

Цибульская Елена Олеговна

**ЧИСЛЕННОЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ  
ПРОЦЕССОВ, ПРОТЕКАЮЩИХ В РОТАЦИОННОМ БИОРЕАКТОРЕ  
ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ КОСТНОЙ ТКАНИ**

1.1.9 – механика жидкости, газа и плазмы

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата физико-математических наук

Новосибирск – 2021 год

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте теоретической и прикладной механики им. С. А. Христиановича Сибирского отделения РАН (Новосибирск).

Научный руководитель:

доктор физико-математических наук **Маслов Николай Анатольевич**.

Официальные оппоненты:

**Якимов Михаил Юрьевич**, доктор физико-математических наук, ведущий научный сотрудник, ФГБУН Институт проблем механики им. А.Ю. Ишлинского Российской академии наук, г. Москва.

**Захаров Юрий Николаевич**, доктор физико-математических наук, профессор, заведующий кафедрой ЮНЕСКО по информационным вычислительным технологиям, ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет», г. Кемерово.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теплофизики им. С. С. Кутателадзе Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск.

Защита состоится 24 декабря 2021 г. в «\_\_\_\_\_» часов на заседании диссертационного совета Д 003.035.02 в Институте теоретической и прикладной механики им. С. А. Христиановича СО РАН по адресу: 630090, г. Новосибирск, ул. Институтская, 4/1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Института теоретической и прикладной механики им. С. А. Христиановича СО РАН по адресу: ул. Институтская, 4/1, г. Новосибирск, 630090, [http://itam.nsc.ru/education/dissertation\\_board.html](http://itam.nsc.ru/education/dissertation_board.html)

Отзыв на автореферат в двух экземплярах, заверенный печатью учреждения, просьба направлять на имя ученого секретаря диссертационного совета.

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета  
доктор физико-математических наук



С. А. Гапонов

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### **Актуальность темы исследования**

Биореакторы – это приборы, используемые в медицине для выращивания клеточных культур и микроорганизмов в оптимальных для их жизнедеятельности физических условиях. В биореакторах клеточные культуры выращиваются в жидкой питательной среде. Благодаря перемешиванию жидкости к клеткам подводятся питательные вещества, кислород и отводятся отходы жизнедеятельности. Таким образом, клетки в процессе выращивания постоянно подвергаются воздействию потоков жидкого питательного раствора и находятся под определенной механической нагрузкой. Для разных видов биоматериала применяют биологические реакторы различных конструкций, чтобы перемешивать питательную среду. Корректность выбора и контроля физических условий в процессе биологического синтеза крайне важны для эффективного нарастания биоматериала, поскольку живые клетки чувствительны к изменениям окружающей среды. Данные задачи решаются методами механики. Изучение структуры течения жидкости в биореакторе, определение областей застоя жидкости, вихревых зон и оценка механической нагрузки, создаваемой потоком жидкости на клеточную культуру, позволяет упростить сложные медицинские эксперименты и заранее предсказать поведение клеток в процессе культивирования. Для исследования потоков могут применяться как экспериментальные, так и численные методы. Однако численное моделирование течения питательной среды в биореакторах позволяет изучить течение в тех случаях, когда экспериментально это сделать невозможно из-за особенностей геометрии биореакторов и исследуемых параметров.

Данная работа посвящена исследованию конструкции биореактора ротационного типа, разработанной специально для выращивания тонкого слоя костной ткани на полимерной биоразлагаемой пленке для последующего создания тканеинженерных имплантатов. Для нового биологического реактора необходимо решить множество отдельных задач, связанных с оптимизацией новой технологии. Эффективное выращивание биоматериала требует определения и контроля оптимальных физических условий. Поскольку способ выращивания биоматериала новый, важно определить варианты улучшения технологии и дальнейшие перспективы. При решении данных задач необходимо применять комплексный подход, включающий не только стандартные для медицины инструменты, но и методы механики по исследованию течения жидкости. Оптические методы, применяемые в механике при исследовании потоков, также могут быть использованы в процессе улучшения технологий биологического синтеза при разработке новых методов диагностики качества выращиваемого биоматериала. Такой подход позволяет значительно упростить оптимизацию новой технологии без дорогостоящих медицинских экспериментов и найти новые пути решения поставленных задач.

**Целью исследования** является разработка технологии тканевой инженерии костной ткани, заключающейся в выращивании костного материала на тонкой полимерной пленке в новом ротационном биореакторе.

### **Задачи исследования**

- Определение с помощью численного моделирования параметров работы ротационного биореактора, обеспечивающих оптимальную дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток в клетки кости за счет воздействия касательным напряжением потока жидкости.
- Выработка рекомендаций по выбору режима работы реактора, структуры течения и по величине механической нагрузки на культивируемый материал.
- Проверка возможности технологии тканевой инженерии костной ткани на основе тонких полимерных пленок.
- Определение перспективных изменений конструкции ротационного биореактора для оптимизации технологии выращивания клеток на тонких пленках.
- Разработка метода оптического контроля роста костной ткани из стволовых клеток в процессе культивирования в ротационном биореакторе.

### **Методы исследования**

В качестве инструментов исследования течения жидкости в ротационном биореакторе использовалось численное моделирование и экспериментальные методы исследования потоков. Для анализа выращенных в биореакторе образцов костной ткани применялся подход лазерно-индуцированной флуоресцентной спектроскопии.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. В ротационном биологическом реакторе при вращении каркаса пленки и неподвижном корпусе на рабочей поверхности возможно создание касательного напряжения потока жидкости, которое подходит для стимуляции дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток в клетки кости. Для используемой геометрии реактора при частоте вращения от 0,083 до 0,233 Гц на внешней поверхности каркаса создается среднее касательное напряжение в диапазоне от 4 до 17 мПа.

2. Изменение исходной конструкции ротационного биологического реактора путем вращения корпуса при неподвижном каркасе пленки приводит к равномерному механическому воздействию потока жидкости на выращиваемый клеточный материал за счет отсутствия вихревого течения в рабочей зоне. Для используемой геометрии реактора средние касательные напряжения на внешней поверхности каркаса составляют от 5 до 20 мПа при частотах вращения от 0,083 до 0,233 Гц. Параллельный сдвиг оси вращения каркаса относительно оси поверхности корпуса приводит к циклическому воздействию потока жидкости на культивируемый клеточный материал. При вращении корпуса в диапазоне

частот вращения 0,05–0,233 Гц размах колебаний касательного напряжения составляет от 127 до 147 %.

3. Для матриц возбуждения – эмиссии лазерно-индуцированной флуоресценции (ЛИФ) оптически тонких образцов с неизвестным составом возможно вычислять чистые спектры отдельных флуоресцирующих компонент модифицированным алгоритмом на основе тензорного метода главных компонент, включающего ограничение числа используемых компонент и их уточнение методом последовательных приближений.

4. Спектры ЛИФ костной ткани, выращенной в ротационном биореакторе на тонкой полимерной пленке, содержат четыре компонента с максимумами флуоресценции на длинах волн 305, 325, 350, 435 нм, которые соответствуют флуорофорам тирозину, триптофану, коллагену и поликапролактону. В образцах, культивируемых в ротационном биореакторе, увеличивается интенсивность флуоресценции коллагена относительно интенсивности поликапролактона по сравнению с образцами, выращенными статически, что свидетельствует о нарастании костной ткани.

**Достоверность полученных результатов** основана на использовании в работе общепринятых методов исследования потоков жидкости и подходов оптики, обоснованных физических и математических моделей, корректного математического аппарата. Достоверность результатов численного моделирования подтверждается верификацией результатов сопоставлением с известными аналитическими решениями и валидацией по экспериментальным данным. Для обоснования точности численных результатов моделирование проводилось на различных расчетных сетках с подтверждением сходимости. Точность восстановления чистых спектров и сходимость расчетов подтверждена тестированием алгоритма на численно моделированных спектральных данных и спектрах флуоресценции оптических фантомов биологических тканей. Точность работы нового алгоритма подтверждена его сравнением со стандартными методами восстановления чистых спектров. Достоверность результатов спектроскопических исследований подтверждается контролем биологических образцов стандартными гистологическими и биохимическими методами.

### **Научная новизна**

Впервые методом численного моделирования показано, что новую конструкцию биологического реактора можно применять для стимулирования дифференцировки мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток в клетки кости, описана картина течения питательной среды в рабочей зоне реактора, установлена зависимость величины касательного напряжения потока жидкости, действующего на клеточный материал, от частоты вращения биореактора.

Проведен анализ картин течения в различных модификациях модели ротационного биологического реактора, и предложены пути развития технологии выращивания клеточного материала на тонких пленках.

Разработан и экспериментально проверен новый алгоритм статистического анализа матриц возбуждения–эмиссии спектров флуоресценции оптически тонких образцов на основе известного тензорного варианта метода главных компонент. Благодаря наличию наборов коррелирующих данных, в отличие от стандартных алгоритмов восстановления чистых спектров, новый алгоритм с высокой точностью восстанавливает спектры флуоресценции и возбуждения чистых компонент в случаях, не удовлетворяющих условиям теорем о разрешимости спектров.

### **Научная и практическая значимость работы**

Результаты численного моделирования течения жидкости в ротационном биореакторе были успешно использованы на практике в медицинских экспериментах по выращиванию костного материала.

Результаты моделирования перспективных моделей на основе ротационного биореактора позволяют развить практическую реализацию технологии создания тканеинженерных конструкций для имплантации костной ткани.

Предложенный алгоритм обработки спектральных данных обладает перспективами при исследовании флуоресценции многокомпонентных оптически тонких образцов любого происхождения. Применение данного метода при исследовании образцов с неизвестным составом позволяет не только провести качественное сравнение спектров, но и количественно описать содержание чистых флуорофоров в образцах.

Результаты, относящиеся к четвертому защищаемому положению, позволяют проводить ЛИФ-диагностику выращиваемого костного материала, оценивать динамику роста костной ткани и равномерность ее распределения по поверхности. В отличие от стандартных гистофлуоресцентных методов, применяемых для оценки качества культивируемого материала, ЛИФ не требует специального окрашивания и сложной подготовки образцов, поэтому данный метод может быть встроен в систему ротационного биореактора для контроля состояния биоматериала в процессе культивирования.

### **Финансовая поддержка работы**

Работа выполнена при следующей финансовой поддержке: базового государственного задания № 0323-2014-0002 «Разработка физических основ теории взаимодействия лазерного излучения с веществом для создания новых высокоэффективных технологий»; базового государственного задания № АААА-А17-117030610122-6 «Разработка научных основ создания принципиально нового высокопрочного функционально-градиентного гетерогенного материала на основе лазерных и аддитивных технологий»; гранта по приоритетным направлениям научно-технологического развития РФ № 075-15-2020781 «Создание теоретической и экспериментальной платформы для изучения физико-химической механики материалов со сложными условиями нагружения».

### **Апробация работы**

Основные положения и результаты работы докладывались на российских и международных конференциях, в том числе: ISMAR-2018 (Новосибирск, 2018 г.), XVI Всероссийский семинар «Динамика Многофазных Сред» (Новосибирск, 2019 г.), Проблемы механики: Теория, эксперимент и новые технологии (Новосибирск–Шерегеш, 2018, 2020, 2021 г.), Высокоэнергетические процессы в механике сплошной среды (Новосибирск, 2017, 2019 г.), Теория и численные методы решения обратных и некорректных задач (Новосибирск, 2016 г.), МНСК (Новосибирск, 2015, 2016, 2017 г.).

### **Публикации**

Всего автором опубликовано 22 печатные работы. По теме диссертации опубликовано 18 научных работ. В рецензируемых научных журналах, входящих в перечень ВАК, опубликовано 6 статей. Основные результаты диссертации опубликованы в рецензируемых журналах «Прикладная механика и техническая физика», «Теплофизика и аэромеханика», «Письма в журнал технической физики», «Journal of Chemometrics», «Biomedicines». В публикациях автор представлен под двумя фамилиями в связи со сменой фамилии.

### **Внедрение результатов работы**

Полученные результаты были использованы в процессе разработки технологии тканевой инженерии костных имплантатов на Кафедре фундаментальной медицины ФГАОУ ВО «Новосибирского национального исследовательского государственного университета».

### **Личный вклад**

Работа проводилась в Институте теоретической и прикладной механики им. С. А. Христиановича СО РАН. В процессе работы автор проводил численное моделирование и экспериментальное исследование течения жидкости в ротационном биологическом реакторе. Автор участвовал в разработке метода анализа спектров флуоресценции, написании программного обеспечения для его реализации. Автор участвовал в настройке экспериментального стенда для измерения спектров ЛИФ, самостоятельно проводил измерение спектров исследуемых образцов. Автором лично проводились тестирование и выявление особенностей вычислений алгоритма анализа спектров, а также обработка спектров выращиваемого в биореакторе клеточного материала и анализ результатов. Подготовку образцов биологических тканей, контроль биологических и медицинских аспектов измерений выполняли коллективы Кафедры фундаментальной медицины Новосибирского национального исследовательского государственного университета и Научно-исследовательского института нейронаук и медицины.

## **Структура и объем работы**

Диссертация состоит из введения, четырех глав, заключения и списка литературы из 129 наименований. Диссертация содержит 132 страницы, включая 47 иллюстраций, 10 таблиц и 7 формул.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

**Во введении** описывается актуальность темы диссертации. Представлен краткий обзор литературы по теме диссертации, описано текущее состояние проблемы и перспективы исследований в данной области, сформулированы цель и задачи исследования. Показана научная новизна и практическая значимость работы, сформулированы положения, выносимые на защиту.

**Первая глава** посвящена обзору литературы на тему применения биореакторов для выращивания клеточного материала для костных имплантатов. В главе приведено описание и сравнение методов лечения крупных костных дефектов с использованием различных видов трансплантатов, включая донорские и собственные костные ткани. Анализ и сравнение достоинств и недостатков каждого подхода позволили обосновать преимущества и перспективы использования тканеинженерных костных имплантатов, состоящих из костной ткани, выращенной на биоразлагаемом каркасе. Костные ткани выращиваются из клеток-предшественников – стволовых клеток, взятых у пациента, а затем сформированный имплантат помещается в организм пациента на место повреждения. В обзоре литературы рассмотрены варианты стимуляции стволовых клеток к преобразованию в клетки кости. Известно, что воздействие касательным напряжением потока жидкости вызывает дифференцировку стволовых клеток, а также способствует эффективному нарастанию костной ткани. Поэтому эта реакция применяется для наращивания костной ткани во многих биореакторах. В главе представлен обзор технологий, применяемых при создании подобных тканеинженерных имплантатов. В частности, рассмотрены такие варианты архитектуры каркасов, как трехмерные пористые образцы и объемные формы, состоящие из отдельных тонких слоев. Последний способ обладает преимуществами, поскольку в нем возможно более равномерное наращивание слоев костных тканей на плоских поверхностях. Складывая объемы из отдельных листов, покрытых живыми клетками, можно создавать более сложные трехмерные формы с равномерным распределением биоматериала внутри имплантата. Исходя из обзора существующих технологий и методов создания каркасов, обоснованы перспективы данного подхода при создании тканеинженерных имплантатов.

Для наращивания костного материала из стволовых клеток на тонкой полимерной пленке в рамках данной технологии профессором П. М. Ларионовым был предложен прибор с новой конструкцией – ротационный биореактор. Предлагаемая конструкция нового биореактора представляет собой стеклянный сосуд, заполненный питательной культуральной средой, в которую соосно на трех тонких проволоках погружен жесткий каркас с закрепленной на нем полимерной пленкой с клетками. Каркас для пленки имеет форму пустой внутри



цилиндрической оболочки. Тонкую пленку, изготовленную на основе биоразлагаемого полимера поликапролактона на установке электроспиннинга, заселяют стволовыми клетками и натягивают на внешнюю поверхность каркаса таким образом, чтобы заселенная поверхность была обращена к стенке стеклянного корпуса. При работе такого реактора течение жидкости возникает только вследствие вращения каркаса пленки, конструкция не имеет дополнительных приспособлений для перемешивания питательной среды. В литературе имеются сведения о положительном влиянии низкого касательного напряжения потока жидкости (около 10 мПа) на стимуляцию дифференцировки стволовых клеток в клетки кости и последующее нарастание костной ткани. При выращивании костной ткани на объемных каркасах в перфузионных биореакторах контролировать потоки жидкости внутри сложной пористой структуры невозможно. В то же время в ротационном биореакторе становится возможным равномерно и контролируемо воздействовать потоком жидкости на стволовые клетки и эффективно наращивать костную ткань.

Поскольку условия наращивания ткани в новом биореакторе не изучены, для оптимизации данного метода создания имплантатов важно решить множество отдельных задач. В разделе рассмотрены методы, применяемые при исследовании течения питательной среды в биореакторах. Обосновано применение численного моделирования течения жидкости в биореакторе для процесса оптимизации новой технологии, рассмотрены методы верификации численного решения. В условиях сложной геометрии реактора и малых характерных величин касательных напряжений численные методы позволяют определить уровень механической нагрузки потока жидкости на клетки.

Контроль нарастания костной ткани при культивировании в биореакторе является важной проблемой в процессе разработки новой технологии. Оптическая диагностика методом ЛИФ представляется альтернативой существующим стандартным методам гистологии и может применяться без повреждения исследуемых образцов. Поскольку биологические образцы уже содержат в себе флуорофоры, которые излучают свет при их возбуждении в ультрафиолетовом диапазоне, не нужно использовать дополнительные окрашивающие вещества. В разделе представлен обзор применения метода ЛИФ в медицинских исследованиях для диагностики множества заболеваний по спектрам флуоресценции.

В обзоре литературы описаны основные тканевые флуорофоры, особенности спектров флуоресценции биологических тканей, в том числе для многокомпонентных оптически тонких образцов. Обосновано применение метода ЛИФ к анализу костных тканей, выращенных на тонкой пленке. В многоатомных биологических молекулах спектры флуоресценции являются сплошными, а не линейчатыми. Когда в образце присутствует несколько флуорофоров, их спектры флуоресценции могут перекрываться, в результате регистрируемый сигнал становится сложным. Дополнительная проблема состоит в том, что некоторые флуорофоры в разных биологических тканях находятся в разном микроокружении, и, соответственно, имеют разные спектры флуоресценции. В такой ситуации невозможно заранее предсказать форму спектра флуоресценции. Поэтому

для того, чтобы корректно описать состав образца и изменения, которые происходят в нем, нужен метод восстановления чистых спектров, который не требует априорную информацию о них.

В разделе приведен обзор алгоритмов анализа спектров флуоресценции биологических тканей, обоснованы перспективы применения для статистического анализа спектральных данных в виде матриц возбуждения – эмиссии. Существующие методы анализа спектральных данных не могут точно восстановить чистые спектры для некоторых вариантов пресечений спектров флуоресценции. Поэтому до сих пор актуален поиск новых алгоритмов, позволяющих рассчитывать чистые спектры основных флуорофоров и определять их вклады в регистрируемый сигнал без использования априорной информации о спектрах.

В заключение в обзоре литературы кратко описаны проблемы, возникающие в процессе разработки новой технологии создания тканеинженерных имплантатов. По результатам обзора литературы сформулированы цели и задачи исследования.

**Вторая глава** посвящена численному моделированию течения жидкости в модели исходно предложенной конструкции ротационного биореактора. Для нового биореактора необходимо определить диапазон частот вращения каркаса пленки со слоем стволовых клеток, который позволит получить касательные напряжения на биоматериале на уровне, подходящем для стимуляции стволовых клеток (около 10 мПа).

В разделе подробно описаны математическая модель и постановка задачи для ротационного биореактора с исходным устройством. Область расчета течения была трехмерной и соответствовала объему, который занимала питательная

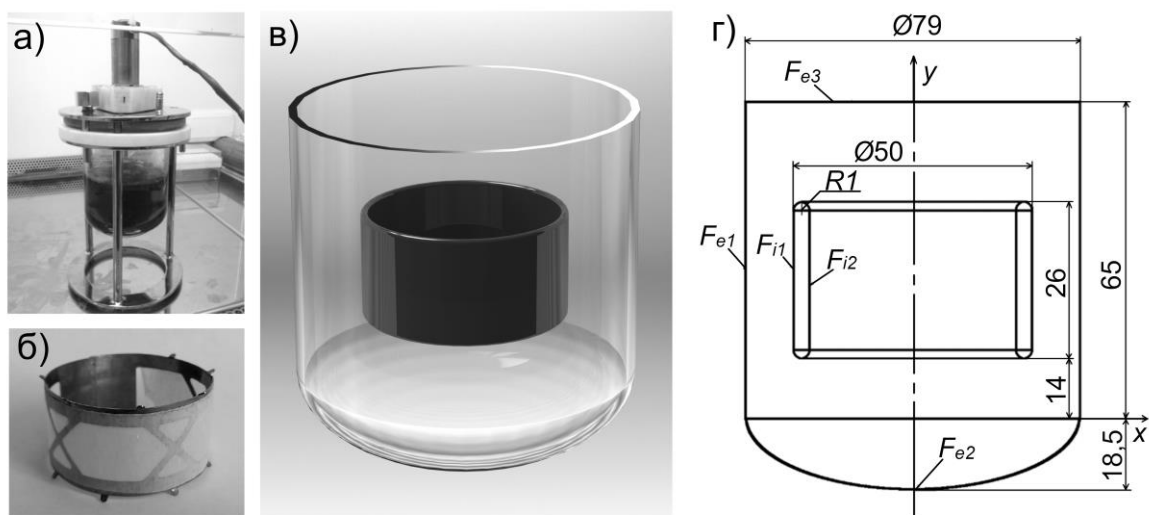


Рис. 1. Образец ротационного биореактора (а) и каркас для полимерной пленки (б); принципиальная схема нового биореактора (в); геометрическая модель нового биореактора (г).

$F_{e1}$ ,  $F_{e2}$ ,  $F_{e3}$  – внешние поверхности;  $F_{i1}$ ,  $F_{i2}$  – поверхности каркаса для пленки. Размеры указаны в миллиметрах.

среда в применяемом на практике образце реактора (рис. 1). Поверхности стеклянного корпуса моделировались цилиндрической поверхностью со скругленным снизу дном. Граница с воздухом моделировалась плоскостью. Каркас пленки упрощенно моделировался отрезком трубы, его плоские торцевые поверхности заменялись тороидальными поверхностями для упрощения расчета. Крепление каркаса пленки к оси двигателя не моделировалось. В исходной модели ротационного биореактора рабочая поверхность, на которой размещается пленка с биоматериалом, соответствует внешней поверхности каркаса  $F_{i1}$  (рис. 1,з).

В главе приведены постановка задачи, начальные и граничные условия. Численное моделирование проводилось в пакете программ ANSYS Fluent. Решалась система уравнений Навье – Стокса для несжимаемой жидкости, теплообмен и гравитационные силы в поставленной задаче не учитывались. Движение жидкости генерировалось вращающимися поверхностями за счет вязкости. Условие вращения ставилось только на поверхности каркаса пленки. Обосновано использование воды при комнатной температуре в качестве рабочей жидкости (плотность  $998,2 \text{ кг/м}^3$  и динамическая вязкость  $1 \text{ мПа}\cdot\text{с}$ ). При дискретизации применялась тетраэдрическая сетка. В пристеночных областях вблизи поверхностей каркаса применялись призматические элементы и дополнительно введено сгущение сетки. Проверялась сеточная сходимость: оптимальное число элементарных объемов  $3,1 \cdot 10^6$  шт.

Верификация математической модели проводилась на задаче определения поля течения в зазоре между вращающимися коаксиальными цилиндрами, поскольку принципиально новый биореактор состоит из двух цилиндрических поверхностей. Сравнение окружной скорости показало, что численное решение хорошо повторяет аналитические решения для плоского и ламинарного течения Куэтта в зазоре цилиндров.

Расчеты проводили при частотах вращения каркаса пленки 0,083, 0,125, 0,167, 0,2 и 0,233 Гц. Из литературы известно, что в системе коаксиальных цилиндров при вращении внутреннего цилиндра образуется течение с чередующимися вихрями Тейлора. Расчеты течения в новом реакторе подтвердили, что в зазоре между стенкой корпуса реактора и каркасом возникает течение в виде двух вихрей с противоположным направлением вращения (рис. 2). Для подтверждения данной структуры проводились эксперименты по оптической визуализации течения жидкости в зазоре реактора с помощью лазерного ножа. Эксперименты подтвердили наличие вихрей Тейлора в зазоре. По фотографиям была оценена максимальная скорость течения жидкости в зазоре и показано, что она близка к рассчитанной скорости при той же частоте вращения каркаса.

Далее в главе приведены результаты визуализации течения и распределения величины механической нагрузки потока жидкости на поверхность с клетками в указанном диапазоне частот вращения каркаса. Было показано, что вихри Тейлора приводят к неравномерному распределению касательного напряжения в зоне их сопряжения: в центре рабочей поверхности его значение ниже, чем на краях (рис. 3,а). В разделе приведен количественный анализ распределе-

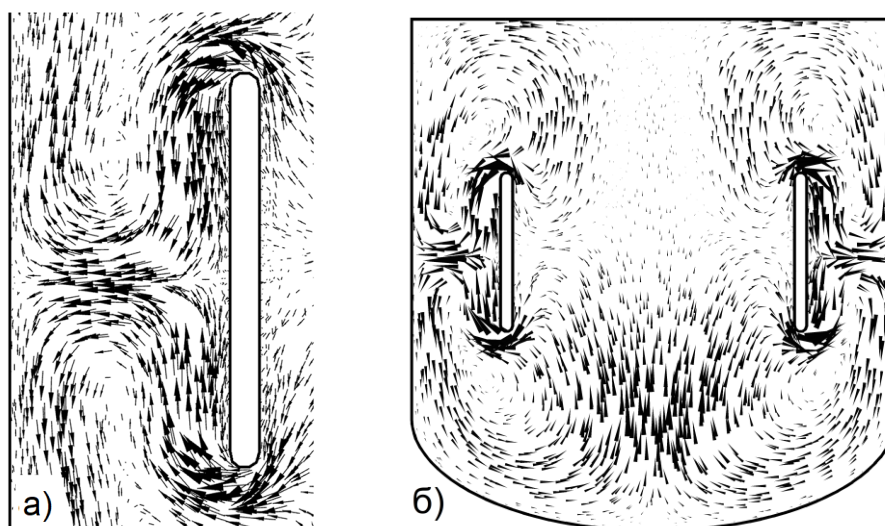


Рис. 2. Визуализации течения жидкости в зазоре между стенкой и вращающимся каркасом (а) и общая картина течения в плоскости симметрии биореактора (б).  
Частота вращения каркаса  $f = 0,083$  Гц.

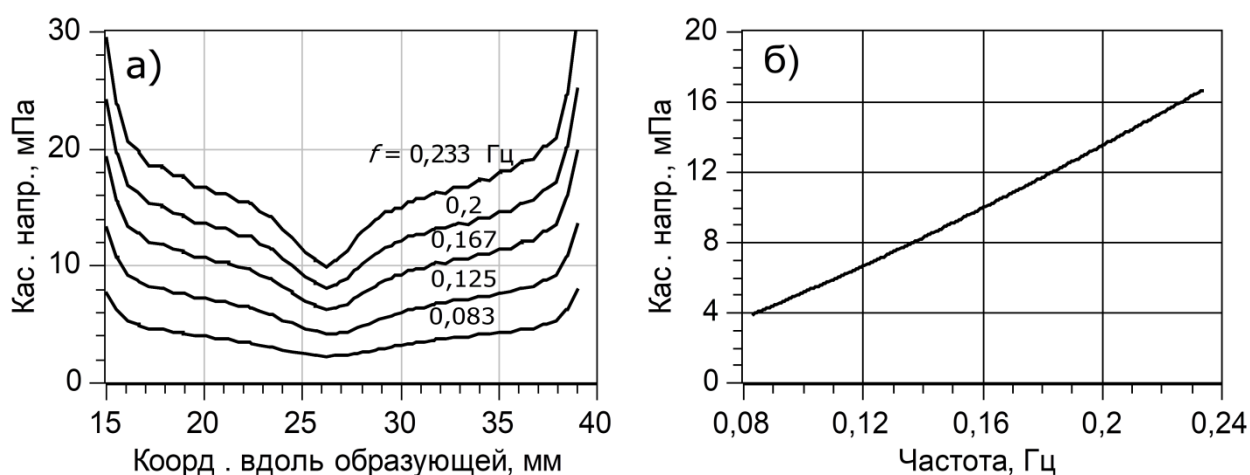


Рис. 3. Касательное напряжение на рабочей поверхности в исходной модели ротационного биореактора: распределение вдоль образующей поверхности (а), зависимость средней величины от частоты вращения каркаса (б).

ния механической нагрузки по рабочей поверхности, на которой культивируются клетки. Показано, что 28–46 % зоны культивирования клеток имеют хорошую однородность распределения касательного напряжения (разброс в 10 % относительно среднего значения) при частоте вращения 0,083–0,233 Гц. На рис. 3,б представлена зависимость усредненного по рабочей поверхности касательного напряжения от частоты вращения каркаса. При частоте вращения от 0,083 до 0,233 Гц на стволовые клетки будет действовать среднее касательное напряжение от 4 до 17 мПа. Можно заключить, что данные частоты вращения подходят для стимуляции стволовых клеток, поскольку известно, что касательное напряжение порядка 10 мПа способно стимулировать их дифференцировку. Дополнительно в разделе приведен анализ распределения статического давления по рабочей поверхности. Показано, что клетки на ней находятся в зоне разрежения, а характерные величины давления не значительны для влияния на стволовые клетки. Полученные результаты далее были использованы

для определения оптимального режима работы реактора в последующих медицинских экспериментах по выращиванию костной ткани.

В главе кратко описаны установочные эксперименты по определению оптимального уровня нагрузки потока жидкости на стволовые клетки в новом реакторе. Анализ биоматериала, выращенного при частотах вращения каркаса от 0,083 до 0,33 Гц, показал, что оптимальной для стимуляции стволовых клеток является частота 0,133 Гц (8 об/мин), которая соответствовала среднему касательному напряжению 8 мПа. В разделе приведены изображения поверхности фрагментов пленки при гистологическом исследовании. Гистологический анализ подтвердил, что после трех недель культивирования в реакторе плотность клеток кости на 36 % выше по сравнению с образцами контроля, которые выращивались статически в культуральной планшете. Уровень коллагена (белка, который сигнализирует о нарастании межклеточного вещества) был выше на 53 % относительно контрольных образцов. Таким образом, на практике было подтверждено, что новый биологический реактор можно применять для выращивания костной ткани для тканеинженерных имплантатов, и определена оптимальная величина для стимуляции стволовых клеток.

**В третьей главе** описываются методы улучшения условий культивирования биологического материала на тонкой полимерной пленке и перспективные изменения для дальнейшего развития технологии. Поскольку в исходной конструкции ротационного биореактора из-за вихрей Тейлора создается неоднородная механическая нагрузка на рабочую поверхность с биоматериалом (см. рис. 3,а), следующей задачей было определение перспективных изменений конструкции для создания более однородной нагрузки на клеточный слой. Дополнительно описана модификация реактора, позволяющая создавать циклическую механическую нагрузку на биологический материал. В разделе приведены сравнение и анализ результатов численного моделирования течения для трех перспективных моделей на основе ротационного биореактора.

Основная геометрия всех моделей совпадала с геометрией исходного ротационного реактора. В начале раздела представлены результаты тестового расчета течения, проведенного для исходной модели с увеличенным диаметром каркаса пленки. Расчет показал, что структура течения вблизи поверхности с биоматериалом изменилась: образовалось четыре вихря Тейлора, что ухудшило равномерность распределения касательного напряжения по поверхности. Поэтому последующие расчеты течения проводились с первоначальным размером каркаса пленки, и основной целью данного раздела являлось определение основных перспективных схем организации течения. Дальнейшую оптимизацию геометрии каркаса для наиболее эффективного использования поверхности культивирования следует проводить после выбора конкретной модели ротационного биореактора.

Первая перспективная модель предполагает изменение рабочей поверхности: расположение пленки с биоматериалом во внутренней полости каркаса пленки на поверхности  $F_{i2}$  (см. рис. 1,2). В исходной модели биореактора при вращении каркаса в зазоре между ним и корпусом образовывались два вихря,

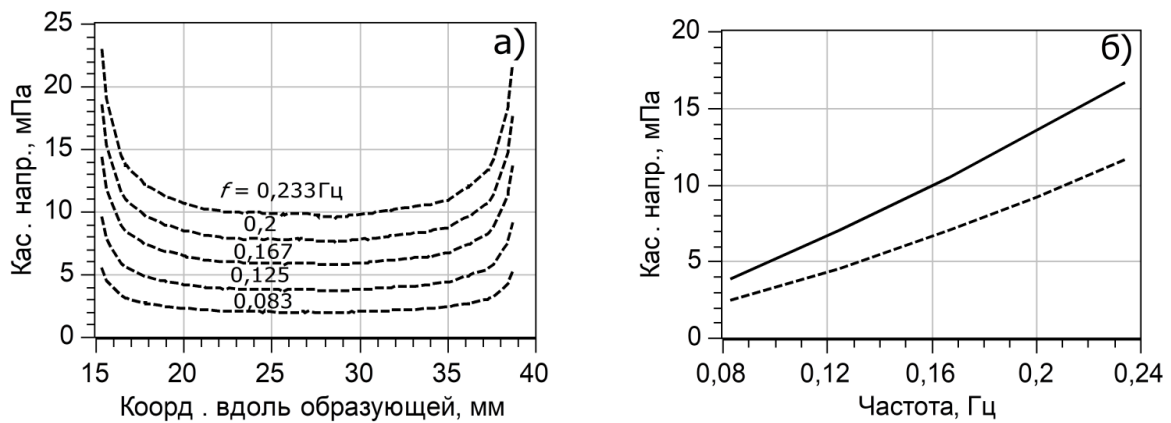


Рис. 4. Касательное напряжение на рабочей поверхности: распределение вдоль образующей поверхности (а), зависимость средней величины от частоты вращения каркаса (б).

Сплошная линия – исходная модель ротационного биореактора, пунктирная линия – первая перспективная модель.

в то время как во внутренней полости вихрей не было. По графику вдоль образующей рабочей поверхности в первой перспективной модели видно (рис. 4,а), что касательное напряжение не имеет минимумов, в отличие от исходной модели (см. рис. 3,а). Хорошую однородность распределения имеет 83–88 % поверхности культивирования при частотах вращения 0,083–0,233 Гц. Среднее касательное напряжение ниже по величине в сравнении с исходной моделью (рис. 4,б), однако данную модификацию можно использовать при дальнейших медицинских экспериментах без значительных изменений в конструкции реактора. В данной модели клетки будут находиться в зоне повышенного давления, но оно не превышает значения для нормальной жизнедеятельности клеток.

Модификации во второй перспективной модели заключаются в замене вращающихся и стационарных элементов. При вращении внешней стенки (кор-

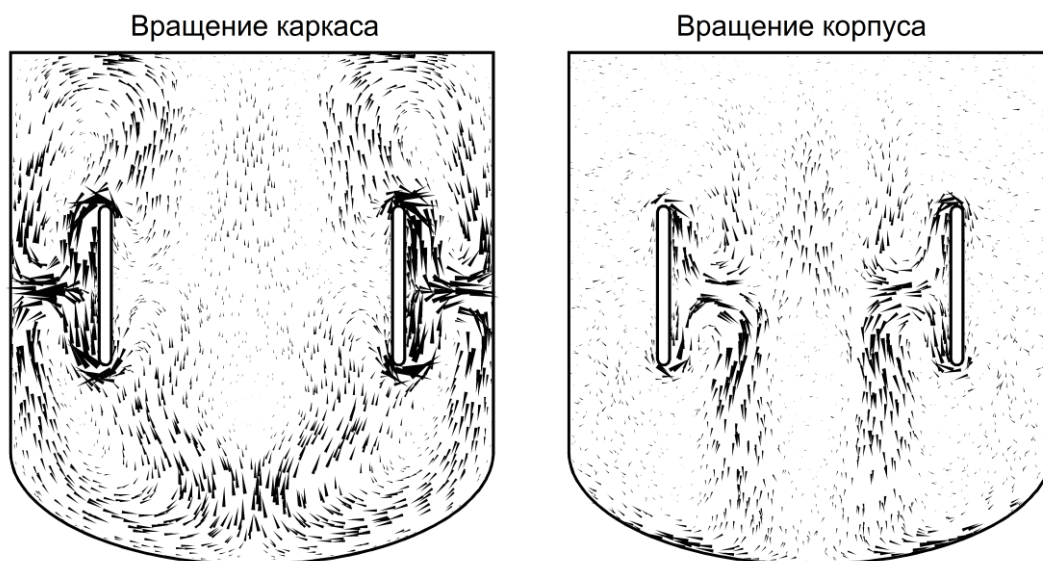


Рис. 5. Визуализация поля течения по проекции вектора скорости на плоскость симметрии при вращении внутреннего каркаса (исходная модель) и стенки корпуса (вторая перспективная модель) при частоте вращения  $f = 0,167$  Гц.

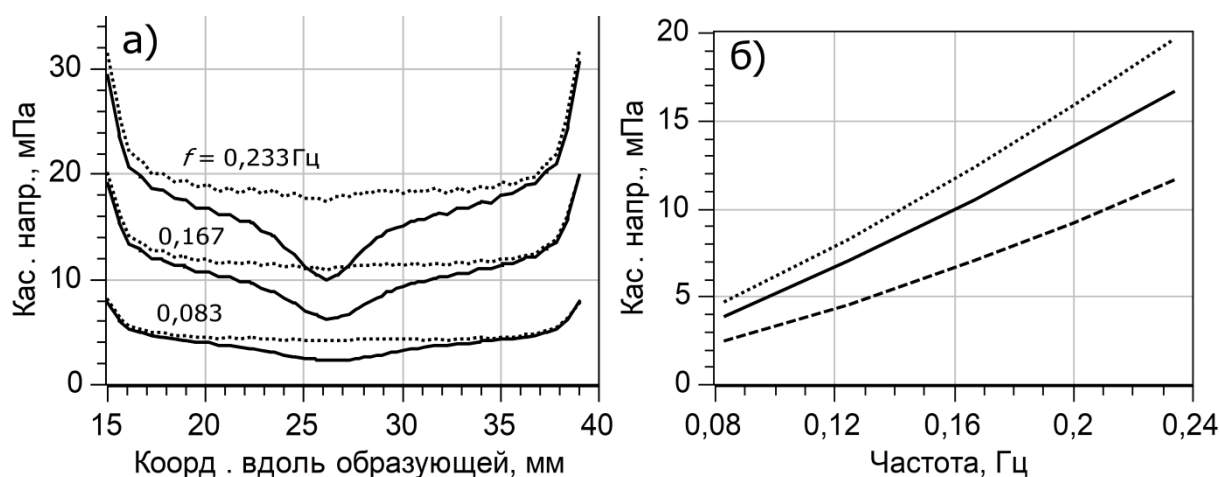


Рис. 6. Касательное напряжение на рабочей поверхности: распределение вдоль образующей поверхности (а), зависимость средней величины от частоты вращения (б).

Сплошная линия – исходная модель ротационного биореактора, пунктирная линия – первая перспективная модель, точки – вторая перспективная модель.

пуca) и неподвижном каркасе пленки течение жидкости устойчиво, в результате в зазоре между корпусом и каркасом не образуется вихрей (рис. 5). Рабочая поверхность в данной модификации соответствует поверхности  $F_{i1}$ , как и в исходной модели. Механическая нагрузка на рабочую поверхность становится более равномерной (рис. 6). Для расчета данного варианта использовалась та же геометрия и расчетная сетка, что и в Главе 2. Граничные условия были изменены на условие вращения поверхностей корпуса вместо вращения поверхностей каркаса. Частоты вращения корпуса для удобства сравнения были выбраны теми же, что и в случае вращения внутреннего каркаса в исходной модели. Остальные граничные условия и постановка задачи не изменялись.

Анализ распределения касательного напряжения по рабочей поверхности показал, что при вращении внешней стенки исчезает минимум в центральной области, но сохраняется повышенное значение механической нагрузки на краях пленки (рис. 6,а). Относительно давления рабочая поверхность находится в зоне разрежения, если вращается каркас, и в зоне повышенного давления, если вращается корпус. В последнем случае 96–100 % зоны культивирования клеток имеют хорошую однородность распределения касательного напряжения и статического давления в исследуемом диапазоне частот вращения. Средние касательные напряжения выше по величине, чем в исходной и первой перспективной модели (рис. 6,б). Максимальное значение касательного напряжения ограничено 20 мПа при частоте вращения 0,233 Гц при данном типе течения. Среднее статическое давление выше, чем в других рассчитываемых моделях, однако оно не превышает величины, которые могут реализовываться в физиологических условиях.

Таким образом, вариант организации течения во второй перспективной модели является лучшей альтернативой существующей исходной схеме, описанной в Главе 2. Данный способ позволяет наиболее равномерно распределять

механическую нагрузку по поверхности культивируемого клеточного материала за счет отсутствия вихрей Гейлора.

Третья рассматриваемая перспективная модель представляет собой асимметричную модель на основе ротационного реактора. Наряду с постоянными потоками, активно исследуется влияние циклической нагрузки на дифференцировку стволовых клеток по типу костной ткани. Такой тип нагрузки можно организовать в ротационном реакторе путем смещения осей вращения.

В разделе подробно описаны особенности геометрии асимметричного ротационного реактора (рис. 7). При расчете данного варианта все основные размеры корпуса и геометрия каркаса пленки совпадали с описанной ранее геометрией в Главе 2. Скругленные торцевые поверхности каркаса на рис. 7 не обозначены. В данной модели оси вращения корпуса и каркаса пленки параллельны и смещены относительно друг друга на расстояние  $s = 5$  мм. Рабочей поверхностью для размещения биологического материала, как и в исходной модели, была выбрана внешняя поверхность каркаса. Таким образом, главным объектом математического моделирования являлась щель между корпусом и каркасом.

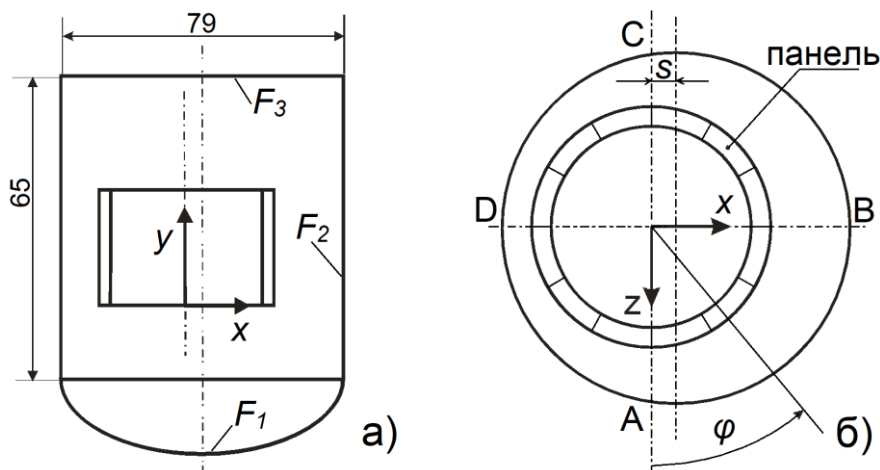


Рис. 7. Геометрия третьей перспективной модели – асимметричного ротационного биологического реактора.

*a* – вид спереди, *б* – вид сверху.

Далее постановка задачи (параметры рабочей среды, решаемые уравнения, начальные данные и т. д.) совпадала с постановкой в Главе 2 за исключением граничных условий. Исследовалось два способа генерации циклического потока в асимметричном реакторе: вращением каркаса пленки и внешней стенки вокруг оси каркаса. Частоты вращения выбраны в диапазоне  $0,05 < f < 0,233$  Гц, поверхности вращались вокруг оси каркаса пленки. Далее в разделе описаны особенности дискретизации расчетной области. Дополнительно для сравнения были проведены расчеты течения на тех же частотах вращения для симметричной модели (использовалась геометрия и расчетная сетка, описанная в Главе 2).

В главе представлено подробное сравнение структуры течения в симметричном и асимметричном биореакторах при вращении как каркаса пленки, так и корпуса (рис. 5 и 8), приведен анализ распределения механической нагрузки



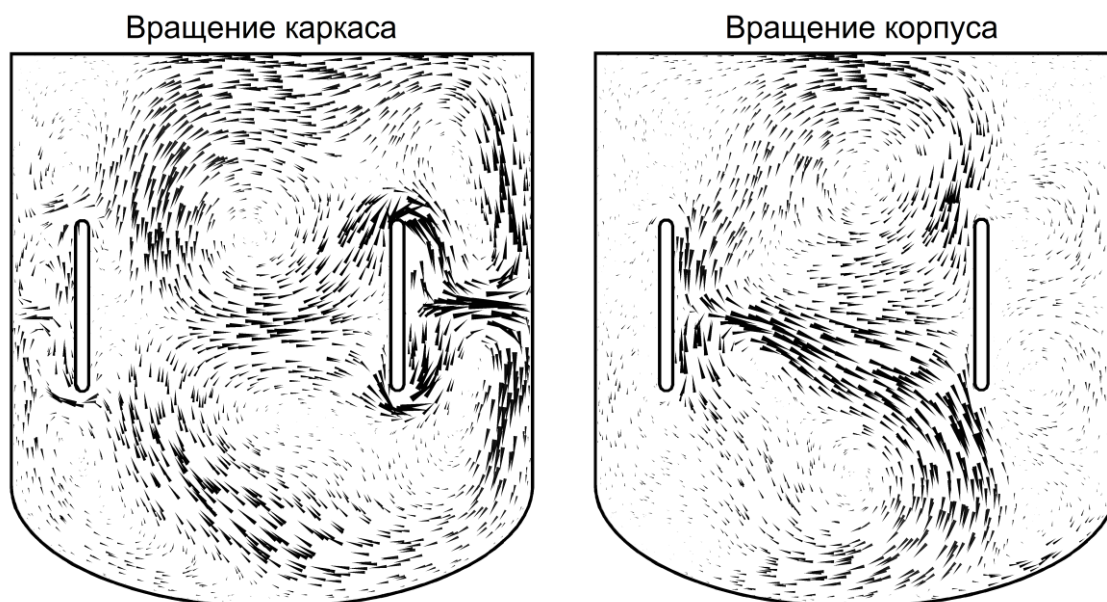


Рис. 8. Визуализация поля течения по проекции вектора скорости на плоскость симметрии в асимметричном реакторе при вращении внутреннего каркаса и стенки корпуса при частоте вращения  $f = 0,167$  Гц.

на рабочую поверхность. В асимметричном биореакторе касательное напряжение в окружном направлении меняется циклически, однако средние значения совпадают с симметричным случаем в пределах 5,5 % на всех исследуемых частотах. Для асимметричной модели вычислялся размах колебаний, являющийся разностью между максимальным и минимальным значениями функции, отнесенной к среднему значению функции, выраженный в процентах. Наибольший размах наблюдается в асимметричном реакторе при вращении корпуса, следовательно, данный вариант наиболее перспективен для циклического воздействия потоком жидкости на клетки. Для касательного напряжения он составляет от 127 до 147 % при частоте вращения  $0,05 < f < 0,233$  Гц.

**Четвертая глава** посвящена разработке метода оптической диагностики выращиваемой в ротационном биореакторе костной ткани. Дальнейшая оптимизация биотехнологического процесса может быть связана с модернизацией реактора для постоянного, неинвазивного контроля состояния биоматериала в процессе культивирования. Подход выращивания костной ткани на тонких пленках делает возможным оптический контроль всех этапов биотехнологии методом ЛИФ-спектроскопии. Данный метод не требует сложной подготовки проб и его можно применять неинвазивно, в отличие от стандартных гистологических методов.

В главе описана экспериментальная установка, применяемая для регистрации спектров ЛИФ биологических образцов. Для возбуждения флуоресценции использовалась перестраиваемая лазерная система Vibrant (HE) 355 II + UV (Opotek Inc, США). Для регистрации спектров флуоресценции использовался монохроматор Acton SpectraPro SP2300 с матрицей Pixis 256 CCD (Princeton Instruments, США). Матрицы возбуждения – эмиссии регистрировались в диапа-

зоне длин волн лазера 210–290 нм с шагом 10 нм. При изменении длины волны лазерного излучения регистрируемые спектры флуоресценции многокомпонентных образцов меняются, поскольку чистые флуорофоров обладают разными спектрами возбуждения. В отличие от отдельных спектров, матрицы – это двумерные наборы спектральных данных, которые содержат в себе дополнительную информацию, что перспективно для статистического анализа. Ультрафиолетовый диапазон длин волн позволяет одновременно возбуждать флуоресценцию нескольких тканевых флуорофоров, включая белок коллаген, который вырабатывается в костной ткани. Таким образом, по изменению в концентрации коллагена можно судить о нарастании костной ткани. Однако регистрируемые спектры костной ткани многокомпонентны, и определить вклад коллагена в них – не простая задача.

Для определения спектров чистых флуорофоров в матрицах оптически тонких образцов костных тканей был предложен новый алгоритм последовательных приближений на основе метода главных компонент (МГК). Для вычисления векторов главных компонент был взят алгоритм NIPALS (non-linear iterative partial least squares) в тензорном виде. Для того чтобы вычислить спектры основных флуорофоров, стандартный алгоритм МГК был модифицирован. В разделе приведено подробное описание этапов вычисления нового алгоритма, отличия от стандартного алгоритма и особенности его работы. В новом алгоритме число главных компонент фиксировалось и задавалось изначально, исходя из предположения о составе образца. Затем спектры главных компонент итеративно уточнялись методом последовательных приближений. Такой подход использует неучтенные ранее данные в остатке и позволяет постепенно перейти от знакопеременных главных компонент к положительно определенным. В результате алгоритм рассчитывает спектры возбуждения и флуоресценции чистых флуорофоров и их весовые коэффициенты, пропорциональные концентрации.

В главе приведены примеры работы алгоритма на тестовых наборах спектральных данных, показан процесс уточнения спектров главных компонент и приведено сравнение вычисленных главных компонент с чистыми спектрами. Приведено сравнение результатов работы нового алгоритма с другими известными методами восстановления чистых спектров: алгоритмом MCR-ALS (multivariate curve resolution-alternating least squares) и подходом составления линейных комбинаций из главных компонент. Сравнение алгоритмов проводилось на модельных наборах трехкомпонентных матриц, сгенерированных случайно с различными условиями пересечения чистых спектров флуоресценции. Сравнение показало, что для пересечения спектров, не удовлетворяющего условиям теорем о разрешимости спектров (когда один спектр полностью накладывается на другой), только новый модифицированный МГК восстанавливает спектры с высокой точностью, благодаря наличию коррелирующих данных в матрицах. Далее в главе приведены результаты тестирования нового алгоритма на реаль-

ных спектральных данных оптически прозрачных двух- и трехкомпонентных смесей водных растворов флуоресцентных красителей. Для этих данных алгоритм также показал хорошую точность восстановления чистых спектров.

Было проведено исследование фотообесцвечивания биологических образцов под воздействием ультрафиолетового излучения для оценки его влияния на анализ спектральных данных. Результаты показали, что быстрее всего выцветание происходит в коротковолновом диапазоне на длинах волн 210–240 нм. Однако, поскольку во время измерения спектров для матриц возбуждения – эмиссии на длинах волн 210–230 нм интенсивность флуоресценции может упасть на 3 %, можно заключить, что фотообесцвечивание незначительно влияет на форму матриц возбуждения – эмиссии и последующий анализ данных.

Далее в главе описано применение нового алгоритма для анализа костной ткани, выращенной в биореакторе на тонкой полимерной пленке. Представлено описание типов исследуемых образцов костных тканей и полимерных пленок, а также особенностей их спектральных данных. Образцы пленок, заселенные стволовыми клетками, культивировали в динамических условиях ротационного биореактора исходной конструкции и в статических условиях культурального планшета в качестве контроля. Для всех групп в процессе культивирования в питательную среду вводили индукторы, стимулирующие превращение стволовых клеток в клетки кости. В биореакторе биоматериал культивировался при частоте вращения 0,133 Гц, что соответствовало среднему касательному напряжению на рабочей поверхности 8 мПа. На второй, третьей и пятой неделе культивирования из реактора и планшета вынимались образцы для исследования методом ЛИФ и гистологического анализа.

Анализ спектральных данных показал, что все зарегистрированные спектры состоят из четырех главных компонент (рис. 9). По максимумам флуоресценции и характеру спектров возбуждения главные компоненты соответствуют флуоресцирующим аминокислотам тирозину (1), триптофану (2), белку коллагену (3) и флуоресцирующим структурам полимера поликапролактона (4), из которого состоят пленки. Было показано, что вклад компоненты, связанной с коллагеном, увеличивается в спектрах образцов, культивируемых в исходном

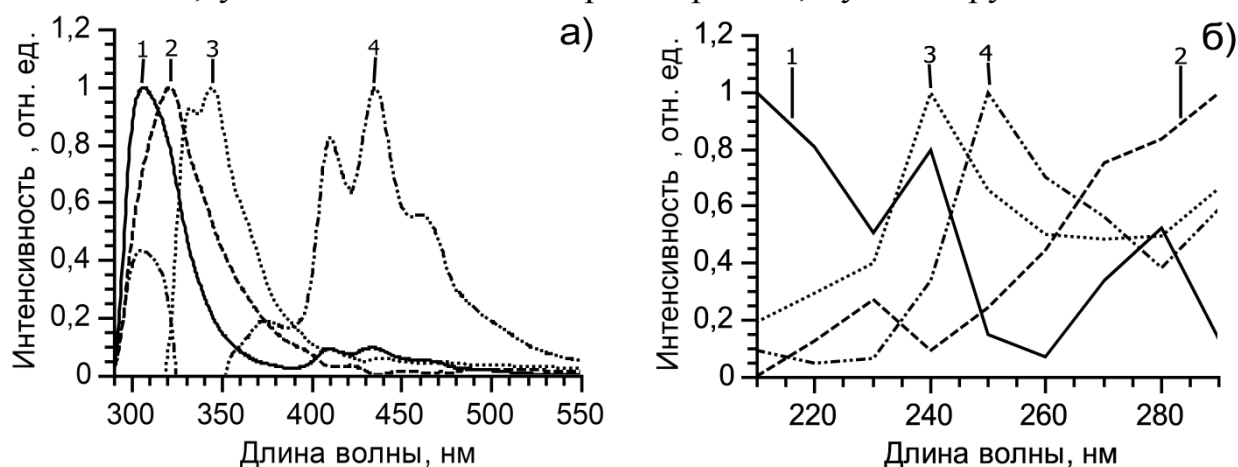


Рис. 9. Спектры флуоресценции (а) и возбуждения (б) главных компонент в образцах костных тканей, выращенных на пленках.

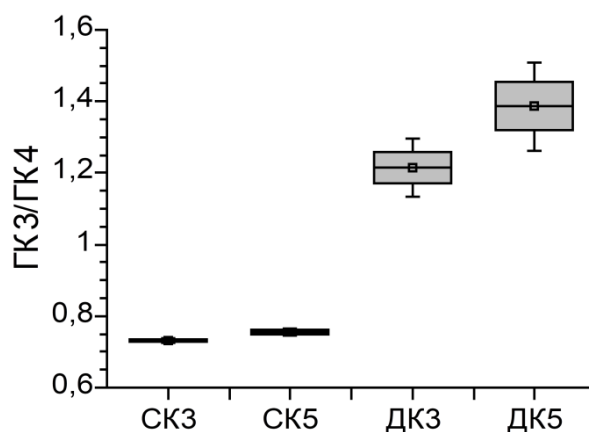


Рис. 10. Отношение весовых коэффициентов третьей и четвертой главных компонент для исследуемых типов образцов пленок.

СК3, СК5 – статическое культивирование после трех и пяти недель, ДК3, ДК5 – динамическое культивирование после трех и пяти недель.

ротационном биореакторе, по сравнению с образцами, выращенными статически в культуральной планшете (рис. 10). При увеличении времени культивирования до пяти недель данное отношение продолжает возрастать, что говорит о росте биологического материала на пленке. Поскольку гистологическое исследование также показало рост уровня коллагена на 53 % при трехнедельном динамическом культивировании по сравнению с образцами контроля и увеличение плотности клеток на 36 %, можно констатировать, что к третьей неделе культура стволовых клеток в динамических условиях трансформируется в костный материал. Таким образом, метод ЛИФ можно применять для диагностики роста костной ткани в процессе культивирования в ротационном биореакторе.

**В заключении** сформулированы основные выводы диссертации.

Моделирование течения жидкости в полости ротационного биореактора исходно предложенной конструкции позволило визуализировать структуру течения и показать наличие вихрей Тейлора, которые вызывают неравномерность распределения механической нагрузки на биоматериал. Моделирование показало, что в новом биореакторе на рабочей поверхности при частотах вращения от 0,083 до 0,233 Гц создается среднее касательное напряжение потока жидкости в диапазоне от 4 до 17 мПа, которое подходит для стимуляции преобразования мезенхимальных стволовых клеток в клетки кости. Медицинские эксперименты позволили найти оптимальную частоту вращения каркаса пленки, равную 0,133 Гц, что соответствовало среднему касательному напряжению 8 мПа. При данных условиях в новом биореакторе были успешно выращены образцы костной ткани.

Были определены перспективные изменения, которые можно внести в исходную конструкцию биореактора ротационного типа для дальнейшей оптимизации технологии. Вторая представленная перспективная модель с вращающимся корпусом позволяет воздействовать на выращиваемые клетки равномерным потоком без вихрей. Средние касательные напряжения на рабочей поверх-

ности составляют от 5 до 20 мПа при частотах вращения от 0,083 до 0,233 Гц. На основе конструкции ротационного биореактора можно реализовывать циклическую нагрузку на биоматериал через смещение оси вращения (третья перспективная модель). При смещении каркаса на 5 мм и вращении корпуса в диапазоне частот вращения 0,05–0,233 Гц размах колебаний касательного напряжения составляет от 127 до 147 %.

Метод ЛИФ можно применять для диагностики нарастания костной ткани на тонкой пленке в новом биореакторе. Для анализа спектральных данных был разработан новый алгоритм на основе МГК. Алгоритм позволяет оценивать число флуоресцирующих компонент, а также с высокой точностью рассчитывать чистые спектры возбуждения, флуоресценции и их весовые коэффициенты. Алгоритм не использует априорную информацию о спектрах и может быть применен при исследовании образцов с неизвестным составом. В отличие от алгоритма MCR-ALS и подхода составления узких комбинаций из главных компонент, новый алгоритм с высокой точностью восстанавливает чистые спектры в случае, не удовлетворяющем условиям теорем о разрешимости спектров.

Новый алгоритм позволил оценить количество основных флуоресцирующих компонент в образцах костного материала, выращенных в ротационном биореакторе исходной конструкции, и рассчитать их спектры возбуждения и флуоресценции. Было установлено, что в спектры флуоресценции костной ткани на пленках вносят вклад аминокислоты тирозин и триптофан, коллаген и флуоресцирующие структуры поликапролактона. Показано, что вклад компоненты, связанной с коллагеном, увеличивается для образцов, культивируемых в ротационном биореакторе, по сравнению со статическими условиями культурального планшета. Гистологическое исследование образцов подтвердило формирование костной ткани.

Данные 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.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

В публикациях автор представлен под двумя фамилиями в связи со сменой фамилии.

### **Статьи в рецензируемых научных журналах из списка ВАК**

1. Цибульская Е. О., Маслов Н. А., Ларионов П. М., Ганимедов В. Л. Технология регенерации костной ткани в ротационном биореакторе: моделирование течения жидкости и лазерная флуоресцентная диагностика // Прикладная механика и техническая физика. – 2020. – Т. 61. – № 5. – С. 109-121.

2. Ларионов П. М., Ганимедов В. Л., Маслов Н. А., Цибульская Е. О. Течение жидкости в замкнутой полости ротационного биологического реактора для регенерации костной ткани // Теплофизика и аэромеханика. – 2019. – Т. 26. – № 6. – С. 953-962.
3. Ганимедов В. Л., Цибульская Е. О., Маслов Н. А., Ларионов П. М. Моделирование течения жидкости в биологическом реакторе ротационного типа // Теплофизика и аэромеханика. – 2018. – Т. 25. – № 2. – С. 219-226.
4. Маслов Н. А., Папаева Е. О. Статистический анализ матриц возбуждения-эмиссии для метода лазерно-индуцированной флуоресценции // Письма в Журнал технической физики. – 2016. – Т. 42. – № 14. – С. 7-13.
5. Tsibulskaya E., Maslov N. Decomposition of multi-component fluorescence spectra by narrow peak method based on principal component analysis // Journal of Chemometrics. – 2021. – Vol. 35. – Iss. 6. – Art. e3343.
6. Tsibulskaya E., Lipovka A., Chupakhin A., Dubovoy A., Parshin D., Maslov N. The relationship between the strength characteristics of cerebral aneurysm walls with their status and laser-induced fluorescence data // Biomedicines. – 2021. – Vol. 9. – Iss. 5. – Art. 537.

#### **Статьи в других изданиях и научных сборниках:**

1. Ражев А. М., Искаков И. А., Чуркин Д. С., Оришич А. М., Маслов Н. А., Цибульская Е. О., Ломзов А. А., Ермакова О. В., Трунов А. Н., Черных В. В. Воздействие лазерного УФ излучения на склеральную ткань глаза больных открытоугольной глаукомой // Квантовая электроника. – 2018. – Т. 48. – № 5. – С. 481-486.
2. Ларионов П. М., Маслов Н. А., Папаева Е. О., Юношев А. С., Самохин А. Г., Терещенко В. П., Павлов В. В., Титов А. Т. Анализ перфузионных свойств скаффолда // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. – 2017. – Т. 6. – № 3. – С. 64-70.
3. Ларионов П. М., Маслов Н. А., Ганимедов В. Л., Папаева Е. О., Терещенко В. П., Богачев С. С., Проскурина А. С., Титов А. Т., Филипенко М. Л., Павлов В. В., Кудров Г. А. Модель механотрансдукции адгезированной на скаффолде клеточной культуры в условиях вихревого биореактора // Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии. – 2017. – № 1. – С. 107.
4. Ganimedov V. L., Papaeva E. O., Maslov N. A., Larionov P. M. Numerical simulation of fluid flow in a rotational bioreactor // AIP Conference Proceedings. – 2017. – Vol. 1893. – № 1. – Art. 030006.
5. Larionov P. M., Maslov N. A., Papaeva E. O., Tereshchenko V. P., Khlestkin V. K., Bogachev S. S., Proskurina A. S., Titov A. T., Filipenko M. L., Pavlov V. V., Kudrov G. A., Orishich A. M. Designing the method for optical in vitro monitoring of the cell-mediated scaffold technology for bone regeneration based on laser-induced fluorescence spectroscopy // AIP Conference Proceedings. – 2016. – Vol. 1760. – № 1. – Art. 020041.
6. Ganimedov V. L., Papaeva E. O., Maslov N. A., Larionov P. M. Mathematical model of a rotational bioreactor for the dynamic cultivation of scaffold-adhered human mesenchymal stem cells for bone regeneration // AIP Conference Proceedings. – 2017. – Vol. 1882. – № 1. – Art. 020020.

7. Larionov P. M., Maslov N. A., Papaeva E. O., Yunoshev A. S., Filipenko M. L., Bogachev S. S., Proskurina A. S., Samokhin A. G., Kudrov G. A., Tereshchenko V. P., Pavlov V. V., Mihailovsky M. V., Prohorenko V. M., Titov A. T., Mamonova E. V., Sadovoy M. A. Perfusion properties of scaffolds: A new approach to tissue engineering designs for bone regeneration // AIP Conference Proceedings. – 2017. – Vol. 1882. – № 1 – Art. 020042.
8. Tsibulskaya E. O., Ganimedov V. L., Maslov N. A., Larionov P. M. Methods of operating mode control of the rotational biological reactor // AIP Conference Proceedings. – 2018. – Vol. 2027. – № 1. – Art. 030100.
9. Ganimedov V. L., Larionov P. M., Maslov N. A., Tsibulskaya E. O. Mathematical model of a rotational biological reactor with a shifted axis of rotation // AIP Conference Proceedings. – 2018. – Vol. 2027. – № 1. – Art. 030020.
10. Tsibulskaya E. O., Maslov N. A. Determination of relative concentrations in two-component mixtures with unknown composition by laser-induced fluorescence spectra // Journal of Physics: Conference Series. – 2019. – Vol. 1404. – Art. 012046.
11. Maslov N. A., Tsibulskaya E. O. Investigation of the photobleaching effect on the measurement of laser-induced fluorescence excitation-emission matrices of biological tissues // AIP Conference Proceedings. – 2019. – Vol. 2125. – № 1. – Art. 030005.
12. Parshin D. V., Tsibulskaya E. O., Dubovoy A. V., Chupakhin A. P., Maslov N. A. Application of laser-induced fluorescence method to the study of the cerebral aneurysm wall: First results and perspectives // AIP Conference Proceedings. – 2019. – Vol. 2125. – № 1. – Art. 020007.

Ответственный за выпуск Е.О. Цибульская

Подписано в печать 18.10. 2021

Формат бумаги 60×84/16, Усл. печ. л. 1.0,  
Уч.-изд. л. 1.0, Тираж 100 экз., Заказ № 14

Отпечатано в типографии ООО «Параллель»  
630090, Новосибирск, ул. Институтская, 4/1

