

КРИОСТРУКТУРИРОВАНИЕ ПОЛИМЕРНЫХ СИСТЕМ: 70. ВЛИЯНИЕ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ СИЛЬНЫХ МИНЕРАЛЬНЫХ КИСЛОТ НА ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И МИКРОСТРУКТУРУ КРИОГЕЛЕЙ ПОЛИВИНИЛОВОГО СПИРТА

В. И. Лозинский¹, А. И. Рунцо^{1,2}, Е. В. Сорокина³, О. Ю. Колосова^{1,*}

¹Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва, Россия

²Институт химии и проблем устойчивого развития (ИПУР), Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, Москва, Россия

³Биологический факультет, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

*e-mail: kolosova@ineos.ac.ru

Аннотация. Нековалентные (физические) макропористые криогели поливинилового спирта (КГПВС), формируемые методом замораживания-оттаивания без использования химических сшивающих реагентов, представляют значительный интерес как биомедицинские материалы. Для их безопасного применения в медицине необходимо обеспечить надежную стерильность соответствующих процессов и изделий. В настоящем исследовании КГПВС были приготовлены замораживанием при -20°C в течение 12 ч водных растворов данного полимера концентрацией 100 г/л и затем размораживанием при нагревании со скоростью $0.03^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. Далее проведена обработка полученных криогелей 1–4 N растворами сильных минеральных кислот (HCl , H_2SO_4 , H_3PO_4) с последующей оценкой как характера изменения физико-химических свойств и микро-структуры гелевой матрицы в результате действия этих кислот, так и возможности их использования для стерилизации криогелей ПВС. Показано, что растворы HCl вызывают значительное набухание и размягчение гелевой матрицы вплоть до ее полного растворения в 4 N HCl . Напротив, обработка КГПВС водными растворами H_2SO_4 или H_3PO_4 приводит к повышению упругости и термостойкости этих криогелей. Испытания стерилизующих свойств таких кислых растворов по отношению к заключенным в криогель клеткам микроорганизмов (бактерии, дрожжи, мицелиальные грибы) выявили высокую эффективность данного подхода, особенно привлекательную как с точки зрения простоты самой обработки, так и в плане экономической целесообразности в случае использования водных растворов серной кислоты.

Ключевые слова: криогели поливинилового спирта, сильные минеральные кислоты, стерилизация

Финансирование. Работа выполнена в рамках Государственного задания № 075-00276-25-00 Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов

Благодарность. Авторы благодарят Зайцеву Наталью Семеновну и Новикова Ивана Александровича за приготовление тонких срезов для микроскопии.

Ссылка для цитирования: Лозинский В.И., Рунцо А.И., Сорокина Е.В., Колосова О.Ю. Криоструктурирование полимерных систем: 70. Влияние водных растворов сильных минеральных кислот на физико-химические свойства и микроструктуру криогелей поливинилового спирта. *Коллоидный журнал / Colloid journal*. 2026. Т. 88. № 1. С. 37–55. <https://doi.org/10.31851/S0023291226010036>

Поступила в редакцию 24.07.2025
После доработки 26.08.2025
Принята к публикации 01.09.2025

CRYOSTRUCTURING OF POLYMERIC SYSTEMS. 70. IMPACT OF AQUEOUS SOLUTIONS OF STRONG MINERAL ACIDS ON PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES AND MICROSTRUCTURE OF POLY(VINYL ALCOHOL) CRYOGELS

V. I. Lozinsky¹, A. I. Runtso^{1,2}, E. V. Sorokina³, O. Yu. Kolosova^{1,*}

¹*A.N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

²*Institute of Chemistry and Problems of Sustainable Development (IPUR), Mendeleev University of Chemical Technology, Moscow, Russia*

³*Department of Biology, Moscow State University, Moscow, Russia*

*e-mail: kolosova@ineos.ac.ru

Abstract. Non-covalent (physical) macroporous cryogels of poly(vinyl alcohol) (PVACGs) formed by the freeze-thaw technique without the use of chemical cross-linking reagents are of considerable interest as biomedical materials. For their safe use in medicine, it is necessary to ensure reliable sterility of the respective processes and products. In the present study, PVACGs were prepared by freezing at -20°C for 12 h aqueous solutions of this polymer with a concentration of 100 g/L and then defrosting while heating at a rate of $0.03^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Subsequent treatment of the resultant cryogels with 1–4 N solutions of strong mineral acids (HCl , H_2SO_4 , H_3PO_4) made it possible to evaluate both the character of changes in the physicochemical properties and microstructure of the gel matrix as a result of the action of these acids and the possibility of their use for the sterilization of PVA cryogels. It has been shown that HCl solutions cause significant swelling and softening of the gel matrix up to its complete dissolution in 4 N HCl . On the contrary, the treatment of cryogels with aqueous solutions of H_2SO_4 or H_3PO_4 leads to an increase in the elasticity and heat endurance of these cryogels. Tests of the sterilizing abilities of such acidic solutions with respect to the cells of microorganisms (bacteria, yeasts, mycelial fungi) entrapped in the cryogel have revealed the high efficiency of this approach, which is especially attractive both from the point of view of the simplicity of the treatment itself and in terms of economic feasibility in the case of using aqueous solutions of sulfuric acid.

Keywords: poly(vinyl alcohol) cryogels, strong mineral acids, sterilization

Funding. This work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation № 075-00276-25-00.

Conflict of interests. The authors of this work declare that they have no conflicts of interest.

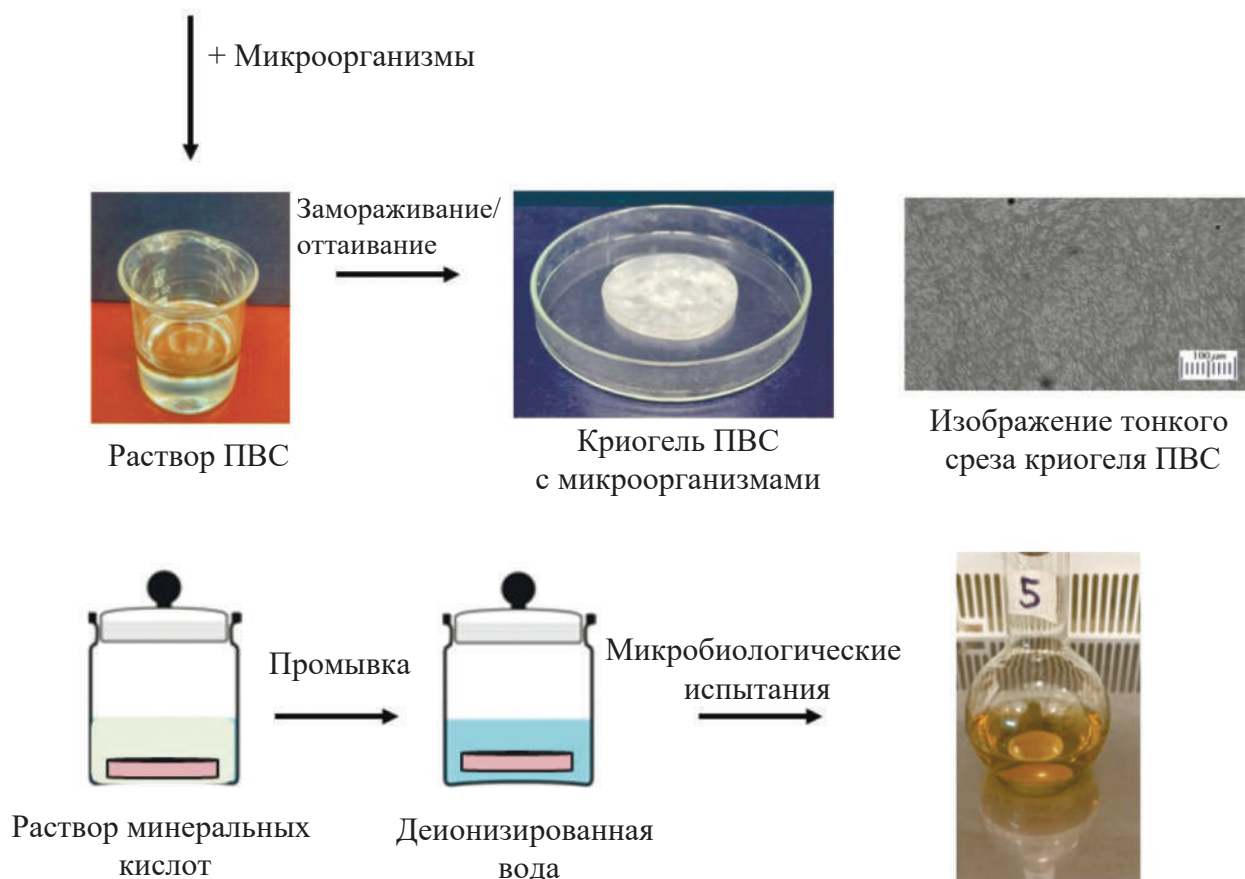
Acknowledgments. The authors are grateful to N.S. Zaitseva and I.V. Novikov for preparing thin sections for microscopy.

For Citation: Lozinsky V.I., Runtso A.I., Sorokina E.V., Kolosova O.Yu. Cryostructuring of Polymeric Systems: 70. Impact of Aqueous Solutions of Strong Mineral Acids on Physico-Chemical Properties and Microstructure of Poly(vinyl alcohol) Cryogels. *Kolloidnyy Zhurnal / Colloid Journal*. 2026;88(1):37–55. (In Russ.) <https://doi.org/10.31851/S0023291226010036>

Received July 24, 2025

Received August 26, 2025

Accepted September 01, 2025



ВВЕДЕНИЕ

Физические криогели поливинилового спирта (КГПВС) формируются замораживанием концентрированных растворов этого полимера, их последующей инкубацией в замороженном состоянии и далее оттаиванием [1–6]. Молекулярные механизмы такого криотропного гелеобразования базируются на водородном связывании между ОН-группами соседних цепей ПВС [3, 4, 7], что в результате приводит к частичной кристаллизации этого полимера [3, 4, 8, 9]. Образующиеся микрокристаллиты в дальнейшем выполняют функцию узлов надмолекулярной трехмерной сетки таких криогелей [10, 11]. В свою очередь, поликристаллы замороженного растворителя действуют как пороги, формируя систему взаимосвязанных макропор внутри объема образующегося криогеля [3, 7, 11–13]. Динамика гелеобразования растворов поливинилового спирта при замораживании-оттаивании, физико-химические свойства и микроструктура КГПВС зависят от совокупности многочисленных факторов [3, 4, 11, 13–17]. К основным из них относятся следующие:

а) характеристики самого гелеобразующего полимера (его молекулярная масса и молекулярно-массовое распределение, количество остаточных О-ацильных групп, тактичность цепей) [3, 4, 15, 18–20];

б) концентрация ПВС в исходном растворе перед его криогенной обработкой [3, 4, 15, 16, 21];

в) тип и состав используемого растворителя [3, 11, 13, 22–27];

г) режимы всех стадий криотропного гелеобразования [3, 4, 16, 17, 20, 28, 29]. В последнем случае к ключевым условиям относятся такие параметры, как скорость охлаждения при замораживании исходного раствора ПВС [29–32], температура и продолжительность инкубации системы в замороженном состоянии [1, 3, 4, 11, 12, 15, 33, 34], скорость нагрева при оттаивании замороженных образцов [3, 11, 29, 33], количество циклов замораживания-оттаивания [3, 4, 8, 35–37].

Помимо научного интереса, эти макропористые упруговязкие гелевые матрицы привлекают значительное внимание в различных прикладных областях, особенно для использования в качестве биотехнологических [3, 38–43] и биомедицинских [1, 3, 4, 44–49] материалов. В частности, известны примеры успешного применения криогелей ПВС в качестве раневых покрытий [50–53], носителей для доставки лекарств [54–57], временных имплантатов [57], протезов хрящей [46, 55, 58–60] и искусственных клапанов сердца [61], в качестве гелевых стандартов и моделей для медицинской

ЯМР-томографии [62–64] и ультразвуковой диагностики [65–67] и др.

Во многих подобных случаях, особенно когда речь идет о материалах медицинского назначения, критически важна их стерильность, т.е. отсутствие микробного загрязнения у соответствующих «изделий». Для обеспечения этого требования обычно применяют один из следующих методов [68–70]:

- термическую стерилизацию (часто в сочетании с высоким давлением, т.е. автоклавирование);
- газовую стерилизацию (обычно это касается сухих материалов);
- радиационную стерилизацию;
- проведение всех операций по изготовлению целевого материала в асептических условиях;
- наполнение соответствующего биоматериала в процессе его приготовления антимикробными веществами или обработка уже сформированных образцов антимикробными/стерилизующими жидкостями, например растворами этанола, перекиси водорода, антибиотиков и т.д.

Выбор конкретного метода стерилизации определяется свойствами самого биомедицинского материала, а также экономическими факторами. Так, в случае матриц на основе КГПВС воздействие высоких температур не подходит, поскольку нековалентная сетка этих криогелей термически разрушается в диапазоне 60–85°C [3, 4, 10, 15, 19, 29, 36, 49, 71]. Стерилизация криогелей ПВС газами малоэффективна из-за плохого проникновения стерилизующего вещества в объем набухшей в воде полимерной матрицы. Радиационная стерилизация, обычно применяемая к сухим биоматериалам с использованием достаточно высоких доз облучения, в случае гидрогелей вызывает радиолиз воды с образованием опасных свободных радикалов. Кроме того, радиационная стерилизация требует специального оборудования и производственных площадей, что существенно влияет на стоимость такой обработки. Последние экономические факторы также тесно связаны с технологией, способной обеспечить асептические условия для изготовления требуемых изделий. Поэтому для стерилизации материалов на основе КГПВС более подходящими являются подходы, базирующиеся на применении растворов таких антимикробных соединений, как антибиотики и антимикотики [55, 72, 73], или некоторые стерилизующие агенты (например, фенол [74]). Однако некоторые из этих веществ недешевы (особенно современные антибиотики) или весьма токсичны, как фенол. Поэтому представляет интерес поиск более дешевых и менее опасных заменителей стерилизующих химикатов, например, простых неорганических кислот, а также поиск экспериментальных условий их применения. В этой связи, прежде всего, необходимо было установить характер влияния водных растворов сильных минеральных кислот на физико-химические свойства и микроструктуру КГПВС, что ранее фактически не было известно. Далее же требовалось

продемонстрировать принципиальную возможность использования такой кислотной обработки для проведения стерилизации изделий из КГПВС. Именно эти исследования и являлись целями данной работы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В экспериментах без дополнительной очистки использовали поливиниловый спирт (ПВС) со степенью деацетилирования 99–100% и молекулярной массой 86 кДа (Acros Organics, Бельгия), соляную кислоту (х.ч., 37% водный раствор) и серную кислоту (х.ч., 100%) («Экротхим», РФ), фосфорную кислоту (ч.д.а., 85% водный раствор) («Русхим», РФ). Для приготовления растворов ПВС и минеральных кислот использовали деионизированную воду. Эту же воду дополнительно стерилизовали кипячением для дальнейшей промывки криогелей после их кислотной обработки.

Штаммы микроорганизмов, использованных в данном исследовании, были получены из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) и коллекции микроорганизмов Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова. Чувствительность бактерий *Escherichia coli* K12 TGI, дрожжеподобного гриба *Candida albicans* N-4 (имеет псевдомицелий без перегородок) и мицелиального гриба *Aspergillus niger* CBS 513.88 (имеет разрозненный мицелий), включенных в матрицу криогеля ПВС, оценивали методом культивирования на жидких селективных питательных средах. Эти среды были следующими:

для клеток *Escherichia coli* – жидкая среда LB (pH 6.8–7.2), содержащая глюкозу (20 г/л), казеин-триптон (Difco Laboratories, США) (10 г/л), дрожжевой экстракт (5 г/л) и NaCl (2 г/л);

для клеток *Candida albicans* N-4 и *Aspergillus niger* CBS513.88 – жидкая посевная среда (pH 7.0–7.2), содержащая глюкозу (20 г/л), пептон (Difco Laboratories, США) (1 г/л) и хлорид натрия (88 г/л).

Образцы КГПВС готовили в соответствии с методикой, описанной ранее [15, 29]. Для этого 10 или 12 г сухого порошка ПВС диспергировали в 100 мл деионизированной воды, после чего суспензию оставляли при комнатной температуре на ночь для набухания полимера. Далее ПВС растворяли, нагревая набухшую массу на кипящей водяной бане в течение 40 мин при перемешивании. Образец взвешивали до и после растворения ПВС, потерю испаряющейся воды компенсировали, что приводило к получению вязких прозрачных растворов с концентрацией полимера 100 или 120 г/л соответственно. Каждый раствор ПВС дозировали в разборные дюралюминиевые формы (внутренний диаметр 15 мм, высота 10 мм), которые герметично закрывали, помещали в камеру прецизионного программируемого криостата FP32 HP (Julabo, Германия), где образцы замораживали при –20°C в течение 12 ч, после чего размораживали нагреванием до 20°C со скоростью 0.03°C/мин, задаваемой микропроцессором криостата.

Для приготовления криогелей ПВС, содержащих клетки микроорганизмов, 24.64 г водного раствора ПВС с концентрацией полимера 120 г/л смешивали с 7.5 мл микробной суспензии, содержащей около $1.3 \cdot 10^{10}$ клеток/мл, чтобы получить жидкую систему с концентрацией ПВС 100 г/л и содержанием микроорганизмов около $0.4 \cdot 10^9$ клеток/мл. Затем по 3 г этой дисперсии слоем толщиной ~3 мм вносили в пластиковые чашки Петри (внутренний диаметр 38 мм). Чашки герметизировали и помещали в криостат, где проводили криогенную обработку аналогично процедуре, использованной при приготовлении криогелей без клеток.

Для обработки растворами сильных минеральных кислот криогелей ПВС без включенных микроорганизмов и с ними каждый цилиндрический КГПВС помещали в 10-кратный объем водного раствора HCl, H₂SO₄ или H₃PO₄ (концентрации приведены в тексте), где инкубировали в течение 72 ч при комнатной температуре, периодически встряхивая. Содержание кислоты в этих растворах рассчитывали таким образом, чтобы равновесная концентрация протонов в соответствующих образцах составляла 1, 2, 3 или 4 N. После такой обработки каждый криогель переносили в 100 мл деионизированной стерилизованной воды и инкубировали при комнатной температуре в течение 24 ч, периодически встряхивая. Воду меняли ежедневно в течение 7 дней, контролируя значение pH промывочной жидкости.

Объем цилиндрических образцов КГПВС определяли измерением штангенциркулем их диаметра и высоты с последующим расчетом объема соответствующего цилиндра.

Компрессионный модуль Юнга (E) криогелей измеряли по ранее описанной методике [35, 55] с использованием автоматического анализатора текстуры TA-Plus (Lloyd Instruments Ltd., Великобритания) по линейному участку кривой «напряжение–деформация» при скорости одноосной деформации 0.2 мм/мин. Испытания проводили до достижения 30% деформации.

Температуру плавления (T_f) КГПВС определяли методом падающего шарика [75]. Для этого в верхней части цилиндрического образца криогеля скальпелем делали небольшой надрез, в который помещали шарик из нержавеющей стали диаметром 3.5 мм и массой 0.275 ± 0.005 г. Затем криогель с шариком переносили в полиэтиленовую пробирку, в которой образец нагревали на водяной бане со скоростью $0.4 \pm 0.1^\circ\text{C}/\text{мин}$. За температуру плавления принимали температуру, при которой шарик, пройдя через слой плавящегося геля, падал на дно пробирки.

Микроструктуру тонких срезов КГПВС изучали с помощью оптического микроскопа Eclipse 55i (Nikon, Япония), оснащенного системой цифровой регистрации изображений MMC-50C-M (MMCSoft, Россия). Тонкие (10 мкм) срезы криогелей готовили ортогонально оси цилиндрических образцов с помощью криомикротомы Minux FS800 (RWD, Китай). Затем каждый срез помещали на предметное стекло, контрастировали

1% водным раствором Конго красного и заключали в фиксирующую среду по известной методике [15, 27, 37]. Размер макропор на изображениях оценивали с помощью программы ImageJ.

Чувствительность клеток бактерий *Escherichia coli*, дрожжей *Candida albicans* и мицелиальных грибов *Aspergillus niger*, иммобилизованных включением в матрицу криогеля ПВС, к обработке 1–4 N водными растворами HCl, H₂SO₄ и H₃PO₄, исследовали методом культивирования на селективных жидких питательных средах. При этом образцы дисков криогелей до и после кислотной обработки с последующей промывкой чистой водой помещали в колбы с соответствующей жидкой питательной средой и инкубировали при 30°C в течение 48 ч на шейкере с постоянной аэрацией. В качестве образцов сравнения использовали криогели ПВС, не содержавшие клетки и инкубировавшиеся в тех же условиях. Наличие или отсутствие клеток в жидкой фазе этих культивационных колб контролировали измерением оптической плотности при 540 нм с помощью денситометра DEN-1 (BioSan, Южная Корея).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Изменение степени набухания криогелей ПВС в водных растворах сильных минеральных кислот

Как было показано ранее [76], криогели ПВС осмотически устойчивы в водных растворах с pH от 3 до 9 при условии отсутствия дополнительных растворенных веществ с выраженными хаотропными или космотропными свойствами, т.е. способностью, соответственно, препятствовать или способствовать водородному связыванию. В более кислой среде (например, в растворах HCl с концентрацией 0.5–1.0 N, т.е. при pH от ~0.3 до 0) наблюдалось дополнительное набухание таких криогелей на 10–20 об. % [76]. Очевидной причиной этого эффекта было частичное протонирование боковых OH-групп в цепях ПВС, что приводило к повышению их гидратации. В свою очередь, принимая во внимание тот факт, что некоторые микроорганизмы, особенно ацидофилы, способны не терять жизнеспособности в довольно кислых средах [77], нами предполагалось использовать более концентрированные растворы сильных минеральных кислот для надежной стерилизации материалов на основе КГПВС от контаминации основными видами микроорганизмов (бактериями, дрожжами, мицелиальными грибами). Поэтому прежде всего необходимо было оценить устойчивость криогелей в таких более кислых средах по сравнению с вышеупомянутыми 0.5–1.0 N растворами HCl. Поскольку в случае более концентрированных растворов использованных нами криогелей степень протонирования гидроксильных групп ПВС также должна была бы возрастать, необходимо было выяснить, как этот эффект повлияет на набухание гелевого материала, его физико-химические

свойства и микроструктуру. Все эти исследования входили в задачи настоящих исследований.

Так, на рис. 1 приведены экспериментальные данные об относительном изменении объема образцов цилиндрических криогелей после их 24-часовой инкубации в водных растворах HCl (2), H₂SO₄ (3) и H₃PO₄ (4) различной концентрации. Значения концентрации выражены как формальная нормальность по атомам водорода этих растворов (в эквивалентах Н на литр) и не учитывает различия в значениях pK_a ионизируемых групп в молекулах серной и фосфорной кислот. По оси ординат отложено процентное отношение объемов насыщенных кислотой цилиндрических криогелей (V_i) к объему КГПВС до инкубации в растворе той или иной кислоты (V_0).

Как оказалось, наиболее выраженное влияние на степень набухания КГПВС оказывают водные растворы соляной кислоты (2, рис. 1): в среде 1 N HCl образцы гелей набухали дополнительно на ~17 об. %, в 2 N HCl – на ~23 об. %, в 3 N HCl – уже на ~150 об. %, а в среде 4 N HCl криогели ПВХ полностью растворялись. В противоположность этому осмотический отклик КГПВС на инкубацию в растворах H₂SO₄ и H₃PO₄ отличался принципиально. А именно, для образцов криогелей, выдержанных в 1–2 N растворах этих кислот, наблюдалась незначительная усадка на 3–7 об. %, в 3 и 4 N растворах фосфорной кислоты объем криогелей ПВХ практически не изменялся, а в среде 3 или 4 N растворов серной кислоты объем образцов КГПВС уменьшался уже на 13–17% (об./об.). Другими словами, инкубация криогелей ПВХ в сильноокислых (pH < 0) водных растворах H₂SO₄ и H₃PO₄ не приводила, в отличие от HCl, к растворению этих гелей.

Вполне очевидно, что такие результаты свидетельствуют о проявлении противоположно направленного

влияния катионов H⁺ (точнее, катионов H₃O⁺) по сравнению с гидратированными анионами SO₄²⁻ и PO₄³⁻ на интегральную устойчивость узлов связей в трехмерной надмолекулярной сетке КГПВС.

С одной стороны, сильноокислая среда вызывает протонирование боковых OH-групп ПВХ, что приводит к появлению одноименных зарядов на макромолекулах и, как следствие, к отталкиванию цепей. Это при отсутствии противодействия данному процессу приводит к постепенному сильному набуханию и окончательному растворению криогеля. Именно такой вариант наблюдался при инкубации образцов КГПВС в 3–4 N растворах соляной кислоты (2, рис. 1). При этом наличие в системе анионов Cl⁻ не препятствует в заметной степени подобным явлениям распада физической сетки потому, что эти анионы, как правило, относительно слабо влияют как на формирование криогелей ПВХ, так и на осмотические характеристики уже сформированных образцов КГПВС [76, 78, 79]. С другой стороны, хорошо известно, что фосфатные и особенно сульфатные анионы в водных средах проявляют выраженные космотропные эффекты по отношению к водородным связям, а также усиливают процессы высаливания водорастворимых высокомолекулярных соединений [80], в том числе и поливинилового спирта [81]. Поэтому в растворах, содержащих анионы SO₄²⁻ и PO₄³⁻, криогели ПВХ претерпевают заметную усадку [76]. Это свойство указанных анионов вероятно является одним из факторов, конкурирующих с растворением КГПВС, обусловленным протонированием их OH-групп в сильноокислой среде. Можно также предположить, что еще одним механизмом, способным стабилизировать трехмерную сетку криогелей ПВХ в водных растворах серной и фосфорной кислот, является формирование солеподобных мостиков между

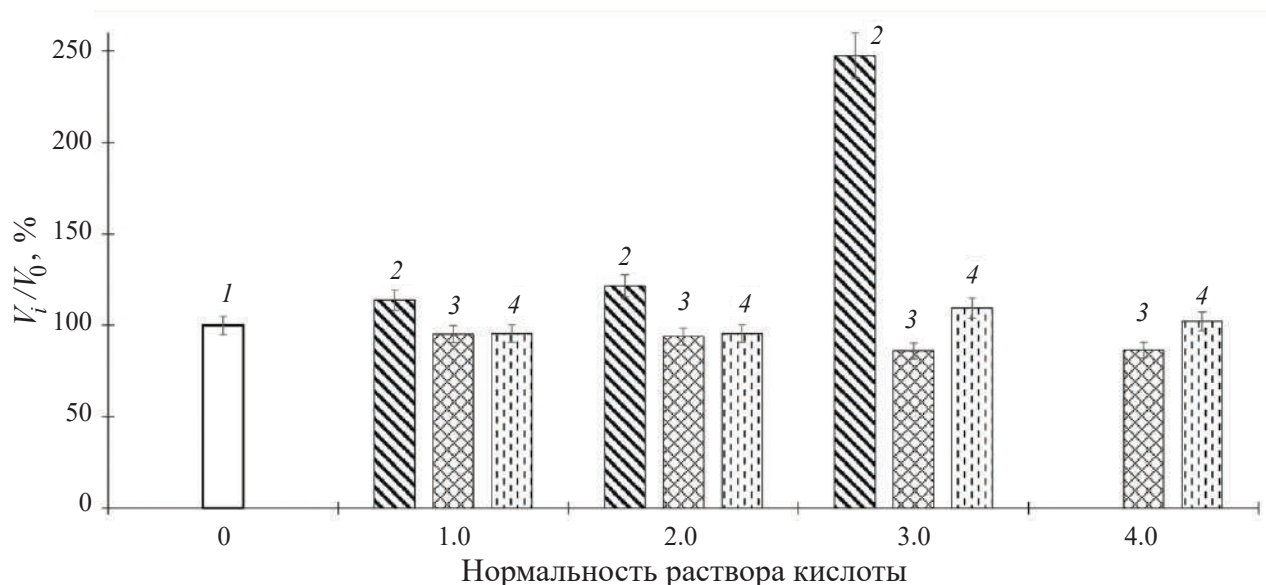


Рис. 1. Относительные изменения объема цилиндрических образцов КГПВС, вызванные инкубацией (до достижения соответствующего концентрационного равновесия) свежеприготовленного криогеля ПВХ (1) в водных растворах кислот: (2) – HCl, (3) – H₂SO₄, (4) – H₃PO₄

протонированными гидроксилами и ди- или три- отрицательно заряженными сульфатными и фосфатными анионами, аналогично процессам, происходящим при образовании достаточно устойчивых органических структур в так называемых «стабилизированных зарядом водородно-связанных органических каркасов» (charge-assisted hydrogen-bonded organic frameworks, CAHOF) [82]. В любом случае данные на рис. 1 свидетельствуют о том, что при погружении в концентрированные водные растворы H_2SO_4 или H_3PO_4 криогели ПВС не теряют своей целостности и, следовательно, такие жидкие среды потенциально могут быть использованы для стерилизации материалов на основе КГПВС без опасения их потери вследствие растворения.

Характер изменения упругости и теплостойкости криогелей ПВС при их инкубации в водных растворах сильных минеральных кислот

Изменения в набухаемости КГПВС под действием растворов сильных минеральных кислот (рис. 1) также отражались на физико-механических свойствах соответствующих образцов криогелей. Так, на рис. 2 приведены диаграммы относительного изменения значений модуля Юнга образцов КГПВС в результате их инкубации в растворах с возрастающей концентрацией HCl , H_2SO_4 и H_3PO_4 . По оси ординат отложено процентное отношение значений модуля Юнга насыщенных кислотой цилиндрических криогелей (E_i) к значению модуля упругости для КГПВС до кислотной обработки (E_0).

Компрессионный модуль Юнга криогелей, проинкубированных в 1 N растворе HCl , повысился примерно

на 30% (2, рис. 2), хотя такие образцы дополнительно набухли примерно на 20% (2, рис. 1), т.е. удельная концентрация ПВС на единицу объема в них понизилась. Такой эффект упрочнения можно, вероятно, объяснить дополнительным вкладом давления набухания в упругие показатели соответствующего геля. Однако при возрастании концентрации HCl в инкубационной среде этот эффект подавлялся солибилизирующим действием данной кислоты, что приводило к постепенному снижению значений E (2, рис. 2 для КГПВС, обработанных 2 и 3 N растворами HCl) и в конечном итоге к полному растворению криогелей в среде 4 N HCl .

В свою очередь, инкубация криогелей ПВС в 1–4 N растворах фосфорной кислоты не вызывала существенных изменений как объема образцов (4, рис. 1), так и их жесткости (4, рис. 2). В то же время идентичные условия инкубации криогелей в 1–4 N водных растворах H_2SO_4 привели к значительно более выраженному влиянию на набухаемость (3, рис. 1) и особенно на упругость (3, рис. 2) соответствующих образцов КГПВС. Величина их модуля Юнга возросла в 2–2.5 раза по сравнению с криогелями до кислотной обработки, что еще раз указывает на высокую «активность» сульфат-анионов в отношении стабилизации целостности КГПВС.

Этот эффект обусловлен не только подавлением обсуждавшегося выше разрушающего целостность криогеля влияния депротонирования и ионизации ОН-групп ПВС в сильноокислых средах, но и образованием некоторого дополнительного количества межцепных водородных связей в КГПВС, обработанных 1–4 N растворами H_2SO_4 . Последний вывод можно сделать из данных по теплостойкости таких криогелей (3, рис. 3),

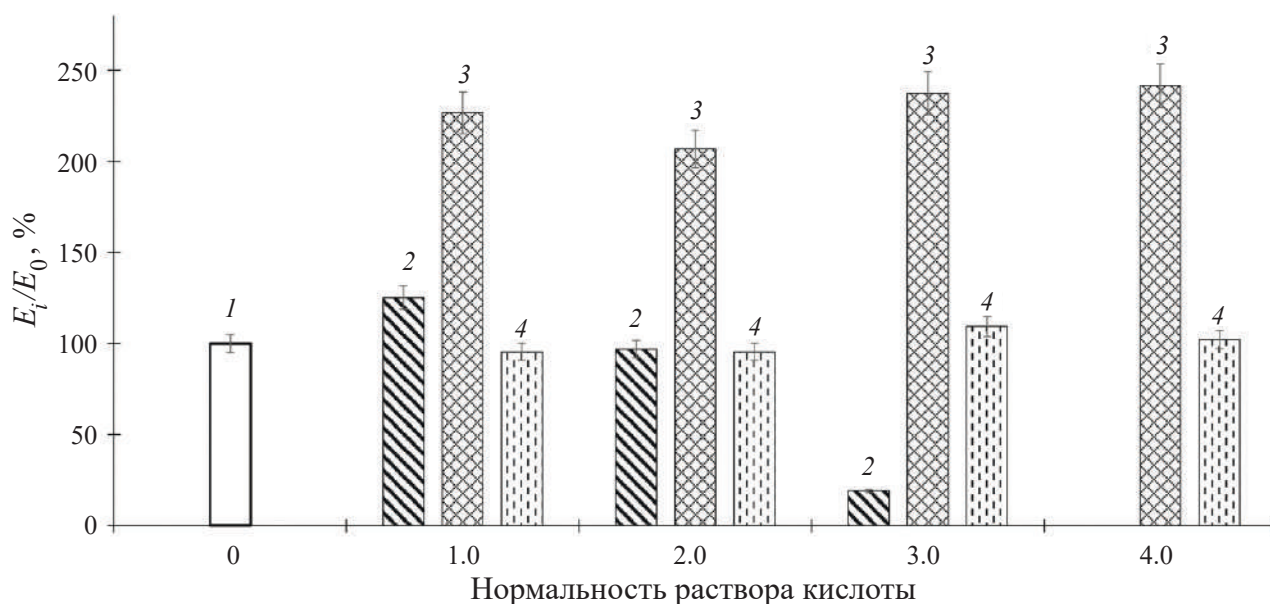


Рис. 2. Относительные изменения значений модуля Юнга цилиндрических образцов КГПВС после инкубации (до достижения соответствующего концентрационного равновесия) свежеприготовленных криогелей ПВС (1) в водных растворах кислот: (2) – HCl , (3) – H_2SO_4 , (4) – H_3PO_4

поскольку для различных физических гидрогелей на основе Н-связанных макромолекул вообще и криогелей ПВС в частности, чем больше количество межцепочечных водородных связей в узлах трехмерной сетки, тем выше температура плавления (T_f) соответствующих гелевых матриц [10, 71, 83, 84].

Прежде всего, для КГПВС наблюдалось монотонное снижение значений T_f с ростом концентрации HCl в инкубационном растворе (2, рис. 3). Напротив, если свежеприготовленные криогели ПВС плавятся около 72°C (1, рис. 3), то образцы КГПВС, обработанные 1–3 N растворами H_2SO_4 , плавятся при 75–78°C (3, рис. 3), и только криогели, проинкубированные в среде 4 N серной кислоты, т.е. в очень сильноокислой среде, имели температуру плавления, близкую к значению T_f для КГПВС до кислотной обработки. В свою очередь, вариации значений температуры плавления КГПВС, инкубированных в 1–4 N растворах фосфорной кислоты (4, рис. 3), были несколько меньше по сравнению с криогелями, выдержанными в течение того же времени в растворах серной кислоты. В целом, можно сделать вывод, что в 1–4 N водных растворах H_3PO_4 и особенно H_2SO_4 не происходит ни потери целостности образцов КГПВС, ни снижения их упругости и теплостойкости. Эти результаты, очевидно, означают, что аналогичная обработка в принципе может быть реализована в процедурах стерилизации изделий на основе КГПВС, представляющих биомедицинский интерес.

В данном аспекте вполне очевидно, что такие КГПВС не будут использовать в биомедицинской практике в виде кислотно-нагруженных гелевых матриц, а только после их тщательной промывки от стерилизующего раствора. Поэтому нужно было выяснить – вернется ли объем, жесткость и теплостойкость криогелей

ПВС к исходным значениям до кислотной обработки после ее проведения и последующей отмытки от соответствующих кислот.

Физико-химические свойства криогелей ПВС после их промывки от растворов сильных минеральных кислот

Процедура промывки криогелей, выдержанных в растворах кислот, включала многократную «экстракцию» каждого образца большим избытком чистой воды с параллельным контролем уровня pH в промывных водах (см. Экспериментальную часть). После завершения промывки были измерены значения V_i/V_0 , E_i/E_0 и T_f для нейтрализованных таким образом гидратированных криогелей. Полученные результаты приведены на диаграммах на рис. 4–6. Столбцы на них обозначены цифрами со штрихами для того, чтобы отличать данные для образцов, обработанных растворами кислот (рис. 1–3), от соответствующих характеристик, показанных на рис. 4–6 для КГПВС, промытых чистой водой.

Было найдено, что объем образцов, набухших в 1–2 N растворах HCl (2, рис. 1), после промывки мало отличался от объема криогелей до кислотной обработки (1, рис. 1, 2), тогда как после сильного набухания КГПВС в 3 N растворе HCl (2, рис. 1) и последующего удаления кислоты объем промытых образцов превышал объем криогелей до кислотной обработки примерно на 30–35% (2', рис. 4). Такой результат может свидетельствовать об уменьшении содержания гелеобразующего полимера в объеме набухшей макропористой полимерной матрицы, например, за счет вымывания золь-фракции, обычно присутствующей в КГПВС [11,

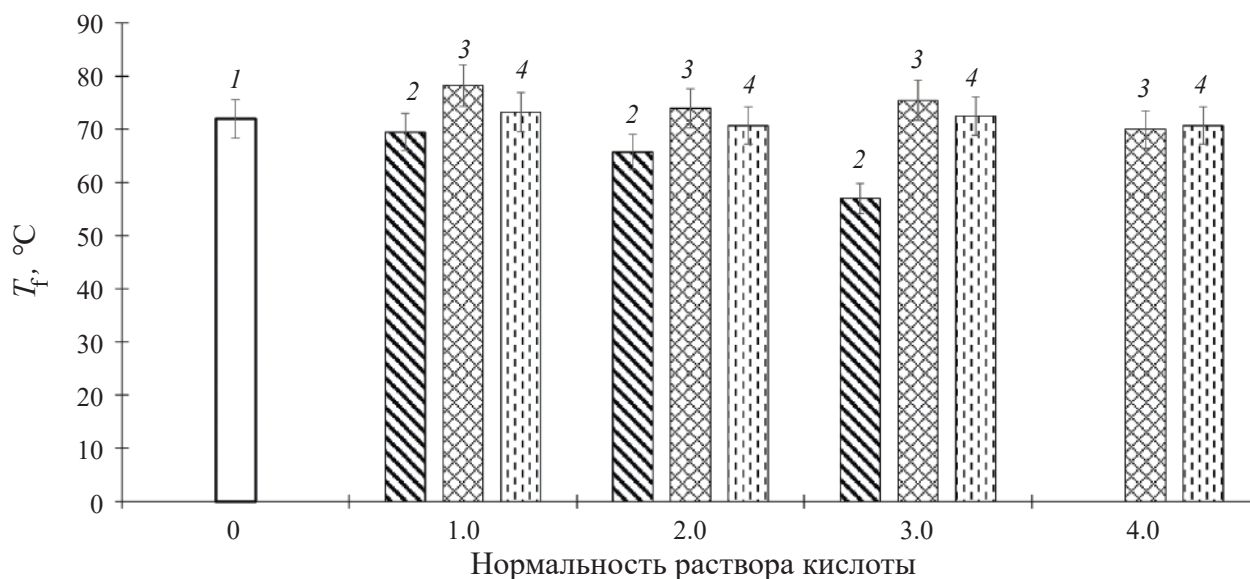


Рис. 3. Относительные изменения значений модуля Юнга цилиндрических образцов КГПВС после инкубации (до достижения соответствующего концентрационного равновесия) свежеприготовленных криогелей ПВС (1) в водных растворах кислот: (2) – HCl, (3) – H_2SO_4 , (4) – H_3PO_4

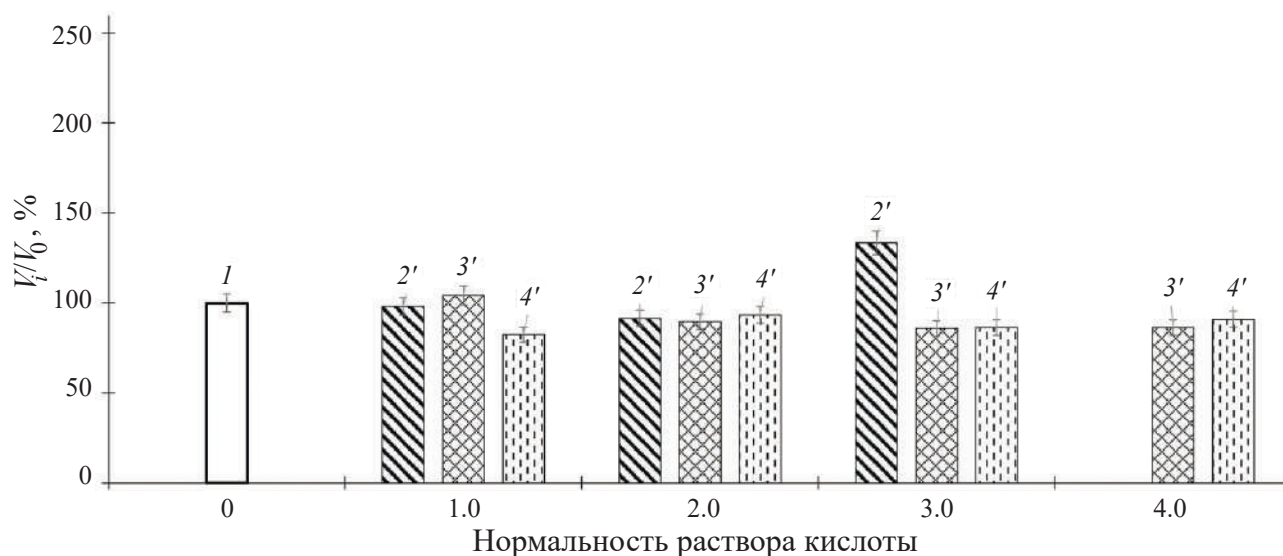


Рис. 4. Относительные изменения объема цилиндрических образцов КГПВС после промывки обработанных кислотой криогелей чистой водой: свежеприготовленные образцы (1), криогели, инкубированные в водных растворах HCl (2'), H₂SO₄ (3') или H₃PO₄ (4') перед промывкой

76, 85, 86], и, как следствие, о большей степени набухания менее концентрированной полимерной сетки.

В свою очередь, объем промытых водой криогелей, предварительно экспонированных в растворах серной (3, рис. 1) или фосфорной (4, рис. 1) кислот, уменьшился на 7–14% по сравнению с КГПВС до кислотной обработки (1, рис. 1, 4). Следовательно, эффект некоторого отбухания криогелей ПВХ под действием этих кислот сохранялся и после удаления из гелевой матрицы H₂SO₄ или H₃PO₄. Этот факт свидетельствует о «фиксации» некоторого уплотнения ее надмолекулярной сетки от воздействия 1–4 N растворов этих кислот. Такое предположение подтверждается и данными о физико-механических характеристиках промытых водой криогелей 3' и 4' (рис. 5).

Если упругость образцов КГПВС, предварительно обработанных растворами соляной кислоты, а затем промытых чистой водой, прогрессивно снижалась с ростом концентрации HCl в инкубационной среде (2', рис. 5), то значения E для КГПВС, промытых от фосфорной и особенно серной кислот (4' и 3', соответственно, рис. 5), примерно в 1.5–2.3 раза превышали значение модуля Юнга криогеля ПВХ до его кислотной обработки. Последние результаты мы рассматриваем как проявление отмеченного выше сильного космотропного влияния сульфат- и фосфат-анионов на образование некоторого количества дополнительных межцепных (ПВС-ПВС) водородных связей в надмолекулярной трехмерной сетке соответствующих КГПВС в результате их инкубации в концентрированных растворах H₂SO₄ или H₃PO₄. Такое воздействие приводило к росту жесткости гелевого материала (3 и 4, рис. 2) и, как показывают данные рис. 5, качественно сохранялось в какой-то степени

и после промывки чистой водой «нагруженных» кислотой образцов (3' и 4', рис. 5).

Таким образом, экспериментальные результаты, приведенные на рис. 4–6, наглядно свидетельствуют о том, что обработка криогелей ПВХ 1–4 N растворами серной или фосфорной кислот не приводит к нежелательным эффектам в отношении целостности гелевого материала и его физико-химических характеристик. При этом известно, что интегральные свойства макропористых КГПВС зависят не только от жесткости самой полимерной фазы – гелевых стенок макропор, но и от морфологии этих пор [3, 4, 11–15, 18, 87, 88]. Поэтому представляло интерес проследить, как процессы насыщения образцов КГПВС растворами HCl, H₂SO₄ или H₃PO₄ с последующей промывкой полученных криогелей чистой водой повлияют на их микроструктуру.

Микроструктура КГПВС после их инкубации в водных растворах сильных минеральных кислот и последующей промывки чистой водой

Исследования тонких срезов полученных нами гелевых матриц проводились с помощью оптической микроскопии по методике, ранее успешно реализованной для различных криогелей ПВХ [15, 27, 35, 55, 74, 79, 88]. При этом необходимо отметить, что данная методика предпочтительнее использования сканирующей электронной микроскопии для изучения структуры таких, как КГПВС, макропористых гелей, поскольку в противовес СЭМ не требуется их сушка, что позволяет наблюдать «незатронутую» высушиванием текстуру полимерного материала в набухом состоянии [3, 14, 15, 26, 35, 88, 89].



Рис. 5. Относительные изменения значений модуля Юнга (E) цилиндрических КГПВС: образцы до кислотной обработки (1), криогели после промывки чистой водой образцов, которые перед промывкой инкубировались в водных растворах HCl (2'), H₂SO₄ (3') и H₃PO₄ (4')

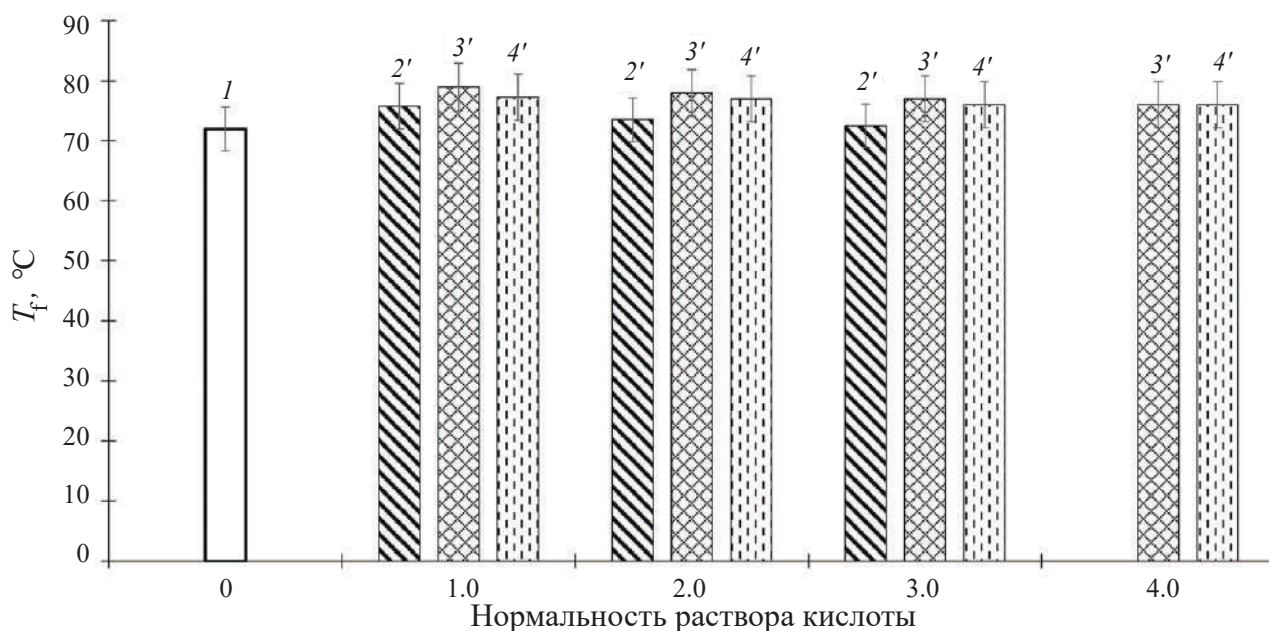


Рис. 6. Значения температуры плавления (T_f) образцов КГПВС после промывки чистой водой обработанных кислотой криогелей: образцы до кислотной обработки (1), криогели, которые перед промывкой инкубировались в водных растворах HCl (2'), H₂SO₄ (3') и H₃PO₄ (4')

Макропористая морфология тонких срезов следующих криогелей ПВХ приведена на микрофотографиях на рис. 7: КГПВС до кислотной обработки (а); образцы криогелей, проинкубированных в 2 N растворах HCl (б), H₂SO₄ (в) или H₃PO₄ (г), а затем промытых чистой водой. Темные области на этих черно-белых изображениях – это гелевые стенки макропор, окрашенные Конго красным, а светлые области – сами макропоры, заполненные водой.

Микроструктура криогеля ПВХ до кислотной обработки (рис. 7а) была типичной для подобных гелевых матриц [3, 15, 35, 53, 88, 89], обладающих системой взаимосвязанных макропор с поперечным сечением 1–10 мкм. Кроме того, на этом изображении видны несколько более интенсивно окрашенные более толстые «тяжи» крупночейистой супрамолекулярной сетки с размерами пор от 15–25 до 60–90 мкм, что свидетельствует об иерархической пористости, присущей такому криогелю.

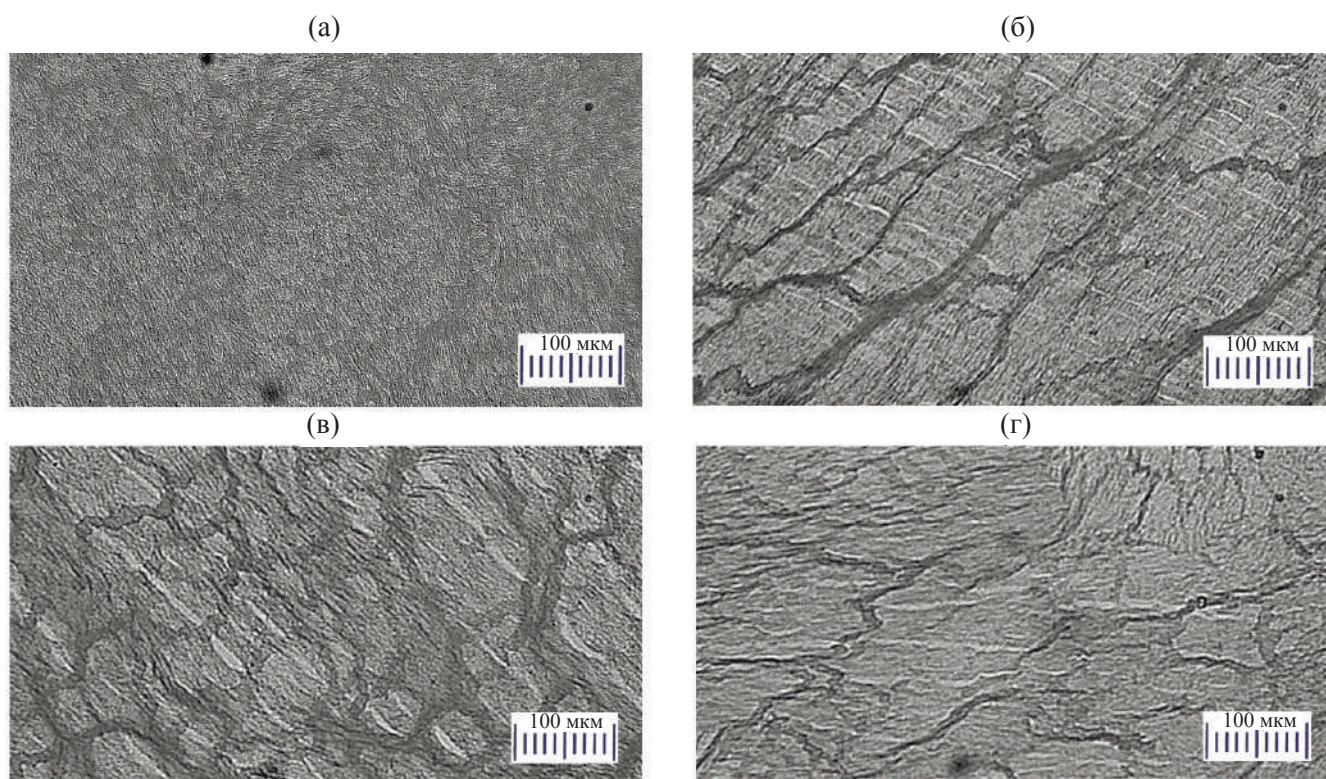


Рис. 7. Изображения (оптический микроскоп) тонких срезов криогелей КГПВС: криогель до кислотной обработки (а); криогели ПВХ, промытые чистой водой после инкубации образцов в 2N растворах 2N HCl (б), H₂SO₄ (в) и H₃PO₄ (г)

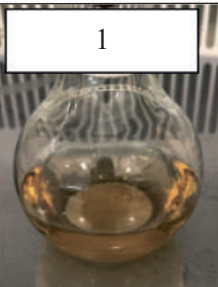
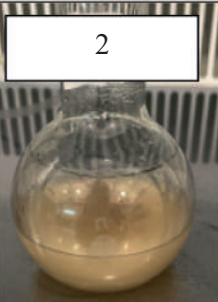
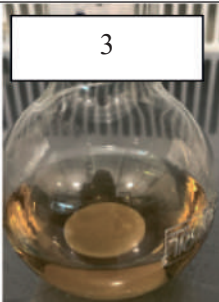
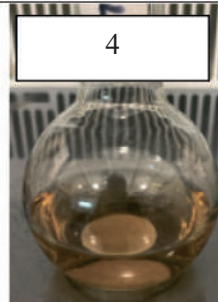
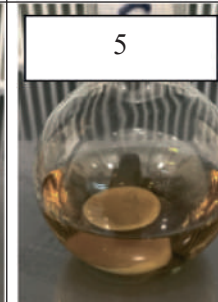
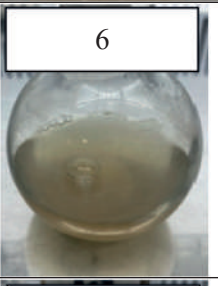
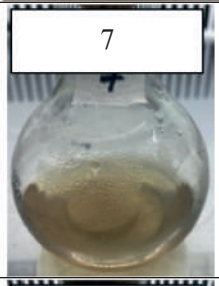
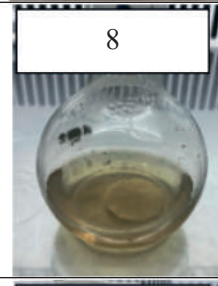
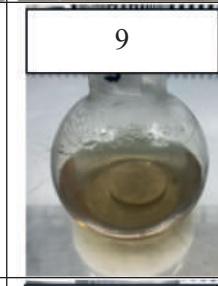
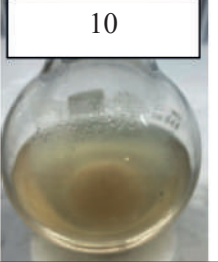
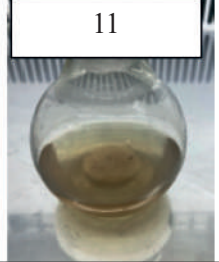
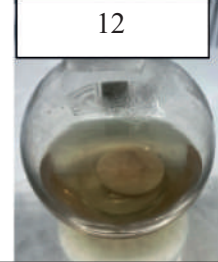
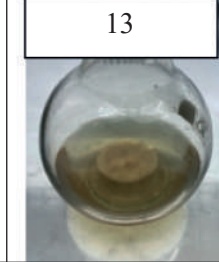
В свою очередь, еще более выраженная текстура подобной крупноячеистой сетки наблюдалась в тонких срезах криогелей после их обработки растворами сильных минеральных кислот (рис. 7б–г). При этом в случае образцов, проинкубированных в растворах соляной и фосфорной кислот, сечение наиболее крупных пор достигало 55–210 мкм (рис. 7б) и 95–190 мкм (рис. 7г) соответственно, а для КГПВС, обработанного раствором серной кислоты, этот параметр находился в диапазоне от ~45 до ~150 мкм (рис. 7в). Из полученных данных следует, что при инкубации соответствующих гелевых образцов в растворах кислот происходили изменения морфологии крупноячеистой сетки этих криогелей, например, за счет вымывания золь-фракции. Тем не менее при использовании 1–4 N растворов H₂SO₄ или H₃PO₄ для кислотной обработки не наблюдалось, как уже подчеркивалось выше, нежелательного ухудшения целостности и физико-механических характеристик таких КГПВС. Однако совокупность основных факторов, обуславливающих изменение макропористой морфологии криогелей ПВХ при их инкубации в водных растворах сильных минеральных кислот, пока еще точно неизвестна и поэтому требует дальнейшего выяснения, что является объектом нашего ближайшего исследования.

Оценка эффективности кислотной обработки для стерилизации криогелей ПВХ, содержащих «искусственные» микробные загрязнения

Для выяснения возможности стерилизации криогелей ПВХ растворами сильных минеральных кислот клетки различных микроорганизмов были включены в объем гелевой матрицы (см. Экспериментальную часть). При этом содержание представителей бактерий, дрожжей и мицелиальных грибов было специально сделано заведомо высоким. Методика, использованная для этих целей, основана на известной схеме иммобилизации микроорганизмов в носителях на основе КГПВС [39], которая обычно обеспечивает хорошее сохранение жизнеспособности клеток [39, 41, 42, 90–92]. Далее образцы КГПВС с включенной биомассой и аналогичные криогели, но обработанные кислотными растворами с последующей промывкой чистой водой, инкубировали в течение 48 ч в колбах со стерильными селективными питательными средами. Последующие измерения оптической плотности при 540 нм (OD₅₄₀) соответствующих жидкостей использовали для оценки количества клеток, выросших *de novo*. Внешний вид таких культивационных сосудов показан на фотографиях в табл. 1.

В первую очередь было установлено отсутствие микробного загрязнения криогеля (колба 1),

Таблица 1. Результаты тестов на присутствие микроорганизмов в криогелях ПВС

Микро- организмы, включенные в матрицу криогеля	Культивационные колбы с культуральными растворами и погруженными в них дисками КГПВС без и с иммобилизованными клетками после обработки образцов 2 N растворами минеральных кислот и затем промытыми до нейтрального состояния			
	H ₂ O	HCl	H ₂ SO ₄	H ₃ PO ₄
Нет	1 			
<i>Escherichia coli</i>	2 	3 	4 	5 
<i>Candida albicans</i>	6 	7 	8 	9 
<i>Aspergillus niger</i>	10 	11 	12 	13 

сформированного из водного раствора ПВС без преднамеренно добавленной биомассы. Этот результат указывает на отсутствие микробных примесей в исходном растворе ПВС.

Что касается образцов криогелей со специально включенными в них микроорганизмами, то во всех трех случаях (колбы 2, 6 и 10) иммобилизованные клетки были живыми и могли расти на селективных питательных средах. После 48-часового культивирования

значения оптической плотности внешних жидкостей над соответствующими образцами криогеля были таковы:

- колба 2 (бактерия *Escherichia coli*) – $OD_{540} = 2.4$, что соответствовало концентрации биомассы 3.0×10^8 клеток/мл;
- колба 6 (дрожжи *Candida albicans*) – $OD_{540} = 1.0$, или 4.1×10^7 клеток/мл;
- колба 10 (гриб *Aspergillus niger*) – $OD_{540} = 0.8$, или 3.2×10^7 клеток/мл.

В отношении же образцов КГПВС с клетками показано, что кислотная обработка таких гелевых матриц с иммобилизованными в них микроорганизмами основных систематических групп приводит к достоверному подавлению жизнеспособности бактерий (колбы 3–5), дрожжей (колбы 7–9) и мицелиальных грибов (колбы 11–13), поскольку даже в богатых питательных средах роста клеток в перечисленных колбах не наблюдалось ($OP_{540} \approx 0$). Аналогичные результаты, т.е. отсутствие жизнеспособных клеток, были получены и при посеве образцов этих жидкостей на плотные агаризованные питательные среды. Другими словами, надежная стерилизация КГПВС, обработанных применявшимися нами растворами минеральных кислот, была достигнута.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Биосовместимые гидрофильные макропористые криогели поливинилового спирта являются востребованными материалами биомедицинского назначения. В связи с этим проблема обеспечения стерильности при их использовании в качестве носителей для доставки лекарственных препаратов, раневых повязок, временных и постоянных имплантатов, протезов хрящевой ткани и т.д. весьма актуальна. Целями данной работы были как оценка возможности стерилизации таких криогелей с помощью доступных и недорогих сильных минеральных кислот (HCl , H_2SO_4 , H_3PO_4), так и изучение влияния водных растворов этих кислот на физико-химические свойства и микроструктуру КГПВС. Причем последний аспект важен и с прикладной точки зрения (если бы гелевый материал разрушался, то кислотная стерилизация просто не нужна), и в фундаментальном

плане как научная основа для прогнозирования дальнейших исследований таких замечательно-интересных объектов, как криогели ПВС. В результате было показано, что их обработка водными растворами соляной кислоты при повышении концентрации HCl от 1 до 3 N в среде инкубации приводит к сильному набуханию образцов геля, значительному снижению их жесткости и теплостойкости, а в 4 N растворе HCl криогель ПВС растворяется полностью, т.е. для целей стерилизации биоматериалов на основе КГПВС растворы HCl не подходят. В то же время характер воздействия растворов 1–4 N серной и фосфорной кислот на КГПВС был фактически противоположным. Такая обработка не вызывала ни растворения, ни заметного размягчения криогелей, а даже, особенно после инкубации в растворах H_2SO_4 , способствовала повышению их модуля упругости и температуры плавления. Этот эффект, как мы полагаем, вероятнее всего, связан с высокой космотропной активностью сульфатных и фосфатных анионов, способствующих образованию дополнительных водородных связей между ОН-группами цепей ПВС. Кроме того, показано, что обработка криогелей ПВС растворами тех же минеральных кислот, когда гелевый носитель содержал иммобилизованные клетки микроорганизмов (бактерий, дрожжей, мицелиальных грибов), приводила к полному подавлению жизнеспособности соответствующих клеток. Полученные экспериментальные результаты свидетельствуют о высокой эффективности такого подхода к стерилизации КГПВС. При этом наиболее перспективным представляется использование растворов серной кислоты, с одной стороны, из-за их благоприятного влияния на физические свойства криогелей ПВС, а с другой стороны, из-за невысокой стоимости этой кислоты.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Nambu M.* Rubber-like poly(vinyl alcohol) gel // *Kobunshi Ronbunshu*. 1990. V. 47. № 9. P. 695–703 (In Japanese).
<https://doi.org/10.1295/koron.47.695>
2. *Peppas N.A.* Turbidimetric studies of aqueous poly(vinyl alcohol) solutions // *Die Makromolekulare Chemie*. 1975. V. 176. P. 3433–3440.
3. *Лозинский В.И.* Криотропное гелеобразование растворов поливинилового спирта // *Успехи химии*. 1998. Т. 67. № 7. С. 641–655.
<https://doi.org/10.1070/RC1998V067N07ABEH000399>
4. *Hassan C.M., Peppas N.A.* Structure and applications of poly(vinyl alcohol) hydrogels produced by conventional crosslinking or by freezing/thawing methods // *Advances in Polymer Science*. 2000. V. 153. P. 37–65.
https://doi.org/10.1007/3-540-46414-X_2
5. *Lozinsky V.I.* A brief history of polymeric cryogels // *Advanced Polymer Science*. 2014. V. 263. P. 1–48.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-05846-7_1
6. *Adelnia H., Ensandoost R., Moonshi S.S., Gavvani J.N., Vasafi E.I., Ta H.T.* Freeze/thawed polyvinyl alcohol hydrogels: Present, past and future // *European Polymer Journal*. 2022. V. 164. P. 110974.
<https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2021.110974>

7. *Masuda K., Horii F.* CP/MAS ^{13}C NMR analyses of the chain conformation and hydrogen bonding for frozen poly(vinyl alcohol) solutions // *Macromolecules*. 1998. V. 31. № 17. P. 5810–5817.
<https://doi.org/10.1021/ma9801265>
8. *Auriemma F., De Rosa C., Triolo R.* Slow crystallization kinetics of poly(vinyl alcohol) in confined environment during cryotropic gelation of aqueous solutions // *Macromolecules*. 2006. V. 39. № 26. P. 9429–9434.
<https://doi.org/10.1021/ma061955q>
9. *De Rosa C., Auriemma F., Di Girolamo R.* Kinetic analysis of cryotropic gelation of poly(vinyl alcohol)/water solutions by small-angle neutron scattering // *Advances in Polymer Science*. 2014. V. 263. P. 159–197.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-05846-7_4
10. *Nishinari K., Watase M., Tanaka F.* Structure of junction zones in poly (vinyl alcohol) gels by rheological and thermal studies // *Journal de Chimie Physique (Paris)*. 1996. V. 93. P. 880–886.
<https://doi.org/10.1051/jcp/1996930880>
11. *Lozinsky V.I., Okay O.* Basic principles of cryotropic gelation // *Advances in Polymer Science*. 2014. V. 263. P. 49–101.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-05846-7_2
12. *Lozinsky V.I., Domotenko L.V., Vainerman E.S., Titova E.F., Mamtsis A.M., Belavtseva E.M., Rogozhin S.V.* Study of cryostructurization of polymer systems. VII. Structure formation under freezing of poly(vinyl alcohol) aqueous solutions // *Colloid & Polymer Science*. 1986. V. 264. P. 19–24.
<https://doi.org/10.1007/BF01410304>
13. *Trieu H., Qutubuddin S.* Poly(vinyl alcohol) hydrogels. 2. Effects of processing parameters on structure and properties // *Polymer*. 1995. V. 36. № 13. P. 2531–2539.
[https://doi.org/10.1016/0032-3861\(95\)91198-G](https://doi.org/10.1016/0032-3861(95)91198-G)
14. *Willcox P.J., Howie D.W., Schmidt-Rohr K., Hoagland D.A., Gido S.P., Pudjijanto S., Kleiner W., Venkatraman S.* Microstructure of poly(vinyl alcohol) hydrogels produced by freeze/thaw cycling // *Journal of Polymer Science, Part B. Polymer Physics*. 1999. V. 37. № 24. P. 3438–3454.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0488\(19991215\)37:24<3438::AID-POLB6>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0488(19991215)37:24<3438::AID-POLB6>3.0.CO;2-9)
15. *Лозинский В.И., Дамшкалн Л.Г., Шаскольский Б.Л., Бабушкина Т.А., Курочкин И.Н., Курочкин И.И.* Изучение криоструктурирования полимерных систем. 27. Физико-химические свойства криогелей поливинилового спирта и особенности их макропористой морфологии // *Коллоидный журнал*. 2007. Т. 69. № 6. С. 798–816.
<https://doi.org/10.31857/S0023291221050116>
16. *Gutiérrez M.C., Aranaz I., Ferrer M.L., del Monto F.* Production and properties of poly(vinyl alcohol) cryogels: recent developments // in: *Macroporous Polymers: Production, Properties and Biological/Biomedical Applications*. Boca Raton, CRC Press, 2010. P. 83–115. ISBN:978-1-4200-8461-0
17. *Lozinsky V.I., Damshkaln L.G.* Study of cryostructuration of polymer systems. XVII. Poly(vinyl alcohol) cryogels: Dynamics of the cryotropic gel-formation // *Journal of Applied Polymer Science*. 2000. V. 77. № 9. P. 2017–2023.
[https://doi.org/10.1002/1097-4628\(20000829\)77:9%3C2017::AID-APP18%3E3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/1097-4628(20000829)77:9%3C2017::AID-APP18%3E3.0.CO;2-6)
18. *Yamaura K., Katoh H., Tanigami T., Matsuzawa S.* Gels of syndiotacticity-rich poly(vinyl alcohol)-water/dimethyl sulfoxide or -water/ethylene glycol solutions // *Journal of Applied Polymer Science*. 1987. V. 34. P. 2347–2354.
<https://doi.org/10.1002/app.1987.070340701>
19. *Watase M., Nishinari K.* Effect of the degree of saponification on the rheological and thermal properties of poly(vinyl alcohol) gels // *Die Makromolekulare Chemie*. 1989. V. 190. № 1. P. 155–163.
<https://doi.org/10.1002/macp.1989.021900117>
20. *Mori Y., Tokura H., Yoshikawa M.* Properties of hydrogels synthesized by freezing and thawing aqueous poly(vinyl alcohol) solutions and their applications // *Journal of Material Science*. 1997. V. 32. P. 491–496.
<https://doi.org/10.1023/A:1018586307534>
21. *Teodorescu M., Bercea M., Morariu S.* Biomaterials of poly(vinyl alcohol) and natural polymers // *Polymer*. 2018. V. 58. № 2. P. 247–287.
<https://doi.org/10.1080/15583724.2017.1403928>
22. *Рогожин С.В., Лозинский В.И., Вайнерман Е.С., Домотенко Л.В., Мамцис А.М., Иванова С.А., Штильман М.И., Коршак В.В.* Нековалентное криоструктурирование в полимерных системах // *Доклады АН СССР*. 1984. Т. 278. № 1. С. 129–133.

23. *Hyon S.H., Cha W.I., Ikada Y.* Preparation of transparent poly(vinyl alcohol) hydrogel // *Polymer Bulletin* 1989. V. 22. P. 119–122.
<https://doi.org/10.1007/BF00255200>
24. *Lozinsky V.I., Domotenko L.V., Zubov A.L., Simenel I.A.* Study of cryostructuring of polymer systems. XII. Poly(vinyl alcohol) cryogels: influence of low-molecular electrolytes // *Journal of Applied Polymer Science*. 1996. V. 61. № 11. P. 1991–1998.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4628\(19960912\)61:11%3C1991::AID-APP13%3E3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4628(19960912)61:11%3C1991::AID-APP13%3E3.0.CO;2-2)
25. *Paţachia S., Friedrich C., Florea C., Croitoru C.* Study of the PVA hydrogel behaviour in 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate ionic liquid // *Express Polymer Letters*. 2011. V. 5. № 2. P. 197–207.
<https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2011.18>
26. *Jiang Y., Hussain H., Kressler J.* Poly(vinyl alcohol) cryogel formation using biocompatible ice nucleating agents // *Macromolecular Materials and Engineering*. 2015. V. 300. № 2. P. 181–190.
<https://doi.org/10.1002/mame.201400229>
27. *Kolosova O.Yu., Kurochkin I.N., Kurochkin I.I., Lozinsky V.I.* Cryostructuring of polymeric systems. 48. Influence of organic non-ionic and ionic chaotropes or kosmotropes on the cryotropic gel-formation of aqueous poly(vinyl alcohol) solutions, as well as on the properties and microstructure of the resultant cryogels // *European Polymer Journal*. 2018. V. 102. P. 169–177.
<https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2018.03.010>
28. *Gun'ko V.M., Savina I.N., Mikhalovsky S.V.* Cryogels: morphological, structural and adsorption characteristics // *Advances in Colloid and Interface Science*. 2013. V. 187–188. P. 1–46.
<https://doi.org/10.1016/j.cis.2012.11.001>
29. *Лозинский В.И., Дамикалн Л.Г., Курочкин И.Н., Курочкин И.И.* Изучение криоструктурирования полимерных систем. 33. Влияние скорости охлаждения водных растворов поливинилового спирта при их замораживании на физико-химические свойства и пористую морфологию криогелей, получающихся после оттаивания // *Коллоидный журнал*. 2012. Т. 74. № 3. С. 343–352.
30. *Gutiérrez M.C., Ferrer M.L., del Monte F.* Ice-templated materials: sophisticated structures exhibiting enhanced functionalities obtained after unidirectional freezing and ice-segregation-induced self-assembly // *Chemistry of Materials*. 2008. V. 20. № 3. P. 634–648.
<https://doi.org/10.1021/cm702028z>
31. *Gusev D.G., Lozinsky V.I., Vainerman E.S., Bakmutov V.I.* Study of the frozen water-poly(vinyl alcohol) system by ^2H and ^{13}C NMR spectroscopy // *Magnetic Resonance in Chemistry*. 1990. V. 28. № 7. P. 651–655.
<https://doi.org/10.1002/mrc.1260280717>
32. *Mikhalev O.I., Serpinski M., Lozinsky V.I., Kapanin P.V., Chkeidze I.I., Alfimov M.V.* Method for determination of liquid microphase volume: application to the investigation of frozen H_2O -poly(vinyl alcohol) system // *Cryo-Letters*. 1991. V. 12. P. 197–206.
33. *Домотенко Л.В., Лозинский В.И., Вайнерман Е.С., Рогожин С.В.* Влияние режимов замораживания водных растворов поливинилового спирта и условий размораживания образцов на свойства получающихся при этом криогелей // *Высокомолекулярные соединения*. 1988. Т. 30А. № 8. С. 1661–1666.
34. *Yamaura K., Karasawa K.-i., Tanigami T., Matsuzawa S.* Gelation of poly(vinyl alcohol) solutions at low temperatures (20 to -78°C) and properties of gels // *Journal of Applied Polymer Science*. 1994. V. 51. № 12. P. 2041–2046.
<https://doi.org/10.1002/app.1994.070511209>
35. *Yokoyama F., Masada I., Shimamura K., Ikawa T., Monobe K.* Morphology and structure of highly elastic poly(vinyl alcohol) hydrogel prepared by repeated freezing-and-melting // *Colloid & Polymer Science*. 1986. V. 264. P. 595–601.
<https://doi.org/10.1007/BF01412597>
36. *Watase M., Nishinari K.* Thermal and rheological properties of poly(vinyl alcohol) hydrogels prepared by repeated cycles of freezing and thawing // *Die Makromolekulare Chemie*. 1988. V. 189. № 4. P. 871–880.
<https://doi.org/10.1002/macp.1988.021890419>
37. *Лозинский В.И., Дамикалн Л.Г., Курочкин И.Н., Курочкин И.И.* Изучение криоструктурирования полимерных систем. 28. Физико-химические свойства и морфология криогелей поливинилового спирта, сфор-

- мированных многократным замораживанием-оттаиванием // Коллоидный журнал. 2008. Т. 70. № 2. С. 212–222.
38. *Varfolomeev S.D., Rainina E.I.; Lozinsky V.I.* Cryoimmobilized enzymes and cells in organic synthesis // *Pure and Applied Chemistry*. 1992. V. 64. № 8. P. 1193–1196.
<https://doi.org/10.1351/pac199264081193>
39. *Lozinsky V.I., Plieva F.M.* Poly(vinyl alcohol) cryogels employed as matrices for cell immobilization. 3. Overview of recent research and developments // *Enzyme and Microbial Technology*. 1998. V. 23. № 3–4. P. 227–242.
[https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(98\)00036-2](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(98)00036-2)
40. *Lozinsky V.I., Plieva F.M., Galaev I.Yu., Mattiasson B.* The potential of polymeric cryogels in bioseparation // *Bioseparation*. 2001. V. 10. P. 163–188.
<https://doi.org/10.1023/A:1016386902611>
41. *Lozinsky V.I., Galaev I.Y., Plieva F.M., Savina I.N., Jungvid H., Mattiasson B.* Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest // *Trends in Biotechnology*. 2003. V. 21. № 10. P. 445–451.
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2003.08.002>
42. *Mattiasson B.* Cryogels for biotechnological applications // *Advances in Polymer Science*. 2014. V. 263. P. 245–282.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-05846-7_7
43. *Lozinsky V.I.* Cryostructuring of polymeric systems. 55. Retrospective view on the more than 40-years studies performed in the A.N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds with respect of the cryostructuring processes in polymeric systems // *Gels*. 2020. V. 6. № 3. P. 29.
<https://doi.org/10.3390/gels6030029>
44. *Suzuki M., Hirasa O.* An approach to artificial muscle using polymer gels formed by micro-phase separation // *Advances in Polymer Science*. 1993. V. 110. P. 241–261.
<https://doi.org/10.1007/BFb0021135>
45. *Baker M.I., Walsh S.P., Schwatz Z., Boyan B.D.* A review of polyvinyl alcohol and its uses in cartilage and orthopedic applications // *Journal of Biomedical Material Research, Part B*. 2012. V. 100B. № 5. P. 1451–1457.
<https://doi.org/10.1002/jbm.b.32694>
46. *Wan W., Bannerman A.D., Yang L., Mak H.* Poly(vinyl alcohol) cryogels for biomedical applications // *Advances in Polymer Science*. 2014. V. 263. P. 283–321.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-05846-7_8
47. *Rivera-Hernandez G., Antunes-Ricardo M., Martínez-Morales P., Sanchez L.* Polyvinyl alcohol based-drug delivery systems for cancer treatment // *International Journal of Pharmaceutics*. 2021. V. 600. P. 120478.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120478>
48. *Bercea M.* Recent advances in poly(vinyl alcohol)-based hydrogels // *Polymers*. 2024. V. 16. № 14. P. 2021.
<https://doi.org/10.3390/polym16142021>
49. *Li M., Wei X., You J., Feng J., Liu X., Zhou J., Wu Q., Zhang Y., Zhou Y.* Cryogels with controllable physico-chemical properties as advanced delivery systems for biomedical applications // *Materials Today Bio*. 2025. V. 32. P. 101815.
<https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2025.101815>
50. *Calo E., Barros J., Ballamyb L., Khutoryanskiy V.V.* Poly(vinyl alcohol)–Gantrez® AN cryogels for wound care applications // *RSC Advances*. 2016. V. 6. № 107. P. 105487–105494.
<https://doi.org/10.1039/C6RA24573K>
51. *Xiang J., Shen L., Hong Y.* Status and future of hydrogels in wound healing: Synthesis, materials and evaluation // *European Polymer Journal*. 2020. V. 130. P. 109609.
<https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.109609>
52. *Tamer T.M., Sabet M.M., Omer A.M., Abbas E., Eid A.I., Mohy-Eldin M.S., Hassan M.A.* Hemostatic and antibacterial PVA/kaolin composite sponges loaded with penicillin-streptomycin for wound dressing applications // *Scientific Reports*. 2021. V. 11. P. 3428.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-82963-1>
53. *Górska A., Baran E., Knapik-Kowalczyk J., Szafraniec-Szczesny J., Paluch M., Kulinowski P., Mendyk A.* Physically cross-linked PVA hydrogels as potential wound dressings: How freez-

- ing conditions and formulation composition define cryogel structure and performance // *Pharmaceutics*. 2024. V. 16. № 11. P. 1388.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16111388>
54. *Lee M., Bae H., Chung N., Lee H., Choi S., Hwang S., Lee J.* Freezing/thawing processing of PVA in the preparation of structured microspheres for protein drug delivery // *Macromolecular Research*. 2011. V. 19. P. 130–136.
<https://doi.org/10.1007/s13233-011-0203-7>
55. *Branco A.C., Oliveira A.S., Monteiro I., Nolasco P., Silva D.C., Figueiredo-Pina C.G., Colaço R., Serro A.P.* PVA-based hydrogels loaded with diclofenac for cartilage replacement // *Gels*. 2022. V. 8. № 3. P. 143.
<https://doi.org/10.3390/gels8030143>
56. *Oustadi F., Nazarpak M.H., Mansouri M., Ketabat F.* Preparation, characterization, and drug release study of ibuprofen-loaded poly(vinyl alcohol)/poly(vinyl pyrrolidone) bilayer antibacterial membrane // *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. 2022. V. 71. № 1. P. 14–23.
<https://doi.org/10.1080/00914037.2020.1798437>
57. *Kolosova O.Yu., Shaikhaliev A.I., Krasnov M.S., Bondar I.M., Sidorskii E.V., Sorokina E.V., Lozinsky V.I.* Cryostructuring of polymeric systems. 64. Preparation and properties of poly(vinyl alcohol)-based cryogels loaded with antimicrobial drugs and assessment of the potential of such gel materials to perform as the gel implants for treatment of infected wounds // *Gels*. 2023. V. 9. № 2. P. 113.
<https://doi.org/10.3390/gels9020113>
58. *Maiolo A.S., Amado M.N., Gonzalez J.S., Alvarez V.A.* Development and characterization of poly(vinyl alcohol) hydrogels for potential use as an articular cartilage replacement // *Material Science and Engineering, Part C*. 2012. V. 32. № 6. P. 1490–1495.
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.04.030>
59. *Beddoes C.M., Whitehouse M.R., Briscoe W.H., Su B.* Hydrogels as replacement materials for damaged articular hyaline cartilage // *Materials*. 2016. V. 9. № 6. P. 443.
<https://doi.org/10.3390/ma9060443>
60. *Jalageri M.B., Kumar G.C.* Hydroxyapatite reinforced polyvinyl alcohol/polyvinyl pyrrolidone based hydrogel for cartilage replacement // *Gels*. 2022. V. 8. № 9. P. 555.
<https://doi.org/10.3390/gels8090555>
61. *Ghanbari H., Viatage H., Kidane A.G., Burriesci G., Tavakoli M., Seifalian A.M.* Polymeric heart valves: New materials, emerging hopes // *Trends in Biotechnology*. 2009. V. 27. № 6. P. 359–367.
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.03.002>
62. *Mano J., Goshima H., Nambu M., Iio M.* New polyvinyl alcohol gel material for MRI phantoms // *Magnetic Resonance in Medicine*. 1986. V. 3. № 6. P. 921–926.
<https://doi.org/10.1002/mrm.1910030612>
63. *Chu K.C., Rutt B.K.* Poly(vinyl alcohol) cryogel: an ideal phantom material for MR studies of arterial flow and elasticity // *Magnetic Resonance in Medicine*. 1997. V. 37. № 2. P. 314–319.
<https://doi.org/10.1002/mrm.1910370230>
64. *Antonίου A., Damianou C.* MR relaxation properties of tissue-mimicking phantoms // *Ultrasonics*. 2022. V. 119. P. 106600.
<https://doi.org/10.1016/j.ultras.2021.106600>
65. *Hoskins P.R.* Simulation and validation of arterial ultrasound imaging and blood flow // *Ultrasound in Medicine and Biology*. 2008. V. 34. № 5. P. 693–517.
<https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2007.10.017>
66. *Al-Mutairi F.F., Chung E.M.L., Moran C.M., Ramna-rine K.V.* A novel elastography phantom prototype for assessment of ultrasound elastography performance // *Ultrasound in Medicine and Biology*. 2021. V. 47. № 9. P. 2749–2758.
<https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2021.05.015>
67. *Jawli A., Nabi G., Huang Z.* A polyvinyl alcohol (PVA)-based phantom for prostate cancer detection using multiparametric ultrasound: A validation study // *Bioengineering*. 2024. V. 11. № 11. P. 1052.
<https://doi.org/10.3390/bioengineering11111052>

68. Sterilization of biomaterials and medical devices. Eds. Lerouge S.; Simmon A // Woodhead Publishing Ltd. 2012. 352 p.
69. *Galante R.S.C., Pinto T., Colaço R., Serro A.P.* Sterilization of hydrogels for biomedical applications: A review // *Journal of Biomedical Materials Research, Part B*. 2017. V. 106. № 6. P. 2472–2492.
<https://doi.org/10.1002/jbm.b.34048>
70. *Beh C.C.* Sterilization techniques of biomaterials (implants and medical devices) // In: *Biomaterials and Biopolymers. AAPS Introductions in the Pharmaceutical Sciences*. Springer, Cham. 2023. V. 7. P. 255–269.
https://doi.org/10.1007/978-3-031-36135-7_12
71. *Watase M., Nishinari K.* Rheological and DSC changes in poly(vinyl alcohol) gels induced by immersion in water // *Journal of Polymer Science, Polymer Physics*. 1985. V. 23. № 9. P. 1803–1811.
<https://doi.org/10.1002/pol.1985.180230906>
72. *Moretto A., Tesolin L., Marsilio F., Schiavon M., Berna M., Veronese F.M.* Slow release of two antibiotics of veterinary interest from PVA hydrogels // *Il Farmaco*. 2004. V. 59. № 1. P. 1–5.
<https://doi.org/10.1016/j.farmac.2003.11.003>
73. *Lotfipour F., Alami-Milani M., Salatin M., Hadavi A., Jelvehgari M.* Freeze-thaw-induced cross-linked PVA/chitosan for oxytetracycline-loaded wound dressing: the experimental design and optimization // *Research in Pharmaceutical Sciences*. 2019. V. 14. № 2. P. 175–189.
<https://doi.org/10.4103/1735-5362.253365>
74. *Kolosova O.Yu., Vasil'ev V.G., Novikov I.A., Sorokina E.V., Lozinsky V.I.* Cryostructuring of polymeric systems: 67. Properties and microstructure of poly(vinyl alcohol) cryogels formed in the presence of phenol or bis-phenols introduced in the aqueous polymeric solutions prior to their freeze-thaw processing // *Polymers*. 2024. V. 16. № 5. P. 675.
<https://doi.org/10.3390/polym16050675>
75. *Колосова О.Ю., Рыжова А.С., Чернышев В.П., Лозинский В.И.* Изучение криоструктурирования полимерных систем. 65. Характер изменений физико-химических свойств криогелей поливинилового спирта, вызываемых действием водных растворов аминокислот общей формулы $H_2N-(CH_2)_n-COOH$ // *Коллоидный журнал*. 2023. Т. 85. № 6. С. 748–761.
<https://doi.org/10.31857/S0023291223600578>
76. *Lozinsky V.I., Zubov A.L., Titova E.F.* Swelling behavior of poly(vinyl alcohol) cryogels employed as matrices for cell immobilization // *Enzyme and Microbial Technology*. 1996. V. 18. № 8. P. 561–569.
[https://doi.org/10.1016/0141-0229\(95\)00148-4](https://doi.org/10.1016/0141-0229(95)00148-4)
77. *Lund P.A., De Biase D., Liran O., Scheler O., Mira N.P., Cetecioglu Z., Fernández E.M., Bover-Cid S., Hall R., Sauer M., O'Byrne C.* Understanding how microorganisms respond to acid pH is central to their control and successful exploitation // *Frontiers in Microbiology*. 2020. V. 11. P. 556140.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.556140>
78. *Lozinsky V.I., Domotenko L.V., Zubov A.L., Simenel I.A.* Study of cryostructuring of polymer systems. XII. Poly(vinyl alcohol) cryogels: influence of low-molecular electrolytes // *Journal of Applied Polymer Science*. 1996. V. 61. № 11. P. 1991–1998.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4628\(19960912\)61:11<1991::AID-APP13>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4628(19960912)61:11<1991::AID-APP13>3.0.CO;2-2)
79. *Лозинский В.И., Сахно Н.Г., Дамшкани Л.Г., Бакеева И.В., Зубов В.П., Курочкин И.Н., Курочкин И.И.* Изучение криоструктурирования полимерных систем. 31. Влияние добавок хлоридов щелочных металлов на физико-химические свойства и морфологию криогелей поливинилового спирта // *Коллоидный журнал*. 2011. Т. 73. № 2. С. 225–234.
80. *Von Hippel P.H., Schleich T.* Ion effects on the solution structure of biological macromolecules // *Accounts of Chemical Research*. 1969. V. 2. № 9. P. 257–265.
<https://doi.org/10.1021/ar50021a001>
81. *Voelkel J.* Salt effect during the swelling and dissolution of poly(vinyl alcohol). Influence of the nature of ions // *Polish Journal of Chemistry*. 1981. V. 55. P. 445–455.
82. *Kuznetsova S.A., Gak A.S., Nelyubina Yu.V., Larionov V.A., Li H., North M., Zhreb V.O., Smol'yakov V.F., Dmitrienko A.O., Medvedev M.G., Gerasimov I.S., Saghyan A.S., Belokon Yu.N.* The charge-assisted hydrogen-bonded organic framework (CAHOF) self-assembled from the conjugated acid of tetrakis(4-aminophenyl) methane and 2,6-naphthalenedisulfonate as a new class of recyclable Brønsted acid catalysts // *Beilstein Journal of Organic Chemistry*. 2020. V. 16. P. 1124–1134.
<https://doi.org/10.3762/bjoc.16.99>

83. *Eldridge J.E., Ferry J.D.* Studies of the cross-linking process in gelatin gels. III. Dependence of melting point on concentration and molecular weight // *Journal of Physical Chemistry*. 1954. V. 58. № 11. P. 992–995.
<https://doi.org/10.1021/j150521a013>
84. *Hatakeyama T., Uno J., Yamada C., Kishi A., Hatakeyama H.* Gel-sol transition of poly(vinyl alcohol) hydrogels formed by freezing and thawing // *Thermochimica Acta*. 2005. V. 431. № 1–2. P. 144–148.
<https://doi.org/10.1016/j.tea.2005.01.062>
85. *Lozinsky V.I., Zubov A.L., Savina I.N., Plieva F.M.* Study of cryostructuring of polymer systems. XIV. Poly(vinyl alcohol) cryogels: Apparent yield of the freeze-thaw-induced gelation of concentrated aqueous solutions of the polymer // *Journal of Applied Polymer Science*. 2000. V. 77. № 8. P. 1822–1831.
[https://doi.org/10.1002/1097-4628\(20000822\)77:8<1822::AID-APP20>3.0.CO;2-%23](https://doi.org/10.1002/1097-4628(20000822)77:8<1822::AID-APP20>3.0.CO;2-%23)
86. *Kokabi M., Sirousazar M., Hassan Z.M.* PVA–clay nanocomposite hydrogels for wound dressing // *European Polymer Journal*. 2007. V. 43. № 3. P. 773–781.
<https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2006.11.030>
87. *Trieu H.H., Qutubuddin S.* Poly(vinyl alcohol) hydrogels: 2. Effects of processing parameters on structure and properties // *Polymer*. 1995. V. 36. № 13. P. 2531–2539.
[https://doi.org/10.1016/0032-3861\(95\)91198-G](https://doi.org/10.1016/0032-3861(95)91198-G)
88. *Kurochkin I.I., Kurochkin I.N., Kolosova O.Yu., Lozinsky V.I.* Cryostructuring of polymeric systems. 56. Application of deep neural networks for the classification of structural features peculiar to macroporous poly(vinyl alcohol) cryogels prepared without and with the additives of chaotropes or kosmotropes // *Molecules*. 2020. V. 25. № 19. P. 4480.
<https://doi.org/10.3390/molecules25194480>
89. *Fergg F., Keil F., Quader H.* Investigations of the microscopic structure of poly(vinyl alcohol) hydrogels by confocal laser scanning microscopy // *Colloid & Polymer Science*. 2001. V. 279. P. 61–67.
<https://doi.org/10.1007/s003960000398>
90. *Szczęsna-Antczak M., Antczak T., Bielecki S.* Stability of extracellular proteinase productivity by *Bacillus subtilis* cells immobilized in PVA–cryogel // *Enzyme and Microbial Technology*. 2004. V. 34. № 2. P. 168–176.
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2003.10.001>
91. *Berillo D., Al-Jwaid A., Caplin J.* Polymeric materials used for immobilisation of bacteria for the bioremediation of contaminants in water // *Polymers*. 2021. V. 13. № 7. P. 1073.
<https://doi.org/10.3390/polym13071073>
92. *Maltseva P.Y., Plotnitskaya N.A., Chudinova A.A., Ilyina I.V., Volcho K.P., Salakhutdinov N.F., Ivshina I.B.* *Rhodococcus rhodochrous* IEGM 1362 immobilized in macroporous PVA cryogel as an effective biocatalyst for the production of bioactive (–)-isopulegol compounds // *Pharmaceuticals*. 2025. V. 18. № 6. P. 839.
<https://doi.org/10.3390/ph18060839>