

ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертационную работу Цибульской Елены Олеговны

«Численное и экспериментальное исследование процессов, протекающих в ротационном биореакторе при выращивании костной ткани»

на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.1.9 – «Механика жидкости газа и плазмы»

Диссертация Цибульской Е.О. посвящена разработке экспериментальных и численных методов исследования и оптимизации рабочих характеристик биореактора ротационного типа с подвижной жидкой средой, разработанного для выращивания тонкого слоя костной ткани на полимерной биоразлагаемой пленке с целью создания биосовместимых имплантатов. Разработанными методами, в частности, решались задачи оптимизации технологии посредством управления течением жидкой среды в объеме реактора. Эффективное выращивание биоматериала требует определения и контроля оптимального набора физических параметров методами механики жидкостей. Оптические методы, применяемые при исследовании потоков, также использовались как в процессе биологического синтеза, так и в отношении диагностики выращиваемого биоматериала. Такой подход позволил значительно ускорить оптимизацию разрабатываемой технологии.

В процессе выращивания биологических тканей в биореакторе клетки подвергаются непрерывному действию потоков жидкого питательного раствора, в частности, находятся под нагрузкой касательных динамических напряжений. Правильность выбора контролируемых параметров физических условий в биореакторе важна для эффективности биологического синтеза.

Для изучения структуры течения жидкости в биореакторе, картин распределений статического давления и касательных напряжений на поверхности образца, определяемых структурой вихревых зон, а также для оценки механической нагрузки, создаваемой потоком жидкости, применялись экспериментальные и расчетные методы гидродинамики. Совместное применение методов численного моделирования течений в биореакторах и экспериментальных методов определения локальных параметров течений расширяет возможности исследования и повышает достоверность полученных данных.

Совокупность применяемых методов и достигнутых результатов позволяет квалифицировать работу как **соответствующую специальности 1.1.9 – Механика жидкости, газа и плазмы.**

В ходе выполнения диссертации Цибульская Е.О. решила **следующие задачи.**

С помощью численного моделирования были определены рабочие параметры ротационного биореактора, структура течений и пространственные и временные распределения величин механической нагрузки со стороны потока жидкости на культивируемый биоматериал. Автором был предложен и исследован ряд принципиальных модификаций конструкции ротационного биореактора, позволяющих оптимизировать технологию. Для контроля роста костной ткани из стволовых клеток автором был разработан метод лазерно-индуцированного флуоресцентного (ЛИФ) анализа компонент выращиваемого биоматериала.

При выполнении работ по диссертации Цибульская Е.О. успешно применила комплекс дополняющих друг друга экспериментальных и численных методов для исследования и оптимизации конструкций биологических реакторов, применяемых для стимулирования дифференцировки биологических тканей при выращивании из стволовых клеток в жидкой питательной среде, позволяющих получить картину течения питательной среды в рабочей зоне реактора. В частности, установлена важная зависимость величин касательных напряжений, действующих со стороны потока жидкости на рабочую поверхность с клеточным материалом, от частоты вращения элементов биореактора. Проведен анализ картин течения в различных модификациях ротационного биореактора и их влияния на равномерность распределения параметров механического воздействия со стороны жидкости на рабочую поверхность.

Разработан и экспериментально проверен новый алгоритм статистического анализа матриц возбуждения-эмиссии спектров флуоресценции оптически тонких образцов при ЛИФ-диагностике. Алгоритм позволяет с высокой точностью восстанавливать спектры возбуждения и флуоресценции отдельных компонент, что дает возможность проводить неразрушающий анализ биологических тканей в процессе выращивания в биореакторе.

Результаты, полученные Цибульской Е.О. при исследовании рабочих характеристик предложенных схем ротационных биореакторов, могут использоваться при реализации технологии выращивания биосовместимых материалов, содержащих живые клетки организма, так называемых тканеинженерных материалов. Разработанный ею алгоритм обработки спектральных данных перспективен для исследования флуоресценции многокомпонентных оптически тонких образцов и позволяет не только провести качественное сравнение спектров, но и количественно описать содержание отдельных компонент в исследуемых образцах. Метод дает возможность проводить ЛИФ-диагностику выращиваемого костного материала, оценивать динамику роста костной ткани и равномерность ее распределения по рабочей поверхности биореактора. Полученные автором результаты были использованы при разработке технологии тканевой инженерии костных имплантатов в медицинских исследовательских организациях.

Диссертация состоит из введения, четырех глав и заключения.

Во введении описано текущее состояние проблемы и перспективы исследований в данной области, сформулированы цели и задачи исследования, а также положения, выносимые на защиту.

В первой главе дан обзор литературы по конструкциям и применению биореакторов, в которых для эффективного нарастания костной ткани создавались условия для дифференцировки стволовых клеток. Обоснованы перспективы схемы ротационного биореактора профессора П.М. Ларионова для создания тканеинженерных имплантатов. При работе такого реактора течение жидкости возникает вследствие вращения каркаса с рабочей поверхностью в виде пленки, вследствие чего становится возможным равномерно и контролируемо воздействовать потоком жидкости на стволовые клетки, расположенные на рабочей поверхности.

Показано, что стандартные методы численного моделирования в принципе позволяют определить уровень механической нагрузки потока жидкости в условиях сложной геометрии реактора и малых характерных величин касательных напряжений.

Оптическая диагностика методом ЛИФ представлена как альтернатива существующим стандартным методам гистологического исследования и может применяться без повреждения исследуемых образцов. При этом актуален поиск новых алгоритмов, позволяющих рассчитывать спектры отдельных компонент и определять их вклады в регистрируемый сигнал без использования априорной информации о спектрах компонент.

Вторая глава посвящена численному моделированию течения жидкости в биореакторах различной конструкции. В качестве исходной схемы для численного моделирования взята конструкция ротационного биореактора П.М. Ларионова. Цибульской О.Е. была разработана численная модель течений жидкой среды в биореакторе.

Верификация разработанной модели проводилась с помощью расчета поля течения Куэтта в зазоре между вращающимися коаксиальными цилиндрами численным и аналитическим методами. Для валидации расчетных структур поля течения использовались данные проведенных автором экспериментов по оптической визуализации течения жидкости в осевом сечении объема реактора методом «лазерного листа». Эксперименты подтвердили наличие расчетных вихревых течений в объеме реактора. Была определена скорость течения жидкости, оказавшаяся близкой к расчетному значению. Было также показано, что присутствие зон взаимодействия вихрей вблизи рабочей поверхности приводит к неравномерному распределению касательных напряжений и других параметров воздействия. Показано, что при частоте вращения от 0,083 до 0,233 Гц

на рабочую поверхность действует среднее касательное напряжение от 4 до 17 мПа, оптимальное для процессов в биореакторе.

Полученные результаты были использованы для определения оптимального режима работы реактора в последующих медицинских экспериментах по выращиванию костной ткани. В ходе реальных экспериментов по выращиванию костной ткани было подтверждено, что ротационный реактор можно применять для выращивания костного материала для тканеинженерных имплантатов при оптимальном значении касательных напряжений в указанном диапазоне.

В третьей главе описываются методы улучшения условий культивирования биологического материала на тонкой полимерной пленке и перспективные изменения конструкции ротационного биореактора для создания более однородной нагрузки на клеточный слой. Проведено сравнение и анализ результатов численного моделирования течения для трех перспективных моделей на основе ротационного биореактора.

Представлены результаты тестового расчета течения, проведенного для исходной модели с увеличенным диаметром каркаса пленки. Расчет показал, что в этих условиях в зазоре между цилиндрическими поверхностями проявилась неустойчивость Тейлора, ухудшившая равномерность распределения касательных напряжений на рабочей поверхности.

В первой из исследованных перспективных моделей рабочая поверхность в виде пленки с биоматериалом была перенесена на внутреннюю поверхность вращающегося внутреннего цилиндрического каркаса биореактора.

Во второй перспективной модели цилиндрический каркас с рабочей поверхностью на его наружной стороне оставался неподвижным элементом, а вращался цилиндрический корпус биореактора. Данный способ позволил более равномерно распределить механические напряжения, создаваемые потоком на рабочей поверхности, за счет перенесения области взаимодействия (сопряжения) образующихся вихревых течений на внутреннюю сторону каркаса.

Третья перспективная модель отличалась смещением оси вращения каркаса с внешней рабочей поверхностью относительно оси корпуса ротационного реактора. В такой конструкции за счет пространственного разделения осей вращения реализуется циклический тип механического действия жидкой среды на рабочую поверхность. Для асимметричной модели вычислен относительный размах колебаний параметров воздействия на рабочую поверхность.

Четвертая глава посвящена разработке метода оптической диагностики и контроля роста костной ткани в ротационном биореакторе на тонкой полимерной основе методом ЛИФ-спектроскопии. Был предложен новый алгоритм последовательных приближений на основе метода главных компонент (МГК). В новом алгоритме число главных компонент фиксировалось и задавалось изначально, исходя из предположения о составе образца. Затем спектры главных

компонент уточнялись методом последовательных приближений. Показано, что метод ЛИФ можно применять для диагностики роста костной ткани в процессе культивирования в ротационном биореакторе.

В заключении сформулированы основные выводы диссертации.

Следует особо отметить **новые результаты**, полученные автором в диссертации.

Разработанная Цибульской Е.О. численная модель течения жидкости в полости ротационного биореактора позволила определить диапазон частоты вращения, при котором достигаются касательные напряжения, оптимальные для стимуляции преобразования стволовых клеток в клетки кости. Проведенные затем медицинские эксперименты позволили подтвердить и уточнить оптимальную частоту вращения каркаса пленки 0,133 Гц при среднем касательном напряжении 8 мПа. При данных условиях в ротационном биореакторе были успешно выращены образцы костной ткани.

Кроме того, было установлено, что наличие вихревого течения приводит к неравномерному распределению механической нагрузки на рабочую поверхность, если она находится в области взаимодействия (сопряжения) тороидальных вихрей.

На основании полученных данных были определены перспективные изменения, которые можно внести в исходную конструкцию ротационного биореактора с целью оптимизации технологии.

Была предложена и исследована перспективная модель с вращающимся корпусом, позволяющая сделать распределение параметров, воздействующих на рабочую поверхность, значительно более равномерным. Средние касательные напряжения на рабочей поверхности при этом составили от 5 до 20 мПа при частотах вращения от 0,083 до 0,233 Гц.

Также была предложена и исследована конструкция ротационного биореактора, реализующая циклическую нагрузку на биоматериал за счет пространственного разделения осей вращения внутреннего каркаса и корпуса. Показано, что разведение осей каркаса и корпуса на 5 мм при неподвижном внутреннем каркасе и вращающемся корпусе в диапазоне частот вращения 0,05–0,233 Гц приводит к относительному размаху колебаний касательного напряжения на рабочей поверхности от 127 до 147 %.

Автором показано, что метод ЛИФ-спектроскопии можно применять для диагностики нарастания костной ткани на тонкой пленке в ротационном биореакторе. Для анализа спектральных данных был разработан новый алгоритм на основе метода главных компонент. Алгоритм позволял оценить число флуоресцирующих компонент, а также с высокой точностью рассчитать спектры возбуждения компонент флуоресценции и их весовые коэффициенты. Алгоритм

не использовал априорную информацию о спектрах компонент и мог быть применен при исследовании образцов с неизвестным составом.

Достоверность полученных в диссертации результатов основана на квалифицированном применении апробированных экспериментальных и численных методов гидродинамики. Достоверность результатов численного моделирования подтверждается сравнением с известными аналитическими решениями и экспериментальными данными. Достоверность результатов спектроскопической ЛИФ-диагностики образцов подтверждается контролем стандартными гистологическими и биохимическими методами.

Принципиальных замечаний по диссертации нет. В качестве частного замечания можно отметить следующее.

Вихревые потоки, наблюдаемые в объеме исследованных биореакторов, автор называет вихрями Тейлора. Тем не менее, в классической работе Тейлора «Устойчивость вязкой жидкости, находящейся между двумя вращающимися цилиндрами» [1], как и в большинстве последующих работ по таким течениям, рассматривались узкие зазоры между длинными цилиндрами, с соотношением длины цилиндра к ширине зазора порядка 100 и более. В системах с малым удлинением, к которым относятся рассматриваемые автором биореакторы, становится существенным влияние течений на торцевых поверхностях, и главную роль в образовании вихрей начинает играть не неустойчивость Тейлора, а течение во вращающихся пограничных слоях, так называемых слоях Экмана [2, 3], особенно при небольших скоростях вращения, когда число Тейлора мало. Таким образом, многие из наблюдаемых в диссертации вихревых течений, строго говоря, вихрями Тейлора называть нельзя.

К сожалению, в диссертации мало внимания уделено обсуждению связи наблюдаемых течений с классическими случаями гидродинамики.

1. Taylor G.I. Stability of a viscous liquid contained between two rotating cylinders // Phil. Trans. R. Soc. Lond. 223:289-343 (1923)

2. Burin M.J., Ji H., Schartman E. et al. Reduction of Ekman circulation within Taylor-Couette flow // Exp. Fluids 40, 962–966 (2006) <https://doi.org/10.1007/s00348-006-0132-y>

3. Sobolík V. , Izrar B., Lusseyran F., Skali S. Interaction between the Ekman layer and the Couette-Taylor instability // International Journal of Heat and Mass Transfer 43(24), 4381-4393 (2000) [https://doi.org/10.1016/S0017-9310\(00\)00067-3](https://doi.org/10.1016/S0017-9310(00)00067-3)

Тем не менее, высказанное замечание не влияет на общие выводы диссертационной работы и справедливость сформулированных в ней научных положений.

Диссертация представляет собой законченную научно-квалификационную исследовательскую работу на актуальную тему, в которой Цибульская Е.О. продемонстрировала владение численными и экспериментальными методами

гидродинамики и успешно решила важную задачу оптимизации сложных биохимических процессов, управляемых потоками жидкости, в ротационном биореакторе. Полученные Цибульской Е.О. результаты демонстрируют эффективность механической стимуляции стволовых клеток потоком жидкости для образования костной ткани, перспективность применения биологических реакторов ротационного типа для тканевой инженерии и лазерной флуоресцентной спектроскопии для диагностики растущей ткани.

Научные положения, сформулированные в диссертации, достаточно обоснованы и не вызывают сомнений. Результаты диссертации опубликованы в ведущих рецензируемых научных изданиях, известны широкому кругу специалистов и получили достаточную апробацию на Всероссийских и международных научных конференциях.

Автореферат правильно и полно отражает содержание диссертации.

Считаю, что диссертация отвечает критериям Положения о порядке присуждения ученых степеней, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Цибульская Елена Олеговна заслуживает присуждения ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.1.9 – «Механика жидкости, газа и плазмы».

Официальный оппонент Якимов Михаил Юрьевич, доктор физико-математических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории лазерных разрядов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института проблем механики им. А.Ю. Ишлинского Российской академии наук (ИПМех РАН).

Адрес: 119526, г. Москва, пр-кт Вернадского, 101, корп. 1, тел.: +7-495-433-8218,
E-mail: yakimov@lantanlaser.ru

— М.Ю. Якимов

Подпись в.н.с., д.ф.-м.н. Якимова Михаила Юрьевича заверяю.

Ученый секретарь ИПМех Р. ...

к. ф.-м.н



М.А. Котов

10 ноября 2021 г.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки институт проблем механики им. А.Ю. Ишлинского Российской академии наук,
Адрес: 119526, Москва, пр-т Вернадского, д. 101, корп. 1,
Тел.: +7-495-434-00-17, E-mail: ipm@ipmnet.ru <http://www.ipmnet.ru>

Председателю
диссертационного совета
24.1.125.01 (Д 003.035.02)
академику В.М. Фомину

ЛИЧНОЕ СОГЛАСИЕ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

Я, Якимов Михаил Юрьевич, даю свое согласие выступить в качестве официального оппонента по диссертации Цибульской Елены Олеговны на тему: «Численное и экспериментальное исследование процессов, протекающих в ротационном биореакторе при выращивании костной ткани» на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.1.9 – механика жидкости, газа и плазмы.

О себе сообщаю:

Ученая степень, отрасли науки	Д.ф.-м.н.
Научные специальности, по которым защищена диссертация	01.02.05- механика жидкости, газа и плазмы
Ученое звание	нет
Академическое звание	нет
Тел:	8-495-433-82-18
E-mail:	yakimov@lantanlaser.ru
Должность	Ведущий научный сотрудник
Подразделение организации	Лаборатория лазерных разрядов
Полное наименование организации, являющейся основным местом работы	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем механики им. А.Ю. Ишлинского Российской академии наук
Ведомственная принадлежность орг.	Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Адрес служебный: Почтовый индекс, город, улица, дом	119526, Российская Федерация, Москва, пр-т Вернадского, д. 101, корп. 1
Web-сайт организации.	http://www.ipmnet.ru
Телефон организации.	+7-495-434-00-17
E-mail организации.	ipm@ipmnet.ru

По теме рассматриваемой диссертации имею более 20 научных работ, в том числе в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет (не более 15 работ):

№	Авторы	Название	Издательство, журнал, год, №, страницы	Вид, год
1	Kotov M. A., Shemyakin A. N., Solovyov N. G., Yakimov M. Y., Glebov V. N., Dubrova G. A., Malyutin A. M., Popov P. A., Poniaev S. A., Lapushkina T. A., Monakhov N. A., Sakharov V. A.	Performance assessment of thermoelectric detector for heat flux measurement behind a reflected shock of low intensity	Applied Thermal Engineering. – 2021. – Т. 195. – С. 117143.	Статья, 2021
2	Шемякин А. Н., Рачков М. Ю., Соловьев Н. Г., Якимов М. Ю.	Управление мощностью излучения технологического CO ₂ -лазера с несамостоятельным тлеющим разрядом путем изменения частоты импульсов ионизации	Мехатроника, автоматизация, управление. – 2020. – Т. 21. – №. 4. – С. 224-231.	Статья, 2020
3	Lavrentyev S. Y., Solovyov N. G., Shemyakin A. N., Yakimov M. Y.	Hydrodynamic phenomena in optical discharges in liquids under self-focusing of periodic-pulse laser radiation	Journal of Physics: Conference Series. – 2020. – Т. 1698. – №. 1. – С. 012017.	Статья в сборнике конференции, 2020
4	Лаврентьев С. Ю., Соловьев Н. Г., Шемякин А. Н., Якимов М. Ю.	Лазерно-индуцированные потоки в жидкостях в зависимости от условий фокусировки излучения фемтосекундного лазера	Физико-химическая кинетика в газовой динамике. – 2019. – Т. 20. – №. 3. – С. 1-9.	Статья, 2019
5	Shemyakin A. N., Rachkov M. Yu., Solovyov N. G., Yakimov M. Yu.	Radiation power control of the industrial CO ₂ lasers excited by a nonself-sustained glow discharge with regard to dissociation in a working gas mixture	Optics and Laser Technology – 2018. – Т. 98. – №. 1. – С. 198-204.	Статья, 2018

Не являюсь членом экспертного совета ВАК

Согласен на включение моих персональных данных в аттестационное дело соискателя и их дальнейшую обработку.

ведущий научный сотру
д.ф.-м.н.

11.10.2021

Подпись в.н.с., д.ф.-м.н
Ученый секретарь ИПН

(Якимов М.Ю.)

(Котов М.А.)