновыми числами 1706 и 1621 см^{-1} [248], в спектре, приведенном на рисунке 13, говорит о протекании процесса модификации. На рисунке 14 видна динамика изменения полос поглощения с указанными волновыми числами. Максимальное значение интенсивности достигается за 4 часа протекания реакции. Что свидетельствует

о полном завершении за данный временной интервал процесса модификации, и последующей стерической перегруппировке, за счет которой образуется временная сшивка, которая может привести к образованию «козла» в реакционной смеси. При использовании исходного полимера с разной молекулярной массой, имело место роста высоты пиков с волновым числом 1706 и 1621 см^{-1} по мере возрастания молекулярной массы полимера.

На ЯМР ^1H спектре модифицированного ПВС, можно видеть серию сигналов с химсдвигами в области 1,5 м.д., соответствующую протонам групп CH_2 основной цепи ПВС. Данные отклики характерны для случая наличия в составе соединения метакрилатных групп, имеющих, как известно, диамагнитную анизотропию.

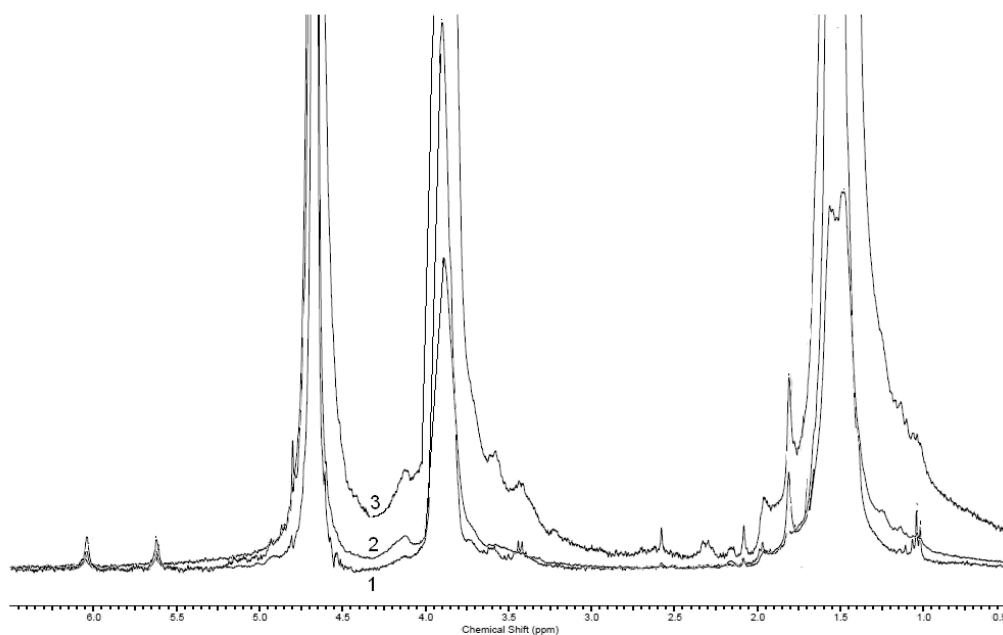


Рисунок 16 - ЯМР ^1H спектр м-ПВС в растворе $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$.
Модификация поливинилового спирта: 1 час - 1, 2 часа - 2, 3 часа - 3

Следует так же обратить внимание на возникновение химических сдвигов: 1,75 м.д., 5,63 м.д. и 6,1 м.д., отвечающих магнитнонеэквивалентным гминальным протонам $\text{СНН}'=$ фрагментов метакрилатных групп. Сигналам протонов 1,9 м.д., 3,3 м.д. и 3,6 м.д. соответствуют

фрагменты $\text{COOCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{O}$ -, 1 которые образуются при раскрытии оксиранового цикла глицидиловых эфиров.

Расчет степени замещения и зависимость степени замещения от количества введенных цепей модификатора, осуществляли на основе данных ЯМР спектра реакционной смеси (рисунки 17 и 18). Молярная степень замещения (МЗ) показывает, сколько 1 моль глицидилметакрилата (CH_3) приходится на 1 молекулу поливинилового спирта (7). По интегральным сигналам интенсивности (Таблица 6), показанных на ЯМР спектре, доля замещенных звеньев может быть определена по формуле:

$$MЗ = \frac{I_{\text{CH}_3(\text{ГМА})} / 3}{I_{\text{CH}_3(\text{ГМА})} / 3 + I_{\text{CH}_2(\text{ПВС})} / 2} \quad (7)$$

, где I_{CH_3} – интегральная интенсивность сигнала (2,85 м.д.) протонов метильной группы ГМА; I_{CH} – интегральная интенсивность сигнала (3,65 м.д.) протонов метильной группы ПВС;

Таблица 6 - Зависимость интенсивность сигналов от времени

Время протекания реакции, час	$I_{\text{CH}_3(\text{ГМА})}$	$I_{\text{CH}_2(\text{ПВС})}$
1	2,54	34,23
2	2,62	26,12
3	2,51	20,31
4	2,65	20,42

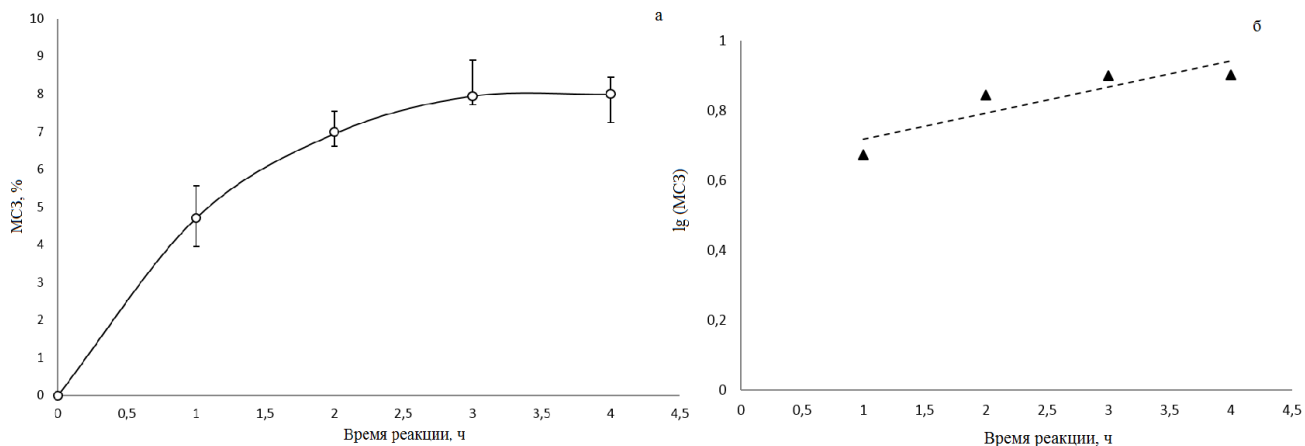


Рисунок 17 - Изменение степени замещения в зависимости от времени протекания реакции (а) между ПВС и глицидилметакрилатом и его логарифмическая анаморфоза (б)

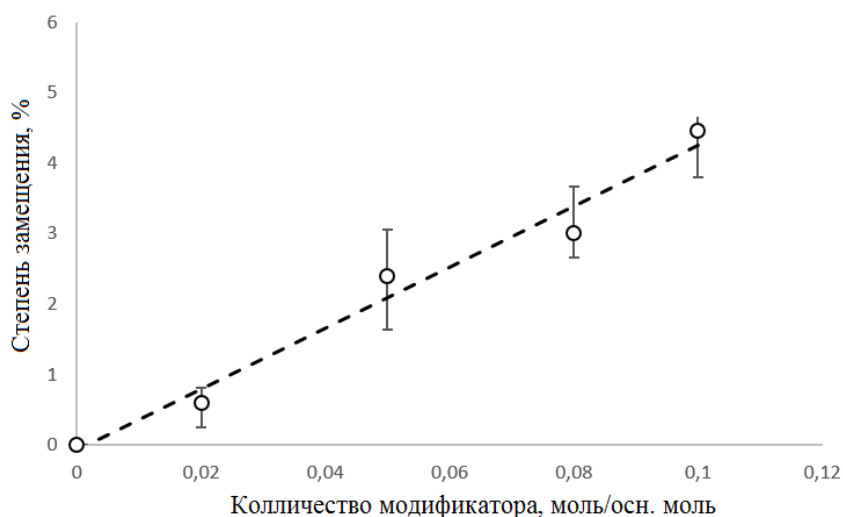


Рисунок 18 - Изменение степени замещения от концентрации ГМА за первый час модификации

Исходя из данных полученных в ходе исследования процесса модификации ПВС с помощью ЯМР спектроскопии, мы делаем вывод, что степени замещения в ходе реакции возрастают до определенного предела и далее остаются постоянными (не превышают $5 \div 10\%$). Зависимость же данной величины от концентрации модификатора прямо пропорциональна. Следовательно, при выборе необходимой концентрации модификатора, мы ориентируемся на степень замещения, не превышающего 5%, так как велика вероятность образования физического геля в процессе синтеза.

Для анализа влияния температуры, концентрации, соотношения реагентов, молекулярной массы исходного полимеров на закономерность модификации ПВС был проведен ряд экспериментов. На рисунках 19-22 приведены зависимости степени замещения от изучаемых факторов.

Можно видеть, что с возрастанием температуры скорость протекания реакции между ПВС и ГМА увеличивается, причем при всех температурах предельная степень замещения достигается за 2÷3 часа. В связи со снижением вязкости системы, увеличения констант равновесия и скорости реакции происходит увеличение критической степени замещения с ростом температуры.

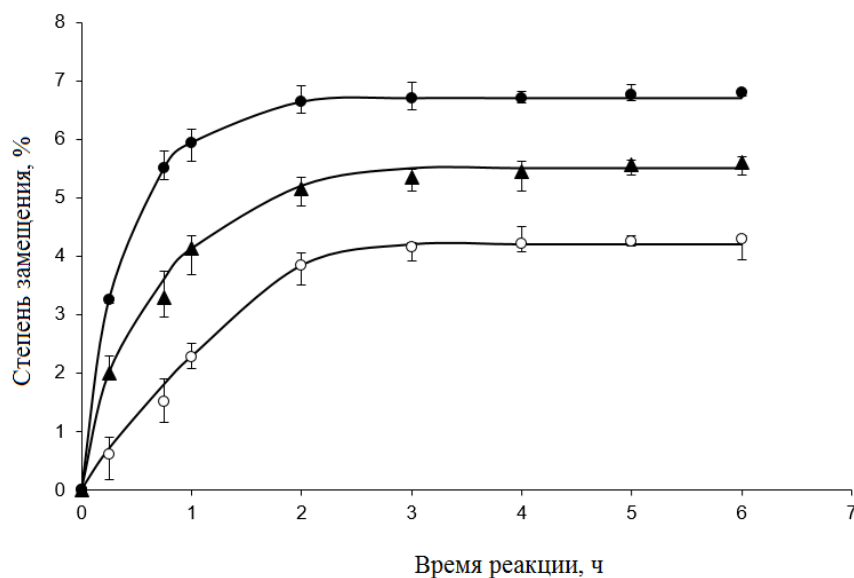


Рисунок 19 - Кинетические кривые для взаимодействия ПВС (6 масс.%, 110000) с ГМА ($[ПВС]/[ГМА] = 10$ осн-моль/моль) при температурах: (○) – 80 °C; (▲) – 90 °C; (●) – 100 °C

О ключевой роли вязкости реакционной среды и лимитировании процесса диффузией свидетельствует наличие зависимости между скоростью и предельной степенью замещения от молекулярной массы ПВС (рисунок 20). Так, при увеличении молекулярной массы ПВС (вязкости реакционной смеси) скорость реакции и предельная степень замещения значительно

уменьшаются, что объясняется уменьшением коэффициентов диффузии реагентов.

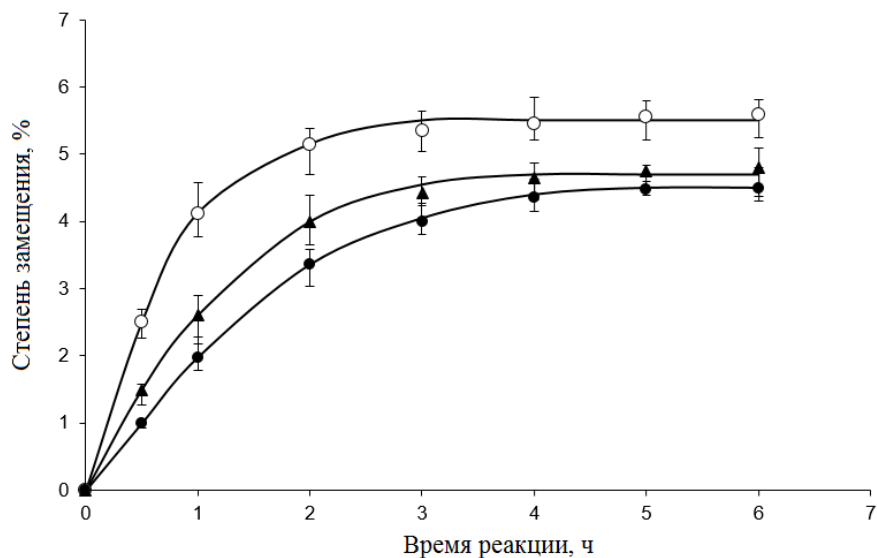


Рисунок 20 - Кинетические кривые для взаимодействия ПВС (6 масс.%) с ГМА ($[ПВС]/[ГМА] = 10$ осн-моль/моль) при температуре 90°C . Молекулярные массы ПВС: (○) – 50000; 2(▲) – 75000; 3(●) – 110000

На рисунке 21 четко виден диффузионно-лимитируемый характер взаимодействия ПВС и ГМА, так как идет убывание скорости реакции и критической степени замещения при возрастании исходных концентраций реагентов. В кинетической же области следовало ожидать обратного результата.

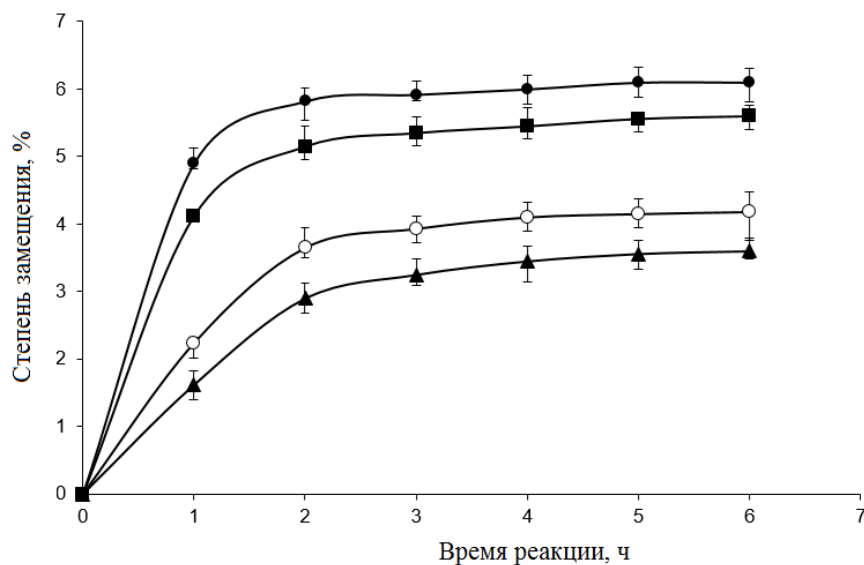


Рисунок 21 - Кинетические кривые для взаимодействия ПВС (110000) с ГМА ($[ПВС]/[ГМА] = 10$ осн-моль/моль) при температуре 90°C . Начальные концентрации ПВС: (●) - 7; (■) - 6; (○) - 5; (▲) - 4 масс. %

Это явление связано с возрастанием вязкости системы с ростом концентрации ПВС в растворе. При постоянной концентрации ПВС увеличение концентрации модифицирующего агента приводит к повышению степени замещения гидроксильных групп.

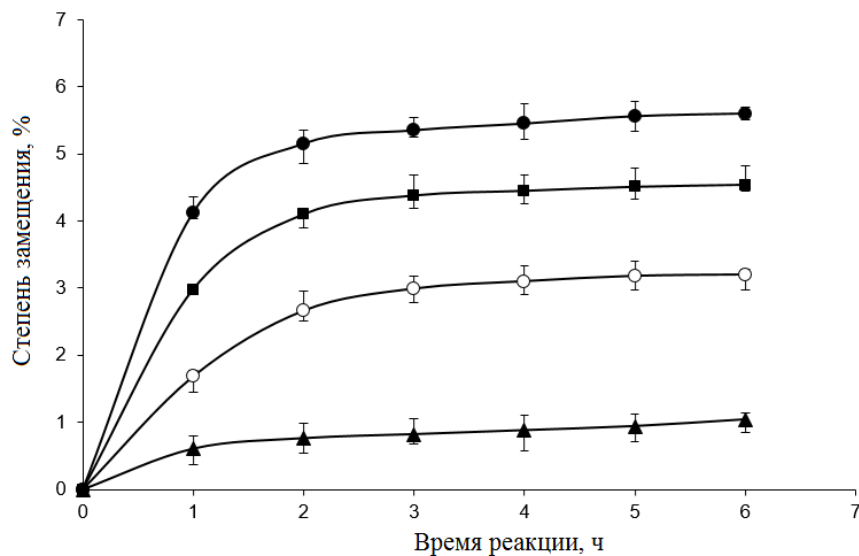


Рисунок 22 - Кинетические кривые для взаимодействия ПВС (6%) с ГМА при температуре 90°C. Соотношения реагентов ($[ПВС]/[ГМА]$): (●)- 1/10; (■) - 1/13; (○) - 1/20; (▲) – 1/50

Таким образом, взаимодействие ПВС и ГМА лимитируется диффузией в исследованном диапазоне изменяемых условий.

При проведении реакции в течении более 6 часов и при использовании ПВС с высокой молекулярной массой происходит образование химически сшитого геля, поэтому было нецелесообразно исследовать процесс при его продолжительности больше 4÷5 часов и использовании молекулярной массы 50000÷85000 кДа. Как можно видеть, с увеличением значения изменяемых параметров скорость реакции увеличивается. С ростом концентрации реакционной смеси относительная доля присоединившегося ГМА уменьшалась, что вызвано увеличением вязкости и снижением диффузии низкомолекулярного компонента.

3.1.2 Математическая модель процесса модификации ПВС.

Экспериментальные результаты неизбежно содержат погрешности, обусловленные тем, что любому процессу измерения сопутствует взаимодействие большого числа различных факторов - погрешностей измерения аналитических приборов, влияния случайных ошибок и тому

подобного. Поэтому итогом любого конкретного анализа является не только выбор оптимальных параметров, но и оценка точности их предсказания.

Проведенный в данной работе эксперимент является пассивным. Обработка таких данных может проводиться статистическими методами:

1. дисперсионным
2. регрессионном

3.1.2.1 Дисперсионный анализ

При проведении дисперсионного анализа рассматривалась математическая модель (8) (Таблица 7).

$$y = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_l + \alpha_i\beta_j + \alpha_i\gamma_l + \beta_j\gamma_l + \alpha_i\beta_j\gamma_l + \varepsilon_{ijkl} \quad (8)$$

, где μ – суммарный эффект во всех опытах (общее среднее); α_i – эффект фактора А (соотношение ПВС/ГМА) на i -ом уровне ; β_j – эффект фактора В (концентрация ПВС) на j -ом уровне ; γ_l – эффект фактора С (температура) на l -ом уровне ; $\alpha_i\beta_j$, $\alpha_i\gamma_l$, $\beta_j\gamma_l$ – эффекты парного взаимодействия факторов; $\alpha_i\beta_j\gamma_l$ – эффект тройного взаимодействия факторов; ε_{ijkl} – ошибка измерения.

Таблица 7 - Результаты проведенного дисперсионного анализа

Источник дисперсии	Сумма сумм	Число степеней свободы	Средний квадрат	Расчетное значение F-критерия	Уровень значимости
А	98,68	3	32,894	2135,32	< 0,001
В	55,0093	3	18,336	1190,3	< 0,001
С	15,016	2	7,508	487,4	< 0,001
АВ	15,888	3	5,296	343,8	< 0,001
АС	1,7867	3	0,5956	38,66	< 0,001
ВС	2,108	5	0,4217	27,376	< 0,001
АВС	2,8517	3	0,9506	61,71	< 0,001
Ошибка	0,754	49	0,0154		
Общая сумма	206,187	71			

Дисперсионный анализ данных подтвердил значимость всех факторов.

Отсюда может быть сделан вывод о том, что наибольший эффект на степень замещения оказывают следующие факторы: соотношение ПВС/ГМА и концентрация ПВС (наибольшие значения F-критерия).

3.1.2.2 Регрессионный анализ.

Регрессионный анализ в матричной форме проводился для полной модели (с учетом эффектов парного и тройного взаимодействий факторов) при помощи программного пакета Matlab. Коэффициенты уравнения линейной регрессии определялись с помощью метода наименьших квадратов. Для уточнения уравнения регрессии применялась процедура последовательного исключения незначимых факторов, при этом ранжирование коэффициентов проводилось на основании t-критерия. Исключение факторов проводилось до тех пор, пока уменьшалась остаточная дисперсия. Оценка адекватности полученного уравнения регрессии проводилась в соответствии с критерием Фишера[249..25].

Поскольку дисперсионный анализ подтвердил значимость не только основных эффектов, но и всех эффектов взаимодействия, при регрессионном анализе также рассматривалась полная модель (уравнение 9).

$$y = b_0 + b_1A + b_2B + b_3C + b_{12}AB + b_{13}AC + b_{23}BC + b_{123}ABC + b_{11}A^2 + b_{22}B^2 + b_{33}C^2 \quad (9)$$

Коэффициенты, полученные в результате регрессионного анализа, в соответствии с проведенной процедурой последовательного исключения незначимых факторов приведены в Таблице 8.

Из представленных данных видно, что на пятом шаге (при исключении коэффициента при эффекте парного взаимодействия X13) остаточная дисперсия возрастает, следовательно, конечное уравнение линейной регрессии (Уравнение 10-11) принимает вид:

$$y = b_0 + b_1A + b_2B + b_3C + b_{12}AB + b_{13}AC + b_{123}ABC \quad (10)$$

$$y = b_0 + b_1A + b_2B + b_3C + b_{12}AB + b_{13}AC + b_{123}ABC \quad (11)$$

Адекватность уравнения была проверена по критерию Фишера.

Таблица 8 - Результаты регрессионного анализа

	Полное уравнение		Исключение 1		Исключение 2		Исключение 3		Исключение 4		Исключение 5	
	b	t	b	t	B	T	b	t	b	t	B	t
b0	3,118	30,57	3,121	30,59	3,125	30,64	3,088	30,28	3,025	29,66	2,88	28,3
b1	1,893	18,565	1,89	18,544	1,902	18,65	1,89	18,56	1,87	18,41	2,006	19,67
b2	1,105	10,835	1,11	10,889	1,108	10,87	1,16	11,38	1,16	11,372	1,129	11,07
b3	0,596	5,844	0,59	5,802	0,61	5,99	0,612	6,009	0,618	6,06	0,84	8,248
b12	0,699	6,863	0,69	6,8	0,694	6,803	0,66	6,47	0,657	6,45	0,65	6,367
b13	0,365	3,584	0,368	3,617	0,348	3,42	0,36	3,537	0,370	3,64		
b23	0,0146	0,143										
b123	0,5608	5,499	0,57	5,603	5,66	5,554	0,59	5,81	0,59	5,808	0,496	4,867
b1 ²	-0,103	-1,01	-0,1	-1,01	-0,10	-0,99	-0,943	-0,943				
2 ²	-,0924	-0,906	-0,09	-0,93	-0,09	-0,93						
b3 ²	0,0299	0,293	0,029	0,286								
s2ост		0,186		0,183		0,179		0,178		0,1768		0,2004

На рисунке 23 представлен график, отражающий точность предсказания по математической модели: по оси «х» были отложены значения, измеренные в ходе эксперимента; по оси «у» - предсказанные математической моделью, указанной выше.

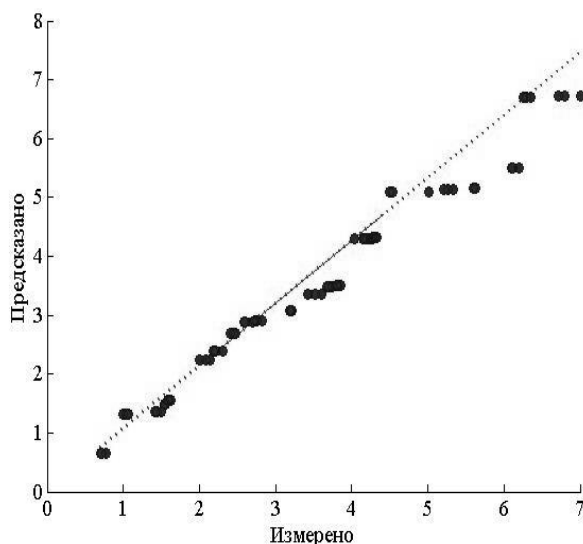


Рисунок 23 - Диаграмма «измерено-предсказано»

Практически все данные лежат на прямой, что говорит о высокой предсказательной способности найденной модели. Образцы, полученные при концентрации исходной реакционной смеси 6, 7 масс.%, показали высокие значения степени замещения в широком диапазоне различных параметров. В пограничных условиях, система либо образует физический гель, либо наблюдается малая степень замещения. Из-за этого такие условия нами не рассматривались.

Анализ полученного уравнения линейной регрессии позволил предположить оптимальные условия ведения процесса и построить поверхность отклика (рисунок 24).

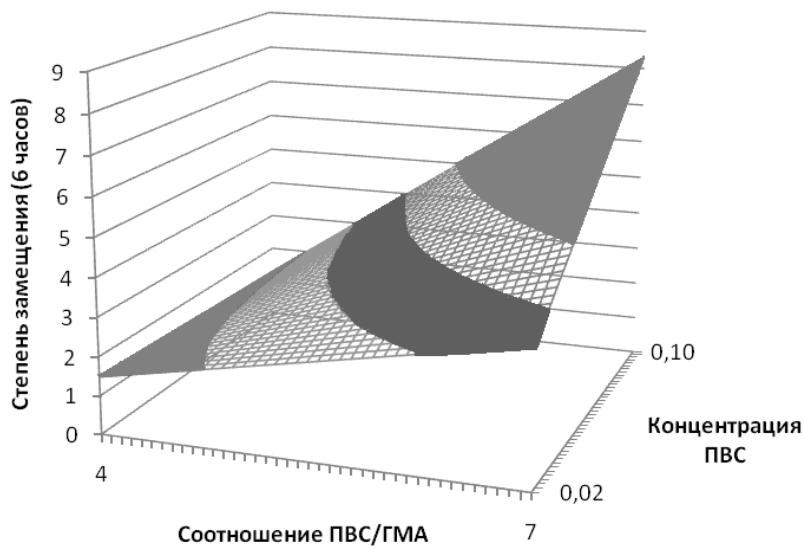


Рисунок 24 - Поверхность отклика для реакции модификации ПВС ГМА

Как можно видеть, лучшими условиями модификации являются интервал при температур $85\div 95^\circ\text{C}$, продолжительность реакции 4 часа, при концентрации исходной смеси $6\div 7$ масс %, соотношение $[\text{ОН (ПВС)} / \text{ГМА}] 1/10$. В дальнейшем при проведении реакции ПВС с ГМА был использован интервал подобранных параметров.

3.1.3 Физико-механическая характеристика образцов модифицированного ПВС

Молекулярно-весовые характеристики исходного и модифицированного ПВС (363 К, длительность модификации 4 часа, мольное соотношение реагентов 0,1 [моль ГМА/осн-моль ПВС]) определяли посредством метода ситовой (эксклюзионной) хроматографии с использованием детектора многоугольного лазерного светорассеяния и дифференциального рефрактометра (ЭХ-МУЛС-ДР).

Исходя из полученных данных, прирост молекулярной массы исходного ПВС указывает на протекании процесса модификации.

На графике (рисунок 25) представлены дифференциальные кривые ММР с унимодальным распределением. Причем в процессе модификации молекулярно-

массовое распределение становится более узким, но продолжает оставаться унимодальным (таблица 9).

Таблица 9. Влияние модификации поливинилового спирта (2 часа) глицидилметакрилатом на его свойства

Параметры	Исходный ПВС	Модифицированный ПВС
M_w , кДа	24.9	358.6
M_w/M_n	1.60	3.83
T_n , °C	180	250
$T_{5\%}$, °C	280	300
T_g , °C	71,2	109,7

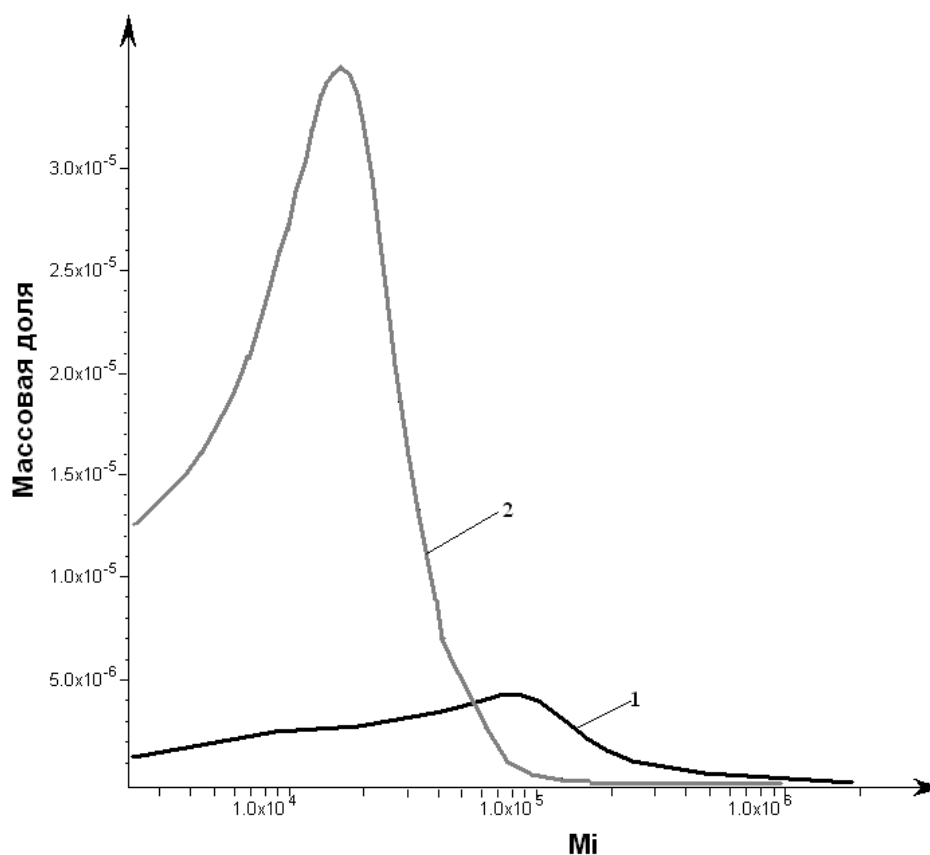


Рисунок 25 - Дифференциальные кривые молекулярно-массового распределения исходного (1) и модифицированного (2) образцов ПВС.

Так, при модификации поливинилового спирта глицидилметакрилатом в десятикратном мольном недостатке по отношению к концентрации гидроксильных групп при температуре 363К достигал в течение 4 часов средневесовой молекулярной массы 358000 Да при ширине молекулярно-весового распределения 3,83, что отвечает среднечисловой молекулярной массе 93500 Да.

Очевидно, что столь значительный прирост среднечисловой молекулярной массы не может являться только результатом введения глицидилметакрилатных групп, и связан с реализацией процессов приводящих к разветвлению цепи. Вероятно, причиной разветвления цепи является кислотнo-катализируемое сопряженное присоединение нуклеофильных гидроксильных групп ПВС к электронодефицитным двойным связям метакрилатных фрагментов.

Также методом ДСК были определены температуры стеклования метакрилатных производных ПВС с различными степенями замещения. Для этого выделяли продукты модификации поливинилового спирта, полученные при температуре 90 °С через 2 часа и 4 часа после начала реакции. Температуры стеклования исходного ПВС и продуктов его модификации через 2 часа и 4 часа после начала реакции составляют 71,2; 109,7 и 150,8 °С соответственно.

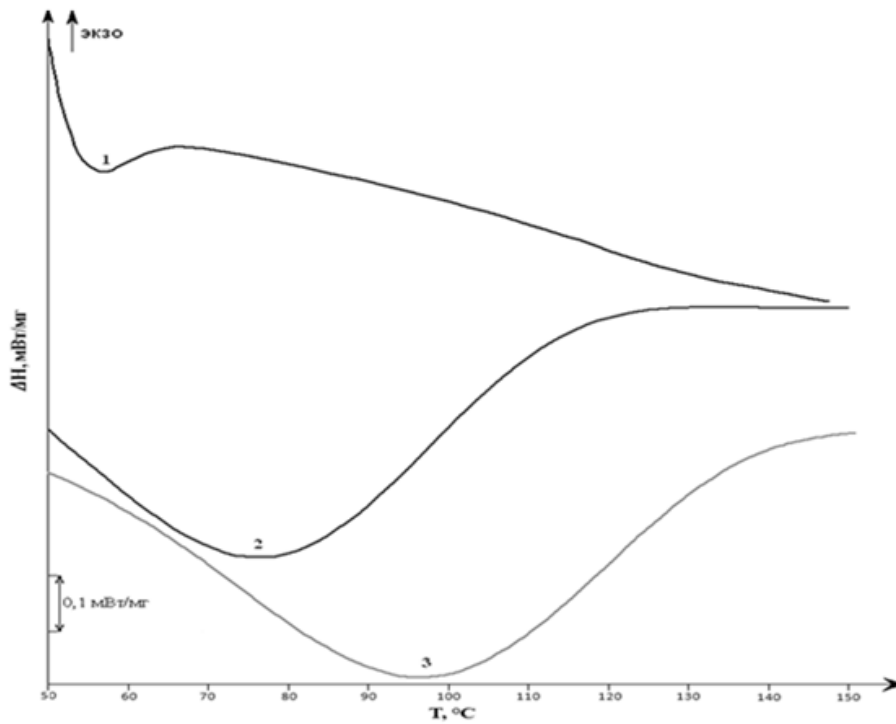


Рисунок 26 -Типичные термограммы исходного (1) и модифицированного (2, 3) ПВХ, полученные при первом сканировании. Время синтеза модифицированного ПВХ – 2 (2часа) или 3 (4часа).

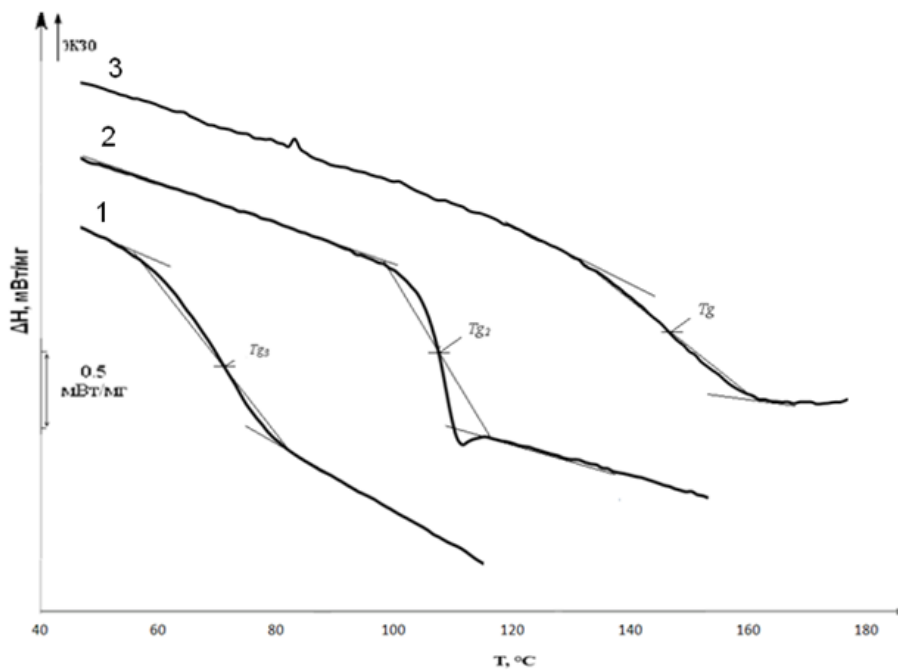


Рисунок 27 -Типичные термограммы исходного (1) и модифицированного (2, 3) ПВХ, полученные при втором сканировании. Время синтеза модифицированного ПВХ – 2 (2часа) или 3 (4часа).

На термограммах исходного и модифицированного ПВС, полученных при первом сканировании (Рисунок 26), в области $50 \div 150$ °С отчетливо виден эндотермический пик, очевидно принадлежащий растворителю (воде), содержащейся в образце. Таким образом, лиофильная сушка продукта модификации ПВС не приводит к его полному избавлению от растворителей, что необходимо учитывать при его анализе (поправка на содержание основного вещества), а также при приготовлении композиций на его основе.

Увеличение температуры стеклования с течением времени нельзя объяснить только введением глицидилметакрилатных групп, так как согласно данным демонстрируемым на рисунке 21 степень замещения в полимере между вторым и четвертым часами практически не изменяется, а температура стеклования значительно возрастает (рисунок 27).

Температура стеклования продукта закономерно зависит от времени синтеза, а между молярной степенью замещения и T_g наблюдается прямая корреляция (рисунок 28).

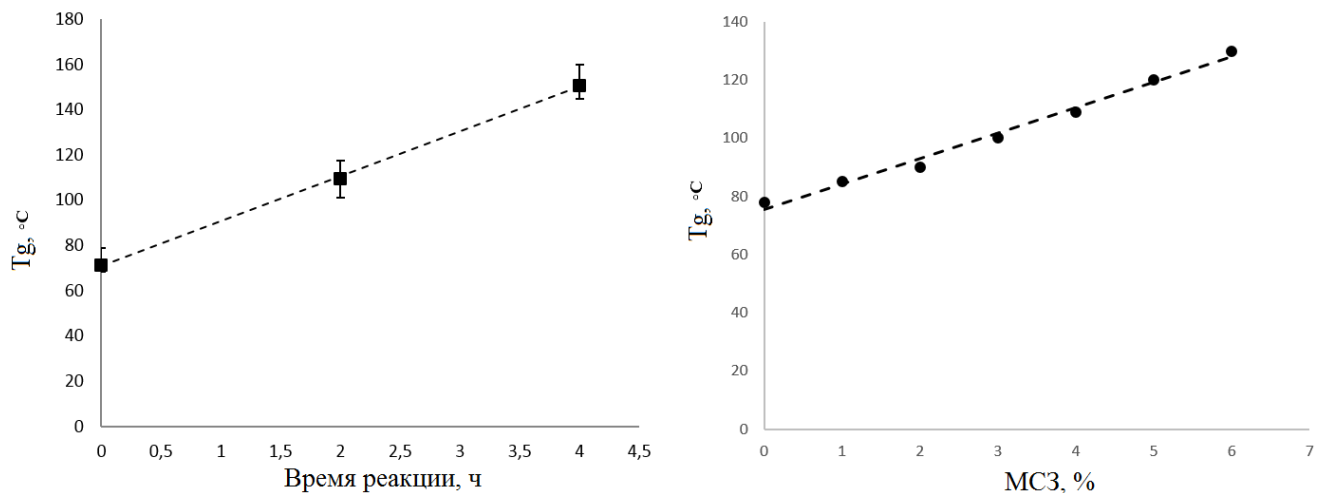


Рисунок 28. Зависимость температуры стеклования модифицированного ПВС от времени синтеза.

Увеличение числа полярных групп вызывает повышение температуры стеклования полимера.

Таким образом, контроль синтеза модифицированного глицидилметакрилатом ПВС, можно осуществлять также и по значению T_g (рисунок 29)

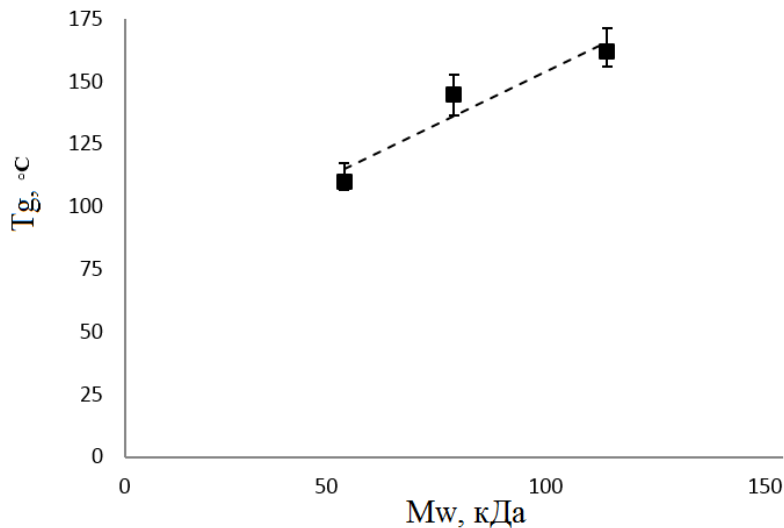


Рисунок 29 Зависимость температуры стеклования модифицированного ПВС от молекулярной массы ПВС.

Так как температура стеклования не зависит от молекулярной массы для линейных однотяжных полимергомологов, а степень замещения гидроксильных групп ПВС изменяется незначительно с течением времени после двух часов модификации глицидилметакрилатом, то прирост температуры стеклования также указывает на реализацию процесса разветвления цепи.

3.2 Исследование процесса получения модифицированного гидроксиэтилированного крахмала (м-ГЭК)

3.2.1 Изучение закономерностей протекания процесса модификации ГЭК

На втором этапе данной работы изучалась возможность получения акриловых производных 2- гидроксипропилокрахмала. Синтез модифицированного ГЭК проводили также путем взаимодействия исходного полимера с глицидиловым эфиром метакриловой кислоты по разработанной ранее методике. Реакцию проводили в течение 4 часов при температуре 90 ± 5 °C в среде ДМСО, в условиях двукратного мольного избытка ГЭК по отношению к глицидилметакрилату (ГМА).

Модификация

гидроксиэтилкрахмала

глицидилметакрилатом протекает по следующему механизму (Рисунок 30).

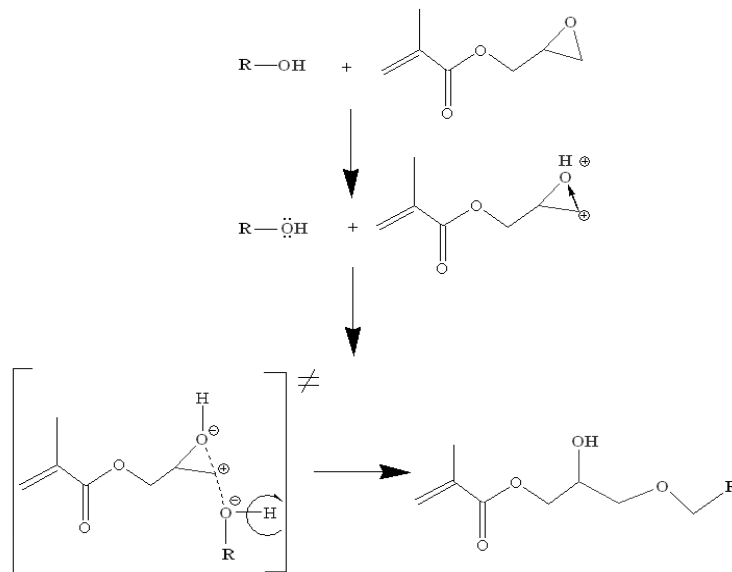


Рисунок 30 - Механизм реакции взаимодействия гидроксильных групп ГЭК с глицидилметакрилатом.

Химическая модификация гидроксиэтилкрахмала (ГЭК) заключается в замещении атома водорода в гидроксильных группах остатком глицидилметакрилата.

Известно, что на каждое звено цепи гидроксиэтилкрахмала приходится по три гидроксигруппы: при атомах углерода (С3) и (С6) и при атоме углерода (С2) в гидроксиэтильном фрагменте. Вследствии этого возникает проблема региоселективности.

Для определения преобладающего направления реакции были получены спектры ИК и ЯМР¹³С модифицированного ГЭК, очищенного от реагентов.

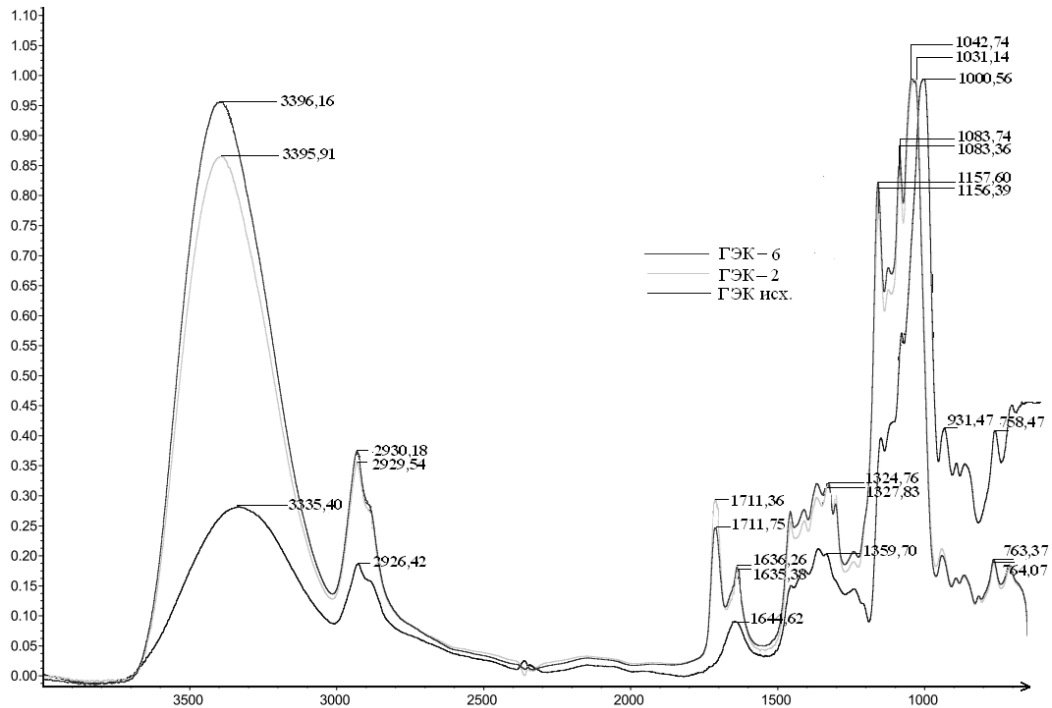


Рисунок 31 - Спектр исходного и модифицированного ГЭК (2 часа и 6 часов от начала реакции)

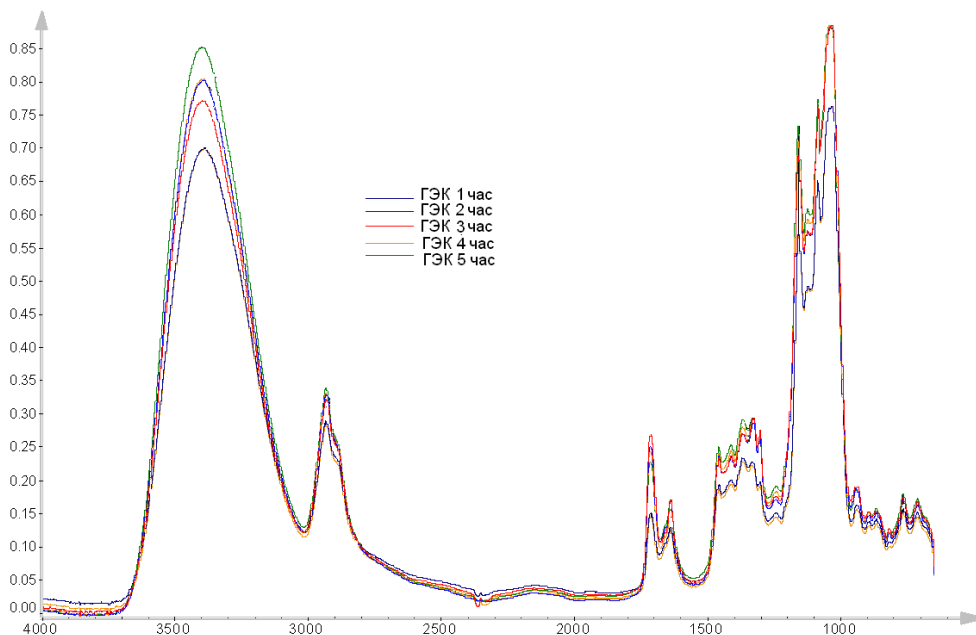


Рисунок 32 - Спектр м-ГЭК при различном времени протекания реакции.

В ИК-спектре модифицированного продукта, представленного выше, можно наблюдать сигнал 1711 см^{-1} , соответствующий валентным колебаниям двойных связей, что указывает на введение метакрилатных фрагментов.

К сожалению, основываясь на данных ИК сложно невозможно достоверно

установить с какой именно гидроксигруппой произошло взаимодействие молекулы ГМА. Хотя можно предполагать, что из-за стерической затруднённости 6-го и 3-го положения функциональной группы, скорее всего присоединение идет по $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ группе при втором атоме углерода.

Для определения направления атаки глицидилметакрилата, изучались спектры ЯМР ^{13}C модифицированного продукта (Рисунок 33).

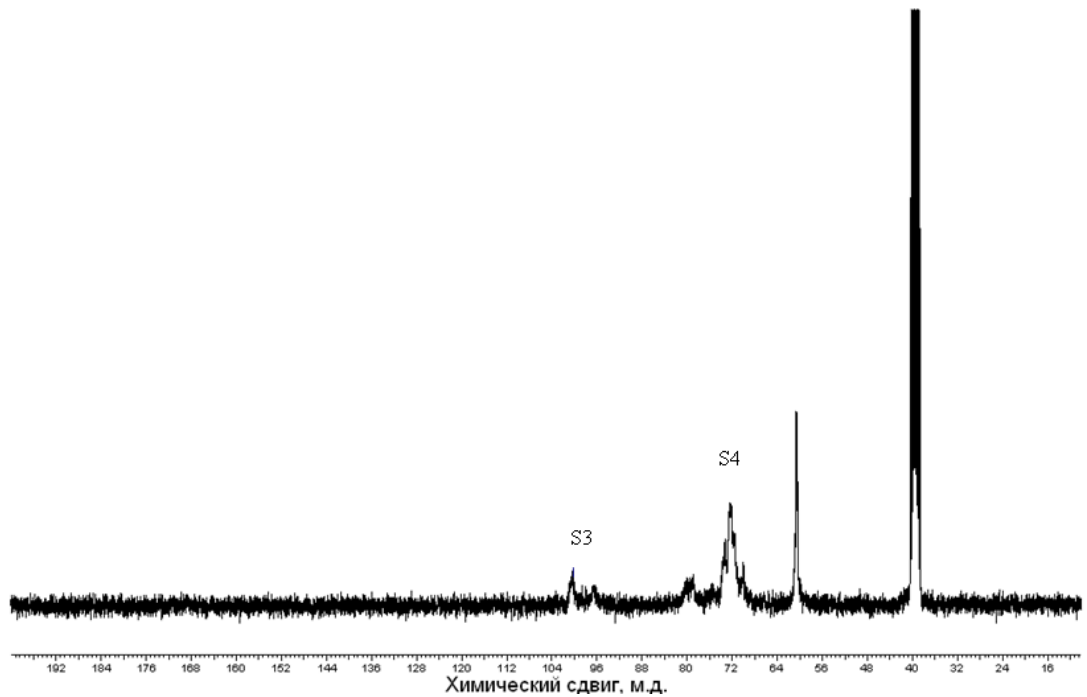
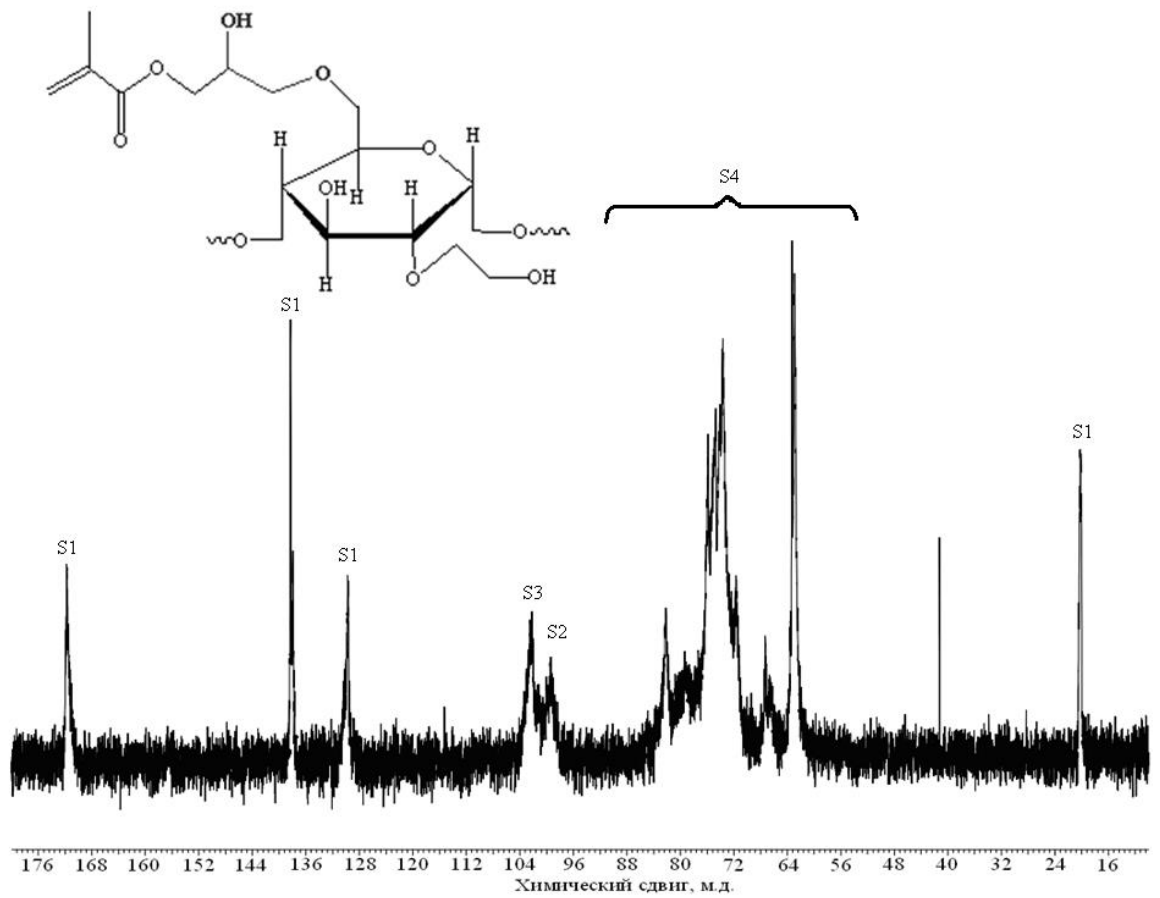


Рисунок 33 - Типичный спектр ЯМР ^{13}C очищенного образца (а) гидроксиэтилкрахмала, модифицированного глицидилметакрилатом и исходного образца (б)

Таблица 10 - Отнесение сигналов в типичном спектре ЯМР ^{13}C продукта модификации.

№	Отнесение сигнала или группы сигналов	Обозначение	Химический сдвиг, м.д.
1	ядра углерода глицидилметакрилатного остатка	S1	172, 138, 130, 20
2	ядра (C1) углерода ГЭК в случае замещения	S2	100
3	аномерные ядра (C1) углерода ГЭК без замещения	S3	102
4	группу сигналов, соответствующих C2 – C6 ядрам углерода ГЭК	S4	62-84

На основании полученных данных можно утверждать, что замещение протекает не по положению C2 и C3, из-за стабильности показателей сигналов аномерных ядер углерода в цепи ГЭК.

Появление уширенного сигнала при 68 м.д. и 80 м.д. указывает на замещение глицидилметакрилатного остатка по гидроксильной группе в положение C6.

На основании выше сказанного, можно констатировать, что процесс получения м-ГЭК выглядит так, как показано на рисунке 34.

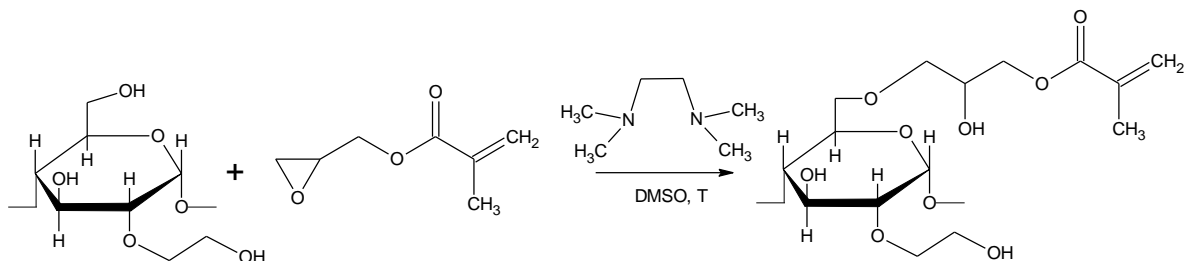


Рисунок 34 - Схема процесса модификации ГЭК

Расчет степени замещения и зависимость степени замещения от количества введенных цепей модификатора, осуществляем исходя из ЯМР спектра реакционной смеси.

Одной из основных характеристик вышеприведенного процесса является молярная степень замещения (МСЗ). Данная величина характеризует долю глюкопиранозных звеньев ГЭК, замещенных хотя бы одним глицидилметакрилатным остатком. Количественное определение МСЗ, изменяющейся в процессе синтеза модифицированного ГЭК, проводили с

помощью ^1H ЯМР-спектроскопии, типичный спектр которого представлен ниже (рисунок 35-39).

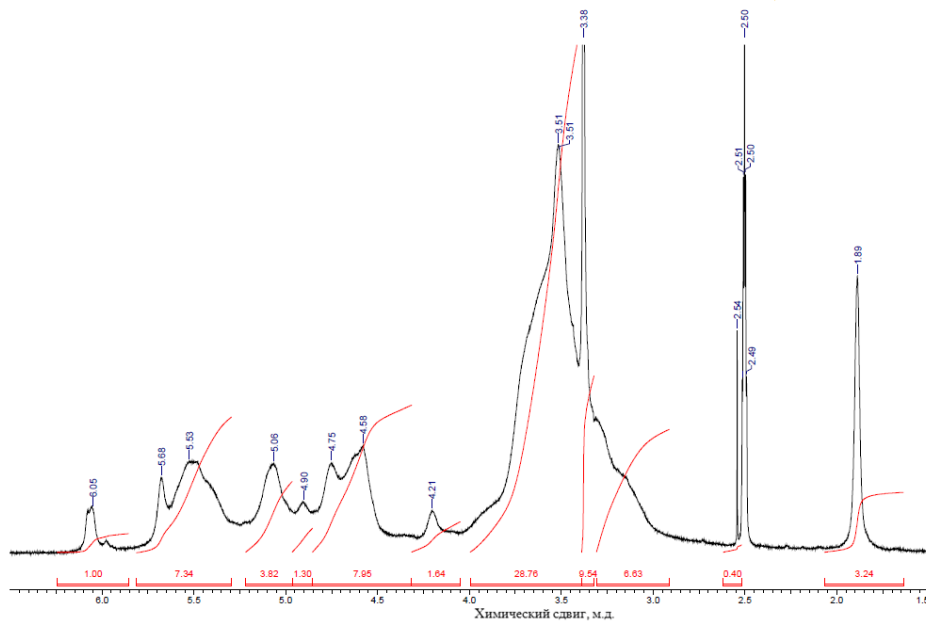


Рисунок 35 - Типичный спектр ЯМР ^1H очищенного образца гидроксиэтилкрахмала, модифицированного глицидилметакрилатом в течение 1 часа от начала реакции

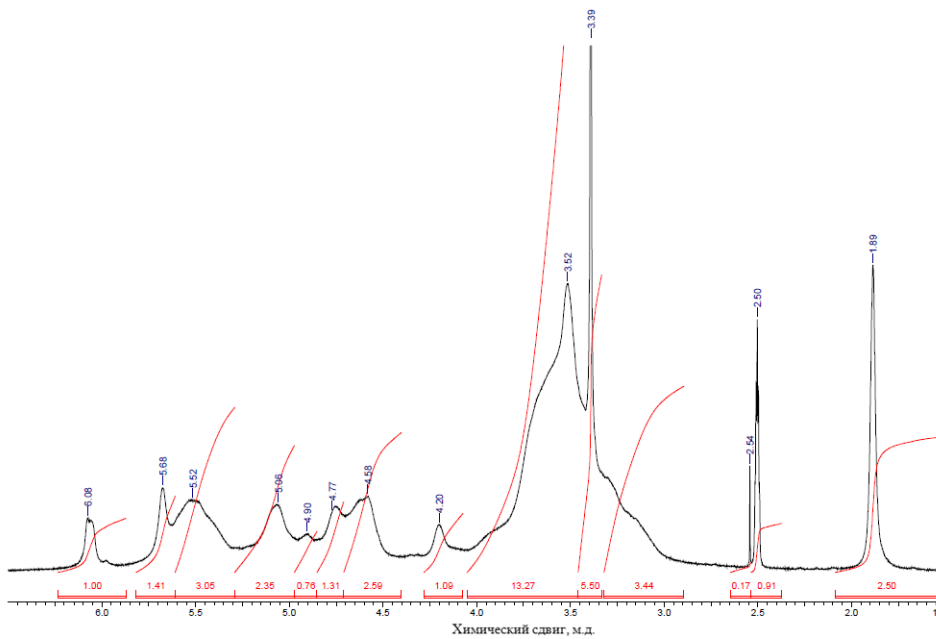


Рисунок 36 - Типичный спектр ЯМР ^1H очищенного образца гидроксиэтилкрахмала, модифицированного глицидилметакрилатом в течение 2 часа от начала реакции

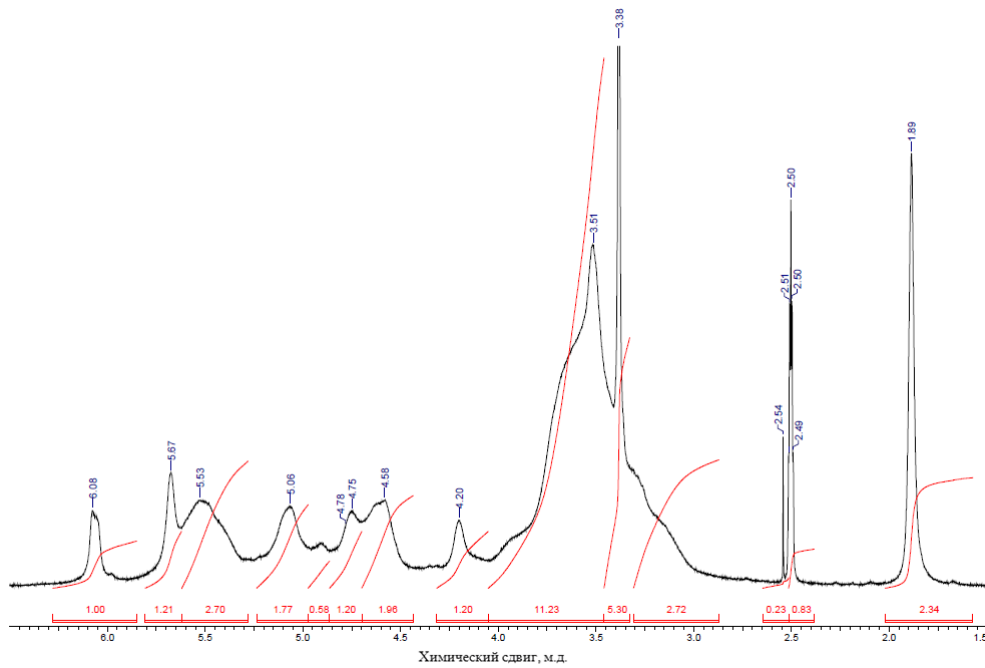


Рисунок 37 - Типичный спектр ЯМР ^1H очищенного образца гидроксиэтилкрахмала, модифицированного глицидилметакрилатом в течение 3 часа от начала реакции

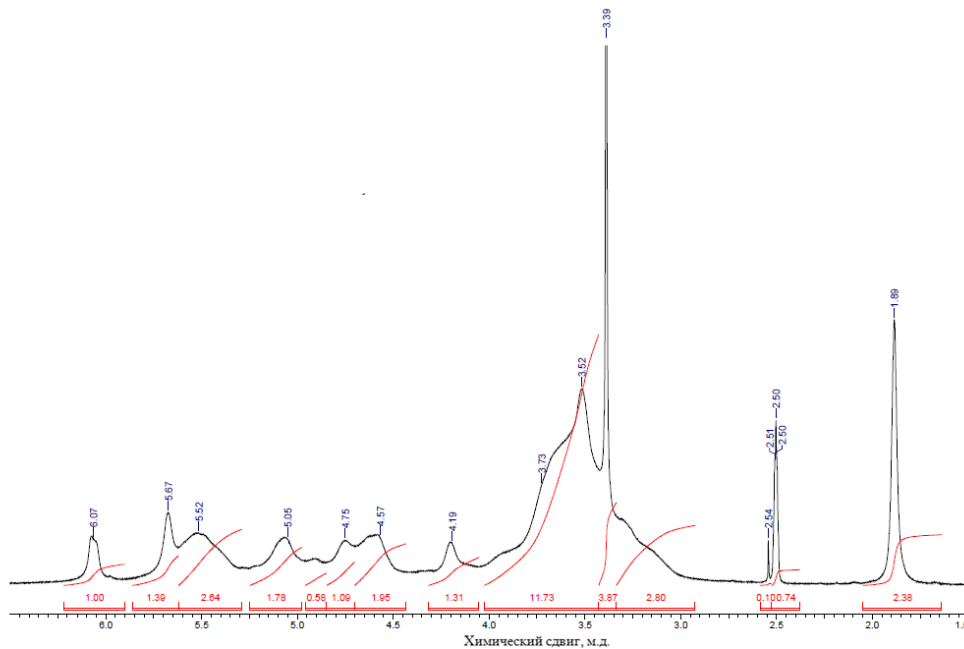


Рисунок 38 - Типичный спектр ЯМР ^1H очищенного образца гидроксиэтилкрахмала, модифицированного глицидилметакрилатом в течение 4 часа от начала реакции

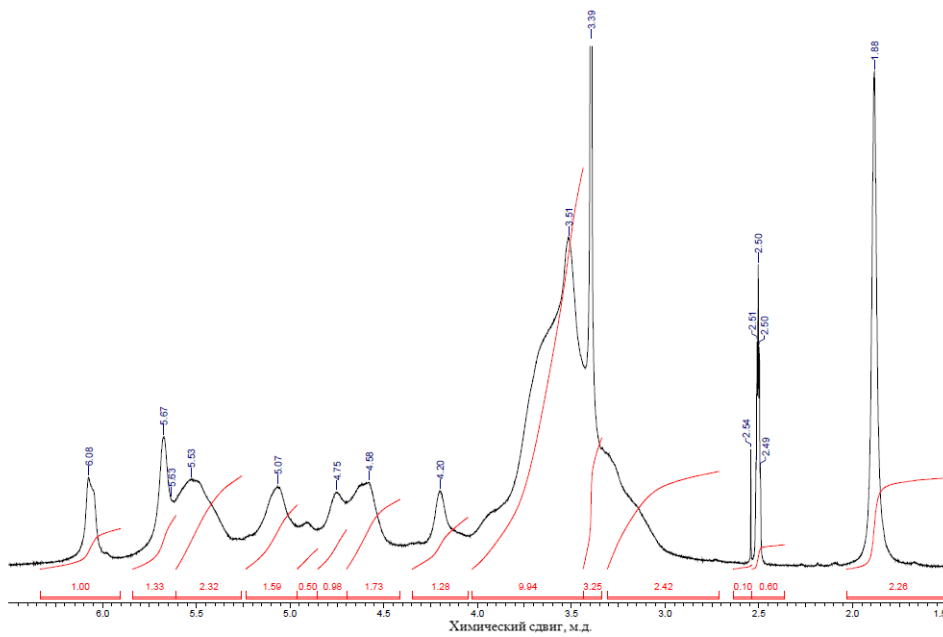


Рисунок 39 - Типичный спектр ЯМР ^1H очищенного образца гидроксиэтилкрахмала, модифицированного глицидилметакрилатом в течение 5 часа от начала реакции

На данных спектрах можно выделить характерный уширенный сигнал аномерных протонов ГЭК (5,5 м.д.), а также сигнал метильной группы остатка ГМА (1,9 м.д.).

Исходя из этого, молярную степень замещения (МСЗ) можно рассчитать по уравнению (12):

$$МСЗ = \frac{\frac{1}{3} I_{\text{CH}_3(\text{ГМА})}}{I_{\text{H}(\text{ГЭК})}} \quad (12)$$

,где $I_{\text{CH}_3(\text{ГМА})}$ – интегральная интенсивность сигнала протонов метильной группы ГМА ($\delta=1.9$ м.д.); $I_{\text{H}(\text{ГЭК})}$ – интегральная интенсивность сигнала аномерных протонов ГЭК ($\delta=5.5$ м.д.).

В процессе синтеза величина МСЗ возрастает (Рисунок 39), однако предельная степень замещения ГЭК глицидилметакрилатом не превышает 35%.

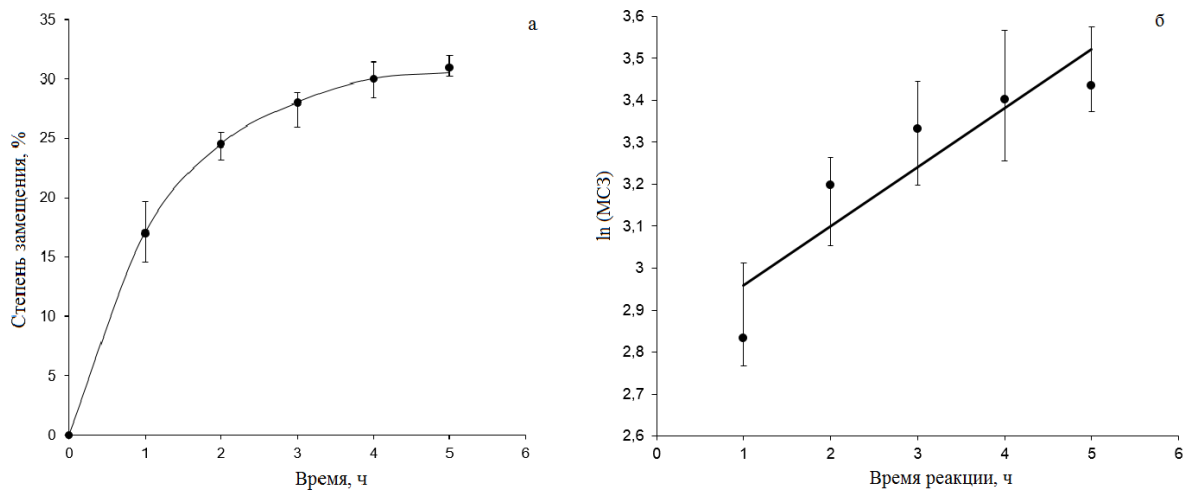


Рисунок 40 - Типичная зависимость молярной степени замещения, полученная при соотношении ГЭК: глицидилметакрилат = 1:0,5 моль/осн-моль (а) и ее полулогарифмическая анаморфоза (б)

Зависимости степени замещения свидетельствуют, что в течение первых трех часов процесс подчиняется уравнению псевдопервого порядка с константой скорости $k=0,15$ л/ч.

Незначительное влияние на МСЗ оказывает соотношение ГЭК/ГМА (Рисунок 41).

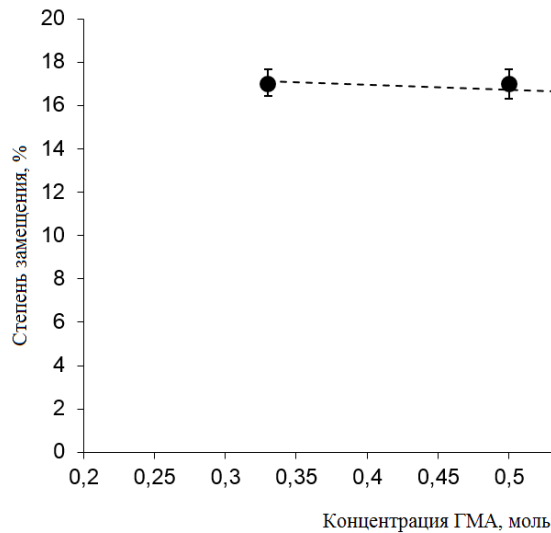


Рисунок 41 - Влияние концентрации глицидилметакрилата на степень замещения, определенную в первый час протекания реакции

Взаимодействие ГМА и ГЭК осложнено протеканием побочных процессов с участием ГМА. В частности, раскрытием эпоксидного цикла при непосредственном взаимодействии с N,N,N,N-тетраметилэтилендиамином (ТМЕДА) и гидролизом ГМА за счет присутствия незначительного количества воды в ДМСО. Помимо этого, в процессе модификации, существенно увеличивается вязкость реакционной среды.

Все это создает значительные трудности количественного описания кинетики взаимодействия ГЭК и ГМА.

Вместе с тем, возможно качественно проследить закономерности изменения степени замещения гидроксигрупп глицидилметакрилатными фрагментами в зависимости от температуры, концентрации глицидилметакрилатных групп и соотношения реагентов. На рисунках 42-44 приведены типичные зависимости для реакций, протекающих при различных условиях.

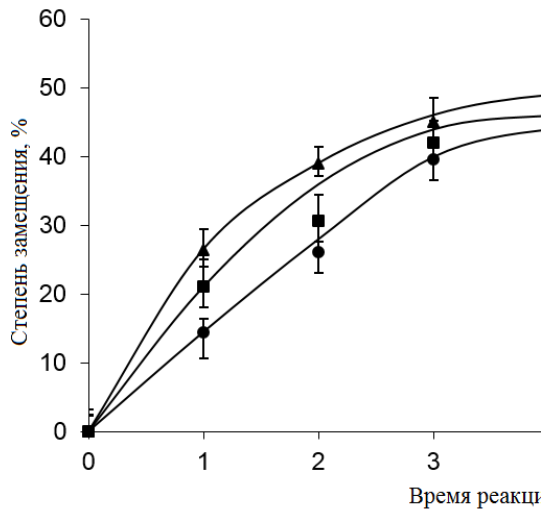


Рисунок 42- Влияние времени протекания процесса на степень замещения полимера при взаимодействии ГЭК и ГМА. Температура: (●) - 80°C, (■)-90 °C, (▲) - 100 °C Соотношение реагентов [ГЭК]/[ГМА] = 1/0,5 (осн.моль/.моль), начальная концентрация ГЭК в ДМСО 10 масс.%

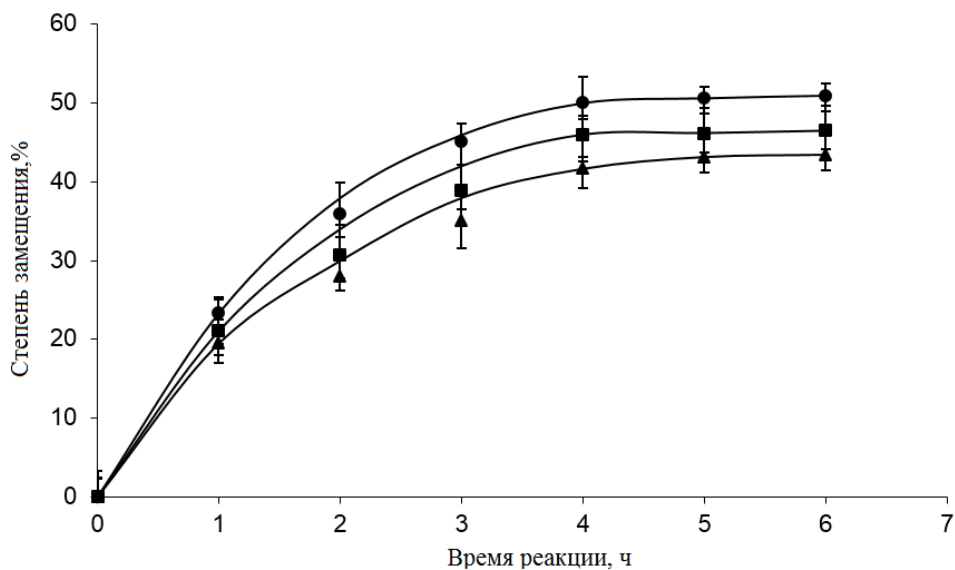


Рисунок 43 - Влияние времени протекания процесса на степень замещения полимера при взаимодействии ГЭК и ГМА. Соотношение реагентов [ГЭК]/[ГМА] : (▲) - 1/0,6 ; (■) - 1/0,5; (●) - 1/0,3 (осн.моль/.моль), Температура протекания реакции - 90 °C , начальная концентрация ГЭК в ДМСО 10 масс.%

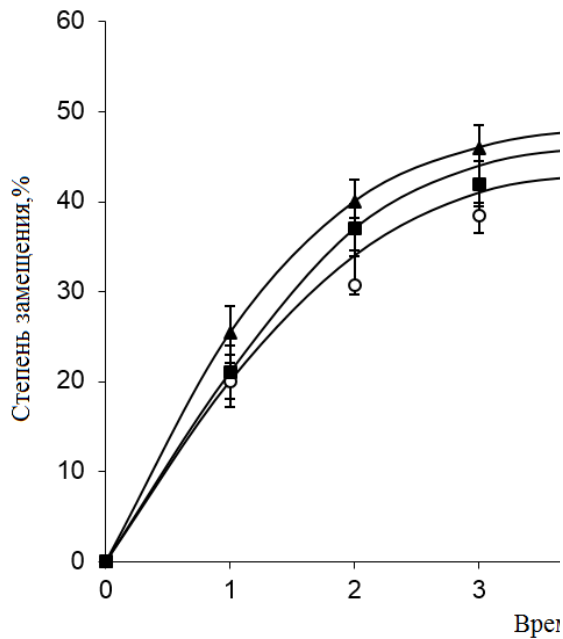


Рисунок 44 - Влияние времени протекания процесса на степень замещения полимера при взаимодействии ГЭК и ГМА. Начальная концентрация ГЭК в ДМСО: (○) - 6 масс.% ; (■) - 10 масс.%; (▲) - 14 масс.% , соотношение реагентов [ГЭК]/[ГМА] - 1 - 1/0,5 (осн.моль/.моль), Температура протекания реакции - 90 °С

Как можно видеть, с ростом температуры, при которой протекал процесс, имело место увеличение скорости реакции и предельной степени замещения (МСЗ), что может свидетельствовать о большей энергии активации основной реакции по сравнению с протекающими параллельно побочными процессами. Характерно, что во всех случаях МСЗ достигается за время около 3÷4 часов.

Согласно полученным данным степень замещения гидроксигрупп остатками глицидилметакрилата в используемых условиях (температура 90 °С, длительность 4 часа) составляла не более 50%, поэтому можно утверждать, что количество ветвлений в расчете на одну макромолекулу исходного ГЭК составляет $0,51 \div 0,53$. Данный факт находится в соответствии с отмеченным ранее значительным увеличением вязкости реакционной среды в процессе протекания реакции, а также тем обстоятельством, что модификация в растворах с концентрацией ГЭК превышающей 10% масс. зачастую вела к образованию сшитых структур. Проведение модификации ГЭК при его эквимолярном соотношении с ГМА также приводило к образованию сшитых продуктов, что вызвало необходимость использования избытка ГЭК. Можно предполагать, что

причиной ветвления является реализация сопряженного присоединения гидроксил-нуклеофилов ГЭК к электронодефицитным двойным связям метакрилатных фрагментов (Рисунок 45).

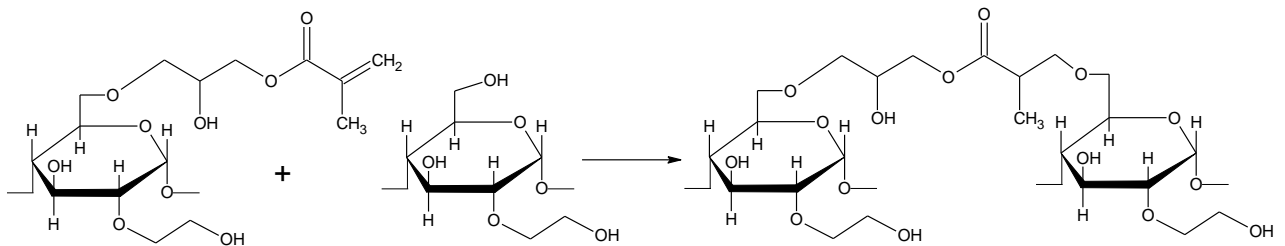


Рисунок 45 - Схема процесса модификации 2 – гидроксипропилкрахмалла

3.2.2 Математическая модель процесса модификации ПВС

Оптимизация условий процесса модификации

Наличие погрешности в эксперименте всегда связано с тем, что всем измерениям сопутствуют взаимодействия большого числа различных факторов, присутствуют погрешности измерения аналитических приборов, а так же всегда существует влияние случайных ошибок. Конечной целью любого исследования является не только выбор оптимальных параметров, но и оценка точности их предсказания.

Проведенное в данной работе исследование относится к пассивным экспериментам. Обработка таких данных может проводиться статистическими методами:

1. Дисперсионным
2. Регрессионном

3.2.2.1 Дисперсионный анализ

При проведении дисперсионного анализа рассматривалась линейная математическая модель (13).

$$y = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_l + \varepsilon_{ijkl} \quad (13)$$

,где μ – суммарный эффект во всех опытах (общее среднее); α_i – эффект фактора А (соотношение ГЭК/ГМА) на i -ом уровне ; β_j – эффект фактора В

(концентрация ГЭК) на j -ом уровне ; γ_1 – эффект фактора С (температура) на l -ом уровне; ε_{ijkl} – ошибка измерения.

Результаты дисперсионного анализа представлены в Таблице 11.

Таблица 11 - Результаты проведенного дисперсионного анализа

Источник дисперсии	Сумма сумм	Число степеней свободы	Средний квадрат	Расчетное значение F-критерия	Уровень значимости
А	388,23	2	194,11	14,12	0,0002
В	127,13	2	63,57	4,63	0,02
С	1442,09	2	721,04	52,46	<0,0001
Ошибка	247,39	18	13,74		
Общая сумма	3296,44	24			

Дисперсионный анализ данных подтвердил значимость всех линейных эффектов. Делаем вывод, что наибольший эффект на степень замещения оказывают следующие факторы: температура и соотношение ГЭК/ГМА.

3.2.2.2 Регрессионный анализ

Для описания линейной зависимости случайной величины от нескольких переменных x_1, x_2, x_3 применяют уравнение множественной регрессии:

$$\hat{y} = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 \quad (14)$$

Уравнение (14) позволяет построить поверхность отклика для двух переменных. Поскольку входящие в уравнение множественной регрессии переменные могут значительно отличаться друг от друга по величине (например, температура, выражаемая в К, и концентрация, выражаемая в долях, будут отличаться на 3÷4 порядка), то необходимо провести их нормирование:

$$y_i^0 = \frac{y_i - \bar{y}}{s_y} \quad (15)$$

$$x_{ji}^0 = \frac{x_{ji} - \bar{x}_j}{s_{x_j}} \quad (16)$$

где y_i^0 и x_{ji}^0 – нормированные значения соответствующих случайных величин y_i и x_{ij} ; \bar{y} и \bar{x}_j – средние значения случайных величин y_i и x_{ij} ; $i = 1, 2, \dots, n$; $j = 1, 2, \dots, k$; s_y и s_{x_j} – среднеквадратичные отклонения:

$$s_y = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}{n - 1}} \quad (17)$$

$$s_{x_j} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_{ji} - \bar{x}_j)^2}{n - 1}} \quad (18)$$

Выборочные коэффициенты корреляции при этом будут равны:

$$r_{y_i^0 \cdot x_{ji}^0}^* = \frac{\sum_{i=1}^n y_i^0 x_{ji}^0}{n - 1} \quad (19)$$

$$r_{x_l^0 \cdot x_m^0}^* = \frac{\sum_{i=1}^n x_{li}^0 x_{mi}^0}{n - 1} \quad (20)$$

поскольку для нормированных переменных $\bar{y}_i^0 = 0$, $\bar{x}_{ji}^0 = 0$, $s_{y^0} = 1$, $s_{x_j^0} = 1$. При этом $l, m = 1, 2, \dots, k$, $l \neq m$.

Коэффициент корреляции, вычисленный для нормированных величин, равен коэффициенту корреляции, вычисленному для величин, выраженных в натуральном масштабе. Необходимо обратить внимание, что уравнение регрессии между нормированными величинами не имеет свободного члена:

$$\hat{y}^0 = a_1 x_1^0 + a_2 x_2^0 + \dots + a_k x_k^0 \quad (21)$$

Коэффициенты уравнения (21) определяют МНК. Система нормальных уравнений для нормированных переменных имеет вид:

$$\llbracket x_{1i}^0 \ x_{ki}^0 \rceil \quad (22)$$

Если умножить правые и левые части входящих в систему уравнений на величину, равную , то получим такую систему уравнений, в которой множителями перед определяемыми недиагональными коэффициентами будут являться выборочные коэффициенты корреляции, согласно уравнениям (19) и (20), а диагональные множители равны единице, поскольку:

$$\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_{ji}^0)^2 = s_{x_{ji}^0}^2 = 1 \quad (23)$$

Система уравнений примет вид:

$$\begin{cases} a_1 + a_2 r_{x_1 x_2}^* + \dots + a_k r_{x_1 x_k}^* = r_{y x_1}^* \\ a_1 r_{x_2 x_1}^* + a_2 + \dots + a_k r_{x_2 x_k}^* = r_{y x_2}^* \\ \dots \\ a_1 r_{x_k x_1}^* + a_2 r_{x_k x_2}^* + \dots + a_k = r_{y x_k}^* \end{cases} \quad (24)$$

Для оценки силы связи множественной регрессии рассчитывают коэффициент множественной корреляции R и поправку к нему R' :

$$R = \sqrt{a_1 r_{y x_1}^* + a_2 r_{y x_2}^* + \dots + a_k r_{y x_k}^*} \quad (25)$$

$$R' = \sqrt{1 - (1 - R^2) \frac{n-1}{n-l}} \quad (26)$$

где n – число опытов; l – число коэффициентов уравнения регрессии.

Коэффициент множественной корреляции лежит в диапазоне $0 \leq R \leq 1$.

После нахождения коэффициентов для уравнения множественной регрессии (2122), выраженного в нормированных переменных, требуется перейти к натуральному масштабу при помощи соотношений:

$$b_j = a_j \frac{s_y}{s_{x_j}} \quad (27)$$

где $j = 1, 2, \dots, k$ и $j \neq 0$.

$$b_0 = \bar{y} - \sum_{i=1}^n b_j \bar{x}_{ji} \quad (28)$$

При наличии параллельных опытов может быть рассчитана дисперсия воспроизводимости и проведен статистический анализ уравнения регрессии.

Результаты параллельных опытов приведены в Таблице 12.

Таблица 12 - Экспериментальные данные

№ опыта	x_1	x_2	x_3	Степень замещения			
				y_1	y_2	y_3	\bar{y}_i
1	0,50	10	80	39,655	46,75	-	44
2	0,50	6	90	44,66	49,5	-	48,4
3	0,50	6	80	30,97	32,4	-	31,79
4	0,50	10	90	50,88	51,43	-	51,15
5	0,67	6	80	25,85	25,58	-	25,85
6	0,67	10	90	48,40	50,38	-	48,95
7	0,67	10	80	26,13	27,39	-	26,95
8	0,67	6	90	43,45	45,65	-	44,539
9	0,50	10	100	57,97	56,27	-	57,75
10	0,50	6	100	53,35	54,01	-	53,625
11	0,33	10	90	56,10	60,50	66,00	57,2
12	0,50	14	90	50,60	55,00	-	53,35
\bar{x}_j	0,54	8,67	88,33	-	-	\bar{y}	45,30
s_{x_j}	0,11	2,61	7,18	-	-	s_y	11,23

Нормированные значения приведены в Таблице 13.

Таблица 13 - Расчётные данные

№	x_1^0	x_2^0	x_3^0	y^0	$y^0 x_1^0$	$y^0 x_2^0$	$y^0 x_3^0$	$x_1^0 x_2^0$	$x_1^0 x_3^0$	$x_2^0 x_3^0$
1	-0,40	0,51	-1,16	-0,12	0,05	-0,06	0,13	-0,21	0,47	-0,59
2	-0,40	-1,02	0,23	0,28	-0,11	-0,28	0,06	0,41	-0,09	-0,24
3	-0,40	-1,02	-1,16	-1,20	0,48	1,23	1,40	0,41	0,47	1,19
4	-0,40	0,51	0,23	0,52	-0,21	0,27	0,12	-0,21	-0,09	0,12
5	1,21	-1,02	-1,16	-1,73	-2,09	1,77	2,01	-1,23	-1,40	1,19
6	1,21	0,51	0,23	0,33	0,39	0,17	0,08	0,62	0,28	0,12
7	1,21	0,51	-1,16	-1,63	-1,97	-0,84	1,90	0,62	-1,40	-0,59
8	1,21	-1,02	0,23	-0,07	-0,08	0,07	-0,02	-1,23	0,28	-0,24
9	-0,40	0,51	1,63	1,11	-0,45	0,57	1,80	-0,21	-0,65	0,83
10	-0,40	-1,02	1,63	0,74	-0,30	-0,76	1,21	0,41	-0,65	-1,66
11	-2,01	0,51	0,23	1,06	-2,13	0,54	0,25	-1,03	-0,47	0,12
12	-0,40	2,05	0,23	0,72	-0,29	1,47	0,17	-0,82	-0,09	0,48

Рассчитаем выборочные коэффициенты корреляции по уравнениям (19) и (20) и, используя их, запишем систему линейных уравнений (24):

$$\begin{cases} a_1 - 0,22 \cdot a_2 - 0,31 \cdot a_3 = -0,61 \\ -0,22 \cdot a_1 + a_2 + 0,06 \cdot a_3 = 0,38 \\ -0,31 \cdot a_1 + 0,06 \cdot a_2 + a_3 = -0,83 \end{cases} \quad (29)$$

Решив систему линейных уравнений, получим следующий вид уравнения множественной регрессии в нормированных переменных:

$$\hat{y}^0 = -0,33 \cdot x_1^0 + 0,26 \cdot x_2^0 + 0,71 \cdot x_3^0 \quad (30)$$

По уравнениям (2526) и (2627) рассчитаем коэффициент множественной корреляции и поправку к нему: $R = 0,94$ и $R' = 0,92$, что позволяет говорить о наличии выраженной функциональной зависимости.

В соответствии с выражениями (27) и (28) пересчитаем коэффициенты a_i и запишем уравнение множественной регрессии в натуральном масштабе:

$$\hat{y} = -43,53 - 35,07 \cdot x_1 + 1,12 \cdot x_2 + 1,11 \cdot x_3 \quad (31)$$

По полученной регрессионной зависимости были найдены значения в экспериментальных точках (Таблица 15) и проведен регрессионный анализ, который показал, что уравнение адекватно экспериментальным данным.

Таблица 14 - Сравнение экспериментальных и рассчитанных по регрессионной зависимости данных

Эксперимент	Модель	Диаграмма «измерено-предсказано»
44,00	39,02	
48,40	45,65	
31,79	34,54	
51,15	50,13	
25,85	28,58	
48,95	44,17	
26,95	33,06	
44,54	39,69	
57,75	61,24	
53,63	56,76	
57,20	56,10	

На диаграмме «измерено- предсказано» практически все данные лежат на прямой, что говорит о высокой предсказательной способности найденной модели.

3.2.3 Физико-механическая характеристика образцов модифицированного ГЭК

Молекулярно-весовые характеристики исходного и модифицированного ГЭК определяли посредством метода ситовой (экслюзионной) хроматографии с использованием детектора многоугольного лазерного светорассеяния и дифференциального рефрактометра (ЭХ-МУЛС-ДР).

О замещении части гидроксильных групп на метакрилатные фрагменты свидетельствует прирост молекулярной массы исходного ГЭК после модификации ГМА по данным экслюзионной хроматографии (Таблица 15). При двукратном мольном избытке ГЭК в расчете на звено по отношению к ГМА, длительности реакции 3 часа и температуре 90⁰С, средневесовая молекулярная масса (M_w) изменяется с 198,7±4,7кДа до 353,2±4,2 кДа. При этом, однако, параметр полидисперсности уменьшается с 3,5 до 3,11. Это, безусловно, связано с увеличением степени замещения до 45-50%, хотя также не следует исключать процессы присоединения молекул ГЭК друг к другу через «мостики» ГМА. Как можно видеть на дифференциальных кривых ММР (рисунок 47), распределение продолжает оставаться унимодальным, хотя и достаточно широким.

Таблица 15 - Влияние модификации гидроксиэтилкрахмала (4 часа) глицидилметакрилатом на его свойства

Параметры	Исходный гидроксиэтилкрахмал	Модифицированный гидроксиэтилкрахмал
M_w , кДа	198.7±4.7	353.2±4.2
M_w/M_n	3.5	3.11
T_n , °С	255	242.5
$T_{5\%}$, °С	290	294
T_g , °С	244	191,7

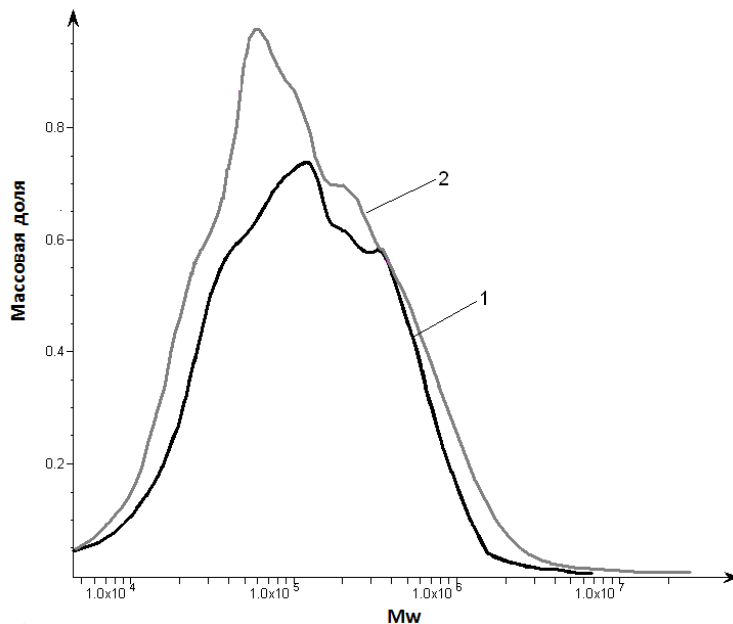


Рисунок 46 - Дифференциальные кривые молекулярно-массового распределения исходного - (1) и модифицированного в течение трех часов при температуре 90 °С - (2) образцов ГЭК

Рост степени замещения, определенный по данным эксклюзионной хроматографии, в предположении о постоянстве степени полимеризации, ведет к значению равному 130% превышающему 100%, что может свидетельствовать о наличии процессов, ведущих к разветвлению цепи полимера и изменению степени его полимеризации.

Также методом ДСК были определены температуры стеклования метакрилатных производных ГЭК с различными степенями замещения (Рисунок 47-48). Для этого выделяли продукты модификации ГЭК глицидилметакрилатом (полученные при температуре 90 °С через 1 час и 4 часа после начала реакции). Температуры стеклования исходного ГЭК и продуктов его модификации через 1 час и 4 часа после начала реакции составляют 191; 215 и 243 °С соответственно.

На термограммах исходного и модифицированного ГЭК, полученных при первом сканировании (Рисунок 47), в области 50-300 °С отчетливо виден эндотермический пик, очевидно принадлежащий растворителю (воде),

содержащейся в образце. Для продуктов синтеза, получаемых в среде диметилсульфоксида, дополнительно фиксируется высокотемпературный эндотермический пик в области 130-240 °С, очевидно, обусловленный наличием остаточного ДМСО. Таким образом, лиофильная сушка продукта модификации ГЭК не приводит к его полному избавлению от растворителей, что необходимо учитывать при его анализе (поправка на содержание основного вещества), а также при приготовлении композиций на его основе.

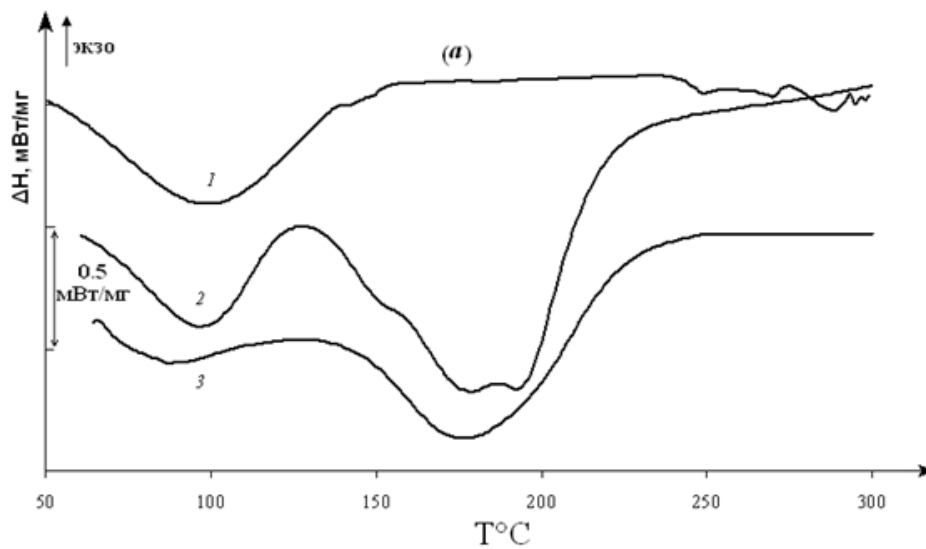


Рисунок 47 -Типичные термограммы исходного (1) и модифицированного (2, 3) ГЭК, полученные при первом сканировании. Время синтеза модифицированного ГЭК – 1 (2) или 4 (3) часа

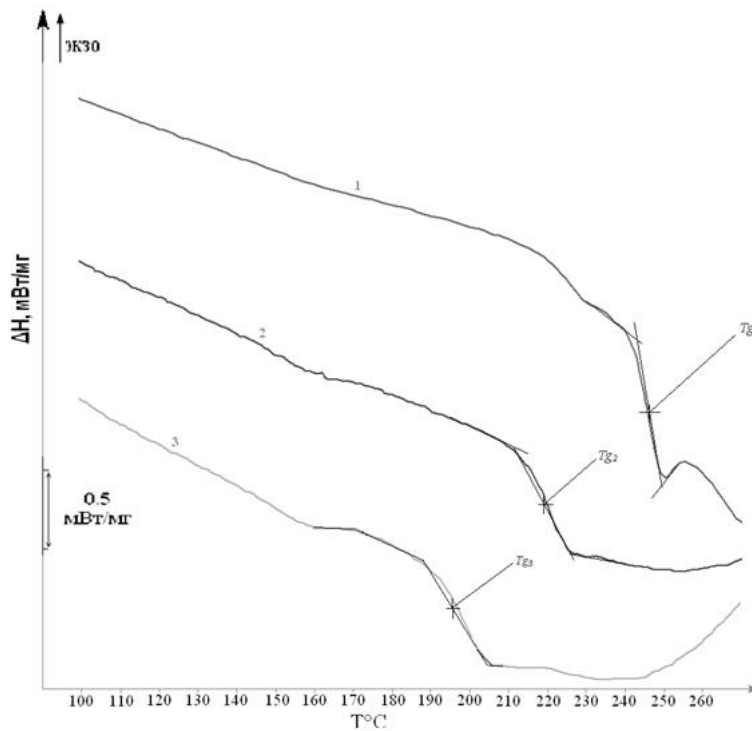


Рисунок 48 -Типичные термограммы исходного (1) и модифицированного (2, 3) ГЭК, полученные при втором сканировании. Время синтеза модифицированного ГЭК – 1 (2) или 4 (3) часа

Повторное сканирование тех же образцов (Рисунок 48) показывает, что растворителя в них больше нет; при этом в области температур $190\div 250$ °С четко выражены переходы стеклования, смещающиеся в область более низких температур при увеличении времени синтеза модифицированного ГЭК. Это обусловлено тем, что в продукте с увеличением времени синтеза возрастает количество метакриловых фрагментов, оказывающих пластифицирующий эффект.

Температура стеклования продукта закономерно зависит от времени синтеза, а между молярной степенью замещения и T_g (температурой стеклования) наблюдается прямая корреляция (Рисунок 49).

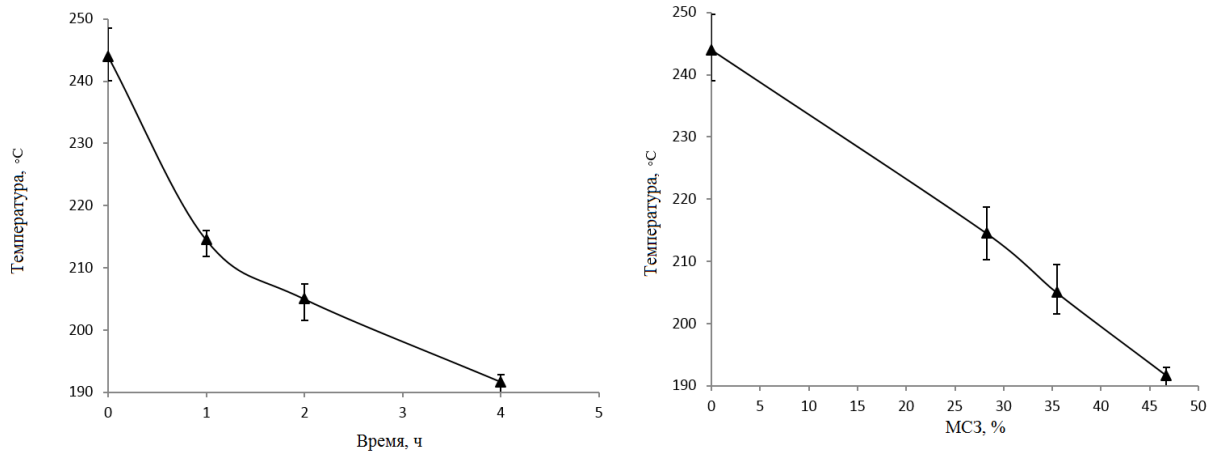


Рисунок 49 - Зависимость температуры стеклования модифицированного ГЭК от времени синтеза для соотношения ГЭК: глицидилметакрилат = 1:0,5 осн. моль/моль

Таким образом, контроль синтеза модифицированного глицидилметакрилатом ГЭК, можно осуществлять также и по значению T_g .

Проведенные исследования показали также, что введение метакрилатных групп оказывает пластифицирующий эффект, причем между величиной понижения температуры стеклования (ΔT_g) и мольной степенью замещения (n) имеется линейная корреляция:

$$\Delta T_g = 0,82n - 0,66 \quad (32)$$

с коэффициентом достоверности 0.996.

Полученный результат свидетельствует о выполнении правила «мольных долей» Журкова, часто справедливого при пластификации полярных полимеров.

3.3 Исследование процессов гелеобразования в растворах м-ПВС и м-ГМА

3.3.1 Изучение процессов гелеобразования, протекающих при положительных температурах

Для получения полимерных гидрогелей на основе м-ПВС и м-ГМА была использована сшивка по свободно-радикальному механизму с использованием веществ-инициаторов.

В качестве иницирующих систем при комнатной температуре были использованы:

- «персульфат калия - N,N,N'N'- тетраметилэтилендиамин» (ПСК–ТМЭД). Данная система обеспечивает высокую воспроизводимость результатов в широком интервале температур. Она характеризуется сравнительно высокой токсичностью.
- «пероксид водорода - аскорбиновая кислота» (ПВ-АК). Преимуществом системы является ее меньшая, по сравнению с упомянутой выше системой, токсичность, что позволяет потенциально формировать полимерные гидрогели *in vivo*.

При проведении процесса при повышенных температурах использовался персульфат калия (ПСК).

При изучении динамики образования гидрогелей было установлено, что во всем интервале значений использованных концентраций реагентов процесс сшивки протекает эффективно и время сшивки варьируется от десятков секунд до нескольких минут (рисунок 50,51).

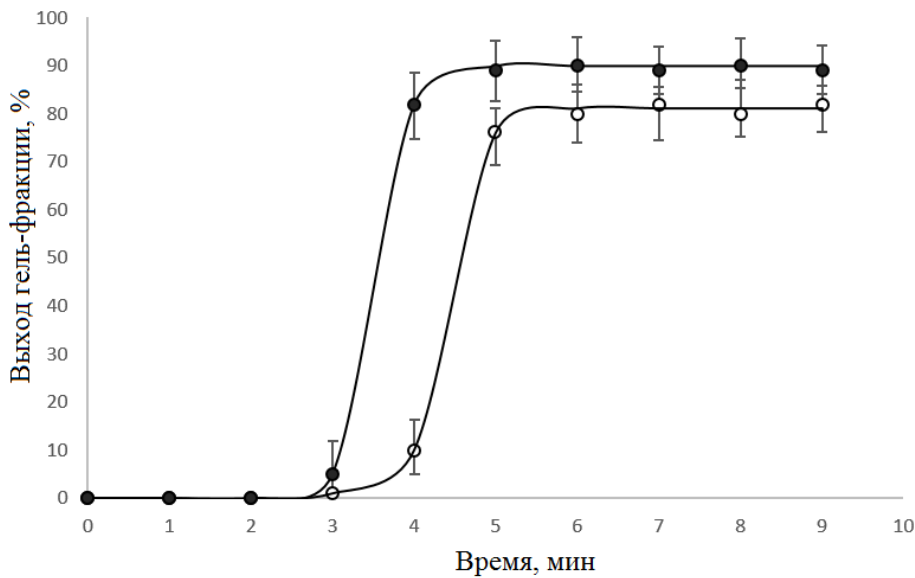


Рисунок 50 - Зависимость выхода гель-фракции полимерной системы с общей концентрации модифицированных полимеров 8 г/100 мл, степень замещения м-ПВС- 2,8 мольн.%, ГЭК – 30,4 мольн.%, время протекания реакции 30 минут. (●)- иницирующая система ПВ-АК(20 °С), (○)- иницирующая система ПСК-ТМЭД (20 °С)

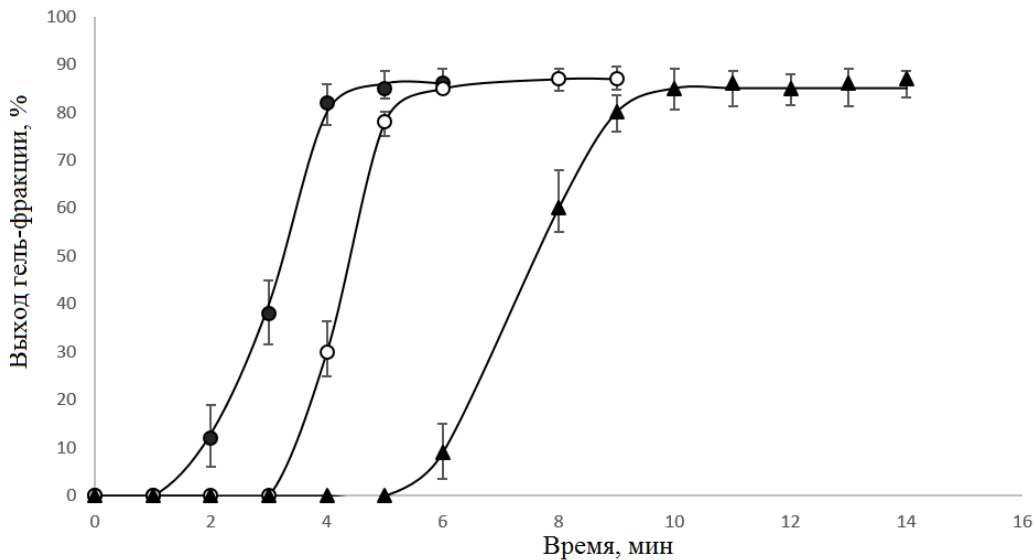


Рисунок 51 - Зависимость выхода гель-фракции полимерной системы с общей концентрации модифицированных полимеров 8 г/100 мл, степень замещения м-ПВС- 2,8 мольн.%, ГЭК – 30,4 мольн.%, время протекания реакции 30 минут. Концентрация иницирующей системы ПСК-ТМЭД: (▲)- 1,5 г/л (○)- , 2,5 г/л, (●) – 4 г/л

Как видно из приведенных графиков в системе происходит быстрое нарастание вязкости и образованием гель-фракции. В случае низких концентраций инициатора идет возникновение нескольких «очагов» гелеобразования, объединяющихся впоследствии в монолитный гидрогель. На рисунках 52 и 53 показано влияние количества вводимого инициатора на процесс образования макрогеля.

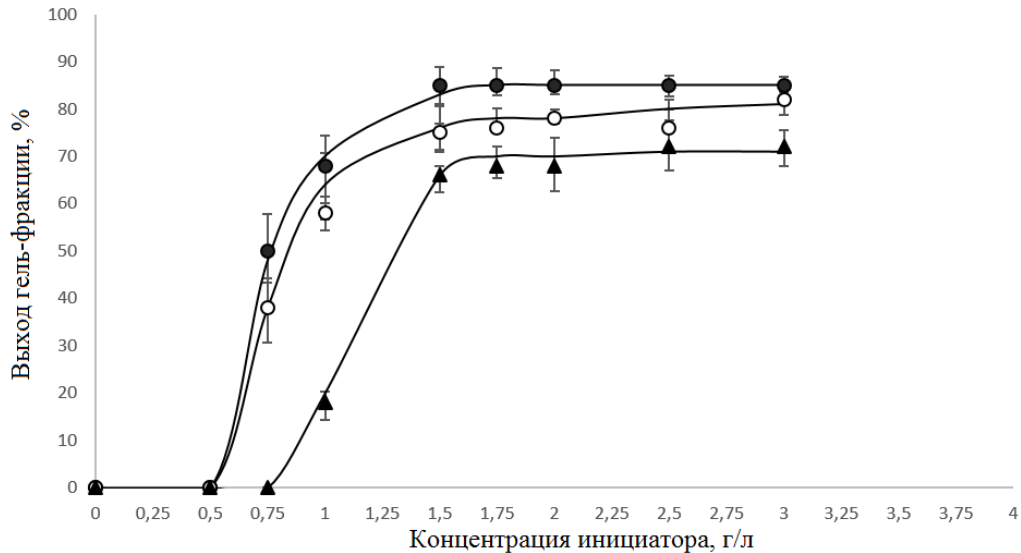


Рисунок 52 – Влияние концентрации инициатора на выход гель-фракции. Общая концентрация модифицированных полимеров 8 г/100 мл, степень замещения м-ПВС- 2,8 мольн.%, ГЭК – 30,4 мольн.%, время протекания реакции 30 минут. (●)- «ПСК-ТМЭД», м-ПВС/м-ГЭК=90/10, (○) – «ПСК-ТМЭД», м-ПВС/м-ГЭК=70/30, (▲) – ПСК, 80°С, м-ПВС/м-ГЭК=90/10

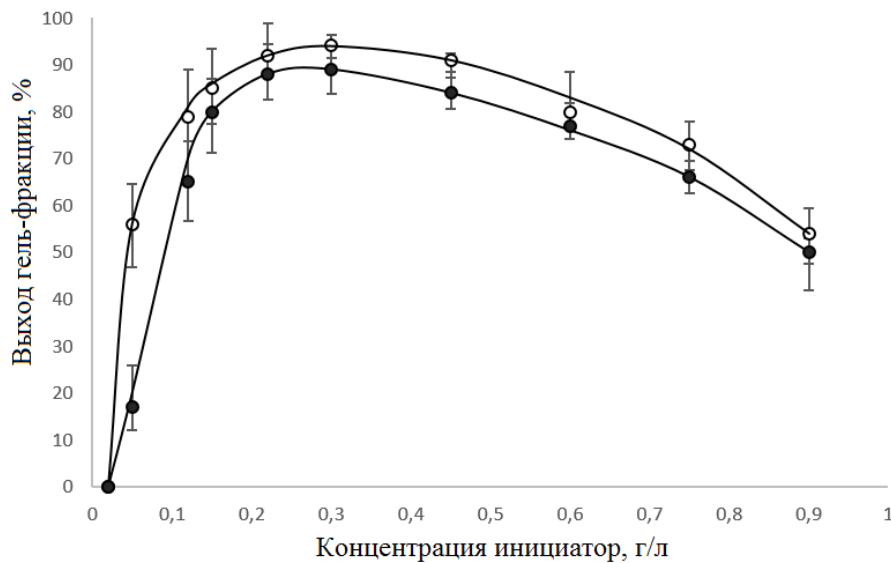


Рисунок 53 – Влияние концентрации инициатора на выход гель-фракции. Иницирующая система - «ПВ-АК». (○) м-ПВС/м-ГЭК=90/10, (●) – м-ПВС/м-ГЭК=70/30. Общая концентрация модифицированных полимеров 8 г/100 мл, степень замещения м-ПВС- 2,8 мольн.%, ГЭК – 30,4 мольн.%, время протекания реакции 30 минут.

Следует отметить существование критической концентрации инициатора, ниже которой не образуется макрогель. Вероятно, это обусловлено отсутствием достаточного количества узлов сшивки. По достижении критической концентрации инициатора идет быстрый рост выхода гель-фракции.

Если в качестве инициатора применялась система «персульфат калия - ТМЭД», то зависимость выхода от концентрации выходила на «плато». При использовании же системы, содержащей перекись водорода, зависимость имела экстремальный характер. Скорее всего, это обусловлено побочной реакцией распада перекиси водорода, сопровождающейся выделением избыточного количества кислорода, являющегося эффективным «обрывателем» радикальной полимеризации. Наличие кислорода объясняет также и плохую воспроизводимость результатов. Исходя из этого, в последующих исследованиях для изучения строения полимерных гидрогелей использовалась система «персульфат калия – N,N,N'N'-тетраметилэтилендиамин».

На рисунках 54-58 изображены типичные зависимости, характеризующие влияния концентрации ненасыщенных полимеров в реакционной системе на выход гидрогелей.

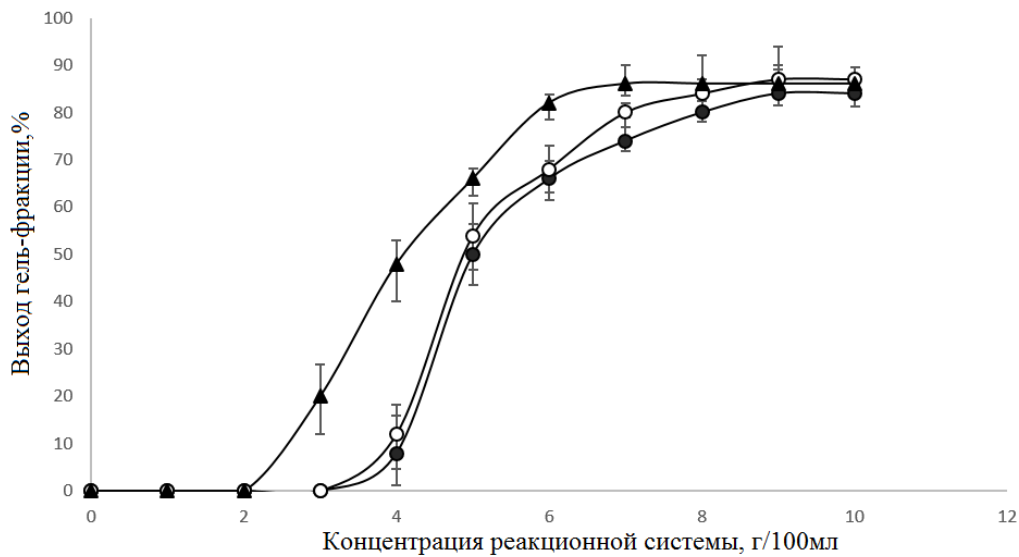


Рисунок 54 - Зависимость выхода гидрогелей на основе м-ПВС от концентрации полимера.

Инициатор «ПСК-ТМЭД», 2,5 г/л, температура 20 °С, время 30 минут, Степень замещения м-ПВС: (●)- 1,8 мольн.%, (○)- 2,8 мольн.%, (▲) – 4,5 мольн.%

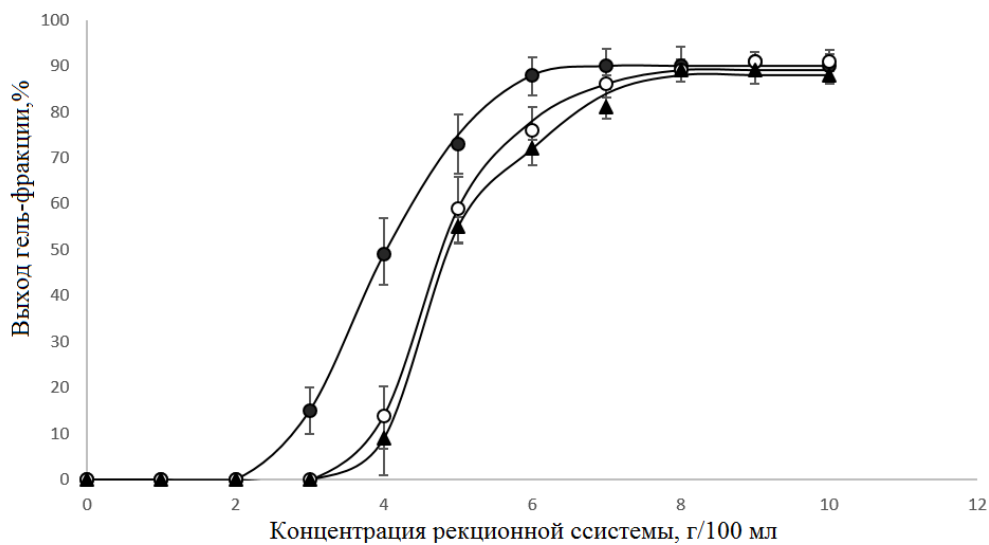


Рисунок 55 - Зависимость выхода гидрогелей на основе м-ПВС от концентрации полимера.

Инициатор «ПВ-АК», 0,25 г/л., температура 20 °С, время – 30 минут.
 Степень замещения м-ПВС: (●)-4,5 мольн.%, (○)- 2,8 мольн.%, (▲) – 1,8 мольн.%

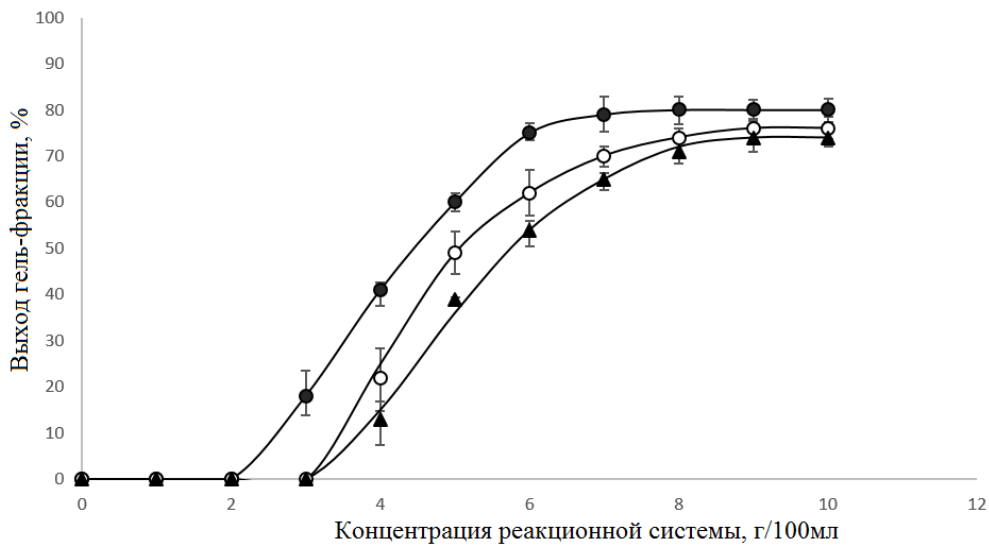


Рисунок 56 - Зависимость выхода гидрогелей на основе м-ПВС от концентрации полимера.

Инициатор ПСК, 2,5 г/л., температура 80 °С, время 1 час. Степень замещения м-ПВС: (●)-4,5 мольн.%, (○)- 2,8 мольн.%, (▲) – 1,8 мольн.%

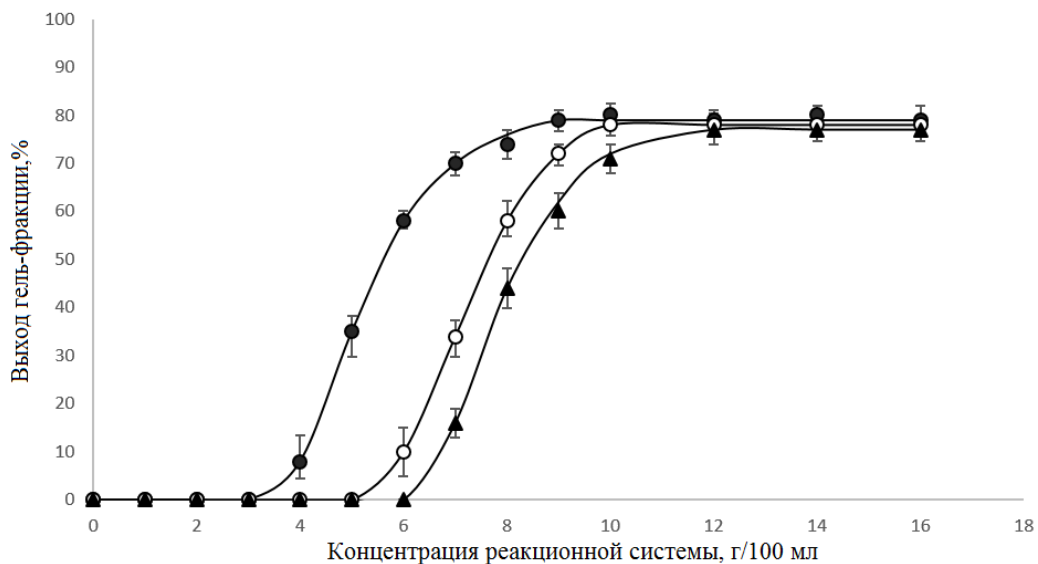


Рисунок 57 – Зависимость выхода гидрогелей на основе м-ГЭК от концентрации полимера.

Инициатор «ПВ-АК», 0,25 г/л., температура 20 °С, время – 30 минут. Степень замещения м-ГЭК: (●)- 20,8 мольн.%, (○)- 30,4 мольн.%, (▲) – 40,8 мольн.%

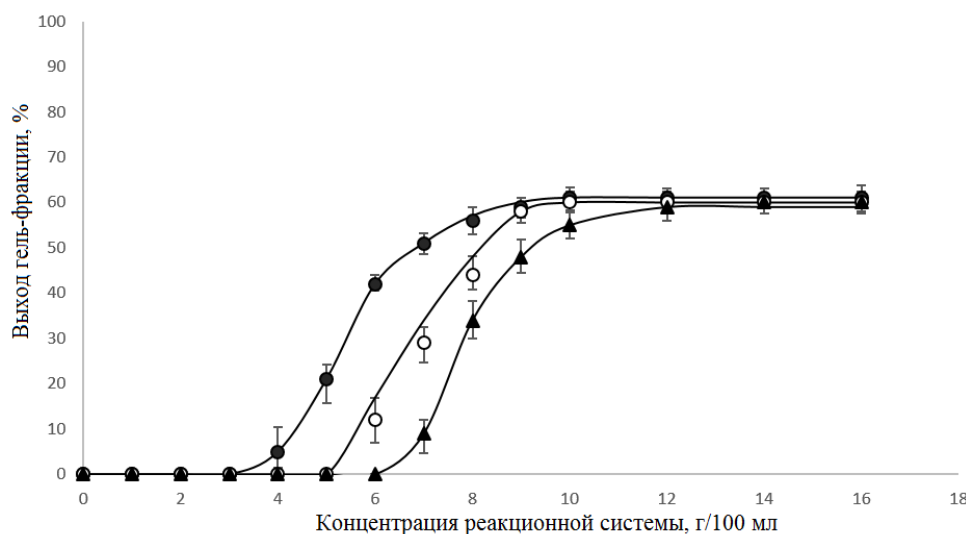


Рисунок 58 – Зависимость выхода гидрогелей на основе м-ГЭК от концентрации полимера.

Инициатор «ПСК-ТМЭД», 2,5 г/л., температура 20 °С, время – 30 минут. Степень замещения м-ГЭК: (●)- 20,8 мольн.%, (○)- 30,8 мольн.%, (▲) – 40,4 мольн.%

Как можно видеть из приведенных графических зависимостей, влияние концентрации полимера в реакционной системе на выход гель-фракции имеет критический характер для обоих полимеров. Ожидаемо критическая концентрация, ниже которой не наблюдается образования макрогеля, зависит от степени замещения полимера. Характерно, что, что критическая концентрация гелеобразования в растворах м-ГЭК заметно выше, вопреки на заметно большей молекулярной массе и, как следствие, меньшей концентрации обеспечивающей перекрытие макромолекулярных клубков, массе этого полимера. Данный факт, очевидно, может быть связан с меньшей доступностью ненасыщенных метакрильных групп.

В силу этого увеличение доли модифицированного ПВС в смеси «м-ПВС–м-ГЭК» ведет к заметному снижению критической концентрации гелеобразования

реакционной системы (рисунок 59 и 60). При этом снижение данного параметра по мере увлечения доли поливинилового спирта имеет нелинейный вид.

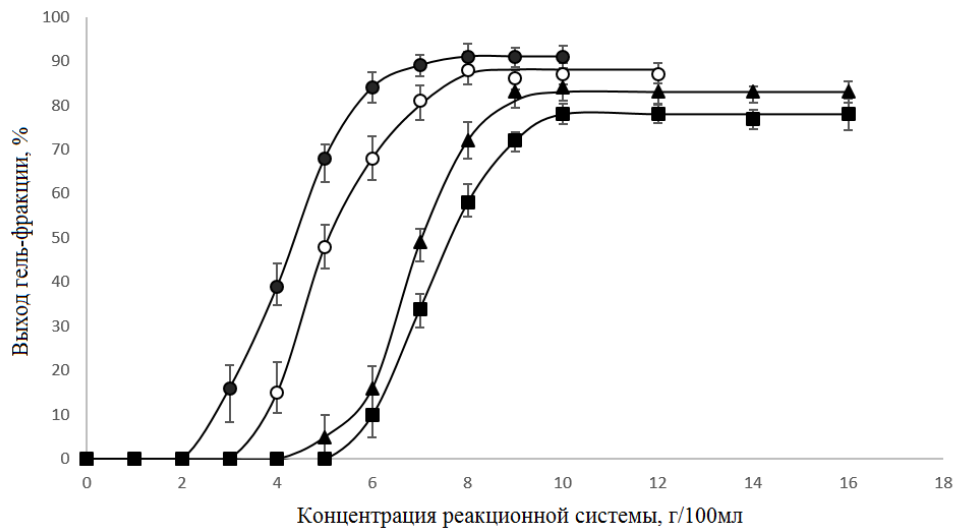


Рисунок 59 – Зависимость выхода гидрогелей на основе м-ПВС и м-ГЭК от концентрации полимеров.

Инициатор «ПВ-АК», 0,25 г/л., время 30 минут, температура 20 °С. Степень замещения полимера: м-ПВС – 4,8 мольн.%, м-ГЭК – 40,8 мольн.%. Соотношение полимеров: (●) – м-ПВС/м-ГЭК=90/10, (○) – м-ПВС/м-ГЭК=50/50, (▲) – м-ПВС/м-ГЭК=10/90, (■) – м-ПВС/м-ГЭК=0/100

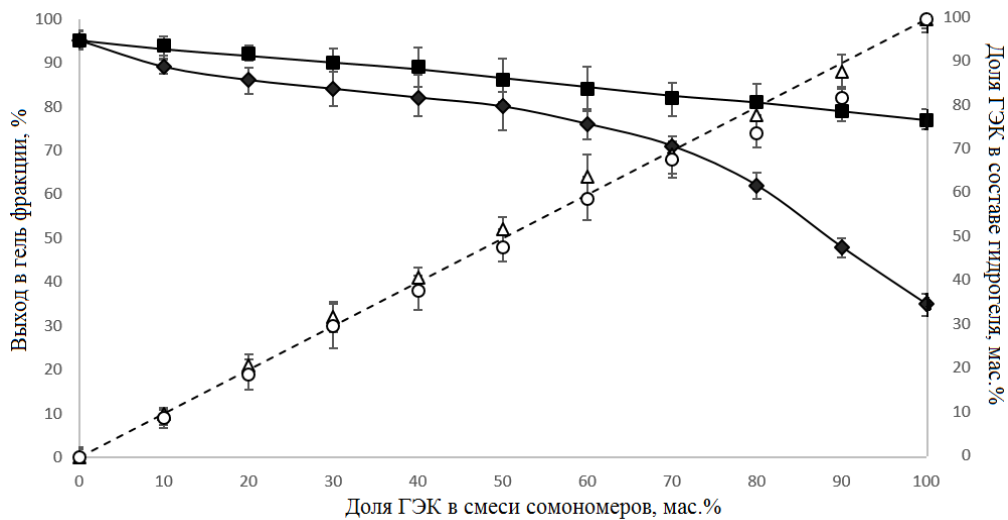


Рисунок 60 - Выход ((■),(◆)) и состав гелевой фракции ((Δ), (○)) при различном соотношении сомономеров. Инициатор «ПВ-АК», 0,25 г/л, время 30 минут, температура 20 °С. Степень замещения полимеров: м-ПВС – 4,8 мольн.%, м-ГЭК – 40,8 мольн.%. Суммарная концентрация модифицированных полимеров: (◆), (○) – 8 г/100 мл., (■), (Δ) – 12 г/100 мл

При этом, как следует из рисунка 60, во всем интервале изменяемых параметров соотношение звеньев сомономеров в составе гидрогелей было близко к их соотношению в исходной смеси.

3.3.2 Изучение процессов гелеобразования, протекающих в криоусловиях

3.3.2.1 Изучение закономерностей процессов гелеобразования, протекающих в криоусловиях.

Наибольший практический интерес с позиций применения в областях, связанных с использованием методов тканевой и клеточной инженерии, представляют макропористые полимерные гидрогели.

Наличие в структуре системы крупных связанных пор обеспечивают таким материалам ряд уникальных свойств:

- высокую удельную поверхность;
- доступность функциональных групп;

- исключение диффузионных затруднений при сорбции и десорбции веществ

На сегодняшний день разработан ряд методов для создания данных систем:

- полимеризация в присутствии специальных порообразователей [250];
- сублимационная сушка полимерных гидрогелей после набухания [251];
- полимеризация в присутствии нерастворимой мелкодисперсной гетерофазы (глюкоза, сахароза, NaCl), в дальнейшем вымываемой;
- проведение полимеризации в присутствии веществ, обладающих растворимостью в мономере, но нерастворимых в полимере [252];
- формирование сетчатой структуры в присутствии гетерофазы замороженного растворителя [253]

Каждый из методов имеет свои преимущества и недостатки.

В данном исследовании при создании макропористых гидрогелей был использован метод криополимеризации в системе «закристаллизованный растворитель (вода) - некристаллизующийся мономер».

Преимуществом данного метода является возможность посредством варьирования условий проведения процесса в широком интервале изменять свойства конечного продукта и, как следствие, получать материалы с требуемыми характеристиками.

Поскольку в криоусловиях изменения физико-химических свойств и реакционной способности участвующих в реакции соединений невозможно предсказать путем экстраполяции характеристик системы, в ходе исследования было оценено влияния на процесс формирования макропористых гидрогелей следующих факторов:

- концентрация реакционной системы;
- соотношения сомономеров;
- температуры;
- количество вводимого инициатора

Реакции проводились в диапазоне концентраций полимеров в реакционной смеси от 1 до 14 масс.%, иницирующей системы – от 0,2 до 2 мг/мл, температур - от минус 5 до минус 30 °С. В качестве иницирующей системы использовалась система «ПСК-ТМЭД».

Эффективностью процесса гелеобразования определяется скоростью потери системой текучести и выходом гель - фракции. В случае протекания процесса в криоусловиях достоверно установить время достижения гель-точки весьма затруднительно, в силу этого, главным показателем становится выход гель - фракции.

На предварительном этапе исследований было реализовано замораживание растворов модифицированных полимеров с концентрациями от 1 до 25 масс.% и их последующая выдержка в течение 24 часов при температуре 9 минус 25 °С, с последующим размораживанием. После размораживания системы образование физических гидрогелей наблюдалось только лишь в растворах модифицированного поливинилового спирта (при концентрации 16 масс.% и более). В силу этого можно констатировать, что в рабочем интервале использованных в работе в дальнейшем концентраций гелеобразование проходило за счет формирования межмолекулярных химических сшивок.

На рисунках 61-63 представлены зависимости, описывающие влияние концентрации реакционной системы на процесс криотропного гелеобразования.

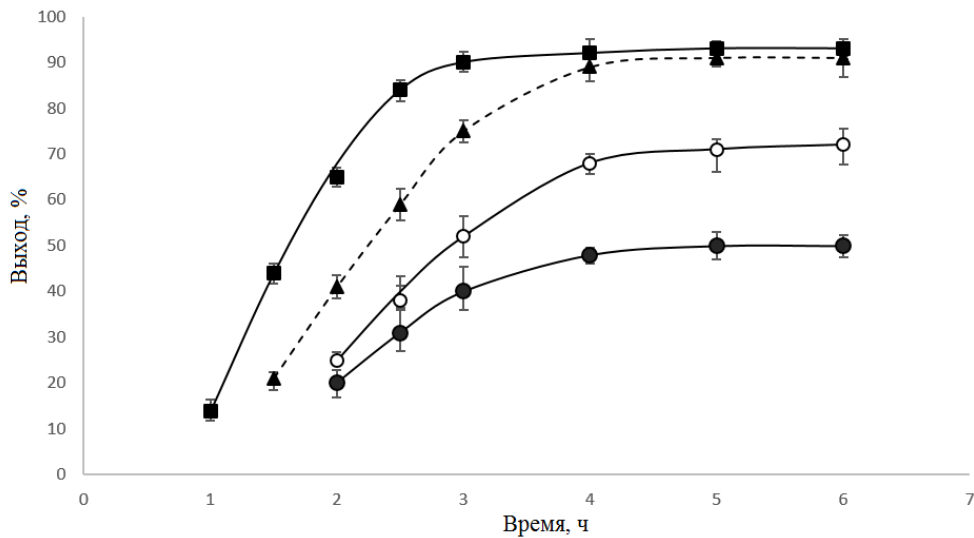


Рисунок 61 - Зависимость выхода макропористых криогелей, сформированных на основе м-ПВС от времени. Концентрация полимера : (●)- 2, (○)- 4, (▲) - 6, (■) - 8 г/100 мл.

Концентрация иницирующей системы– 1 мг/мл, температура – минус 15 °С, степень замещения м-ПВС – 4,8 мольн. %

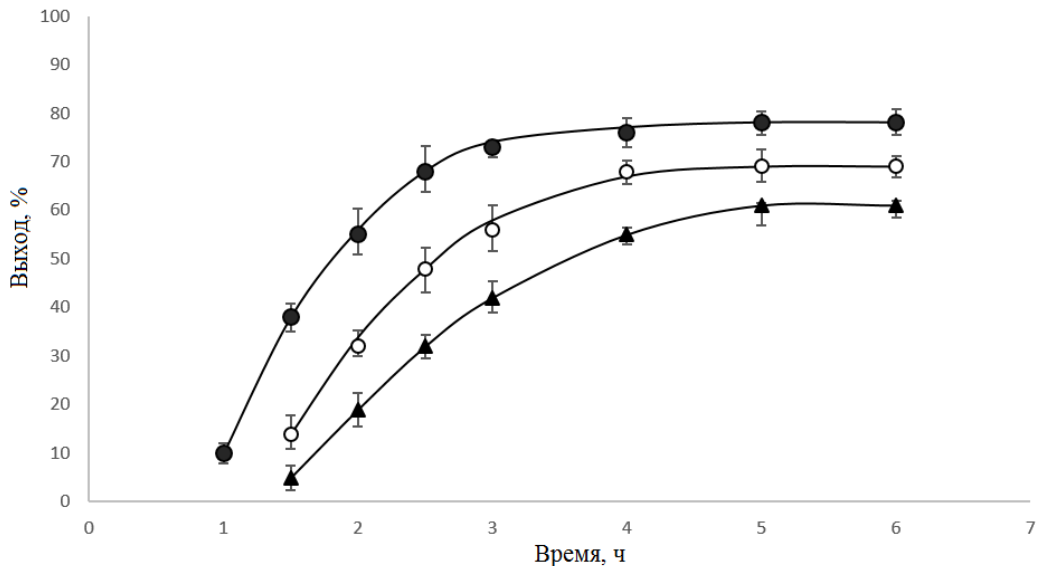


Рисунок 62 - Зависимость выхода макропористых криогелей, сформированных на основе м-ГЭК от времени. Концентрация полимера : (▲)- 6, (○)- 8, (●) – 12 г/100 мл.

Концентрация иницирующей системы– 1 мг/мл, температура – минус 15 °С, степень замещения м-ГЭК – 40,8 мольн. %

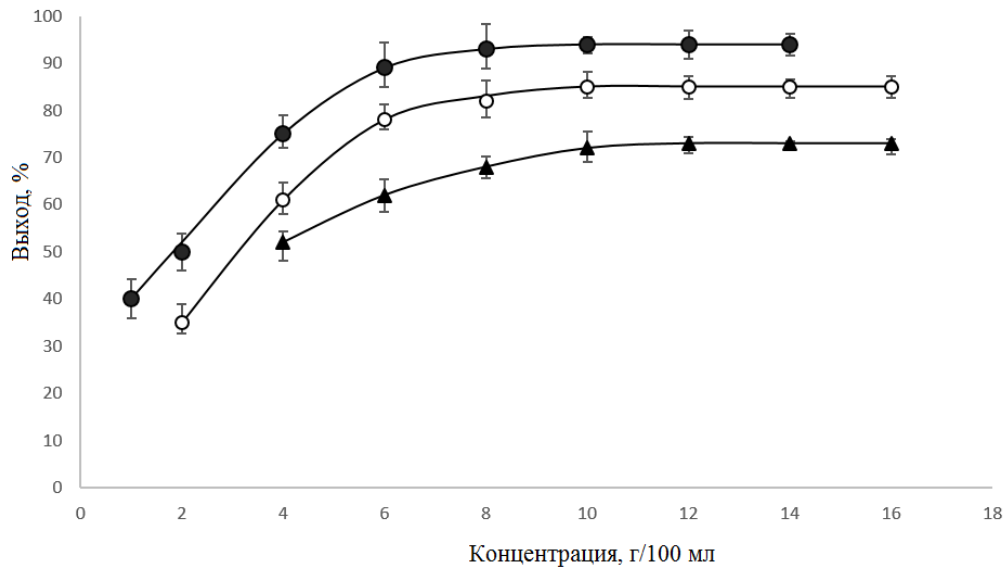


Рисунок 63 - Зависимость выхода макропористых криогелей от концентрации реакционной системы. (●)- м-ПВС, (○)- м-ГЭК, (▲) – м-ПВС/ГЭК=70/30.

На приведенных выше рисунках можно видеть, что рост суммарной концентрации полимеров в реакционной смеси ожидаемо ведет к ускорению процесса гелеобразования. При этом наблюдаемый выход гидрогелей выше, чем в случае гелеобразования при положительных температурах, а минимальные концентрации, при которых наблюдается гелеобразование, ниже. Это связано с концентрированием реакционной системы в межкристаллическом пространстве.

На рисунках 64-66 представлен характер влияния количества инициатора на процесс криотропного гелеобразования.

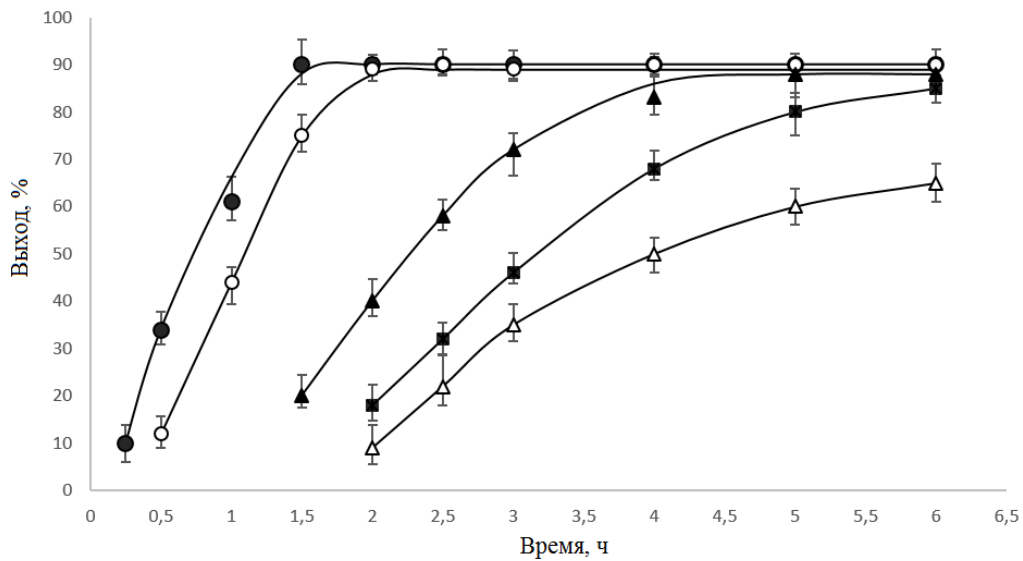


Рисунок 64 - Зависимость выхода анизотропных криогелей, сформированных на основе м-ПВС, от продолжительности реакции. Концентрация инициатора: (●) - 2 мг/мл., (○) - 1,6 мг/мл, (▲) - 1,2 мг/мл, (■) - 0,8 мг/мл, (Δ) - 0,4 мг/мл. Температура минус 15 °С, концентрация полимера 6 г/100 мл, степень замещения макромера 4,8 моль.%

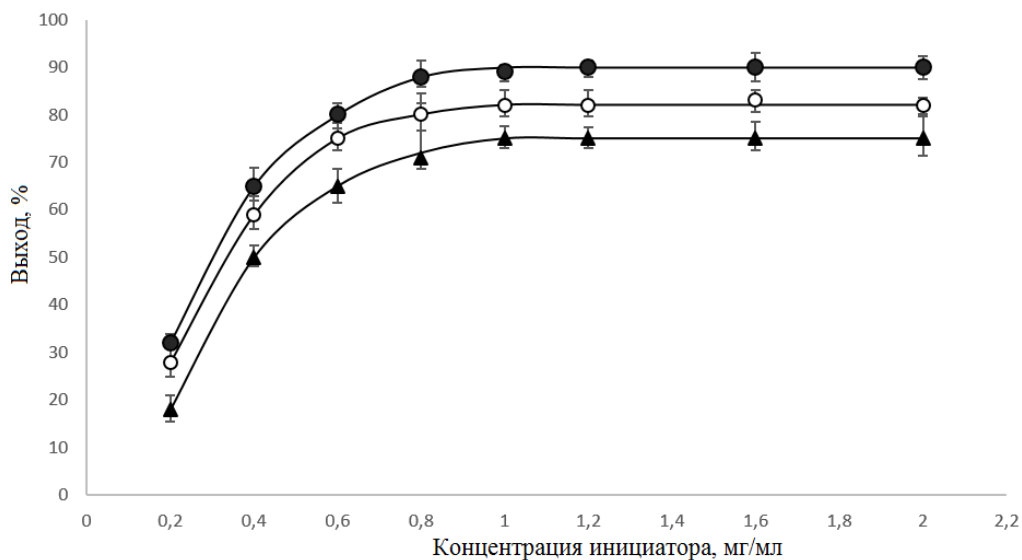


Рисунок 65 - Влияние количества инициатора на выход макропористых гидрогелей.

(●) - м-ПВС, (○) - м-ГЭК, (▲) - м-ПВС/м-ГЭК=70/30

Можно видеть, что ведение процесса при малых концентрациях инициатора ведет к низкому выходу продукта. Это обусловлено нехваткой свободных

радикалов в реакционной системе. При возрастании концентрации инициатора доля свободных радикалов в системе увеличивается, что приводит к увеличению скорости реакции и выхода гидрогелей. Однако при увеличении количества инициатора в реакционной системе до значения более 1,6 мг/мл было отмечено снижение механические и осмотические характеристики образующихся после оттаивания гидрогелей из-за формирования частично изотропного геля, в силу того, что с увеличением числа реакционных центров, процессы сшивки начинают протекать быстрее формирования кристаллов льда.

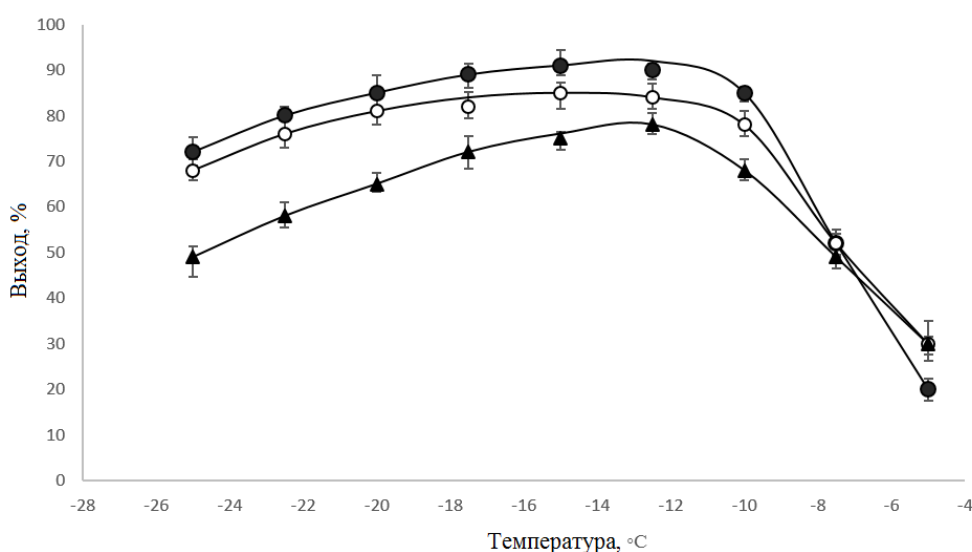


Рисунок 66 – Влияние температуры на выход макропористых гидрогелей. (●) – м-ПВС, (○) – м-ПВС/м-ГЭК=30/70; (▲) – м-ГЭК, концентрация инициатора 1,2 мг/мл, суммарная концентрация полимеров 10 г/100 мл.

Изучение процессов, протекающих при различных температурах, показало, что зависимость выхода гель-фракции от данного параметра для всех исследуемых смесей имела колоколообразный вид. На рисунке 66 видно, что максимальный выход достигался при температуре от минус 14 до минус 17 °C. Подобный вид температурной зависимости достаточно характерен для криоусловий, и связан с конкурированием процессов ускорения скорости реакции вследствие концентрирования реакционной системы при замораживании, и ее замедлением по мере снижения температуры согласно закону Аррениуса.

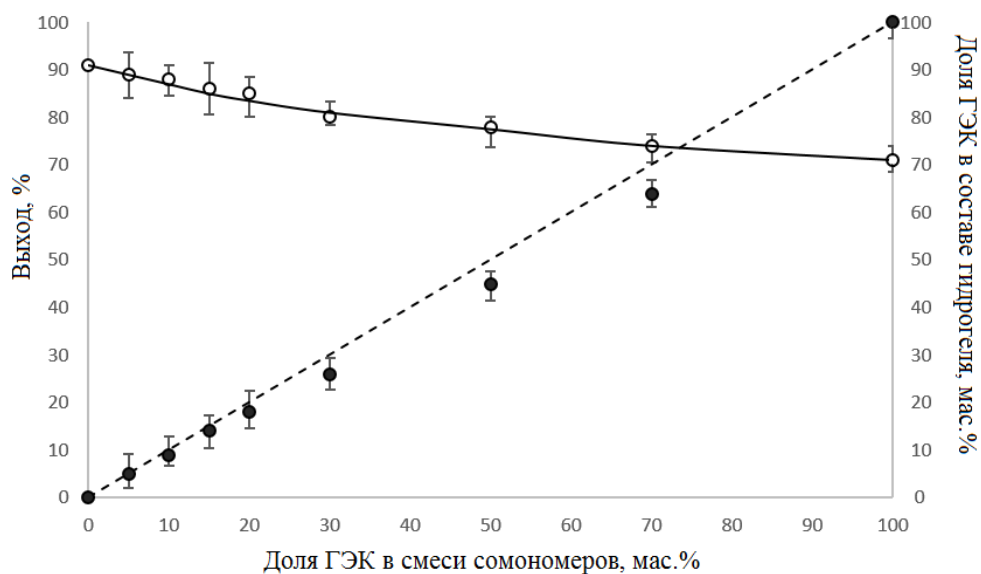


Рисунок 67 - Влияние соотношения модифицированных полимеров на выход макропористых гидрогелей (○) и их состав (●).

Концентрация инициатора – 2 мг/мл, суммарная концентрация полимеров 8 г/100 мл, температура – минус 15 °С

Увеличение относительной доли модифицированного 2 – гидроксиэтилкрахмала в смеси полимеров, как и в случае протекания процессов при положительных температурах, ведет к уменьшению эффективности гелеобразования. Как и говорилось ранее, это, очевидно, связано с меньшей доступностью кратных связей, находящихся в боковых цепях гидроксиэтилкрахмала. При этом что состав, получаемых в криоусловиях гидрогелей, почти идентичен составу исходной реакционной смеси (рисунок 67).

3.3.2.2 Изучение пористости полимерных гидрогелей, полученных в криоусловиях

Одной из значимых характеристик материалов, контактирующих с внутренними средами живых организмов, является их пористость. Наличие системы связанных пор обеспечивает эффективный рост, миграцию и питание клеток.

Важнейшее значение имеет размер пор:

- недостаточный размер - сокращает миграцию клеток и ведет к образованию толстой соединительно-тканной капсулы вокруг имплантированного материала. Это может приводить к снижению диффузии питательных веществ, продуктов жизнедеятельности клеток и биодеструкции материала, что может приводить к развитию хронического воспаления в зоне имплантации;
- избыточный размер уменьшает внутреннюю площадь поверхности, уменьшая, в частности, клеточную адгезию.

В настоящее время в областях связанных с хирургией используются матриксы с размером пор от 75 до 135 мкм, оптимальным же, принято считать размер – 100 ÷ 135 мкм. В случае материалов для регенерации кожных покровов кожи и лечения ран размер пор, обеспечивающих оптимальную клеточную активность и их жизнеспособность, лежит в интервале от 20 до 120 мкм [254].

Нахождение баланса между химическим строением полимера, степенью развитости его пористости, размером и характером распределения пор по размерам дает возможность создавать материалы, обеспечивающие благоприятные условия для регенерации того или иного типа тканей.

Анализ поверхности полученных гидрогелей осуществлялся посредством сканирующей электронной микроскопии. Микрофотографии количественно обрабатывали, путем выбора эквивалентного радиуса поры. Поиск данного радиуса проводили визуально. Подобная схема анализа обусловлена сложностью поверхности получаемых макропористых криогелей.

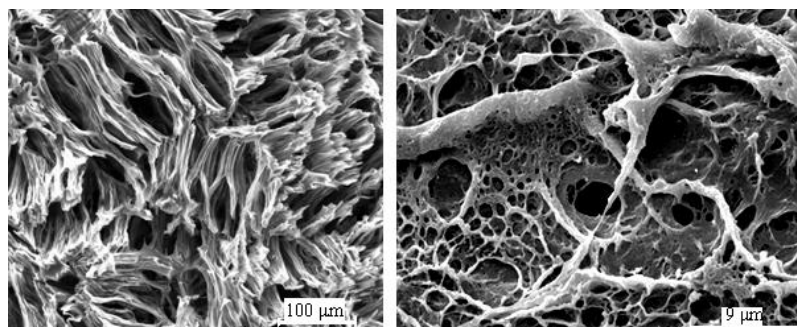


Рисунок 68 - Характерные микрофотографии макропористых материалов

Из рисунка 68 видно, что основной объем образцов составляет система связанных между собой крупных пор радиусом в десятки микрометров, которые, в основном, и определяют физико-химические характеристики геля. Следует отметить, что в структуре гидрогелей присутствует большое количество более мелких пор, локализованных в стенках макропор. Это существенно увеличивает удельную поверхность макропор и обеспечивает дополнительное сообщение между макропорами гидрогеля.

Как показали исследования, степень несферичности пор (отношение наибольшего к наименьшему диаметру) находилась в интервале от 2,1 до 3,1.

Подобный характер распределения пор и их форма не зависели от условий получения и состава гидрогеля.

Образование пор в условиях криоструктурирования характеризуется двумя конкурирующими процессами:

1. образование кристаллов льда в объеме гидрогеля, образующих крупные и, как правило, сопряженные поры
2. Образование пространственной сетки сшитого полимера, которая тормозит рост кристаллов льда.

При низкой скорости образования пространственной сетки, образуется система с развитой макропористой структурой. Если же скорость сшивки превышает скорость кристаллизации воды, то формируется мелкопористая структура. Поры, в последнем случае, являются дефектами, возникшие вследствие кристаллизации воды. В реальности же эти процессы протекают параллельно, в силу чего реализуется некий промежуточный вариант пористой системы.

Нами изучалось влияние различных факторов, определяющих условия протекания процесса создания пористой структуры.

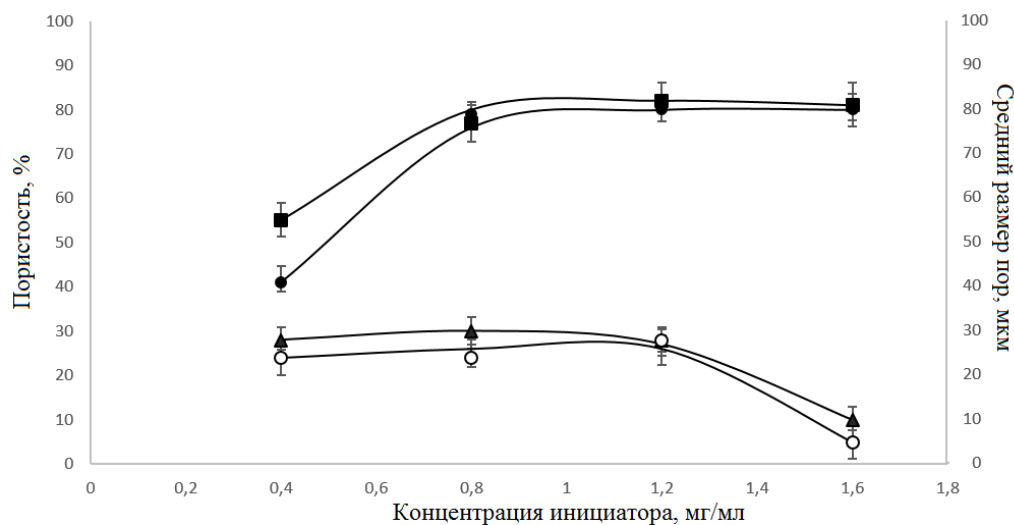


Рисунок 69 – Влияние концентрации инициатора на пористость (■, ●) и средний размера пор (○,▲) полимерных гидрогелей. Концентрация модифицированных полимеров – 8 г/100 мл, температура –минус 15 °С, соотношение полимеров: (●,▲) – м-ПВС/м-ГЭК=90/10, (○,■) – м-ПВС/м-ГЭК=70/30

Изображенная на рисунке 69 зависимость указывает на отсутствие до некоего граничного значения влияния концентрации инициатора на пористость и характер распределения пор по размерам.

Это обусловлено тем, что до определенной концентрации инициатора, скорость сшивки позволяет формировать кристаллы льда до того, как количество сформированной гель-фракция начинает влиять на протекание процесса кристаллизации воды.

При последующем увеличении концентрации инициатора имеет место образование значительной доли изотропного геля. Данный процесс проходит до завершения процесса кристаллизации, что ведет к быстрому уменьшению пористости системы. То есть имеет место образование «глухих» пор (Рисунок 70).

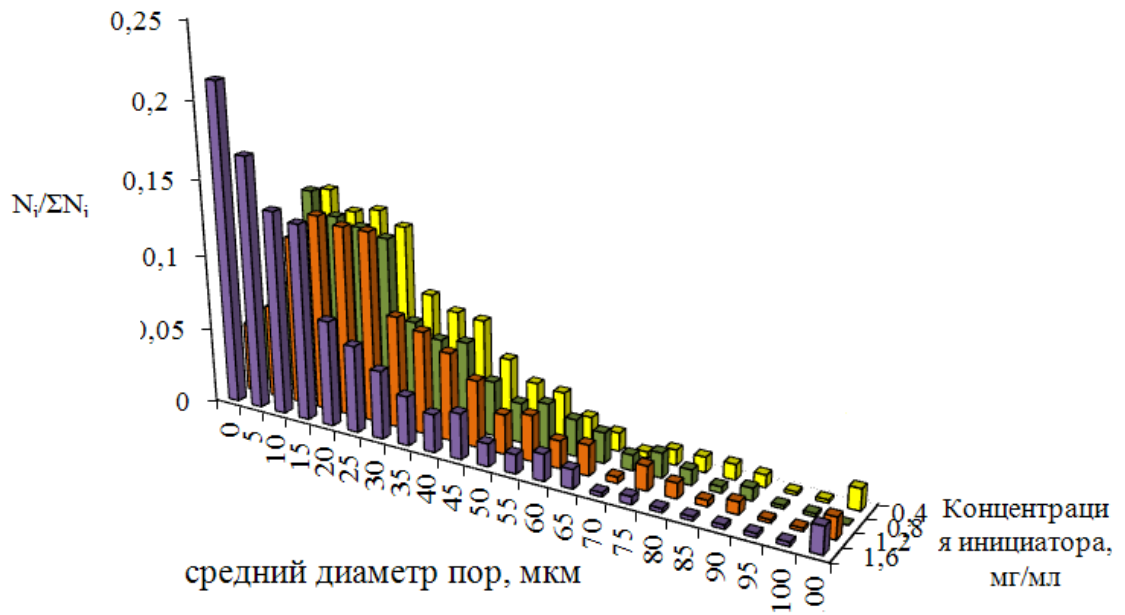


Рисунок 70 – Влияние концентрации инициатора на характер распределения пор по размерам.

Суммарная концентрация полимеров 6 мас.%, соотношение полимеров м-ПВС/м-ГЭК=90/10, температура – минус 15 °С

Как видно из представленной гистограммы, по мере роста общей концентрации, растет процент мелких пор, распределение же пор по размерам становится более узким.

Варьирование температуры и общей концентрации сомономеров в системе приводит к более значимому изменению пористости.

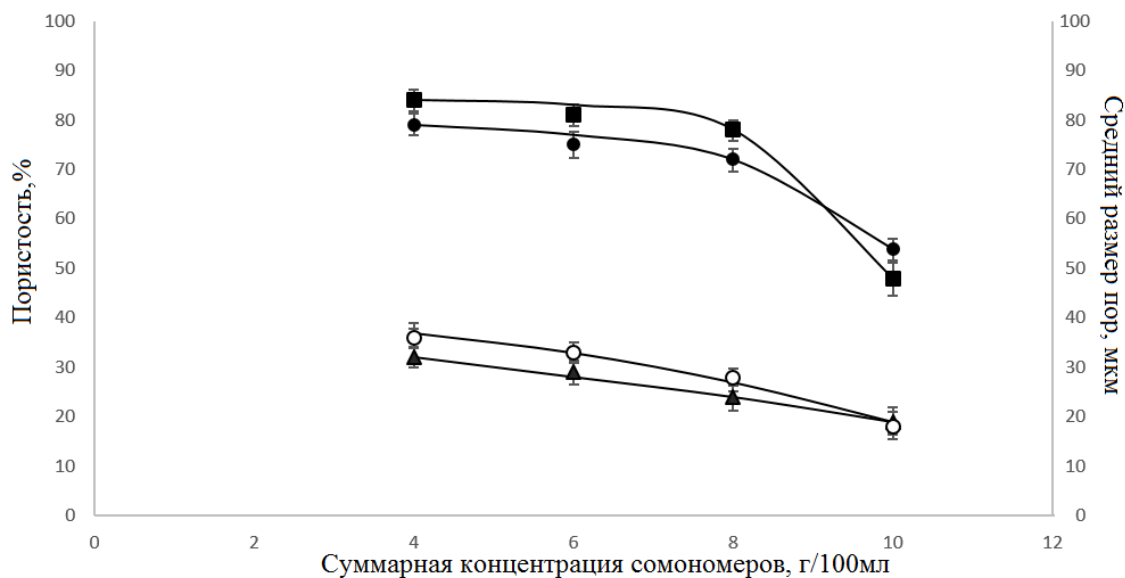


Рисунок 71- Влияние суммарной концентрации модифицированных полимеров на пористость (■,●) и средний размер пор (○,▲) полимерных гидрогелей.

Температура – минус 15 °С, соотношение полимеров: (▲,●) – м-ПВС/м-ГЭК=90/10, (○,■) – м-ПВС/м-ГЭК=70/30

Как можно видеть на рисунке 71 рост концентрации реакционной системы ведет к постепенному уменьшению общей пористости образующихся гидрогелей, что объясняется увеличением полимерной части в единице объема.

На рисунках 72, 73 представлены зависимости пористости и среднего размера пор от температуры.

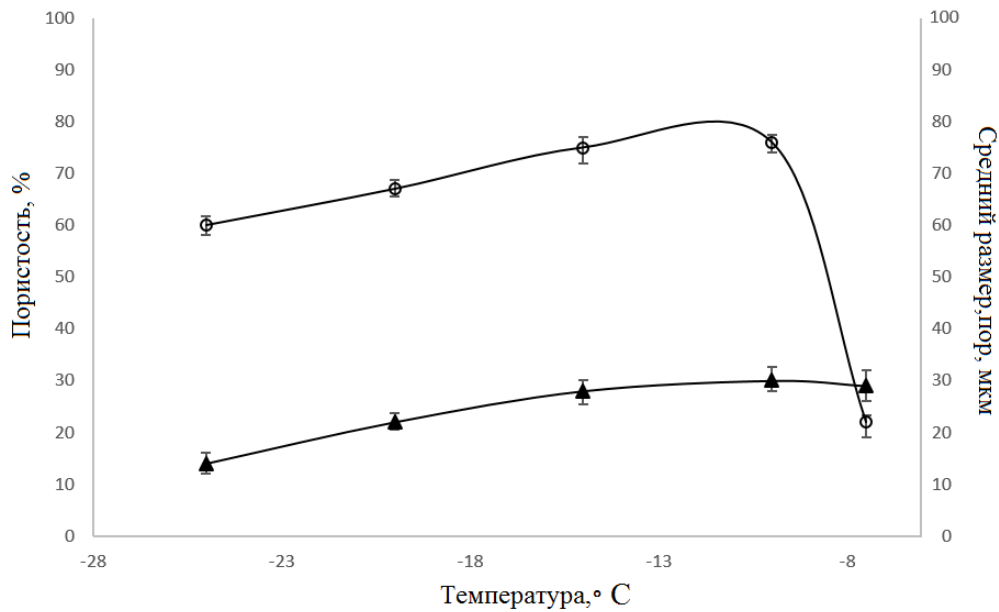


Рисунок 72 – Влияние температуры проведения процесса на пористость (○) и средний размер пор (▲) полимерных гидрогелей.

Соотношение полимеров м-ПВС/м-ГЭК=70/30

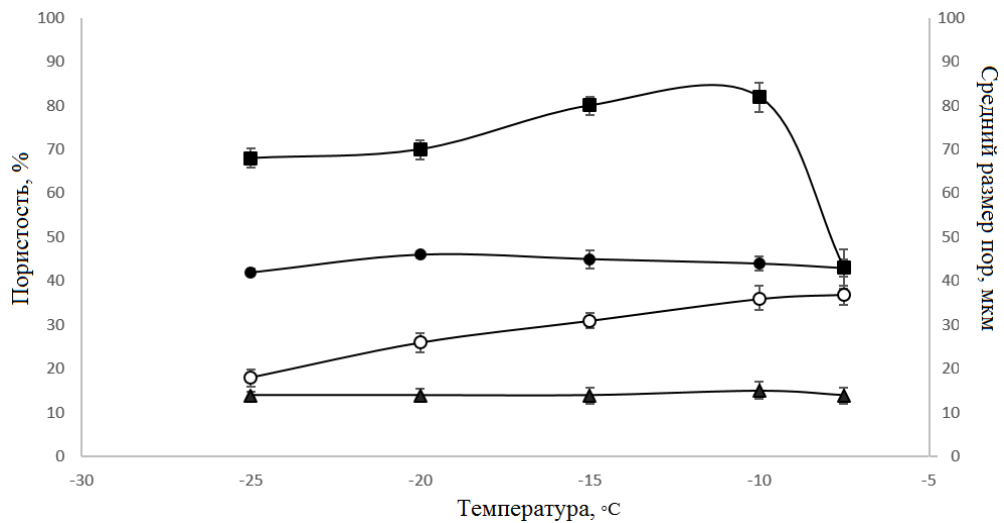


Рисунок 73 – Влияние температуры проведения процесса и метода охлаждения на пористость (■, ●) и средний размер пор (○, ▲) полимерных гидрогелей

Метод охлаждения системы: (○, ■) – «обычный», (●, ▲) – «температурная закалка». Соотношение полимеров – м-ПВС/м-ГЭК=90/10

Как можно наблюдать, в диапазоне температур от минус 15 до минус 25 °С имеет место снижение пористости по мере уменьшения температуры. Это может объясняться: образованием мелких пор, структурным переохлаждением, вымораживанием растворителя и формированием физического криогеля.

Как следует из зависимостей, представленных на рисунках 74-75, при температуре проведения реакции выше минус 10 °С, быстрое уменьшение пористости объясняется формированием изотропного геля из-за низкой скорости кристаллизации растворителя.

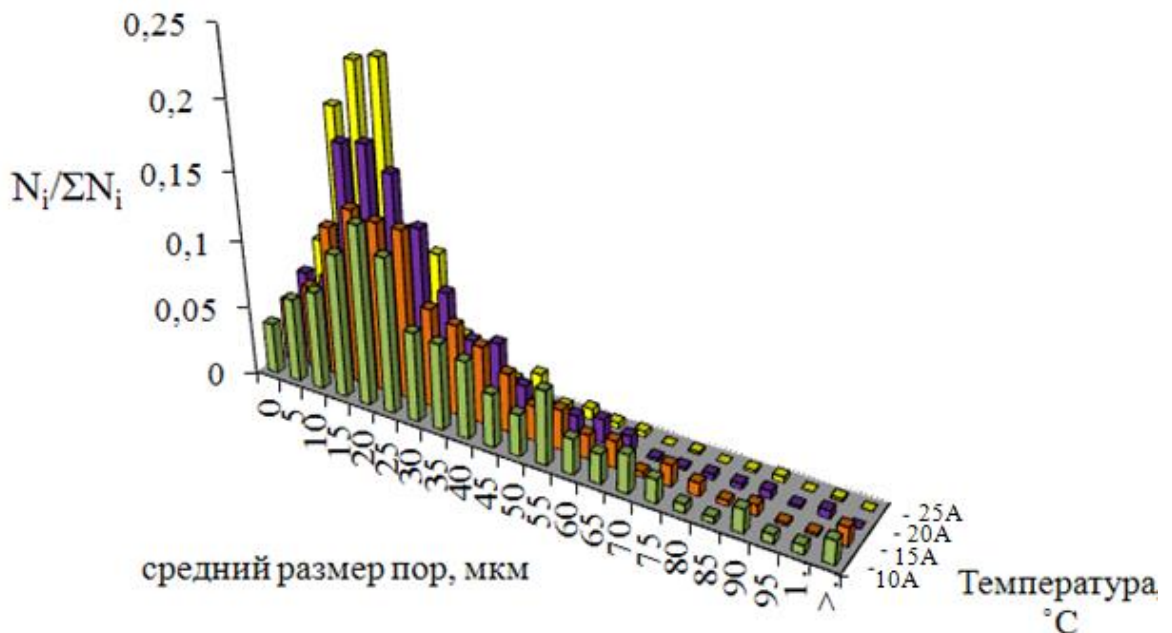


Рисунок 74 – Влияние температуры проведения процесса на характер распределения пор по размерам. «Обычное» охлаждение».

Суммарная концентрация полимеров 6 г/100 мл, соотношение полимеров м-ПВС/м-ГЭК=90/10

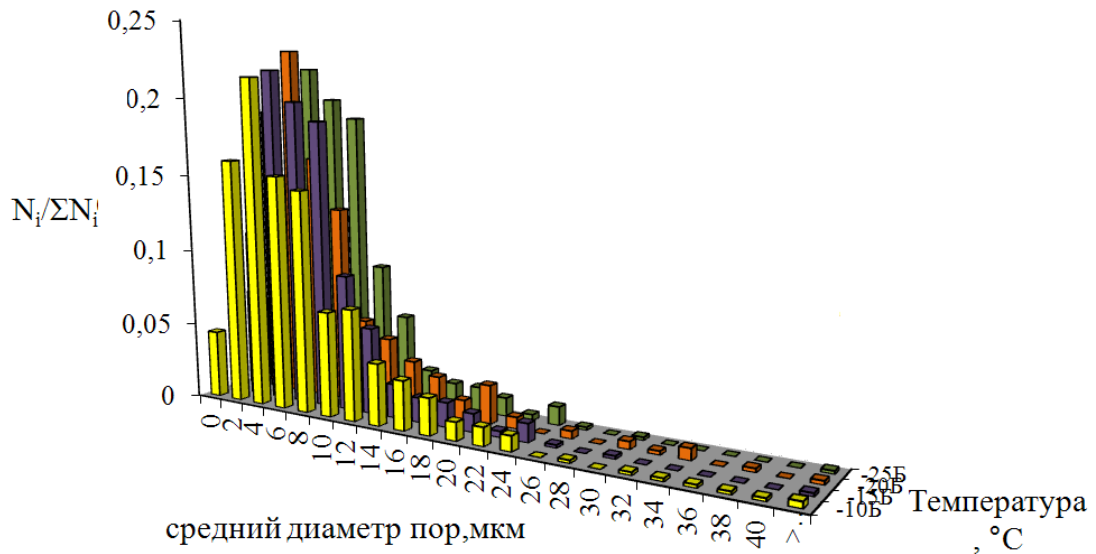


Рисунок 75 – Влияние температуры проведения процесса на характер распределения пор по размерам. «Температурная закалка».

Суммарная концентрация полимеров 6 г/100 мл, соотношение полимеров м-ПВС/м-ГЭК=90/10

В диапазоне температур от минус 10°C до минус 25°C идет: монотонное уменьшение среднего размера пор, уменьшение ширины интервала изменения размера пор и насыщение системы мелкими порами, что связано с ростом числа центров кристаллизации и ростом скорости кристаллов льда, что и вызывает образование множества более мелких пор.

Данное предположение может быть подтверждено картиной, имеющей место при охлаждении системы методом «температурной закалки», то есть резким охлаждением до температуры жидкого азота с последующим повышением температуры до требуемой. В этом случае полимерные гидрогели содержали очень мелкие поры, и размер которых и характер распределения по размерам был практически неизменен при изменении температуры, проведения процесса.

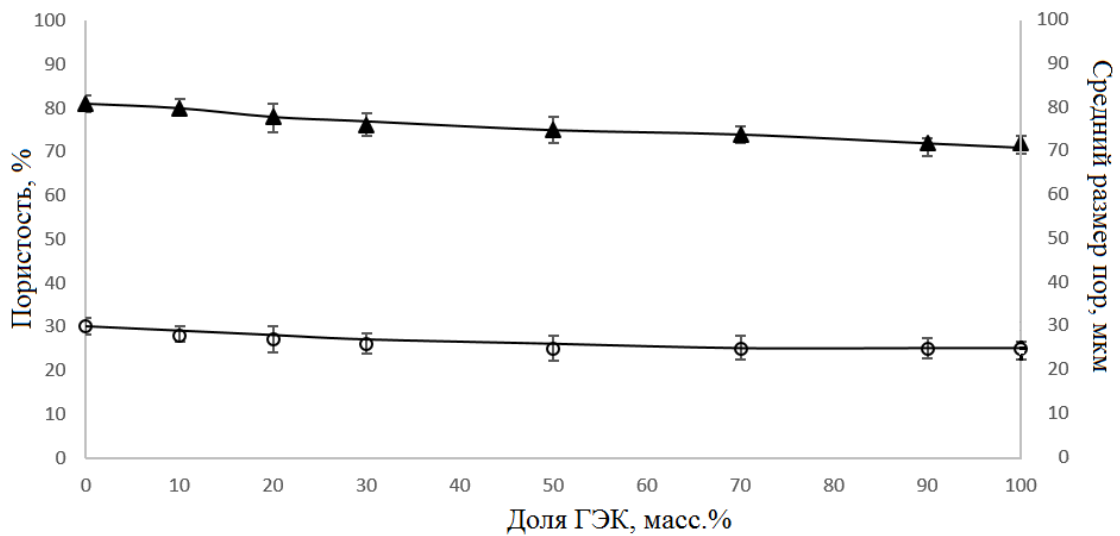


Рисунок 76 – Влияние соотношения модифицированных полимеров в системе на пористость (▲) и средний размер пор (○) полимерных гидрогелей

Суммарная концентрация полимеров 8 г/100 мл, температура проведения синтеза – минус 15 °С

Как показали исследования изменения пористости гидрогелей, сформированных при разных соотношениях модифицированных полимеров в системе, незначительны по сравнению с гидрогелями, полученными при различных концентрациях реакционной смеси и температурах. Однако, увеличение относительной доли м-ГЭК все же вело к уменьшению пористости и среднего размера пор (Рисунок 76), что, может определяться ростом вязкости реакционной системы..

3.3.2.3 Изучение равновесной набухаемости гидрогелей, полученных в криоусловиях

Как было показано ранее, синтезированные в криоусловиях гидрогели представляют собой структуру, состоящую связанных между собой пор, разделенных сшитыми макромолекулярными участками. Открытопористая

структура дает им возможность быстро сорбировать жидкость за счет капиллярных сил, что и обеспечивает быстрое набухание данного материала. Из-за этого скорость набухания макропористых гидрогелей значительно выше скорости набухания изотропных гелей.

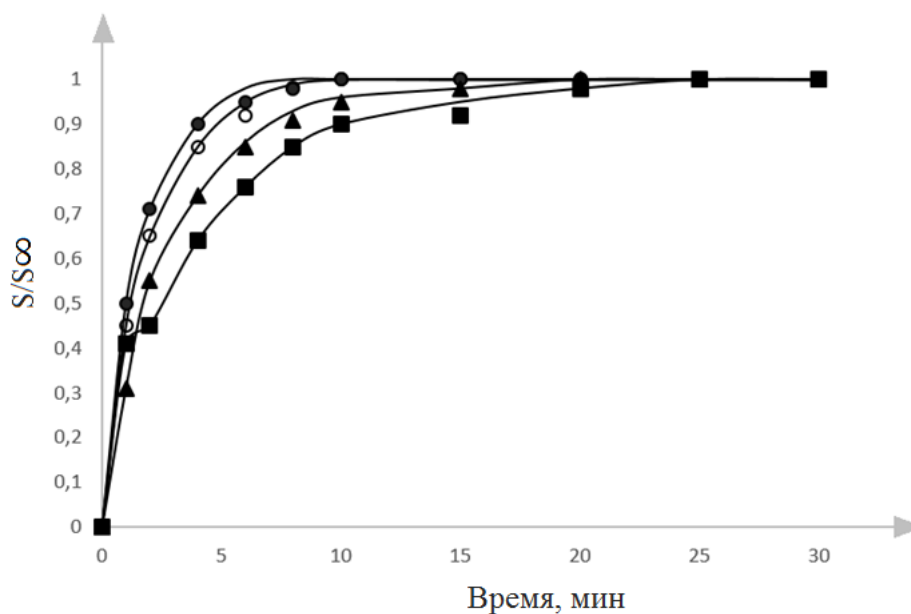


Рисунок 77 - Влияние времени на равновесную набухаемость макропористых гидрогелей, полученных при различной концентрации модифицированных полимеров.

Суммарная концентрация полимеров (●)-2, (○)-4, (▲)-6, (■)-10 г/100мл., соотношение полимеров м-ПВС/м-ГЭК=90/10, температура проведения процесса – минус 15 °С

Как видно из рисунка 77, равновесная набухаемость макропористых гидрогелей, полученных в криоусловиях, достигалась всего за 20-30 минут, тогда как для гелей, полученных при положительных температурах, этот процесс в зависимости от размера образца может продолжаться в течение как нескольких часов, так и нескольких недель.

Большая часть поглощаемой макропористым гидрогелем жидкости занимает свободное пространство пор, которые составляют, как это было показано выше, основной объем образца. Количество же жидкости, поглощаемое полимерной частью материала сравнительно мало и для всех синтезированных

гидрогелей находилось в интервале от 4 до 5 мл/г.

Поэтому равновесное набухание синтезированных полимерных макропористых гидрогелей определяется преимущественно степенью развитости пористой структуры образца.

В силу этого, на способность полученных макропористых гидрогелей к сорбции воды заметное влияния оказывали изменение температуры процесса, состава смеси, концентрации реакционной системы. При этом, для всех изученных образцов вид зависимости набухаемости от изменяемых параметров процесса, совпадал с видом зависимости пористости гидрогеля (Рисунок 78-82).

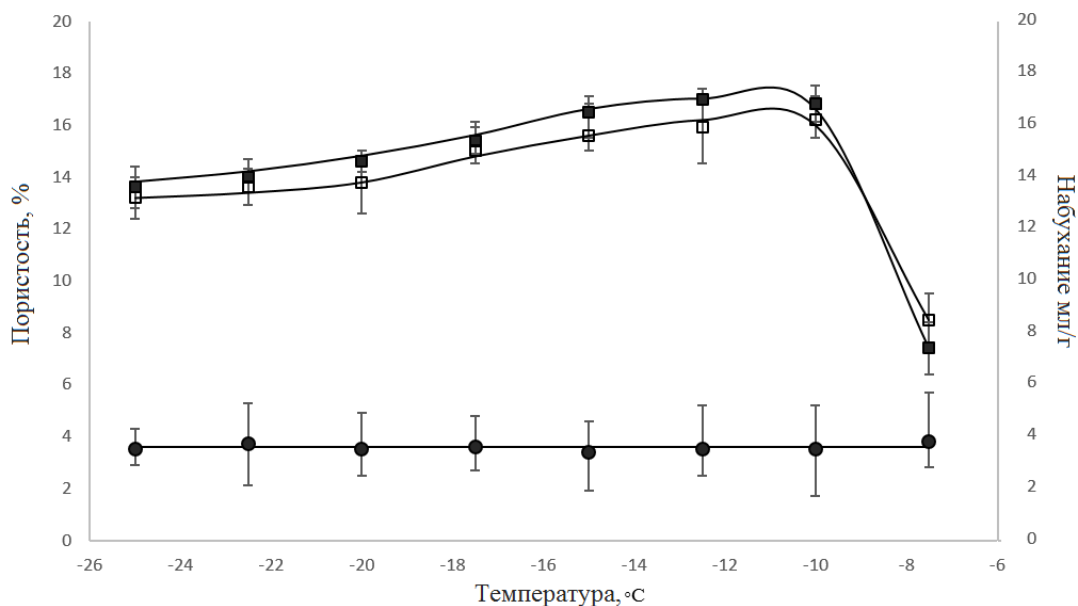


Рисунок 78 – Влияние температуры на величину равновесной набухаемости макропористых гидрогелей (□), набухаемости их полимерной части (●) и общей пористости (■).

Соотношение полимеров м-ПВС/м-ГЭК=90/10, температура проведения процесса – минус 15 °С

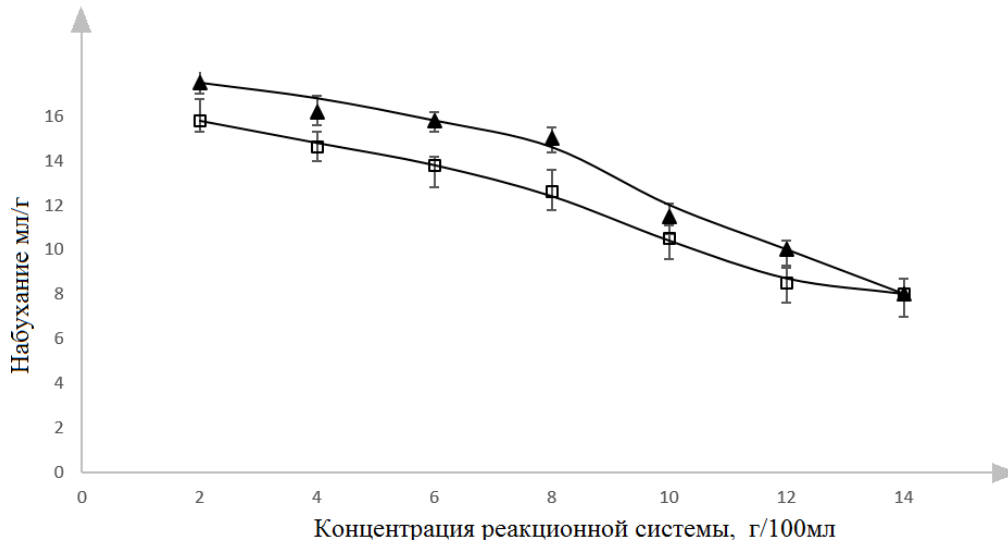


Рисунок 79- Влияние концентрации реакционной системы на равновесную набухаемость полимерных гидрогелей.

Соотношение полимеров: (▲) – м-ПВС/м-ГЭК=90/10, (□) – м-ПВС/м-ГЭК=70/30, температура проведения процесса – минус 15 °С

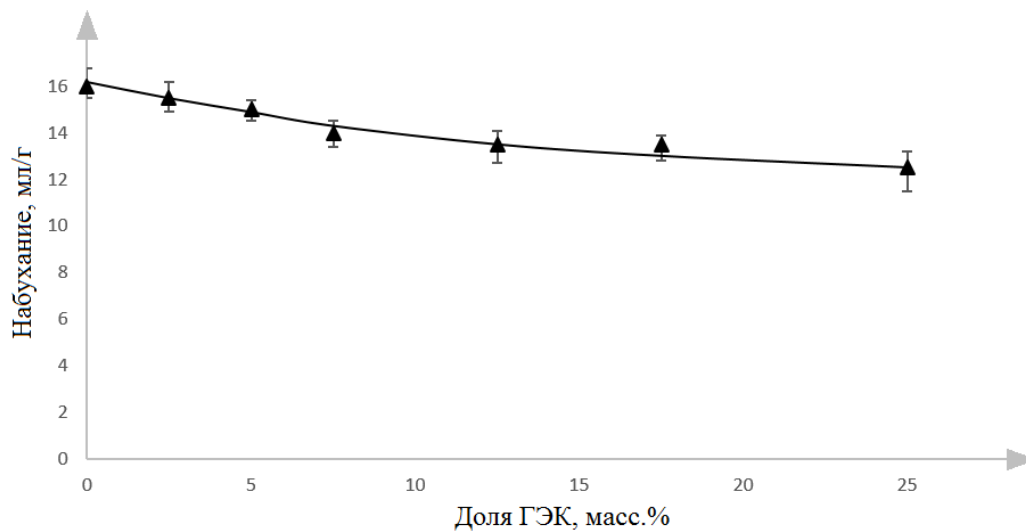


Рисунок 80 - Влияние соотношения модифицированных полимеров в реакционной системе на равновесную набухаемость полимерных гидрогелей.

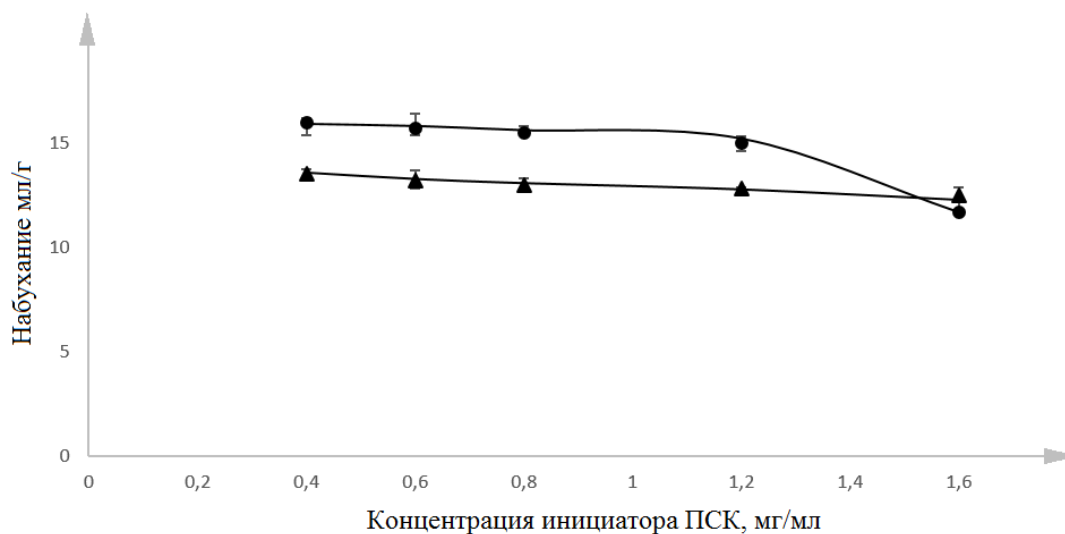


Рисунок 81 - Влияние количества инициатора на равновесную набухаемость полимерных гидрогелей.

Соотношение полимеров: (▲) – м-ПВС/м-ГЭК=90/10, (●) – м-ПВС/м-ГЭК=70/30, температура проведения процесса – минус 15 °С

Соотношение же модифицированных полимеров и количество инициатора практически не влияли на величину равновесного набухания полученных гидрогелей.

Из-за частого использования полимерных гидрогелей в контакте с растворами с различной ионной силой и значением рН интерес так же представляло изучение осмотической стабильности полученных гелей, (Рисунок 84)

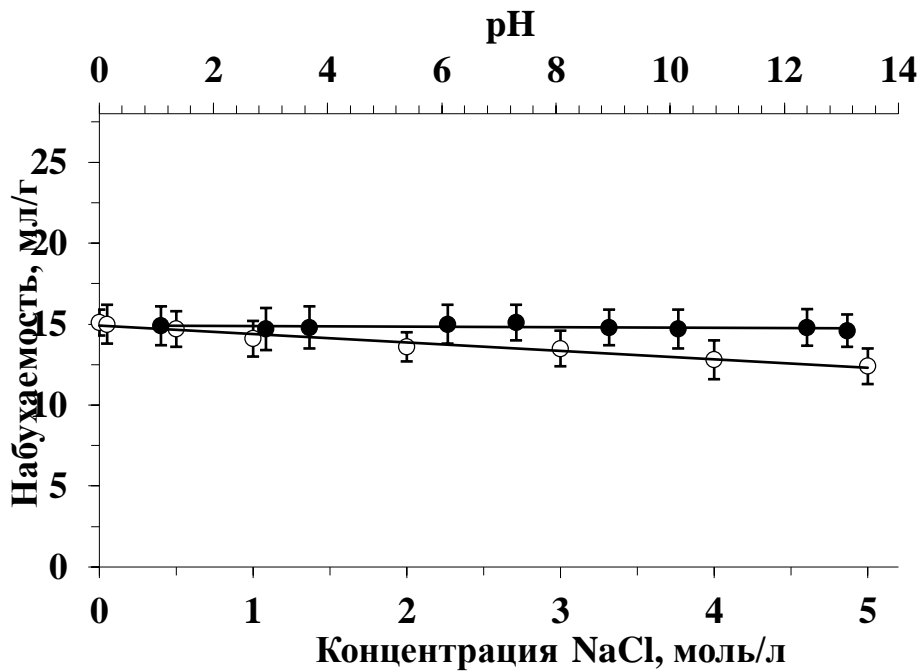


Рисунок 82 – Влияние ионной силы и величины pH раствора на равновесную набухаемость макропористых гидрогелей.

Соотношение м-ПВС/м-ГЭК=90/10, температура проведения процесса – минус 15 °С

Как можно видеть на рисунке 82 синтезированные анизотропные гидрогели, в отличие от изотропных, крайне незначительно изменяли набухаемость при изменении как ионной силы раствора, так и величины его pH. Что однозначно свидетельствует о их осмотической стабильности.

3.3.2.4 Ферментативный гидролиз полимерных гидрогелей, полученных в криоусловиях

С целью подтверждения возможности биодекструкции синтезированных гидрогелей за счет ферментативного гидролиза цепей ГЭК изучался их гидролиз амилитическими ферментными препаратами.

Ферментными препаратами амилаз были прогидролизованы образцы пористых гидрогелей на основе м-ПВС и м-ГЭК с разным содержанием

последнего – 0, 25, 50, 75 и 100% по массе, соответственно. Использовались ферментные препараты:

- глюкаваморин – комплекс грибных глюкоамилазы и α -амилазы; оптимум действия 50 °С, рН 5;
- амилолихетерм – бактериальная α -амилаза, оптимум действия 90 °С, рН

Общая схема гидролиза: 50 г/л образца + 1 г/л ферментного препарата (~ 5 мг белка/г субстрата). Гидролиз вели в термостатируемом шейкере в оптимальных для ферментного препарата условиях при постоянном перемешивании 900 об/мин. Время гидролиза составляло 2 суток. По истечении указанного времени реакцию смесь центрифугировали 5 мин при 14000 об/мин, в супернатанте определяли концентрацию восстанавливающих сахаров (ВС). Глубину гидролиза рассчитывали по формуле:

$$\text{Глубина гидролиза, \%} = \frac{[\text{ВС}] \times 100\%}{[\text{крахмал в реакционной смеси}]} = \frac{[\text{ВС}] \times 100\%}{(50 \times \text{массовая доля крахмала в образце})} \quad (33)$$

Численные значения полученных результатов можно видеть в таблице 16.

Таблица 16 – Результаты ферментативного гидролиза образцов гидрогелей

№	Содержание м-ГЭК, %	Глюкаваморин		Амилолихетерм	
		[ВС], г/л	глубина гидролиза, %	[ВС], г/л	глубина гидролиза, %
1	0	0	0	0	0
2	25	0,6	5	0	0
3	50	1,7	7	0,1	0,4
4	75	2,8	7	0,2	0,5
5	100	3,1	6	0,2	0,4

Анализ полученных данных позволяет предположить, что при гидролизе гидрогелей, содержащих модифицированный ГЭК, наиболее эффективным

являлся препарат грибных амилаз Глюкаваморин. Поскольку при увеличении содержания модифицированного 2-гидроксиэтилкрахма в образцах концентрация продукта гидролиза (восстанавливающих сахаров) увеличивается, но при этом глубина гидролиза остается практически неизменной, можно предположить, что размер пор гидрогелевого материала достаточен для успешной диффузии ферментов к субстрату и оттоку продуктов реакции, но сам модифицированный крахмал, включенный в трехмерную сетку гидрогеля является «плохим» субстратом - гидролиз гидрогеля на основе «чистого» м-ГМА глюкаваморином приводит лишь к 6%-ой глубине гидролиза, тогда как «обычный» ГМА гидролизуеться этим препаратом на 90÷99%.

В то же время сам факт наличия ферментативного гидролиза цепей ГЭК в составе комбинированных гидрогелей ПВС-ГЭК является очевидным и свидетельствует о верности сделанного лежащего в основании работы предположения.

3.4 Изучение биосовместимости полимерных гидрогелей на основе м-ПВС и м-ГЭК

3.4.1 Изучение токсичности полимерных гидрогелей

Для оценки токсичности образцов полимерных гидрогелей нами был использован комплекс методов [255-258], рекомендуемых стандартами серии ISO 10993[259-261], который предполагает:

1. изучение гемолитической активности и цитотоксического действия вытяжек из образцов;
2. исследования по изучению раздражающего и сенсибилизирующего действия;
3. изучение острой, подострой и хронической токсичности материалов «in vivo»

Ниже приведены результаты проведенных исследований.

Оценку гемолитического действия водных вытяжек проводили в опытах «in vitro» с изолированными эритроцитами кроликов[262,263]. Данный метод основан

на сравнении оптической плотности суспензии вытяжек с кровью и оптической плотности раствора при 100% гемолизе.

$$\% \text{ гемолиза} = \frac{E_{\text{опт}} - E_{\text{к}}}{E_{100}} \times 100, \quad (33)$$

где $E_{\text{оп}}$ - оптическая плотность опытной пробы;

$E_{\text{к}}$ - оптическая плотность контрольной пробы;

E_{100} - оптическая плотность пробы со 100 %-ным гемолизом.

Исследуемые вытяжки из образцов можно считать свободными от гемолитически действующих веществ, если процент гемолиза, определяемый по формуле (34), имеет значение менее двух процентов.

Как следует из полученных данных (таблица 17), вытяжки из всех образцов гидрогелевых материалов можно считать свободными от гемолитически действующих веществ. Процент гемолиза экстрактов всех образцов не превышал значений от 0 до 0,18%.

Таблица 17 - Результаты исследования гемолитической активности и цитотоксичности вытяжек из образцов гидрогелей

Образец	Содержание м-ГЭК, %	Гемолитическая активность (допустимое значение - не более 2,0%)	Цитотоксичность (допустимое значение - индекс токсичности 70-120%)
1	0	0	98
2	30	0,08	92
3	50	0,14	90
4	90	0,18	91

Аналогичная картина наблюдалась и при изучении цитотоксичности водных вытяжек из образцов [264,265], для оценки которой использовали суспензионную кратковременную культуру подвижных половых клеток, приготовленную из

замороженной спермы крупного рогатого скота, с последующим определением индекса токсичности по формуле.

$$I_t = \frac{t_{cp}^0}{t_{cp}^k} \times 100\% , \quad (34)$$

где t_{cp}^0 и t_{cp}^k - средние арифметические значения времени подвижности соответственно для опытной и контрольной выборок образцов

Для всех изученных образцов индекс цитотоксичности не превысил 90 % (таблица 17)

Острое общетоксическое действие вытяжек образцов гидрогелей изучали на белых беспородных мышах массой 20-22 г, разделенных на подопытные и контрольную группы по 20 голов в каждой. Содержание животных полностью соответствовало санитарным нормам.

Подопытным животным однократно внутрибрюшинно вводили по 1 мл вытяжек (из расчета 50 мл/1кг массы тела). Контрольные животные в том же режиме получали дистиллированную воду. Температура вводимых растворов составляла $37 \pm 1,5^\circ\text{C}$.

В течение эксперимента оценивали общее состояние животных, изменение внешнего вида, поведения, двигательной активности, контролировали прирост массы тела. По окончании эксперимента животных забивали методом декапитации, макроскопически оценивали состояние брюшины и внутренних органов, определяют органо-соматические показатели (ОСП).

$$\text{ОСП} = \frac{m(\text{органа})\text{мг}}{m(\text{тела})\text{г}} \quad (35)$$

Полученные данные подвергали статистической обработке с использованием критерия Стьюдента «t».

При проведении эксперимента в течение всего периода наблюдения не было отмечено случаев гибели животных, внешних проявлений интоксикации, как в опыте, так и в контроле.

Макроскопически состояние внутренних органов и брюшины в месте введения вытяжек соответствовало контролю и физиологической норме. Как можно видеть из приведенных данных (таблица 18), статистически достоверных

изменений массы тела и ОСП (органо-соматических показателей) у подопытных животных по сравнению с контрольной группой не наблюдалось.

Таблица 18 - Органо-соматические показатели животных, подвергавшихся воздействию вытяжек из экспериментальных образцов

Образец	Содержание ГЭК, %	Масса тела, г	ОСП (печень)	ОСП (почки)	ОСП (селезенка)
Контроль		18,60±0,44	45,97±3,47	14,47±0,69	3,62±0,49
Макропористые гидрогели	0	18,94±0,44	46,57±3,49	14,52±0,70	3,65±0,62
	30	19,20±0,44	44,36±3,55	14,53±0,71	3,74±0,71
	50	18,85±0,39	47,19±3,53	14,23±0,62	3,94±0,78
	90	18,56±0,38	48,36±4,01	14,91±0,97	3,99±0,61

Таблица 19 - Результаты изучения сенсibiliзирующего действия экспериментальных образцов

Образец	Содержание ГЭК, %	Реакция кожи в баллах (не более 0-1 балла)	РСЛЛ	Соотношение ОСП иммунокомпетентных органов
1	0	0-0,4	Менее 10,0%	0,436± 0,057
2	30	0-0,4	Менее 10,0%	0,441±0,039
3	50	0-0,4	Менее 10,0%	0,459±0,067
4	90	0-0,4	Менее 10,0%	0,501±0,040

Сенсibiliзирующее действие изучали по стандартной методике, оценивая степень кожной реакции и с использованием диагностического метода специфического лизиса лейкоцитов (РСЛЛ), рассчитываемого по формуле:

$$\text{Показатель РСЛЛ} = \frac{L_{\text{контроль}} - L_{\text{опыт}}}{L_{\text{контроль}}} \times 100\% , \quad (36)$$

где $L_{\text{контроль}}$ – количество лейкоцитов в пробе без аллергена

$L_{\text{опыт}}$ – количество лейкоцитов в пробе с вытяжкой

Реакцию расценивают как положительную при показателе РСЛЛ выше 10%. Показатель РСЛЛ превышающий 20 % свидетельствует о высоком уровне сенсибилизации животных.

Как можно видеть из приведенных данных (Таблица 19), вытяжки из образцов не обладали сенсибилизирующим действием, о чем свидетельствует отсутствие кожной реакции на аппликационных участках, а также в месте проведения предварительной сенсибилизации и провокационной внутрикожной пробы, значения показателей РСЛЛ и соотношение ОСП (органо-соматические показатели) иммунокомпетентных органов (Таблица 18)

Завершающим этапом в оценке токсичности разработанных гидрогелевых материалов образцов стали исследования в условиях подострого и хронического токсикологического экспериментов с использованием патоморфологических методов.

Изучение проводили на белых крысах-самцах. Пористые лиофильно высушенные образцы в виде специально изготовленных образцов помещали для набухания в изотонический раствор, после чего под медикаментозным наркозом (препарат зоолетил в дозе 15 мг/кг) имплантировали подопытным животным подкожно в область спины.

На ранних сроках (1 неделя, 3 недели) наблюдалась воспалительная реакция на имплантируемый материал грануляционного характера с образованием соединительно-тканной капсулы разной толщины (рисунок 84). без рубцевания. На гистологических препаратах обнаруживается поперечно-полосатая мышечная ткань с явлениями отека, очагом фиброзной ткани со структурами геля, очаговыми кровоизлияниями в этой зоне, большим количеством новообразованных сосудов капиллярного типа, полнокровных сосудов,

единичными гигантскими многоядерными клетками типа инородных тел и выраженной диффузно-очаговой лимфоидной инфильтрацией, представленной зрелыми лимфоцитами в виде очаговых скоплений. В строме встречаются единичные лимфоидные фолликулы без зародышевых центров. При иммуногистохимическом анализе (ИГХ) реакция с антителами к CD45, CD 3, CD15, CD20 - положительная. При фенотипировании клеточный состав стромальной инфильтрации представлен зрелыми Т- (порядка 70%) и В-лимфоцитами (порядка 30%). Это позволяет охарактеризовать воспалительную реакцию как реакцию на имплантируемый материал в пределах нормы.

При этом наблюдалась явная корреляция между интенсивностью воспалительной реакции, толщиной капсулы (на 21 день) и содержанием в составе имплантированного образца гидроксиэтилкрахмала. Увеличение доли этого полимера вело к интенсификации воспаления и увеличению отёка окружающих тканей вокруг имплантируемого материала. Что очевидно объясняется большей биореакционной способностью ГЭК по сравнению с ПВС.

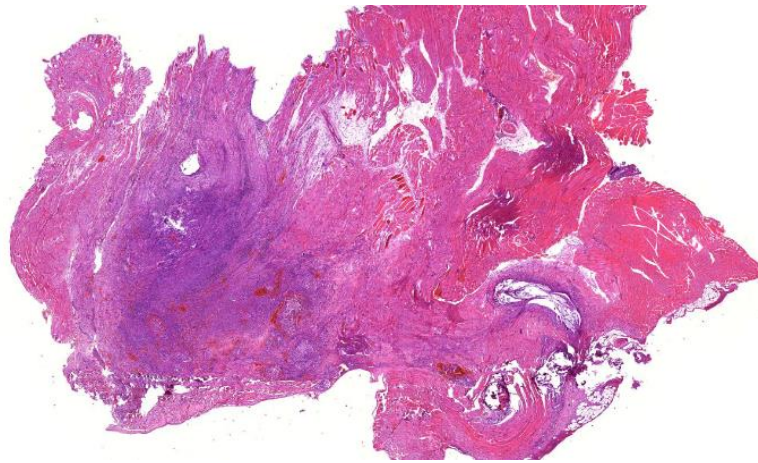


Рисунок 83 - Пример гистологического препарата тканей в месте имплантации. 3 недели. Соотношение м-ПВС/м-ГЭК= 70/30

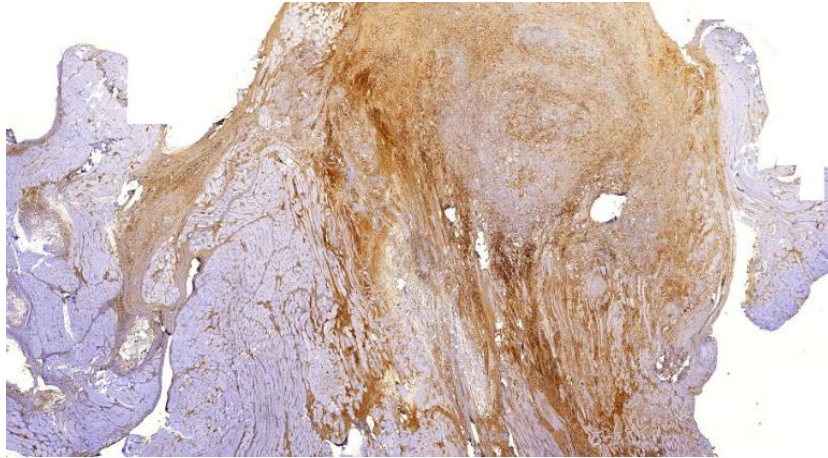


Рисунок 84 - Пример гистологического препарата тканей в месте имплантации. ИГХ реакция с CD 3. 3 недели. Соотношение м-ПВС/м-ГЭК= 70/30

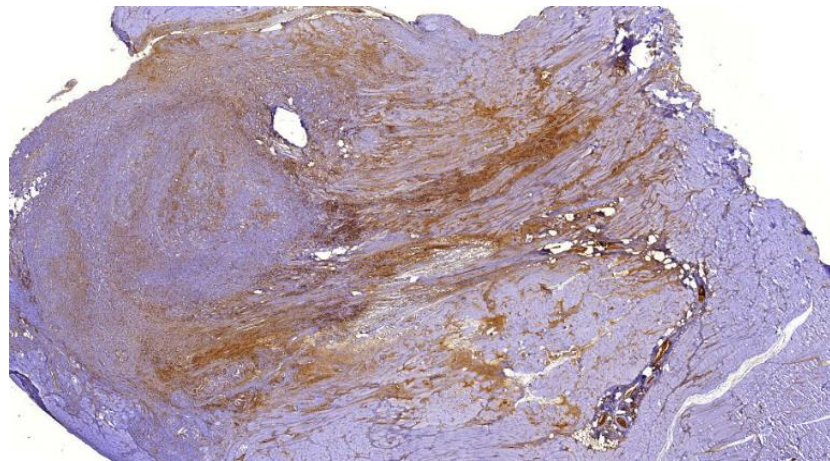


Рисунок 85 - Пример гистологического препарата тканей в месте имплантации. ИГХ реакция с CD 15. 3 недели. Соотношение м-ПВС/м-ГЭК= 70/30

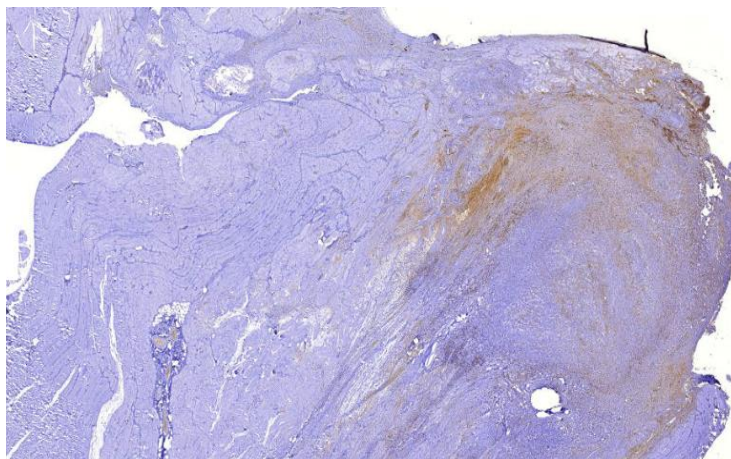


Рисунок 86 - Пример гистологического препарата тканей в месте имплантации. ИГХ реакция с CD 45. 3 недели. Соотношение м-ПВС/м-ГЭК= 70/30

При более продолжительных сроках имплантации наблюдалась постепенная биодеструкция имплантированного материала с замещением его тканями организма. По истечении 2 месяцев в зоне имплантации наблюдается скелетная поперечно-полосатая мышечная ткань, с очагами фиброзной ткани, содержащей со структуры геля. Причем, количество сохранившегося геля уменьшается с ростом доли ГЭК в составе имплантированных образцов. Элементов хронического воспаления не наблюдается, при иммуногистохимическом анализе реакция с антителами к CD45, CD15, CD3, CD20 отрицательна.

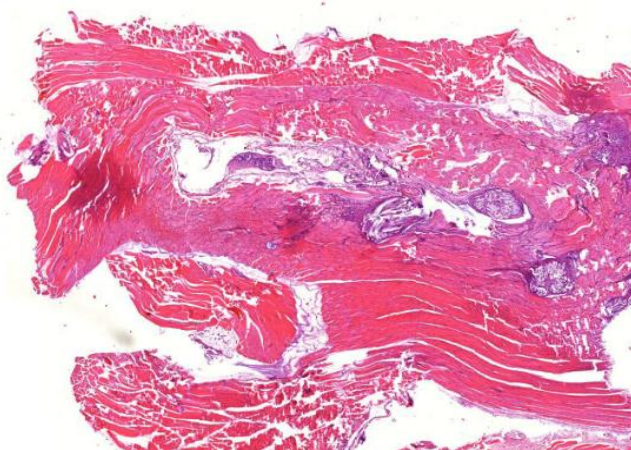


Рисунок 87 - Пример гистологического препарата тканей в месте имплантации. 8 недель. Соотношение м-ПВС/м-ГЭК= 70/30

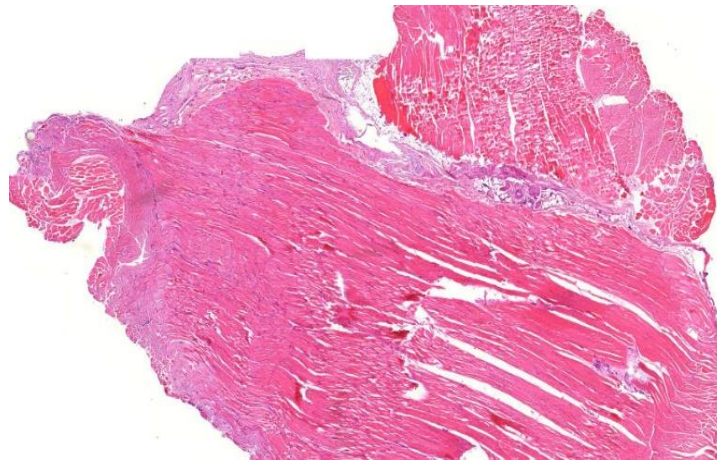


Рисунок 88 - Пример гистологического препарата тканей в месте имплантации. 16 недель. Соотношение м-ПВС/м-ГЭК= 70/30

Спустя 4 месяца в зоне имплантации обнаруживаются поперечно-полосатые мышечные волокна, среди которых обнаруживаются участки фиброзно-жировой ткани с сосудами артериального типа, у некоторых образцов с низким содержанием ГЭК в месте имплантации присутствовали рассеянные единичные структуры геля. При ИГХ анализе для всех образцов реакция с антителами к CD45, CD15, CD3, CD20 отрицательна.

Изучение внутренних органов после имплантации не обнаружило на протяжении всего эксперимента видимых отличий от контрольной группы за исключением незначительного увеличения числа купферовских клеток в печени. Купферовские клетки как макрофаги реагируют на мельчайшие частицы имплантированного материала, попадающие в печень. Всё это говорит об отсутствии заметной токсичности материалов.

На основании полученных данных, можно констатировать, что реакция организма экспериментальных животных на введение образцов разработанных материалов заключалась:

- на начальных стадиях. В минимальной воспалительной тканевой реакции, при этом отсутствовала нейтрофильная инфильтрация и макрофагальная реакция в окружающей ткани. В процессе шло формирование тонкой

соединительно-тканная капсулы, что свидетельствует о сравнительной биоинертности материалов.

- на последующих стадиях. Наблюдалась биодеградация имплантированных образцов материалов за счёт прорастания в них тканей и макрофагальной резорбции, а также вследствие бесклеточного лизиса непроращенной части имплантата.

3.4.2 Изучение влияния состава образцов макропористых гидрогелей на скорость их биодеструкции

Поскольку при проведении изучения токсичности была обнаружена явная корреляция между составом имплантируемого материала и его скоростью биодеградации, было проведено более детальное изучение данной зависимости[266,267].

Эксперимент также проводили на беспородных крысах-самцах. Под общим наркозом скальпелем рассекалась предварительно обритая кожа на обеих задних лапах крысы с внутренней стороны. После рассечения фасций, производилась резекция мышечной ткани пинцетом и имплантация образца гидрогеля. Из эксперимента животные выводились спустя 1,2,3,4,6 месяцев. Материалом для гистологических исследований служили образцы мышечной ткани, изъятые из места имплантации.

Посредством бинокля с малым увеличением (4,5×) с помощью цифровой камеры получали фотоизображения полученных гистологических препаратов поперечных срезов, которые затем анализировали на компьютере с использованием планиметрической программы UTHSCSA Image Tool. Определяли площадь имплантата и площадь замещенной части имплантата. Данные по каждому имплантату усреднялись.

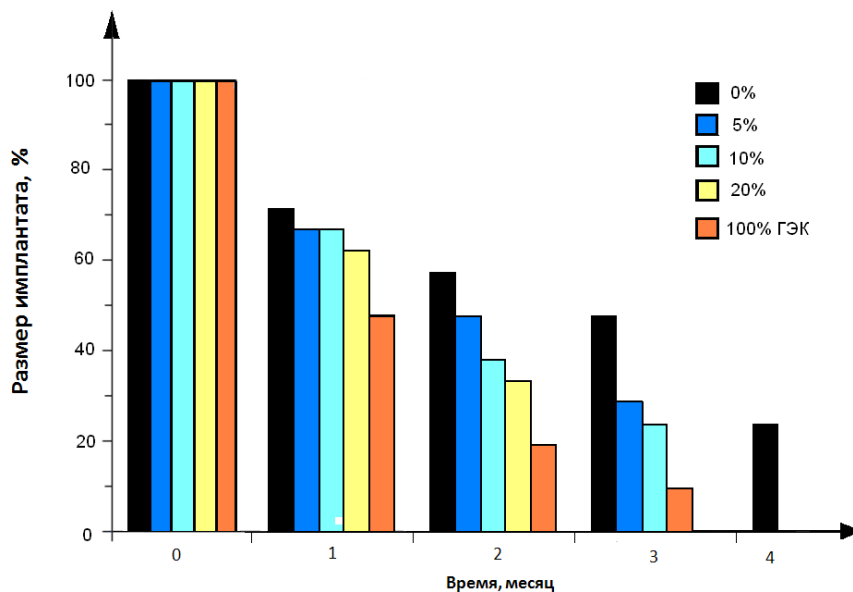


Рисунок 89 - Динамика изменения размеров имплантированных образцов гидрогелей на основе м-ПВС и м-ГЭК с различным содержанием ГЭК

Полученные экспериментальные данные приведены на диаграмме выше (Рисунок 89). Как можно видеть даже небольшое количество введенного в состав гидрогеля гидроксиэтилкрахмала приводит к заметному ускорению биодеградации. Данный факт, очевидно, связан с ускорением фрагментирования образца вследствие ферментативного безклеточного лизиса участков ГЭК. Что упрощает резорбцию материала макрофагами и гигантскими клетками.

4 Экспериментальная часть

4.1 Характеристика исходных веществ

В качестве исходных объектов исследования использовались:

1. Гидроксиэтилкрахмал (ГЭК) фармацевтического качества марки 200/0.5 производства компании Серум-Верк (Германия) ($M_w=200$ кДа, степень замещения 0.5)
2. Поливиниловый спирт (ПВС), марок VF-14, VF-17 и VF-24 (ССР, Тайвань) с молекулярными массами 50000; 75000; 110000, соответственно со степенью гидролиза более 98%
3. Глицидиловый эфир метакриловой кислоты («Сигма»), предварительно очищенный в процессе вакуумной перегонки ($T_{кип}=78,0$ °С при давлении 2 мм. рт. ст.).
4. Диметилсульфоксид (ДМСО) («Химмед»). Дополнительно не очищался.
5. N,N,N',N'-тетраметилэтилдамин (ТМЕД) («Merck KGaA»). Дополнительно не очищался.
6. Персульфат аммония (ПСК) («Сигма»). Дополнительно не очищался.
7. Вода дистиллированная.
8. Серная кислота («Сигма Тек»). Дополнительно не очищалась.

4.2 Исследование процесса гелеобразования в растворах м-ПВС и м-ГЭК

4.2.1 Модификация исходных полимеров

В трехгорлую стеклянную колбу, снабженную термометром, верхнеприводной мешалкой, обратным холодильником заливали диметилсульфоксид, добавляли навеску полимера и перемешивали при нагревании до полного растворения полимера. Затем раствор нагревали до температуры реакции, после чего добавляли глицидилметакрилат и катализатор (серная кислота, либо ТМЭД, соответственно) в диметилсульфоксиде и

перемешивали в течении заданного времени, поддерживая требуемую температуру.

После завершения реакции реакционную систему охлаждали. Продукт высаждали в охлажденный ацетон. Выпавший полимер промывали в ацетоне в течение часа и отделяли центрифугированием (Sigma 16P, Германия). Полученный продукт растворяли в дистиллированной воде после чего упаривали на ротационном испарителе (Laborota 4010, Германия).

Для определения степени замещения, полученный модифицированный полимер после осаждения растворяли в дистиллированной воде и очищали диализом против воды (диализные мешки Sigma 12 000), очищенный раствор сушили с использованием лиофильной сушки (Martin Christ Alpha 1-4 LD, Германия).

Степень замещения определяли, анализируя соотношения интегральных интенсивностей сигналов на спектрах ^1H -ЯМР полимера.

4.2.2 Анализ строения модифицированных полимеров

Снятие спектров осуществляли с использованием ИК-спектрометра НПВО Nicolet IS10 и ЯМР-спектрометра Avance Bruker DPX-300

Молекулярно-массовые характеристики определяли методом ситовой (эксклюзионной) хроматографии с детектором многоугольного лазерного светорассеяния и дифференциальным рефрактометром (ЭХ-МУЛС-ДР). Использовали колонки TSKgel 5000PW (размер пор 17 мкм, размер частиц 100 Ангстрем) и 3000PW (размер пор 12 мкм, размер частиц 200 Ангстрем) производства Tosoh Bioscience, размером 30×7.5 см, соединенные в следующей последовательности: 5000PW/5000PW/3000PW. Расчеты проводились полидисперсным методом калибровки. Расчет средних молекулярных масс осуществляли программным обеспечением «Astra» 5.3.4.14 (Wyatt Tehnology) в автоматическом режиме. Статистическую обработку результатов выполняли при помощи программы Microsoft Excel в соответствии с ГОСТ 54500.3-2011.

Температуру стеклования определяли с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (Netzsch DSC 204 F1 Phoenix) в диапазоне

температур 25-300 °С при скорости нагрева 10 К/ мин в условиях продувки инертным газом (аргоном). В силу наличия в образце остаточного растворителя, для каждого образца производили по два сканирования: после первого сканирования, заканчивающегося при максимально возможной температуре, не нарушающей термостабильность образца, его охлаждали до минус 25 °С и проводили второе сканирование.

4.2.3 Синтез полимерных гидрогелей на основе м- ПВС и м-ГЭК

4.2.3.1 Синтез полимерных гидрогелей при положительных температурах.

Полимерные гидрогели получали в тонкостенных стеклянных пробирках диаметром 15 мм. Для этого раствор модифицированного полимера заливали в пробирки, добавляли иницирующую систему или водный раствор инициатора и выдерживали при заданной температуре в течении заданного времени. По завершении процесса сшивки образовавшийся гидрогель извлекали, измельчали и тщательно промывали большим избытком воды, после чего фильтровали и определяли выход гель-фракции аналогично тому, как это указано в п.4.2.1.

4.2.3.2 Синтез полимерных гидрогелей в воднозамороженных системах

Синтез гидрогелей осуществляли тонких стеклянных пробирках объемом 15 мл. Навески сомономеров растворяли в дистиллированной воде, полученный раствор охлаждали до температуры 0÷5 °С, добавляли инициатор и в течение одной минуты помещали в криотермостат (Julabo F-32, США), где поддерживали заданную температуру с точностью $\pm 0,2$ °С в течение требуемого времени.

По завершении процесса реакцию систему быстро размораживали, образовавшиеся гидрогели извлекали и промывали в горячей воде до полного исчезновения в промывных водах непрореагировавших компонентов. Критерием качества отмывки служила величина оптической плотности промывных вод в интервале длин волн 200-400 нм (оптическую плотность определяли с использованием Unico 2804, Япония). После отмывки гидрогели замораживали и сушили с использованием лиофильной сушки (Martin Christ Alpha 1-4 LD, Германия) до постоянной массы.

Выход гель-фракции определили аналогично тому, как это указано в п. 4.2.3.1.

4.2.4 Исследование морфологии поверхности полимерных гидрогелей.

Образцы для исследования получали в разъемных стеклянных формах размером 100×50×3 мм, сообразно методикам, приведенным в п. 4.2.3. но после промывки полученные для фиксации пористой структуры гидрогели замораживали в жидком азоте, поскольку при быстром охлаждении снижается вероятность образования в структуре гидрогелей артефактов, и сушили с использованием лиофильной сушки (Martin Christ Alpha 1-4 LD, Германия).

Для получения микрофотографий использовали сканирующий растровый электронный микроскоп JSM U3 (Япония) (ускоряющее напряжение 15 кВ; ток электронного пучка – 1×10^{-10} Ампер), снабженный системой WinEDS. Микрофотографии получали при четырех увеличениях ×3000, ×1000, ×300, ×100, ×40 раз, соответственно.

Обработка микрофотографий образцов гидрогелей, проводилась путем выбора эквивалентного диаметра поры с площадью которой равной площади неопределенной фигуры поры. Причем поиск этого оптимума проводили визуально с использованием специальных шаблонов.

Диаметр эквивалентной сферы определяли согласно выражению:

$$d_s = 4\sqrt{a \cdot b}, \quad (37)$$

где a, b - радиусы эллипса с площадью равной площади поры

Проводилась обработка не менее трех микрофотографии для каждого образца (как правило при увеличении ×300 раз). Количество обработанных пор на каждой микрофотографии было не менее 500. По результатам, в соответствии с принятой методикой, строили гистограммы распределения пор по размерам.

Средний диаметр пор определяли по формуле:

$$d_{cp} = \frac{\sum_{i=0}^N d_{э,i}}{N}, \quad (38)$$

где $d_{э,i}$ - эквивалентный диаметр поры

N - общее число пор

Также определяли общую пористость полимерных гидрогелей по формуле:

$$P = \frac{\sum_{i=1}^N \pi \cdot a_i \cdot b_i}{S}, \quad (39)$$

где a_i, b_i ,- радиусы эллипса

S - общая площадь поверхности

N - число пор

4.3 Изучение биосовместимости полимерных гидрогелей

4.3.1 Изучение цитотоксичности экспериментальных образцов гидрогелевых материалов

Готовые к испытаниям образцы полимерных гидрогелей помещали в стеклянные плоскодонные конические колбы с плотно притертыми пробками, заливали дистиллированной водой и термостатировали при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в «динамическом» режиме на протяжении 14 суток.

Соотношение между массой образца (M) и объемом добавляемой дистиллированной воды (V), играющей роль модельной среды рассчитывали из уравнения:

$$\frac{M}{V} = \frac{m}{V} \cdot k \quad (40)$$

где m – максимальная масса образца при его практическом применении, г;

k - коэффициент аггравации, равный 10.

В качестве контрольного раствора использовали дистиллированную воду, на которой готовились вытяжки, которую термостатировали в тех же условиях.

Для оценки цитотоксического и цитостатического действия водных вытяжек из образцов использовали суспензионную кратковременную культуру подвижных половых клеток, приготовленную из замороженной спермы крупного рогатого скота, с последующим определением индекса токсичности.

В качестве контрольного раствора использовалась глюкозо-цитратная среда следующего состава: глюкоза – 4 г, цитрат натрия – 1 г, дистиллированная вода - 100 мл. Одновременно раствор служил и разбавителем для оттаивания замороженной спермы. Опытный раствор (вытяжки из образцов) доводили до изотонии глюкозой и цитратом.

Стеклянные пробирки с плотно притертыми пробками с контрольным и опытными растворами (по 0,4 мл) помещали в водяную баню при температуре $40^{\circ}\pm 1,5^{\circ}\text{C}$. Для приготовления маточного раствора спермы в пробирку вносили 0,4 мл разбавителя и ставят в водяную баню при температуре $40 \pm 1,5^{\circ}\text{C}$, в нагретый раствор опускали извлеченную из сосуда Дьюара гранулу замороженной спермы.

Для приготовления рабочих образцов в пробирки с контрольным и опытным растворами помещали по 0,1 мл маточного раствора спермы. Рабочие образцы переносили в капилляры. Капилляры помещали в анализатор (стенд для определения подвижности суспензионной культуры подвижных клеток типа АТ-04). Производили обработку экспериментальных данных.

Индекс токсичности определяли по формуле:

$$It = \frac{t_{\text{cp}}^0}{t_{\text{cp}}^k} \times 100\% \quad (41)$$

где t_{cp}^0 и t_{cp}^k - средние арифметические значения времени подвижности соответственно для опытной и контрольной выборок образцов.

Исследуемые вытяжки из экспериментальных образцов можно считать нетоксичными, если индекс токсичности находится в интервале от 70 до 120 %.

4.3.2 Определение гемотоксического действия экспериментальных образцов гидрогелевых материалов

Пробоподготовку проводили аналогично п. 4.3.1.

Оценку гемолитического действия водных вытяжек проводили в опытах «in vitro» с изолированными эритроцитами кроликов. Для приготовления взвеси эритроцитов использовали цитратную кровь кролика, приготовленную на 3,8% растворе цитрата натрия в соотношении 1:9.

Для обеспечения статистической достоверности отбирали 3 образца крови. Цитратную кровь в количестве 5 мл центрифугировали в течение 10 минут при 900 об/мин, отделяя надосадочную жидкость. К осадку добавляли 8 мл физиологического раствора. Содержимое перемешивали и центрифугировали еще 10 минут, надосадочную жидкость отделяли. Надосадочная жидкость должна быть прозрачной, бесцветной, не иметь следов гемолиза. При несоответствии надосадочной жидкости указанным требованиям, операцию по отмыванию осадка эритроцитов физиологическим раствором повторяли.

Для получения 10% взвеси эритроцитов 1 мл осадка клеток смешивали с 9 мл физиологического раствора.

Опытную пробу готовили, используя 10% взвесь эритроцитов крови кролика и вытяжку из образцов (5 мл), контрольную пробу - 10% взвесь эритроцитов и изотонический раствор хлорида натрия. Пробу помещали в термостат на 1 час при температуре 37 ± 3 °С, после чего центрифугировали и определяли оптическую плотность на фотометре в кювете с толщиной слоя 1 см при длине волны 540 нм против дистиллированной воды.

Расчет процента гемолиза производили по формуле:

$$\% \text{ гемолиза} = \frac{E_{\text{опт}} - E_{\text{к}}}{E_{100}} \times 100, \quad (42)$$

где $E_{\text{опт}}$ - оптическая плотность опытной пробы;

$E_{\text{к}}$ - оптическая плотность контрольной пробы;

E_{100} - оптическая плотность пробы со 100%-ным гемолизом.

Исследуемые вытяжки из образцов имплантатов можно считать свободными от гемолитически действующих веществ, если процент гемолиза во всех трех образцах крови менее двух.

4.3.3 Определение раздражающего действия образцов гидрогелевых материалов

Пробоподготовку проводили аналогично п. 4.3.1.

Раздражающее действие вытяжек из образцов изучали при воздействии на слизистую оболочку глаз кроликов

В эксперимент отбирали не менее трех животных на каждый из образцов, с этой целью за сутки до начала исследования визуально оценивали состояние глаз каждого кролика для выявления выраженных повреждений.

В случае обнаружения патологических изменений хотя бы в одном глазу животное заменяли. С целью более четкого выявления изменений роговицы использовали 2% раствор флуоресцеина натрия, офтальмоскоп, ручную щелевую лампу и другие устройства.

Испытуемую вытяжку из образцов инстиллировали в один глаз кролика в количестве 1-2 капель, другой глаз оставляли для контроля (в него вносили дистиллированную воду). Оба глаза животных, которым инстиллировали вытяжку из образцов, осматривали через 1, 24, 48, 72 часа после воздействия. Наблюдаемую реакцию оценивали и регистрировали в соответствии с системой классификации повреждений (Таблица 20).

Если при воздействии на слизистую оболочку глаза более чем у одного животного на любой стадии исследования возникали патологические изменения, отмеченные в таблице знаком «*», считали, что вытяжка обладает раздражающим действием. В том случае, если патологические изменения выявлялись в подопытном глазу только у одного из трех кроликов, и сомнительных результатах исследования повторяли на большем количестве животных. Если патологические изменения при повторных исследованиях обнаруживались более чем у половины кроликов, считали, что вытяжка обладает раздражающим действием.

Таблица 20 - Система классификации повреждений глаза

Наблюдаемая реакция	Оценка в баллах
1.Роговица	
Степень помутнения	
Отсутствие	0
Генерализованное или диффузное помутнение, детали радужной оболочки хорошо различимы	1
Легко различимое полупрозрачное помутнение, детали радужной оболочки замутнены	2
Опалесцирующее помутнение, детали радужной оболочки не различимы, размер зрачка определить невозможно	3
Помутнение светонепроницаемо, радужная оболочка не видна	4
Площадь пораженной роговицы	*
Одна четверть (или менее)	0
Более одной четверти, но меньше половины	1
Более половины, но меньше трех четвертей	2
Более трех четвертей или площадь всего глаза	3
2.Радужная оболочка	
Нормальная	
Складчатость выше нормы, заметно набухание, сосуды инъецированы, радужная оболочка реагирует на свет	0
Реакция на свет отсутствует, увеличено количество кровоизлияний	1
3. Конъюнктива	
Нормальные сосуды	
Сосуды заметно инъецированы	2
Более выраженная диффузная гиперемия, отдельные сосуды плохо различимы	*
Диффузная резко выраженная краснота	0
4.Отек конъюнктивы	1
Отсутствие отека	2
Слегка заметный отек	*
Выраженный отек с частичным закрытием века	3
отек с половинным закрытием века	*
отек с закрытием века от половинного до полного	
5.Выделения	0
Отсутствие выделений	1
Незначительные выделения, отличающиеся от нормальных	2
Выделения на веках и шерсть вокруг глаз	*
Выделения на веках и шерсть вокруг глаз и значительной площади мордочки	3
	*
	4
	*
	0
	1
	2
	*
	3
	*
*Положительный результат	

4.3.4 Исследование сенсibiliзирующего действия

Пробоподготовку проводили аналогично п. 4.3.1.

Для исследования сенсibiliзирующего действия образцов белым крысам в наружную поверхность уха внутрикожно вводили по 0,02 мл вытяжек. Контрольным животным вводили по 0,02 мл модельной среды (дистиллированная вода). Наблюдение за состоянием кожи проводили через 15 мин, 1, 24, 48 и 72 часа после введения.

Таблица 11 - Оценка кожно-раздражающего действия

Кожная реакция (изучаемые показатели)	Оценка в баллах	Оценка результатов эксперимента	Средний балл
Эритема		Отсутствие реакции	0 – 0,4
Отсутствие эритемы	0		
Очень слабая эритема	1		
Отчетливая эритема	2		
Средняя эритема	3	Слабая реакция	0,5 – 0,9
Сильная эритема	4		
Образование отека			
Отсутствие отека	0		
Очень слабый отек	1	Средняя реакция	2,0 – 4,9
Отчетливый отек	2		
Средний отек (возвышение на 1 мм)	3		
Сильный отек (возвышение более 1 мм)	4	Сильная реакция	5,0 – 8,0
Общий максимальный балл, оценивающий раздражение	8		

Через 10 суток проводили по 5 накожных аппликаций - наносили по 0,5 мл вытяжки на выстриженные заранее участки кожи животных размером 1x1 см. Контрольным животным проводили аппликации модельной среды в том же режиме. Ежедневно наблюдали и оценивали реакцию раздражения.

Через сутки после последней аппликации проводили провокационную пробу путем внутрикожного введения 0,02 мл вытяжки в противоположный проведенным аппликациям бок каждого животного. Реакцию на провокационную пробу отмечали через 24, 48 и 72 часа.

В соответствии с классификацией (Таблица 21) оценивали степень кожной реакции, включая эритему и отек для каждого животного и каждого интервала времени (24, 48 и 72 часа) после воздействия. Для каждого животного складывали баллы кожной реакции, вызванной исследуемым материалом (включая отек и эритему) в каждый интервал времени наблюдения и делили на общее число наблюдений, получали балл первичного раздражения, который вычисляли и для контроля. Из балла первичного раздражения подопытных животных вычитали показатель контроля. Затем складывали полученные баллы кожной реакции всех подопытных животных и делят на количество особей. Полученный индекс суммарного раздражения сравнивали с показателями, представленными в таблице, отмечая слабую, среднюю или сильную реакцию на воздействие изучаемого материала.

Оценку возможного сенсибилизирующего действия проводили с использованием диагностического метода специфического лизиса лейкоцитов (РСЛЛ). Через 24 часа после проведения внутрикожной пробы животных забивали декапитацией, брали кровь для проведения РСЛЛ.

Исследуемую кровь в количестве 0,1 мл, добавляли в две центрифужные или видалевские пробирки:

1 (опытная) - по 0,05 мл антикоагулянта и вытяжки, которая доведена до изотонии хлоридом натрия

2 (контрольная) - по 0,05 мл антикоагулянта и физиологического раствора

Обе пробирки инкубировали в течение 2-х часов при температуре 37°C.

Подсчет абсолютного количества лейкоцитов проводили на приборе Picoscale

Показатель РСЛЛ рассчитывали по формуле:

$$\text{Показатель РСЛЛ} = \frac{L_{\text{контроль}} - L_{\text{опыт}}}{L_{\text{контроль}}} \times 100\% \quad (43)$$

где $L_{\text{контроль}}$ – количество лейкоцитов в пробе без аллергена;

$L_{\text{опыт}}$ - количество лейкоцитов в пробе с вытяжкой.

Реакцию расценивали как положительную при показателе РСЛЛ выше 10%. Показатель РСЛЛ превышающий 20 % свидетельствует о высоком уровне сенсibilизации животных.

4.3.5 Исследование острого общетоксического действия

Пробоподготовку проводили аналогично п. 4.3.1

Действие вытяжек образцов изучали на белых беспородных мышах массой 20-22 г. Животных разделяли на подопытные и контрольную группы не менее чем по 10 голов в каждой. Содержание животных полностью соответствовало санитарным нормам. Подопытным животным однократно внутрибрюшинно вводили по 1 мл вытяжек (из расчета 50 мл/1кг массы тела). Контрольные животные в том же режиме получали дистиллированную воду. Температура вводимых растворов - $37 \pm 1,5^{\circ}\text{C}$.

В течение эксперимента оценивали общее состояние животных, изменение внешнего вида, поведения, двигательной активности, контролировали прирост массы тела. По окончании эксперимента животных забивали методом декапитации, макроскопически оценивали состояние брюшины и внутренних органов, определяли органо-соматические показатели (ОСП), рассчитываемые как соотношение массы органа в миллиграммах к массе тела в граммах.

Полученные данные подвергали статистической обработке с использованием критерия Стьюдента «t» и проверяли наличие, статистически достоверных изменений массы тела и ОСП (органо-соматических показателей) у подопытных животных по сравнению с контрольной группой.

4.3.6 Исследование подострого и хронического общетоксического действия

Изучение подострой и хронической токсичности образцов гидрогелей проводили на беспородных белых крысах-самцах, являющихся наиболее подходящим видом животных для проведения токсикологических исследований. Пористые и изотропные гидрогели в виде специально изготовленных образцов, под медикаментозным наркозом (препарат зоолетил в дозе 15 мг/кг) имплантировали подопытным животным внутримышечно в область бедра.

Расчет массы имплантата проводили по формуле:

$$m = \frac{M}{P} \cdot p \cdot K, \quad (44)$$

где М - максимальное количество для одного пациента;

Р - средняя масса тела человека (70 кг);

р - средняя масса тела подопытных животных (0,250 кг);

К- коэффициент аgravации, равный 10.

Содержание подопытных и контрольных животных полностью соответствовало санитарным нормам.

Длительность эксперимента с момента имплантации составляла 1, 3 недели, 2 и 4 месяца.

Часть подопытных и контрольных животных (по 5 особей из группы) выводили из эксперимента методом декапитации через и отбирали материал для проведения патоморфологических исследований.

Внутренние органы подопытных и контрольных животных (печень, почки, селезенка), а также соединительнотканная капсула, окружающая образцы, взятые у подопытных животных, подвергались патоморфологическим исследованиям.

5. Выводы

1. Радикальной полимеризацией модифицированных глицидилметакрилатом поливинилового спирта и 2-гидроксиэтилкрахмалата, были получены биосовместимые гидрогели, способные к биодеградации с заданной скоростью и пригодные для медико-биологического использования.

2. Опытным путем определены условия, позволяющие синтезировать водорастворимые продукты с заданной степенью замещения.

3. Установлен характер влияния на процесс сшивки концентрационного, температурного, временного и ряда других иных факторов.

4. Электронно-микроскопическими исследованиями показано, что полученные макромеры представляют собой анизотропные материалы с размером пор в интервале 1-100мкм. Общая пористость и средний размер пор уменьшается по мере роста концентрации полимера и убывания температуры процесса, но практически не зависят от концентрации инициатора и соотношения сомономеров в реакционной смеси.

5. Исследования на клеточных культурах и экспериментальных животных показали высокую степень биосовместимости полученных гидрогелевых материалов. Установлена их способность к биодеградации с замещением собственными тканями организма. Продемонстрирована возможность регулирования скорости биодеградации посредством варьированием состава полимерного гидрогеля.

6. Список литературы

1. Cadar O., Paul M., Roman C., Miclean M., Majdik C. Biodegradation of poly(lactic acid) and (lactic acid-ethylene-malonic or succinic acid) copolymers under controlled composting conditions in a laboratory system // *Polym. Degrad. Stab.*– 2012 .– Vol.97.–№ 3.– 354-357p.
2. Bianca Posocco , Eva Dreussi , Jacopo de Santa , Polysaccharides for the Delivery of Antitumor Drugs // *Materials* 2015, 8, 2569-2615
3. Senthil S. Kumar, Biopolymers in Medical Applications// Department of Textile Technology, Kumaraguru College of Technology.– Coimbatore, 2007.
4. Fisher OZ, Khademhosseini A, Langer R, Peppas NA, Bioinspired materials for controlling stem cell fate// *Acc Chem Res.*– 2010.– 43(3).– 419-428p.
5. Lowman AM, Peppas NA. Hydrogels// *Encyclopedia of controlled drug delivery.*– New York.– 1999.– 397–418p.
6. Slaughter BV, Khurshid SS, Fisher OZ, Khademhosseini A, Peppas N, Hydrogels in regenerative medicine// *Adv Mater.*–2009.– 21(32–33).–3307-3329p
7. Honey Priya James, Rijo John, Anju Alex, Anoop K.R. Smart polymers for the controlled delivery of drugs – a concise overview// *Acta Pharmaceutica Sinica B.*– 2014.–4(2).–120-127p
8. F. Lim, A.M. Sun, Microencapsulated islets as bioartificial pancreas// *Science.*– 1980.– 210.–908-910p.
9. Ulijn RV, Bib N, Jayawarna V, Thornton PD, Todd SJ, Mart R, Bioresponsive hydrogels// *Mater Today.*– (2007).–10(4).– 40p
10. I.V. Yannas, E. Lee, D.P. Orgill, Synthesis and characterization of a model extracellular matrix that induces partial regeneration of adult mammalian skin// *Proc. Natl. Acad. Sci.– USA.*– 1989.–86.– 933-937p.
11. Muhammad Usman Minhas, Mahmood Ahmad, Liaqat Ali, Muhammad Sohail, Synthesis of chemically cross-linked polyvinyl alcohol-co-poly (methacrylic acid) hydrogels by copolymerization; a potential graft-polymeric carrier for oral delivery of 5-fluorouracil // *Journal of Pharmaceutical Sciences* .–2013.–21.–1p.

12. Peppas NA, Huang Y, Torres M-Lugo, Ward JH, Zhang J, Physicochemical, foundations and structural design of hydrogels in medicine and biology // *Annu. Rev. Biomed. Eng.*–2000.– 2.– 9-29p.
13. Barbara Zavan, Roberta Cortivo and Giovanni Abatangelo, *Hydrogels and Tissue Engineering*, Springer-Verlag.– Italia 2009
14. V. Kudela, *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering* // Wiley, New York.– 1987.
15. Jinchun Sun and Huaping Tan, *Alginate-Based Biomaterials for Regenerative Medicine Applications* // *Materials* .–2013.– 6p.
16. Dr. J. Vernengo and Dr. S. Farrell, *Drug Delivery with Alginate*, June 2007
17. Erich Schuster , Johanna Eckardt, Anne-Marie Hermansson , Anette Larsson^c, Niklas Lorén , Annika Altskär, Anna Ström, *Microstructural, mechanical and mass transport properties of isotropic and capillary alginate gels* // *The Royal Society of Chemistry* 1st November.– 2013.
18. Marijke M. Faas, Genaro Alberto Paredes Juárez, Paul de Vos, *Immunological and technical considerations in application of alginate-based microencapsulation systems* // *Bioeng.– Biotechnol.*– 2014
19. Poonam Patil, Daksha Chavanke, Milind Wagh, *A review on Iontropic gelation method: novel approach for controlled gastroretentive gelspheres* // *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.*–2012.– Vol 4(4)
20. Raphael Riva, Heloise Ragelle, Anne des Rieux, Nicolas Duhem, Christine Jerome, Veronique Preat, *Chitosan and Chitosan Derivatives in Drug Delivery and Tissue Engineering* // *Adv Polym Sci.*–2011.– 244.–19-44p.
21. J. Bergera, M. Reista, J.M. Mayera, O. Feltb, N.A. Peppasc, R. Gurnyb, *Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications* // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.*– 2004.– 57 .–19-34p.
22. A. Chenite, C. Chaput, D. Wang, C. Combes, M.D. Buschmann, C.D. Hoemann, J.C. Leroux, B.L. Atkinson, F. Binette, A. Selmani, *Novel injectable neutral*

solutions of chitosan form biodegradable gels in situ // *Biomaterials.*–2000.– 21 .– 2155-2161p.

23. T. Watanabe, A. Ohtsuka, N. Murase, P. Barth, K. Gersonde, NMR studies on water and polymer diffusion in dextran gels. Influence of potassium ions on microstructure formation and gelation mechanism // *Magn. Reson. Med.*–1996.– 35 .– 697-705p.

24. F. Yokoyama, I. Masada, K. Shimamura, T. Ikawa, K. Monobe, Morphology and structure of highly elastic polyvinyl alcohol hydrogel prepared by repeated freezing-and-melting // *Colloid Polym. Sci.*–1986.– 264.– 595-601p.

25. El-Refaie Kenawy, Elbadawy A. Kamoun, Mohamed S. Mohy Eldin, Mahmoud A. El-Meligy, Physically crosslinked poly(vinyl alcohol)-hydroxyethyl starch blend hydrogel membranes: Synthesis and characterization for biomedical applications // *Arabian Journal of Chemistry Volume.*– 2014.–7(3).–372-380p.

26. Y. Ikada, K. Jamshidi, H. Tsuji, S.-H. Hyon, Stereocomplex formation between enantiomeric polylactides // *Macromolecules.*–1987.– 20.– 904-906p.

27. S.J de Jong, S.C De Smedt, C.F van Nostrum, J.J Kettenes-van den Bosch, W.E Hennink, Biodegradable hydrogels based on stereocomplex formation between lactic acid oligomers grafted to dextran // *J Demeester Journal of Controlled Release .*–2001.– Volume 72(1–3).– 47-56p.

28. Hennink WE1, De Jong SJ, Bos GW, Veldhuis TF, van Nostrum CF, Biodegradable dextran hydrogels crosslinked by stereocomplex formation for the controlled release of pharmaceutical proteins // *Int J Pharm.*–2004.– 277(1-2).– 99-104p.

29. S. Forster, M. Antonietti, Amphiphilic block copolymers in structure-controlled nanomaterial hybrids // *Adv. Mater.*–1998.– 10.– 195-217p.

30. Constantinos Tsitsilianis, Reversible hydrogels from amphiphilic polyelectrolyte model multiblock copolymers.– Patra, 2009

31. Joseph P. Kennedy, Pious Kurian. Physically crosslinked amphiphilic networks, methods of preparation, and uses thereof. The University Of Akron.– 2003.

32. K. Akiyoshi, S. Deguchi, N. Moriguchi, S. Yamaguchi, J. Sunamoto, Self-aggregates of hydrophobized polysaccharides in water - formation and characteristics of nanoparticles // *Macromolecules.*–1993.– 26.– 3062-3068p.
33. K. Akiyoshi, E.-C. Kang, S. Kurumada, J. Sunamoto, Controlled association of amphiphilic polymers in water: thermosensitive nanoparticles formed by self-assembly of hydrophobically modified pullulans and poly(N-isopropylacrylamides) // *Macromolecules.*–2000.– 33.– 3244-3249p.
34. K. Akiyoshi, S. Deguchi, H. Tajima, T. Nishikawa, J. Sunamoto, Microscopic structure and thermoresponsiveness of a hydrogel nanoparticle by self-assembly of a hydrophobized polysaccharide // *Macromolecules.*–1997.– 30.– 857-861p.
35. Takigami, M., Amada, H., Nagasawa, N., Yagi, T., Kasahara, T., Takigami, S. & Tamada, Preparation and properties of CMC gel // *Transactions of the Materials Research Society of Japan.*–2007.– 32(3).– 713-716p.
36. Syed K. H. Gulrez, Saphwan Al-Assaf and Glyn O Phillips, *Hydrogels: Methods of Preparation, Characterisation and Applications // Progress in Molecular and Environmental Bioengineering – From Analysis and Modeling to Technology Applications.*– 2011.
37. D. Eagland, N.J. Crowther, C.J. Butler, Complexation between polyoxyethylene and polymethacrylic acid - The importance of the molar mass of polyethylene // *Eur. Polym. J.*–1994.– 30.– 767-773p.
38. Hubbell, J.A., Hydrogel systems for barriers and local drug delivery in the control of wound healing // *Journal of Controlled Release.*– 1996.– 39(2-3).– 305-313p.
39. J. Cappello, J. Crissman, M. Dorman, M. Mikolajczak, G. Textor, M. Marquet, F.Ferrari, Genetic-engineering of structural protein polymers // *Biotechnol. Prog.*–1990.– 6.– 198-202p.
40. Pu Shi, Joshua A Gustafson, J Andrew MacKay Genetically engineered nanocarriers or drug delivery // *International Journal of Nanomedicine.*–2014.– 9.– 1617–1626p.

41. J. Cappello, J.W. Crissman, M. Crissman, F.A. Ferrari, G. Textor, O. Wallis, J.R. Whitley, X. Zhou, D. Burman, L. Aukerman, E.R. Stedronsky, In-situ self-assembling protein polymer gel systems for administration, delivery, and release of drugs // *J. Controlled Release.*–1998.– 53.– 105-117p.
42. Takashi Miyata, Noriko Asami & Tadashi Uragami, A reversibly antigen-responsive hydrogel // *Nature.*– 1999.–399.
43. T. Miyata, N. Asami, T. Uragami, Preparation of an antigen-sensitive hydrogel using antigen–antibody bindings // *Macromolecules.*–1999.– 32 .– 2082-2084p.
44. Kosmas Deligkaris, Tadele Shiferaw Tadele, Wouter Olthuis, Albert van den Berg , Hydrogel-based devices for biomedical applications // *Sensors and Actuators B.*–2010.– 147.– 765-774p.
45. Allan S. Hoffman , Hydrogels for biomedical applications // *University of Washington Advanced Drug Delivery Reviews.*–2002.– 43.– 3–12p.
46. Jaya Maitra , Vivek Kumar Shukla, Cross-linking in Hydrogels - A Review // *American Journal of Polymer Science.*– 2014.– 4(2).– 25-31p.
47. N.A. Peppas: *Hydrogels in Medicine and Pharmacy, Vol. 1. Fundamentals*, CRC Press, Boca Raton, FL.– 1986.– 180.
48. E. H. Cordes, W. P. Jencks, On the Mechanism of Schiff Base Formation and Hydrolysis // *Journal of the American Chemical Society.*–1962.– 84(5).–307p.
49. Zhaoqi Yang, Pinhua Sun, Compare of three ways of synthesis of simple Schiff base // *Molbank* 2006.–2006.– 514.
50. Christian Solís-Calero, Joaquín Ortega-Castro, Alfonso Hernández-Laguna, Francisco Muñoz , A comparative DFT study of the Schiff base formation from acetaldehyde and butylamine, glycine and phosphatidylethanolamine // *Theor Chem Acc.*–2012.– 131.– 1263
51. Murakami Y1, Yokoyama M, Okano T, Nishida H, Tomizawa Y, Endo M, Kurosawa H., A novel synthetic tissue-adhesive hydrogel using a crosslinkable polymeric micelle // *J Biomed Mater Res A.*–2007.–80(2).– 421.

52. Jian-feng Pan, Chang-an Guo, Teng Fei, Wen-shuai Fan, Jia Liu, Shuo Li and Zuo-qin Yan, Preparation and Characterization of a Novel Injectable Hydrogel // *Adv Genet Eng* 2.– 2013.–105.
53. Huaping Tan, Kacey G. Marra , Injectable, Biodegradable Hydrogels for Tissue Engineering Applications // *Materials*.–2010.–(3).– 1746-1767
54. Malcolm Xing , Schiff-based aldehydic hyaluronic acid-chitosan hydrogel compositions and uses thereof.– 2014
55. Bulpitt P, Aeschlimann D. New Strategy for Chemical Modification of Hyaluronic Acid: Preparation of Functionalized Derivatives and Their Use in the Formation of Novel Biocompatible Hydrogels // *J. Biomed. Mater. Res.*–1999.–(47) .– 152-169p.
56. Sytze J. Buwalda, Pieter J. Dijkstra, Jan Feijen, In Situ Forming Poly(ethylene glycol)-Poly(L -lactide) Hydrogels via Michael Addition:Mechanical Properties, Degradation, and Protein Release // *Macromol. Chem. Phys.*–2012.–213.– 766–775p.
57. Christine Hiemstra, Leonardus J. van der Aa, Zhiyuan Zhong, Pieter J. Dijkstra, and Jan Feijen, Rapidly in Situ-Forming Degradable Hydrogels from Dextran Thiols through Michael Addition // *Biomacromolecules*.–2007.– 8(5).
58. Jordan S. Miller, Colette J. Shen, Wesley R. Legant, Jan D. Baranski, Brandon L. Blakely, Christopher S. Chen, Bioactive hydrogels made from step-growth derived PEG–peptide macromers // *Biomaterials*.–2010.– 31.– 3736-3743p.
59. Mariarosaria Tortora, Francesca Cavalieri, Ester Chiessi, and Gaio Paradossi, Michael-Type Addition Reactions for the In Situ Formation of Poly(vinyl alcohol)-Based Hydrogels // *Biomacromolecules*.–2007.– 8.– 209-214p.
60. Flurin Willi, Reactivity of Acrylamide Derivatives with Thiols Evaluation of the Applicability of this Michael-type Addition for in situ Forming of Hydrogels // *Student of Material Science*.–ETH Zürich, 2001
61. Park Y, Lutolf MP, Hubbell JA, Hunziker EB, Wong M. Bovine, Primary Chondrocyte Culture in Synthetic Matrix Metalloproteinase-Sensitive

Poly(ethylene glycol)-Based Hydrogels as a Scaffold for Cartilage Repair // *Tissue Eng.*–2004.–10.– 515-522p.

62. Cotton GJ, Muir TW. Peptide Ligation and Its Application to Protein Engineering // *Chem. Biol.*–1999.–6.– 247-256p.

63. Hong Du, Guangyu Zha, Lilong Gao, Huan Wang, Xiaodong Li, Zhiquan Shena, Weipu Zhu, Fully biodegradable antibacterial hydrogels via thiol–ene “click” chemistry // *Polym. Chem.*–2014.–5.

64. Michael Malkoch, Robert Vestberg, Nalini Gupta, Laetitia Mespouille, Philippe Dubois, Andrew F. Mason, James L. Hedrick, Qi Liao, Curtis W. Frank, Kevin Kingsburye, Craig J. Hawker, Synthesis of well-defined hydrogel networks using Click chemistry // *Chem. Commun.*– 2006.– 2774-2776p.

65. Novel hydrogels via click chemistry: synthesis and potential biomedical applications, Crescenzi V1, Cornelio L, Di Meo C, Nardecchia S, Lamanna R. // *Biomacromolecules.*–2007.– 8(6).

66. Jing Zhang, Xiao-Ding Xu, De-Qun Wu, Xian-Zheng Zhang, , Ren-Xi Zhuo, Synthesis of thermosensitive P(NIPAAm-co-HEMA)/cellulose hydrogels via “click” chemistry.– 2009.

67. A. Uliniuc, M. Popa, T. Hamaide, M. Dobromir, New approaches in hydrogel synthesis – click chemistry:A Review // *Cellulose Chem. Technol.*–2012.– 46 (1-2).– 1-11p.

68. Daniela Pasqui, Milena De Cagna and Rolando Barbucci, Polysaccharide-Based Hydrogels: The Key Role of Water in Affecting Mechanical Properties // *Polymers.*– 2012.– 4.– 1517-1534p.0

69. Hossein Omidian, Kinam Park, Introduction to Hydrogels, Biomedical Applications of Hydrogels Handbook.– 2010

70. Omidian, H.; Park K. Introduction to Hydrogels. In Biomedical Applications of Hydrogels Handbook // Ottenbrite, R.M., Ed.; Springer: London, UK.– 2010.– 1–16p.

71. Iwona Gibas and Helena Janik, Review: Synthetic polymer hydrogels for biomedical applications // *chemistry & chemical technology.*– 2010.–4(4).

72. C Maldonado-Codina, Hydrogel Lenses // Materials and Manufacture: A Review, Optometry in Practice.–2003.– 4 .– 101 – 115p.
73. Ferrer G., Pradas M., Gomez Ribelles J. and Sanchez M.: Polymer.– 2004.– 45.– 6207p.
74. Jadwiga Ostrowska-Czubenko, Milena Pieróg, Magdalena Gierszewska-Drużyńska, State of water in noncrosslinked and crosslinked hydrogel chitozan membranes – DSC studies // Progress on Chemistry and Application of Chitin and Its., XVI, 2011.
75. Zofia Modrzejewska, Characterization of water state in chitosan hydrogel membranes // Progress on Chemistry and Application of Chitin and Its, XVI, 2011.
76. Тагер А.А. Физико-химия полимеров, под ред. А. А. Аскадского. Научный мир, 2007. – 573с.
77. Annabi N1, Mithieux SM, Weiss AS, Dehghani F., Cross-linked open-pore elastic hydrogels based on tropoelastin, elastin and high pressure CO2 // Biomaterials.– 2010.– 31(7).– 1655-65p.
78. Tristan I. Crolla, Silke Gentzb, Kilian Muellerb, Malcolm Davidsona, Andrea J. O’Connora, Geoffrey W. Stevensa, Justin J. Cooper-Whitec, Modelling oxygen diffusion and cell growth in a porous, vascularising scaffoldfor soft tissue engineering applications // Chemical Engineering Science.–2005.– 60.– 4924 – 4934p.
79. Sidi A. Bencherif , Thomas M. Braschler, Philippe Renaud, Advances in the design of macroporous polymer scaffolds for potential applications in dentistry // Periodontal Implant Science.–2013.– 43.– 251-261p.
80. Gerecht S., Townsend S.A., Pressler H., Zhu H., Nijst C.L., Bruggeman, J.P., Nichol, J.W., Langer, R. A porous photocurable elastomer for cell encapsulation and culture // Biomaterials.–2007.– 28.– 4826p.
81. Dr Domokos Bartis , Dr. Judit Pongracz, Three dimensional tissue cultures and tissue engineering .– 2011
82. Nasim Annabi, M.S., Jason W. Nichol, Ph.D.,2,3, Xia Zhong, M.S., Chengdong Ji, M.B.E., Sandeep Koshy, B.A.Sc.,Ali Khademhosseini, Ph.D.,and Fariba

Dehghani, Ph.D., Controlling the Porosity and Microarchitecture of Hydrogels for Tissue Engineering // Tissue Engineering B.–2010.– 16(4).

83. Peter X , Biodegradable Polymer Scaffolds with Well-Defined Interconnected Spherical Pore Network // Tissue engineering.– 7(1).

84. Virginia Saez-Martinez, Garbine Atorrasagasti, Beatriz Olalde, Iratxe Madarieta, Fabrice Morine, Nerea Garagorri, Fabrication and Characterization of Macroporous Poly(Ethylene Glycol) Hydrogels Generated by Several Types of Porogens // International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials.– 2012.– 62.– 502-508p.

85. Kim J1, Yaszemski MJ, Lu L., Three-dimensional porous biodegradable polymeric scaffolds fabricated with biodegradable hydrogel porogens // Tissue Eng Part C Methods.–2009.– 15(4).

86. Amarpreet S. Sawhney, Steven L. Bennett, Suresh S. Pai, Scott R. Sershen, Fred H. Superabsorbent, freeze dried hydrogels for medical applications, патент US20070231366 A1,– 4.10.2007.

87. Kang HW1, Tabata Y, Ikada Y., Fabrication of porous gelatin scaffolds for tissue engineering // Biomaterials.–1999.–20(14).– 1339p.

88. Ali Fathi, Michael Barnard, Roya Ravarian, Fariba Dehghani, Fabrication of Porous Chitosan/Bioactive Glass Hydrogels in an Aqueous Media Using CO₂ as a Gas Foaming Agent // School of Chemical and Biomolecular Engineering, The University of Sydney.– Sydney, 2006

89. Manish Keshavlal Ladola, Superporous hydrogel (SPH): A Novel and advanced technique of oral controlled release drug delivery system // World Journal of Pharmaceutical Research.–2014.– 3(5).

90. Parks K.L, Beckman E.J. Generation of microcellular polyurethane foams via polymerization in carbon dioxide. Foam formation and characterization // Polymer Engineering and Science.–1996.– 36(19).– 2417-2431.

91. Ning Zhu and Xiongbiao Chen, Biofabrication of Tissue Scaffolds, Advances in Biomaterials Science and Biomedical Applications // INTECH Open Access Publisher.– 2013

92. Li, L., and Hsieh, Y.-L. Ultra-fine polyelectrolyte hydrogel fibers from polyacrylic acid = polyvinyl alcohol // *Nanotechnology*.–2005.– 16.– 2852p.
93. Yongsung Hwang, Chao Zhang and Shyni Varghese, Poly(ethylene glycol) cryogels as potential cell scaffolds: effect of polymerization conditions on cryogel microstructure and properties // *J. Mater. Chem.*–2010.– 20.– 345-351p
94. Hedberg EL, Shih CK, Lemoine JJ, Timmer MD, Liebschner MA, Jansen JA, et al. // *Biomaterials*.–2005.– 26.– 3215p.
95. Лозинский В.И. Криогели на основе природных и синтетических полимеров: получение, свойства и области применения // *Успехи химии*.– 2002.– Т. 71. № 6.– С. 559-585.
96. E. A. Phelps, A. J. García, Engineering more than a cell: vascularization strategies in tissue engineering // *Current Opinion in Biotechnology*.–2010.– 21(5).– 704-709p.
97. M. B. Dainiak, A. Kumar, I. Y. Galaev, and B. Mattiasson, Detachment of affinity-captured bioparticles by deformation macroporous hydrogel // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.–2006.– 103(4).– 849–854p.
98. Mattiasson B, Kumar A, IYu Galaev, editors. Macroporous Polymers. Production Properties and Biotechnological // *Biomedical Applications*. CRC Press.– 2009
99. Timothy M. A.Henderson, Katharina Ladewig, David N, Haylock, Keith M., McLean, Andrea J., O'Connor, Cryogels for biomedical applications // *J. Mater. Chem.* 1 B.– 2013.– 2682-2695p.
100. Vladimir I. Lozinsky and Oguz Okay, Basic Principles of Cryotropic Gelation, Polymeric Cryogels // *Advances in Polymer Science*.–2014.– 263p.
101. Akshay Srivastava, Era Jain, Ashok Kumar , The physical characterization of supermacroporous poly (N-isopropylacrylamide) cryogel: Mechanical strength and swelling/de-swelling kinetics // *Materials Science and Engineering A*.–2007.– 464 .– 93–100p.

102. A. Kumar, V. Bansal, K. S. Nandakumar, Integrated bioprocess for the production and isolation of urokinase from animal cell culture using supermacroporous cryogel matrices// *Biotechnology and Bioengineering*.– 2006.– 93(4).– 636-646p.
103. Sidi A. Bencherif, Thomas M. Braschler, Philippe Renaud, Advances in the design of macroporous polymer scaffolds for potential applications in dentistry// *J Periodontal Implant Sci*.–2013.– 43.– 251-260p.
104. Г.Б. Сергеев, В. А. Батюк. РЕАКЦИИ В МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ ЗАМОРОЖЕННЫХ СИСТЕМАХ // *Успехи химии*.– 1976.– Т. 45, № 5.– С. 793-826.
105. Fatima M. Plieva, Malin Karlsson, Maria-Rosa Aguilar, David Gomez, Sergey Mikhailovskyd, Igor Yu. Galaev, Pore structure in supermacroporous polyacrylamide based cryogels// *Soft Matter*.–2005.– 1.– 303-309p.
106. Akshay Srivastava, Akhilesh Kumar Shakya, Ashok Kumar, Boronate affinity chromatography of cells and biomacromolecules using cryogel matrices// *Enzyme and Microbial Technology*.–2012.– 51.– 373-381p.
107. Lozinsky VI, Plieva FM, Galaev IY, Mattiasson B. The potential of polymeric cryogels in bioseparation// *Bioseparation*.–2001.– 10.– 88-163.
108. Wim Noppe , Fatima M. Plieva, Karen Vanhoorelbeke, Hans Deckmyn, Mervet Tuncel, Ali Tuncel, Igor Yu. Galaev, Bo Mattiasson, Macroporous monolithic gels, cryogels, with immobilized phages from phage-display library as a new platform for fast development of affinity adsorbent capable of target capture from crude feeds// *Journal of Biotechnology*ю.–2007.– 131.– 293-299p.
109. Veyis Karakoç, Deniz Türkmen, Huma Shaikh, Nilay Bereli, Cenk A. Andac, Adil Denizli, Synthesis and Characterization of Poly(N-isopropylacrylamide) Thermosensitive Based Cryogel // *J. Biol. & Chem*.–2013.– 41 (2).– 159-166p.
110. Vladimir I. Lozinsky, Igor Yu. Galaev, Fatima M. Plieva, Irina N. Savina, Hans Jungvid , Bo Mattiasson, Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest // *TRENDS in Biotechnology*.–2003.– 21(10).–51-445p.

111. Mishra R, Goel SK, Gupta KC, Kumar A. Biocomposite cryogels as tissue engineered biomaterials for regeneration of critical-sized cranial bone defects // *Tissue Eng Part A*.– 2013
112. Archana Sharma, Sumrita Bhat, Tanushree Vishnoi, Vijayashree Nayak, Ashok Umar, Three-Dimensional Supermacroporous Carrageenan-Gelatin Cryogel Matrix for Tissue Engineering Applications // *BioMed Research International*.–2013.–e ID 478279.– 15p.
113. Novel porous scaffolds of pH responsive hitosan/carrageenan-based polyelectrolyte complexes for tissue engineering, J. V. Araujo,¹ N. avidenko,¹ M. Danner,² R. E. Cameron,¹ S. M. Best¹ // *Journal of biomedical materials research*.– 2014.– 102A(12).
114. minimization of burst release in pH-response kappa-carrageenan/polyvinyl alcohol hydrogels // *Chemical engineering research and design*.–2013.– 91(3).– 508-519p.
115. Gildas K. Gbassi, Thierry Vandamme, Probiotic Encapsulation Technology: From Microencapsulation to Release into the Gut // *Pharmaceutics*.– 2012.– 4.– 149-163p.
116. Alisa Katsen-Globa, Ina Meiser, Yuriy A. Petrenko, Roman V, Ivanov Vladimir, I. Lozinsky, Heiko Zimmermann, Alexander Yu, Petrenko, Towards ready-to-use 3-D scaffolds for regenerative medicine: adhesion-based cryopreservation of human mesenchymal stem cells attached and spread within alginate–gelatin cryogel scaffolds // *J Mater Sci: Mater Med*.–2014.– 25.– 857-871p.
117. Rostislav V. Shevchenko^{a, b}, Marc Eemanc^c, Behzad Rowshanravana, Iain U. Allana, Irina N. Savina^a, Matt Illsley^a, Michel Salmon^c, Stuart L. James^a, Sergey V. Mikhalovskya^d, S. Elizabeth James^a, The in vitro characterization of a gelatin scaffold, prepared by cryogelation and assessed in vivo as a dermal replacement in wound repair, // *Acta Biomaterialia*.–2014.– 10(7).– 3156-3166p.
118. Kun-Hung Changa, Han-Tsung Liaoa, Jyh-Ping Chena, Preparation and characterization of gelatin/hyaluronic acid cryogels for adipose tissue engineering: In vitro and in vivo studies // *Acta Biomaterialia*.–2013.– 9(11).– 9012-9026p.

119. E. Ogur, Polyvinyl Alcohol: Materials, Processing and Applications // Rappa Review Reports.–2005.–16(2).
120. Jinkui Wu, a Xinglong Gong, Yanceng Fan and Hesheng Xi, Physically crosslinked poly(vinyl alcohol) hydrogels with magnetic field controlled modulus // Soft Matter.–2011.– 7.– 6205p
121. S. K. Mallapragada, N.A. Peppas, Dissolution Mechanism of Semicrystalline Poly (vinylalcohol) in Water // Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics.–1996.– 34.– 1339-1346p.
122. Kentaroh Sugiura, Morio Hashimoto, Shuji Matsuzawa and Kazuo Yamaura, Influence of degree of crystallinity and syndiotacticity on infrared spectra of solid PVA // Journal of Applied Polymer Science.–2001.– 82(5).– 1291-1298p.
123. F. L. Marten, Vinyl Alcohol Polymers, Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology.–New York.– 2002
124. Jing Tao, Effects of Molecular Weight and Solution Concentration on Electrospinning of PVA // Worcester Polytechnic Institute.– 2003.
125. Adeyinka Aina¹, Andrew Morris, Manish Gupta, Nashiru Billa, Neesha Madhvani, Ritika Sharma, Stephen Dought, Vivek Shah, Yamina Boukari, Dissolution behavior of poly vinyl alcohol in water and its effect on the physical morphologies of PLGA scaffolds UK // Journal of Pharmaceutical and Biosciences.–2014.– 2(1).– 1-6p.
126. О.Ю. Колосова, Е.А. Кондратьева, В.И. Лозинский, Исследование влияния ряда хаотропных и космоптропных веществ на физико-химические свойства криогелей поливинилового спирта // Успехи в химии и химической технологии. Том XXVII. 2013. №3
127. El-Refaie Kenawya, Mohamed H. El-Newehya, Salem S. Al-Deyab, Controlled release of atenolol from freeze/thawed poly(vinyl alcohol) hydrogel // Journal of Saudi Chemical Society.–2010.– 14(2).– 2010.– 237-240p.
128. Alia S. Hickey¹, Nikolaos A. Peppas, Mesh size and diffusive characteristics of semicrystalline poly(vinyl alcohol) membranes prepared by freezing/thawing techniques // Journal of Membrane Science.–1995.– 107.– 229-237p.

129. J. L. Valentín, D. Lopez, R. Hernandez, C. Mijangos, K. Saalwachter, Structure of Poly(vinyl alcohol) Cryo-Hydrogels as Studied by Proton Low-Field NMR Spectroscopy // *Macromolecules*.–2009.–42.– 263-272p.
130. Martha Elena Londono, Juan Manuel Jaramillo, Roser Sabater, *Revista Eia*, Dielectric properties of polyvinyl alcohol hydrogels prepared by freezing-thawing technique.–2012.– ISSN 1794-1237.– 18.–105-114p.
131. Ostuka, E, Sugiyama, M., and Suzuki, A. Formation and destruction of physical crosslinks by mild treatments in chemically crosslinked poly(vinyl alcohol) gels // *Polym. Bull.*–2011.–67.– 1215-1226p.
132. C.M. Hassan¹, J.H. Ward, N.A. Peppas, Modeling of crystal dissolution of poly(vinyl alcohol) gels produced by freezing/thawing processes // *Polymer*.–2000.– 41(18).– 6729-6739p.
133. Nikolaos Peppas, Turbidimetric studies of aqueous poly(vinyl alcohol) solutions // *Makromolekulare Chemische*.–1975.–176(11).– 3433-3440p.
134. Jolanta Stasko, Mārtiņš Kalniņš, Anda Dzene, Velta Tupureina, Poly(vinyl alcohol) hydrogels // *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences*.–2009.– 58(1).– 63-66p.
135. Stasko, J., Kalnins, M., Dzene, A., and Tupureina, V. Development of poly(vinyl alcohol) based systems for wound dressings // *IFMBE Proceedings*.–2008.– 20.– 80-82p.
136. Paolo Barretta, Federico Bordi, Cristina Rinaldi, Gaio Paradossi, A Dynamic Light Scattering Study of Hydrogels Based on Telechelic Poly(vinyl alcohol) // *J. Phys. Chem. B*.–2000.– 104(47).
137. Jaleh Varshosaz, Niloufar Koopaie, Cross-linked Poly (vinyl alcohol) Hydrogel : Study of Swelling and Drug Release Behaviour // *Iranian Polymer Journal* .– 2002.–11(2).– 123-131p.
138. Shuhei Kudo, Emiko Otsuka, Atsushi Suzuki, Swelling Behavior of Chemically Crosslinked PVA Gels in Mixed Solvents // *Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics*.–1978.– Vol. 48.–1986p.

139. J. Ruiz, A. MantecoÂn, V. Caadiz, Synthesis and properties of hydrogels from polyvinyl alcohol and ethylenediaminetetraacetic dianhydride // *Polymer*.–2001.– 42.– 6347-6354p.
140. Component Feng Li, Gang Wu, Jianping Wang, Chengtao Wang, Tribological Properties of Poly(vinyl alcohol) Hydrogel in Response to Ceramic Femoral // *Iranian Polymer Journal*.–2009.– 18 (11).
141. Gaio Paradossi, Francesca Avalieri, Ester Chiessi, Poly (vinyl alcohol) as versatile biomaterial for potential biomedical applications // *Journal of materials science: materials in medicine*.–2003.– 14.– 687 - 691p.
142. Gohil J., Bhattacharya A., Ray P., Studies On The Crosslinking Of Poly (Vinyl Alcohol) // *Journal of Polymer Research*.–2006.– 13(2).– 161p.
143. A.A. Artyukhov, M.I. Shtilman, A.N. Kuskov, L.I. Pashkova, A.M. Tsatsakis, A.K. Rizos, Polyvinyl alcohol cross-linked macroporous polymeric hydrogels: Structure formation and regularity investigation // *Journal of Non-Crystalline Solids*.–2011.– 357.– 700-706p.
144. Shtilman, M.I., *Polymers for Biomedical Applications*. Akademkniga .– Moscow.– 2006.
145. Shtilman, M.I., Artyukhov, A.A., Chalykh, A.E., Semenchuk, O.V., Tsatsakis, A.M., Cryogels of ionogenic molecules // *Int. Polym. Sci. Technol*.–2007.– 34 (3).– 41-46p.
146. Shtilman, M.I., Artyukhov, A.A., Zolotaikina, T.S., Korshak, A.Y., Gorchakov, A.V., Tsatsakis, A.M., Crosslinked macroporous polymeric hydrogels of polyvinyl alcohol: a study of the influence of the synthesis conditions // *Int. Polym.Sci. Technol*.–2006.– 33 (10).– 25-29p.
147. Shtilman, M.I., Lotter, M.M., Tzatzarakis, M., Tsatsakis, A.M., Polymeric fungicides: a review // *Polym. Sci. Ser. B*.–1999.– 41.– 243-254p.
148. Artyukhov, A.A., Shtilman, M.I., Kuskov, A.N., Fomina, A.P., Lisovyy, D.E., Golunova, A.S., Tsatsakis, A.M., Macroporous polymeric hydrogels formed from acrylate modified polyvinyl alcohol macromers // *J. Polym. Res*.–2011.– 18 (4).– 667-673p.

149. Edwin Marin, John Rojasand Yhors Ciro, Review of polyvinyl alcohol derivatives: Promising materials for pharmaceutical and biomedical applications // *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*.–2014.– 8(24).– 674-684p,
150. Muhammad Usman Minhas, Mahmood Ahmad, Liaqat Ali, Muhammad Sohail, Synthesis of chemically cross-linked polyvinyl alcohol-co-poly (methacrylic acid) hydrogels by copolymerization; a potential graft-polymeric carrier for oral delivery of 5-fluorouracil // *Daru*.–2013.– 21(1).– 44p.
151. Yusong P, Dangsheng X, Xiaolin C: Mechanical properties of nanohydroxyapatite reinforced poly(vinyl alcohol) gel composites as biomaterial // *J Mater Sci*.– 2007.– 42.– 5129-5134p.
152. Martens P., Anseth K. S., Characterization of hydrogels formed from acrylate modified poly(vinyl alcohol) macromers // *Polymer*.–2000.– 41.– 7715-7722p.
153. Eastman S. A., Lesser A. J., McCarthy T. J.: Quantitative poly(vinyl alcohol) modification in ionic liquids: Esterification and urethanation with low surface tension producing reagents // *Macromolecules*.–2010.– 43.– 4584- 4588p.
154. Lee C.T., Kung P.H., Lee Y.D.: Preparation of poly(vinyl alcohol)-chondroitin sulfate hydrogel as matrices in tissue engineering // *Carbohydrate Polymers*.–2005.– 61.– 348-354p.
155. Ghugare S. V., Mozetic P., Paradossi G.: Temperaturesensitive poly(vinyl alcohol)/poly(methacrylate-co-Nisopropyl acrylamide) microgels for doxorubicin delivery // *Biomacromolecules*.–2009.– 10.– 1589-1596p.
156. Pitarresi G., Palumbo F. S., Giommona G., Casadei M. A., Micheletti Moracci F.: Biodegradable hydrogels obtained by photocrosslinking of dextran and polyaspartamide derivatives // *Biomaterials*.–2003.–24.– 4301-4313p.
157. Park, S.E., Nho, Y.-Ch., Synthesis of PVA/PVP hydrogels having two-layer by radiation and their physical properties // *Radiat. Phys. Chem*.–2003.– 67.–361-365p.
158. Park, S.-E., Nho, Y.-Ch., Kim, H.-Il, Preparation of poly(polyethylene glycol methacrylate-co-acrylic acid) hydrogels by radiation and their physical properties // *Radiat. Phys. Chem*.–2004.– 69.– 221-227p.

159. Zhai M., Yoshii F., Kume T., Hashim K. Syntheses of PVA/starch grafted hydrogels by irradiation // *Carbohydrate Polymers*.–2002.– 50.– 295-303p.
160. Yamamoto Y., Tagawa S. Radiolytically prepared poly(vinyl alcohol) hydrogel containing α -cyclodextrin // *Radiation Physics and Chemistry*.–2004.– 69.– 347-349p.
161. Anastasia V. Duflot, Natalia K. Kitaeva , Vladimir R. Duflot, Radiation-chemical preparation of poly(vinyl alcohol) hydrogels // *Radiation Physics and Chemistry*.–2015.– 107.– 1-6p.
162. Brahatheeswaran Dhandayuthapani, Yasuhiko Yoshida, Toru Maekawa, D. Sakthi Kumar, Review Article Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review // *International Journal of Polymer Science*.–2011.– ID 290602.–19p.
163. Bret D. Ulery, Lakshmi S. Nair, Cato T. Laurencin, Biomedical Applications of Biodegradable Polymers // *J Polym Sci B Polym Phys*.–2011.– 49(12).– 832-864p.
164. Christie M. Hassan, Nikolaos A. Peppas, Structure and Applications of Poly(vinyl alcohol) Hydrogels Produced by Conventional Crosslinking or by Freezing/Thawing Methods // *Advances in Polymer Science*.–2000.– 153.
165. Tadavarthy SM, Moller JH, Amplatz K. Polyvinyl alcohol (Ivalon)-A new embolic material // *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med*.–1975.– 125.– 609-616p..
166. Maribel I. Baker,¹ Steven P. Walsh,² Zvi Schwartz,¹ Barbara D. Boyan¹, A review of polyvinyl alcohol and its uses in cartilage and orthopedic applications // *Journal of biomedical materials research*.– 2012.– 100(5).–1451-7p.
167. Mihori Kita, Yuichiro Ogura, Yoshihito Honda, Suong-Hyu Hyon, Won-II Cha, Yoshito Ikada, Evaluation of polyvinyl alcohol hydrogel as a soft contact lens material // *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*.–1990.– 228(6).– 533-537p.
168. Lynn C. Winterton¹, John M. Lally, Karen B. Sentell¹, L. Lawrence Chapoy, The elution of poly (vinyl alcohol) from a contact lens: The realization of a time release moisturizing agent/artificial tear // *Journal of Biomedical Materials Research: Applied Biomaterials* 80B.–2007.–2.– 424-432p.

169. Suong-Hyu Hyona, Won-Ill Chab, Yoshito Ikadac, Mihori Kitad, Yuichiro Ogurae, Yoshihito Hondaf, Poly(vinyl alcohol) hydrogels as soft contact lens material // *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition.*–1994.– 5(5).

170. Merrill Goldenberg, Polyvinyl alcohol derivatives containing pendant vinylic monomer reaction product units bound through ether groups and hydrogel contact lenses made therefrom.– US4978713.– Dec. 18.– 1990.

171. Jean-Pierre Pelage , Polyvinyl Alcohol Particles versus Tris-acryl Gelatin Microspheres for Uterine Artery Embolization for Leiomyomas // *Journal of Vascular and Interventional Radiology.*–2004.– 15(8).– 789-791p.

172. Udrescu Luciana-Gabriela, Physical properties of some polymeric materials and macromolecular materials of biomedical interests.– Cluj-Napoca.– 2012

173. Al. Chiriac, Jorg Baldof, N. Dobrin, I. Poata, Embolic materials for cerebral endovascular therapy // *Romanian Neurosurgery.*–2010.– XVII 2.– 171 – 181p.

174. Sandeep Vaidya, Kathleen R. Tozer, Jarvis Chen, An Overview of Embolic Agents // *Semin Intervent Radiol.*–2008.– 25(3).– 204-215p.

175. R. G. Quisling, J. P. Mickle, W. B. Ballinger, C. C. Carver, B. Kaplan, Histopathologic Analysis of Intraarterial Polyvinyl Alcohol Microemboli in Rat Cerebral Cortex.– *AJNR.*–1984.– 5.– 101-4

176. Marc Chaouat, Catherine Le Visage, Wilms E. Baille, Brigitte Escoubet, Frederic Chaubet, Mircea Alexandru Mateescu, Didier Letourneur, A Novel Cross-linked Poly(vinyl alcohol) (PVA) for Vascular Grafts // *Adv. Funct. Mater.*–2008.– 18.– 2855-2861p.

177. Juliette C. Sliker,¹ Max Ditzel,¹ Joris J. Harlaar,¹ Irene M. Mulder,¹ Eva B. Deerenberg,¹ Yvonne M. Bastiaansen-Jenniskens, Gert-Jan J. Kleinrensink, Johannes Jeekel, and Johan F. Lange, Effects of New Anti-Adhesion Polyvinyl Alcohol Gel on Healing of Colon Anastomoses in Rats // *Surgical Infections.*–2012.–13(6).

178. Renz BW¹, Leitner K, Odermatt E, Worthley DL, Angele MK, Jauch KW, Lang RA, PVA gel as a potential adhesion barrier: a safety study in a large animal model of intestinal surgery // *Langenbecks Arch Surg.*–2014.– 399(3).– 349-57p.

179. B.R. Rawal, Rahul Ribeiro, Manoj Chouksey and K. Tripathi, Biomaterials for Cartilage Repair: A Review // Journal of Medical Sciences.– 2013.– 615-620p.
180. Masanori Kobayashi , Hyon Suong Hyu , Development and Evaluation of Polyvinyl Alcohol-Hydrogels as an Artificial Articular Cartilage for Orthopedic // ImplantsMaterials.–2010.–3.– 2753-2771p.
181. Ruyin Ma, Dangsheng Xiong, , Feng Miao, Jinfeng Zhang, Yan Peng, Novel PVP/PVA hydrogels for articular cartilage replacement // Materials Science and Engineering.–2009.– 29C(6).– 1979-1983.
182. Biswajit Bera, Development of artificial articular cartilage // Sadhana.– 2009.–34(5).– 823-831p.
183. Jason A. Stammen, Stephen Williams, Robert E. Guldberg, Mechanical properties of a novel PVA hydrogel in shear and unconned compression // Biomaterials.–2001.– 22.– 799-806p.
184. Maribel I. Baker¹, Steven P. Walsh, Z Schwartz, Barbara D. Boyan, A review of polyvinyl alcohol and its uses in cartilage and orthopedic applications // Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials.–2012.– 100B(5).– 1451-1457p.
185. Injury Repair, M. Kobayashi, J. Toguchida, Development of polyvinyl alcohol-hydrogel (PVA-H) shields with a high water content for tendom // Journal of Hand Surgery (British and European.–2001.– 26B(5).– 436- 440p.
186. Hsingching Crystal Hsu, Ultrasonic wave propagation in polyvinilalcohol hydrogels and articular cartilage // Georgia Institute of Technology.– 2004.
187. Asnaghi MA, Candiani G, Fare S, Trends in biomedical engineering: focus on Regenerative Medicine // J. Appl Biomater Biomech.–2011.– 9.– 73-86p.
188. Wylie RC, Ahsan S. Aizawa Y, Maxwell KL, Morshead CM, Shoichet MS. Spatially controlled simultaneous patterning of multiple growth factors in three-dimensional hydrogels // Nat Mater.–2011.–10.– 799-806p.

189. Kopefiek J. Hydrogel biomaterials: A smart future // *Biomaterials*.–2007.– 28.– 5185p.
190. Moller L, Krause A, Dahlmann J, Gruh I, Kirschning A, Drager G. Preparation and evaluation of hydrogel-com-posites from methacrylated hyaluronic acid, alginate, and gelatin for tissue engineering // *Int J Artif Organs*.–2011.– 34.– 93-102p.
191. Huaping Tan and Kacey G. Marra, *Injectable, Biodegradable Hydrogels for Tissue Engineering Applications* // *Materials*.–2010.– 3.– 1746-1767p.
192. J. A. Fernandez Pierna, P. Volery, R. Besson, V. Baeten, P. Dardenne, *Classification of Modified Starches by Fourier Transform Infrared Spectroscopy Using Support Vector Machines* // *Journal Article*.–2005.–53.– 6581-5p.
193. Introduction on starch, Evaluation of Common Agricultural Policy Measures applied to the Starch Sector , Final Report - AGROSYNERGIE – November 2010
194. Sajilata, M.G., Singhal, R.S. and Kulkarni, P.R., 'Resistant Starch—A Review' // *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*.–2006.– 5 (1).– 1-17p.
195. Chun Bei Huang, Robert Jeng, Mohini Sain, Bradley A. Saville, Martin Hubbesb .Production, characterization, and mechanical properties of starch modified by ophiostome // *BioResources*.–2006.– 1(2).– 257-269p.
196. Emeje Martins Ochubiojo1 and Asha Rodrigues. *Starch: From Food to Medicine*, National Institute for Pharmaceutical Research and Development.– *Health and Social Aspects of the Food Industry – Nigeria India, Scientific*.– 2012.
197. Lovedeep Kaur, Jaspreet Singh, Qiang Liu, *Starch – a potential biomaterial for biomedical applications* // *Nanomaterials and Nanosystems for Biomedical Applications*.–2007.– 83–98p.
198. M.G. Sajilata, Rekha S. Singhal, Pushpa R. Kulkarni, *Resistant Starch— A Review* // *Cjmphensive reviews in food science and food safety*.–2006.– 5.
199. Chung-wai Chiu and Daniel Solarek . *Modification of Starches. Starch: Chemistry and Technology* // Third Edition Copyright , 2009, Elsevier Inc.

200. Congming Xiao, Current advances of chemical and physical starch-based hydrogels // *Starch/Stärke*.–2013.– 65.– 82-88p.
201. Katarzyna Leja, Grażyna Lewandowicz, Polymer Biodegradation, Biodegradable Polymers – a Review // *Polish J. of Environ. Stud.*2010.– 19(2).– 255-266p.
202. Radhiah Shakri, Effects of amylose content and chemically cross-linking starch on in-vitro digestibility and extrusion of starch.– Kansas State university Manhattan, Kansas , 2013.
203. Helena Sá-Lima, Sofia G. Caridade, João F. Manoab, Rui L. Reis, Stimuli-responsive chitosan-starch injectable hydrogels combined with encapsulated adipose-derived stromal cells for articular cartilage regeneration // *Soft Matter*.–2010.– 6.– 5184-5195p.
204. Arti Vashist, Sharif Ahmed, Hydrogels: Smart Materials for Drug Delivery // *OJCHEG*.–2013.– 29(3).– 861-870p.
205. Toshio Yoshimura, Rumi Yoshimura, Chieko Seki, Rumiko Fujioka, Synthesis and characterization of biodegradable hydrogels based on starch and succinic anhydride // *Carbohydrate Polymers*.–2006.– 64.– 345-349p.
206. Adriano V. Reis, Marcos R. Uilherme, Thais A. Moia, Luiz H. C. Mattoso, Edvani C. Muniz, Elias B. Tambourgi, Synthesis and Characterization of a Starch-Modified Hydrogel as Potential Carrier for Drug Delivery System // *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*.–2008.– 46.– 2567-2574p.
207. Elsillzallbeth Diana Barcer, Starch-based hydrogel // *A61P 3/10 (2006.01) Biomrdical applications*.– US 2010/0331232 A1, 2010.
208. Javasekara R., Harding I., Bowater I., Lonergan G., Christie G.B.Y. Biodegradation by Composting of Surface Modified Starch and PVA Blended Films // *J Polym Environm*.–2003.–11(2).
209. Nadras Othman, Nur Azleen Azhhari, Hanafi Ismail, Thermal Properties of Polyvinyl Alcohol (PVOH)/Corn Starch Blend Film // *Malaysian Polymer Journal*.– 2011.–6(6).– 147-154p.

210. Zahra Hejri, Ali Akbar Seifkordi , Ali Ahmadpour , Seyed Mojtaba Zebarjad , and Abdolmajid Maskooki , Biodegradable starch/poly (vinyl alcohol) film reinforced with tita-nium dioxide nanoparticles // International Journal of Minerals, Metallurgy and Materials.–2013.– 20 (7).–1p.
211. J. L. Valentin, D. Lopez, R. Hernandez, C. Mijangos, K. Saalwachter, Structure of Poly(vinyl alcohol) Cryo-Hydrogels as Studied by Proton Low-Field NMR Spectroscopy // Macromolecules.–2009.–42.– 263-272p.
212. Vinod Kumar, Sangeeta Garg and Asim Kumar Jana, Preparation and Characterization of Succinated starch/PVA blend films // Department of Chemical Engineering, National Institute of Technology.– India,2010.
213. D. Ray, P. Roy, S. Sengupta, S.P. Sengupta, A.K. Mohanty, and M. Misra, A study of dynamic mechanical and ther-mal behavior of starch/poly (vinylalcohol) based films // Journal of Polymers and the Environment.–2009.– 17(1).– 49-55p.
214. Mohammad Taghi Taghizadeh, Narges Sabouri, Thermal Degradation Behavior of Polyvinyl Alcohol / Starch / Carboxymethyl Cellulose / Clay Nanocomposites // Universal Journal of Chemistry.–2013.– 1(2).– 21-29p.
215. Fahmida Parvin¹, Md. Arifur Rahman, Jahid M. M. Islam, Dr. Mubarak A. Khan, A. H. M. Saadat, Preparation and Characterization of Starch/PVA Blend for Biodegradable Packaging Material // Advanced Materials Research.–2010.– 123-125.– 351-354p.
216. N. Tudorachi , C.N. Cascaval , M. Rusu , M. Pruteanu, Testing of polyvinyl alcohol and starch mixtures as biodegradable polymeric materials // Polymer Testing.– 2000.– 19.– 785-799p.
217. Congming Xiao, Meiling Yang, Controlled preparation of physical cross-linked starch-g-PVA hydrogel // Carbohydrate Polymers.–2006.– 64.– 37-40p.
218. Kunal Pal, A.K.Banthia, D.K.Majumdar , Preparation of Transparent Starch Based Hydrogel Membrane with Potential Application as Wound Dressing // Trends Biomater. Artif. Organs.–2006.– 20(1).– 59-67p.
219. Isabelle Vroman, Lan Tighzert, Biodegradable Polymers // Materials.– 2009.–2.– 307-344p.

220. J. Boldt, Volume replacement in the surgical patient—does the type of solution make a difference // *British Journal of Anaesthesia*.—2000.— 84 (6).— 783-93p.

221. Панов А.В. Реакция гидроксипропилирования как метод химической модификации крахмал.— Москва.— 2009

222. Takashi Hitosugi, Toshiyuki Saito, Sono Suzuki, Ieko Kubota, Emi Shoda, Toru Shimizu, Yoshiyuki Oi, Hydroxyethyl Starch: The Effect of Molecular Weight and Degree of Substitution on Intravascular Retention In Vivo // *International Anesthesia Research Society*.—2007.— 105(3).

223. Boldt J. Fluid choice for resuscitation of the trauma patient: a review of the physiological, pharmacological, and clinical evidence // *Can J Anaesth*.— 2004.— 51.

224. I. von Roten¹, C. Madjdpour, P. Frascarolo, M.-A. Burmeister, A. Fisch, S. Schramm, T. Bombeli, D. R. Spahn, Molar substitution and C2/C6 ratio of hydroxyethyl starch: influence on blood coagulation // *British Journal of Anaesthesia* .— 2006.—96 (4).— 455p.

225. Allison B Dart¹, Thomas C Mutter, Chelsea A Ruth, Shayne P Taback, Hydroxyethyl starch (HES) versus other fluid therapies: effects on kidney function (Review) // *Cochrane Database of Systematic Reviews*.—2010.—1.

226. Muhammad Nazir Tahir, Ahmad Adnan, Eunae Cho, Seunho Jung, Controlled Ondansetron Release Based on Hydroxyethyl Starch Hydroxyethyl Methacrylate // *Bull. Korean Chem. Soc.*—2012.— 33(12).

227. Christiane S. Hartog, Helga Skupin, Charles Natanson, Junfeng Sun, Konrad Reinhart, Systematic analysis of hydroxyethyl starch (HES) reviews: proliferation of low-quality reviews overwhelms the results of well-performed meta-analyses // *Intensive Care Med.*—2012.— 38.— 1258-1271p.

228. Hyun Jee Kim, Sae Young Kim, Min Ju Oh, and Jin Mo Kim, Anaphylaxis induced by hydroxyethyl starch during general anesthesia // *Korean J Anesthesiol.*— 2012.— 63(3).— 260-262p.

229. Hans-Jiirgen Dieterich, Dietrich Kraft, Clemens Sirtl, Heinz Laubenthal, Wolfgang Schimetta, Werner Piilz, Eckehart Gerlach, Klaus Peter,

Hydroxyethyl Starch Antibodies in Humans: Incidence and Clinical Relevance // *Anesth Analg.*–1998.– 86.– 1123p.

230. Westphal M, James MF, Kozek Langenecker S, Stocker R, Guidet B, Van Aken H, Hydroxyethyl starches: different products-different effects // *Anesthesiology.*–2009.– 111.– 187-202p.

231. Caroline Thyès, Caveh Madjdpour, Philippe Frascarolo, Thierry Buclin, Marco Burki, Andreas Fisch, Marc-Alexander Burmeister, Lars Asmis, Donat R. Spahn, F.R.C.A., Effect of High- and Low-molecular-weight Low-substituted Hydroxyethyl Starch on Blood Coagulation during Acute Normovolemic Hemodilution in Pigs // *Anesthesiology.*–2006.– 105.– 1228p.

232. T. M. Goszczynski¹, B. Filip-Psurska¹, K. Kempinska¹, J. Wietrzyk, J. Boratynski, Hydroxyethyl starch as an effective methotrexate carrier in anticancer therapy // *Pharma Res Per.*– 2014.–2(3).

233. Martin Westphal, Michael F. M. James, Sibylle Kozek-Langenecker, Reto Stocker, Bertrand Guidet, Hugo Van Aken // *Hydroxyethyl Starches Anesthesiology.*–2009.– 111.– 187-202p.

234. Eleonora Goluzza, Katarina Sakic, Nada Orsolica, Marija Grkovic Topalovic, Dinko Tonkovic, The influence of intravascular volume maintenance with a hydroxyethyl starch solution on coagulation in patients undergoing transurethral resection of the prostate // *periodicum biologorum.*–2011.–113(1).– 75-79p.

235. Carlos A Estrada¹ and Raghavan Murugan, Hydroxyethyl starch in severe sepsis: end of starch era // *Estrada and Murugan Critical Care.*–2013.–17.– 310p.

236. Helene Freichels, Manfred Wagner, Patricia Okwieka, Ralf Georg Meyer, Volker Mailander, Katharina Landfester, Anna Musyanovych, (Oligo)mannose functionalized hydroxyethyl starch nanocapsules: en route to drug delivery systems with targeting properties // *Cite this: J. Mater. Chem. B.*– 2013.– 1.

237. Muhammad Nazir Tahir, Ahmad Adnan, Eunae Cho, Seunho Jung, Controlled Ondansetron Release Based on Hydroxyethyl Starch Hydroxyethyl Methacrylate // *Bull. Korean Chem. Soc.*–2012.–33(12).

238. A.D.A. Schwoerer, S. Harling, K. Scheibe, H. Menzel, R. Daniels, Influence of degree of substitution of HES-HEMA on the release of incorporated drug models from corresponding hydrogels // *Eur. J. Pharm. Biopharm.*–2009.– 73.– 351-356p.

239. S. Harling, A. Schwoerer, K. Scheibe, R. Daniels, H. Menzel, A new hydrogel drug delivery system based on hydroxyethylstarch derivatives // *J. Microencaps.*–2010.– 27.– 400-408p.

240. Elbadawy A. Kamoun, Henning Menzel, HES-HEMA nanocomposite polymer hydrogels: swelling behavior and characterization // *J Polym Res.*– 2012.–19.– 9851p.

241. El-Refaie Kenawy , Elbadawy A. Kamoun , Mohamed S. Mohy Eldin, Mahmoud A. El-Meligy, Physically crosslinked poly(vinyl alcohol)- hydroxyethyl starch blend hydrogel membranes: Synthesis and characterization for biomedical applications // *Arabian Journal of Chemistry.*–2014.– 7.– 372-380p.

242. El-Refaie Kenawy a, Elbadawy A. Kamoun, Mohamed S. Mohy Eldin, Mahmoud A. El-Meligy, Physically crosslinked poly(vinyl alcohol)-hydroxyethyl starch blend hydrogel membranes: Synthesis and characterization for biomedical applications // *Arabian Journal of Chemistry.*–2014.– 7(3)– 372-380p.

243. A.A. Artyukhov, M.I. Shtilman, A.N. Kuskov, L.I. Pashkova, A.M. Tsatsakis, A.K. Rizos, Polyvinyl alcohol cross-linked macroporous polymeric hydrogels: Structure formation and regularity investigation // *Journal of Non-Crystalline Solids.*–2011.– 357.– 700-706p.

244. Shtilman, M.I., Artyukhov, A.A., Zolotaikina, T.S., Korshak, A.Y., Gorchakov, A.V., Tsatsakis, A.M., Crosslinked macroporous polymeric hydrogels of polyvinyl alcohol: a study of the influence of the synthesis conditions // *Int. Polym.Sci. Technol.*–2006.– 33 (10)– 25-29p.

245. Shtilman, M.I., Lotter, M.M., Tzatzarakis, M., Tsatsakis, A.M., Polymeric fungicides: a review // *Polym. Sci. Ser. B.*–1999.– 41.– 243-254p.

246. Artyukhov, A.A., Shtilman, M.I., Kuskov, A.N., Fomina, A.P., Lisovyy, D.E., Golunova, A.S., Tsatsakis, A.M., Macroporous polymeric hydrogels formed from

acrylate modified polyvinyl alcohol macromers // J. Polym. Res.–2011.– 18 (4).– 667-673p.

247. Slaughter BV, Khurshid SS, Fisher OZ, Khademhosseini A, Peppas N, Hydrogels in regenerative medicine // Adv Mater.–2009.– 21(32–33).–3307-3329p

248. Honey Priya James, Rijo John, Anju Alex, Anoop K.R. Smart polymers for the controlled delivery of drugs – a concise overview // Acta Pharmaceutica Sinica B.– 2014.–4(2).–120-127p.

249. A. Chenite, C. Chaput, D. Wang, C. Combes, M.D. Buschmann, C.D. Hoemann, J.C. Leroux, B.L. Atkinson, F. Binette, A. Selmani, Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ // Biomaterials.–2000.– 21.– 2155-2161p.

250. Syed K. H. Gulrez¹ ., Saphwan Al-Assaf. Hydrogels: Methods of Preparation, Characterisation and Applications// "Progress in Molecular and Environmental Bioengineering - From Analysis and Modeling to Technology Applications".– ISBN 978-953-307-268-5–2011 .–35p

251. Xiaoli Hu, Chen Sun, Bin Peng , Shilong Chen , Int J Clin. Swelling property of PVA hydrogels with different concentration and specifications and its influencing factors // Exp Med.– 2016.–9(2).–708-716p.

252. Garima Singh, Alka Lohani, Shiv Sankar Bhattacharya . Hydrogel as a novel drug delivery system // J.fundam.pharm.res.– 2014.– 2(1).–35-48p.

253. Jaya Maitra, Vivek Kumar Shukla American . Cross-linking in Hydrogels C Journal of Polymer Science.–2014.– 4(2).– 25-31p.

254. Ланина С.Я., Сулова В.Ю., Беняев Н.Е. Токсикологическая и биологическая безопасность медицинских изделий. // Медицинские технологии .– 2011.–№4(6).– с.31-35.

255. Ланина С.Я. Санитарно-химические исследования как обязательный этап в оценке безопасности полимерных материалов и изделий для медицины// I-я Международная научно-практическая конференция «Современные полимерные материалы в медицине и медицинской технике».– С-Петербург, 2005.– с.216-221.

256. Лаппо В.Г., Ланина С.Я., Тимохина В.И. Токсиколого-гигиенический контроль полимеров и изделий медицинского назначения.// Ж. Всесоюзного химического общества им. Д.И.Менделеева.–Москва1985.–т.XXX, № 4.– с.461-465.

257. Предельно допустимые количества химических веществ, выделяющихся из материалов, контактирующих с пищевыми продуктами. Гигиенические нормативы. ГН 2.3.3.972-00. МЗ РФ.– М.– 2000.– с. 16-25.

258. Ланина С.Я. и др., Методологические и методические вопросы гигиены и токсикологии полимерных материалов и изделий медицинского назначения. Научный обзор.– М.– 1982.– с.61-86.

259. ГОСТ Р ИСО 10993.12-99. «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Ч.12. Приготовление проб и стандартные образцы».–М.:ИПК Издательство стандартов ,2000.–16с.

260. ГОСТ Р 50855-96 Контейнеры для крови и ее компонентов. Требования химической и биологической безопасности и методы испытаний. — М.: ИПК Издательство стандартов, 1996. — 46 с.

261. МУК 4.1.763-4.1.779-99. Определение химических соединений в биологических средах, МЗ России.– М., 2000.– с. 68-76.

262. Стандарты серии ГОСТ Р ИСО 10993 «Оценка биологического действия медицинских изделий: Ч.9. Основные принципы идентификации и количественного определения потенциальных продуктов деструкции.

263. Ермаченко Л.А. Атомно-абсорбционный анализ в санитарно-гигиенических исследованиях / Л.Г. Подунова. — М.: Чувашия, 1997. — 208 с.

264. ГОСТ Р ИСО 10993-4-2009 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 4. Исследование изделий, взаимодействующих с кровью. — М.: Стандартиформ, 2010. — 32 с.

265. ГОСТ Р ИСО 10993-5-2009 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 5. Исследование на цитотоксичность: методы «in vitro». — М.: Стандартиформ, 2010. — 16 с.

266. ГОСТ Р ИСО 10993-10- 2009 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 10. Исследование раздражающего и сенсибилизирующего действия. — М.: Стандартинформ, 2010. — 42 с.

267. ГОСТ Р ИСО 10993-11-2009 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 11. Исследование общетоксического действия. — М.: Стандартинформ, 2009. — 27 с

268. Назаренко Г.И., Кишкун А.А. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований. — М.: Медицина. - 2000. — 544 с.