

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ ИНСТИТУТ ТЕОРЕТИЧЕСКОЙ И ПРИКЛАДНОЙ МЕХАНИКИ
ИМ. С. А. ХРИСТИАНОВИЧА
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Цибульская Елена Олеговна

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

1.1.9 – Механика жидкости, газа и плазмы

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:
д. ф.-м. н., Маслов Н. А.

Новосибирск – 2021 год

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	5
Глава 1. Обзор литературы.....	12
1.1. Подходы к лечению крупных дефектов кости.....	12
1.2. Технологии создания каркасов тканеинженерных конструкций..	14
1.3. Биореакторы для выращивания костной ткани на каркасах.....	18
1.4. Методы исследования течения питательной среды в биологических реакторах.....	20
1.5. Метод лазерно-индуцированной флуоресценции.....	22
1.6. Флуорофоры биологических тканей.....	25
1.7. Особенности флуоресценции в биологических тканях.....	29
Поглощение и рассеяние.....	30
Фотообесцвечивание.....	31
1.8. Применение ЛИФ в биологии и медицине.....	33
1.9. Обработка спектральных данных.....	35
1.10. Заключение.....	39
Глава 2. Численное моделирование течения жидкости в полости ротационного биологического реактора.....	42
2.1. Математическая модель ротационного биореактора.....	42
2.2. Верификация математической модели.....	46
2.3. Валидация вычислительного алгоритма, оптическая визуализация течения в биореакторе.....	48
2.4. Результаты численного моделирования.....	50
2.5. Эксперименты по выращиванию костного материала.....	56

Выводы по Главе 2.....	60
Глава 3. Численное моделирование течения жидкости в перспективных модификациях ротационного биореактора	63
3.1. Модель реактора с размещением биологического материала на внутренней поверхности каркаса	65
3.2. Модель биореактора с вращением внешней стенки.....	67
3.3. Модель биореактора со смещенной осью вращения.....	71
Математическая модель	71
Результаты численного моделирования	74
Выводы по Главе 3.....	80
Глава 4. Разработка метода анализа роста костной ткани в ротационном биореакторе.....	82
4.1. Метод измерения спектров ЛИФ	83
4.2. Новый алгоритм на основе метода главных компонент	84
4.3. Отработка алгоритма на модельных спектрах.....	90
Попарное пересечение спектров флуоресценции	92
Тройное пересечение спектров флуоресценции.....	93
Полное наложение первого спектра флуоресценции на второй.....	94
4.4. Отработка алгоритма на смесях флуоресцентных красителей	96
Двухкомпонентные смеси.....	98
Трехкомпонентные смеси	100
Двухкомпонентные смеси с близкими максимумами спектров флуоресценции	103
4.5. Исследование фотообесцвечивания биологических тканей	105

4.6. Анализ спектров ЛИФ образцов костной ткани, выращенных в ротационном биореакторе.....	108
Подготовка образцов.....	109
Результаты анализа спектров ЛИФ.....	110
Выводы по Главе 4.....	114
Заключение	116
Список литературы	119

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Биореакторы – это приборы, используемые в медицине для выращивания клеточных культур и микроорганизмов в оптимальных физических условиях для их жизнедеятельности. 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 с различными конструкциями и способами перемешивания питательной среды. 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 диссертация 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.

В связи с вышеизложенным, целью диссертационной работы являлась разработка технологии тканевой инженерии костной ткани, заключающейся в выращивании костного материала на тонкой полимерной пленке в новом ротационном биореакторе.

Задачами настоящей работы было:

- 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.

Апробация работы

По теме диссертации опубликовано 18 научных работ. В рецензируемых научных журналах, входящих в перечень ВАК, опубликовано 6 статей. Публикаций в других изданиях и научных сборниках – 12. Основные результаты диссертации опубликованы в рецензируемых журналах «Прикладная механика и техническая физика», «Теплофизика и Аэромеханика», «Письма в журнал технической физики», «Journal of Chemometrics», «Biomedicines» и 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.).

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 ФГБУН «Институт 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 проводилась отработка и выявление особенностей работы 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 ФГАОУ ВО «Новосибирского национального исследовательского государственного университета» и ФГБНУ «Научно-исследовательского института нейронаук и медицины».

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Подходы к лечению крупных дефектов кости

Костная ткань по статистике является второй по частоте трансплантации тканью после крови [1]. Несмотря на то, что кость обладает способностью полностью регенерировать, при крупных костных дефектах (например, сегментарных дефектах трубчатой кости с размером 8–9 см), либо патологических переломах, естественных процессов восстановления часто оказывается недостаточно. Поэтому для ускорения процесса заживления требуются специальные трансплантационные материалы, замещающие недостающие ткани.

Стандартным методом лечения крупных костных дефектов является трансплантация донорских тканей [2]. По происхождению такие костные трансплантаты можно разделить на три типа: аллотрансплантаты (используются ткани особи одного вида), ксенотрансплантаты (ткани особи иного вида) и аутооттрансплантаты (собственные ткани). Каждый из этих вариантов имеет свои положительные и отрицательные стороны, а выбор конкретного типа зависит от множества факторов: размера костного дефекта, способа подготовки и обработки трансплантата, требуемых биомеханических параметров, этических проблем и риска возможных осложнений. Использование алло- и ксенотрансплантатов связано с возможными проблемами передачи инфекций, а также высокими требованиями к обработке и очистке материалов для уменьшения риска отторжения пересаженных образцов. Альтернативным подходом является использование собственных тканей пациента – аутокости. Но объем таких тканей, которые можно извлечь и пересадить ограничен.

Искусственные имплантаты, металлоконструкции или протезы являются альтернативой, не использующей биологические ткани, что убирает этические проблемы и задачи стерилизации образцов. Однако данное направление в последнее время теряет актуальность из-за тенденции не оставлять в организме пациента чужеродные материалы. Кроме того,

использование искусственных конструкций, которые не замещаются собственными тканями пациента, снижает прочность кости из-за снятия с них напряжения, а также требует замены с течением времени вследствие износа.

Поэтому в настоящее время активно развивается направление тканеинженерных имплантатов, состоящих из различных каркасов и размещенного на них биоматериала [2, 3]. Они представляют собой искусственно созданные объемные пористые каркасы, заселенные собственными клетками пациента. Заселение каркасов клетками перед имплантацией позволяет ускорить процесс регенерации костного дефекта, заранее создав на нем костный матрикс, который служит естественным каркасом для клеток [4], и естественным резервуаром для минералов, коллагеновых волокон, ростовых факторов и других веществ. Таким образом, уже не требуется время для постепенного прорастания клеток из окружающей костной ткани в пустой каркас. Данный подход позволяет создавать каркасы с определенными механическими, остеогенными и другими свойствами [3]. Основным требованием к материалу, из которого делается каркас, является его биосовместимость и биоразлагаемость. Использование искусственных каркасов, в отличие от донорских трансплантатов, позволяет избежать таких недостатков, как риск заражения инфекциями и отторжение чужеродных тканей. При создании искусственных каркасов для основы используются биосовместимые материалы, а также вещества, стимулирующие рост клеток кости. Особую роль играет пористость каркаса, так как через поровую систему должна происходить доставка питательных веществ до растущих клеток, отвод продуктов их жизнедеятельности и прорастание кровеносных сосудов (васкуляризация). После имплантации в организм пациента все чужеродные соединения должны постепенно деградировать и замещаться собственными тканями. Однако идеальный материал для каркасов все еще не найден, стоимость

материалов и процедур высока, и в результате клиническое применение тканеинженерных конструкций остается ограниченным.

1.2. Технологии создания каркасов тканеинженерных конструкций

В технологиях создании каркасов для тканеинженерных имплантатов можно выделить два направления. Первое – это создание непосредственно объемных пористых конструкций. В качестве каркасов используют очищенные от донорских клеток кости животных или людей, либо искусственные пористые конструкции. К наиболее популярным методам создания искусственных каркасов можно отнести методы электроспиннинга, выщелачивания, вспенивания газом, сублимационной сушки, 3Д печати [5]. Данные технологии позволяют получать пористые каркасы с различной внутренней структурой и размером пор на основе множества биосовместимых материалов. Сеть пор в отсутствие кровоснабжения обеспечивает доступ к клеткам питательных веществ и кислорода. Также пористость способствует миграции клеток внутрь каркаса. Важную роль играет индивидуальный размер пор. При слишком малом размере пор, клеткам становится трудно мигрировать внутрь каркаса. Было показано, что каркасы с размерами пор около 300 мкм, способствуют регенерации кости и прорастанию кровеносных сосудов [6]. Следовательно, каркасы должны быть сконструированы в соответствии с наиболее благоприятными для клеток и тканей условиями.

Метод электроспиннинга использует внешнее электрическое поле для вытягивания заряженных нитей полимерных растворов в виде тонких струй из капилляра к пластине коллектора. Данный метод обладает широким диапазоном настроек: выбор различных полимеров и растворителей для основы, диаметра и пространственной организации его волокон, возможность использовать различные добавки и биомолекулы. В качестве основы используются такие природные полимеры как коллаген, желатин, хитозан, или искусственные: полилактид (PLA), полигликолид (PGA),

поликапролактон (PCL) и т. д. [3, 7]. Поликапролактон – биодергадируемый материал, который в организме человека постепенно распадается на воду, углекислый газ и капроновую кислоту и рассасывается в течение 3–4 лет [8]. Электроспиннингом можно создавать каркасы из волокон с широким диапазоном размеров (диаметр от единиц нанометров до нескольких микрон) [9]. Внутреннюю структуру и размер пор также можно регулировать пространственной укладкой волокон (хаотичной, либо структурированной), хотя размер пор в общем случае оказывается ограничен диаметром волокон. Благодаря своей гибкости метод электроспиннинга широко применим в тканевой инженерии.

Равномерность предварительного заселения объемных конструкций клетками пациента и последующее разрастание ткани контролировать сложно [10]. Поэтому ко второму направлению в изготовлении тканеинженерных имплантатов относится сборка объемных конструкций из отдельных тонких листов или пленок, в виде оригами, или свитка [11, 12]. Этот подход обладает явным преимуществом, так как послойное заселение клетками проще контролировать, а также можно создавать объемные формы с более сложной пространственной структурой. В статье [12] авторы изготавливали методом 3Д печати тонкие листы на основе поликапролактона либо полилактидгликолида и гидроксиапатита. Подобные листы могут быть различным образом сложены, скручены и разрезаны для придания каркасам формы, которую невозможно было бы напрямую напечатать из-за большого количества неподдерживаемых выступов.

Для заселения каркасов используются мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки. Данный вид клеток способен преобразовываться в клетки костной ткани (остеобласты), хрящевые и жировые клетки [13]. Наиболее перспективными для целей восстановления костных дефектов являются клетки костномозгового происхождения [14]. Преимущественно мезенхимальные стволовые клетки у людей получают из костного мозга подвздошной кости.

Для того, чтобы запустить преобразование мезенхимальных стволовых клеток в клетки кости, используют специфичные сигнальные молекулы – индукторы. Для человеческих стволовых клеток одним из таких индукторов является дексаметазон [15]. Однако обработка индукторами – это не единственная возможность направить жизнь стволовых клеток в нужную сторону. Известно, что механическое воздействие на клетки за счет касательного напряжения жидкости может стимулировать дифференцировку без использования дексаметазона [16 – 18]. Касательное напряжение жидкости оказывает влияние на множество процессов, протекающих в клетках [19, 20] и способно направить жизнь стволовых клеток в сторону остеогенеза [21]. Данное явление называется механотрансдукцией (процесс преобразования механических сил в специфические клеточные сигналы).

В клетках обнаружено несколько клеточных структур, которые воспринимают механическое воздействие: цитоскелет, различные мембранные белки и т. д [22]. Деформация клеток вызывается деформацией каркаса, на котором растут клетки, и касательным напряжением (напряжением сдвига) потока тканевой жидкости, которая доставляет к ним питательные вещества. Оба способа задействуют разные сигнальные пути: деформация каркаса влияет на клетки непосредственно через поверхность прикрепления клеток, а поток жидкости воздействует через клеточную мембрану [23]. Существует лишь несколько исследований, которые сравнивают эффекты от воздействия потока жидкости и механического напряжения каркаса на костные клетки. Но хотя клетки часто реагируют на оба стимула, считается, что более сильную реакцию вызывает поток жидкости [24, 25]. Поэтому на практике явление механотрансдукции применяют именно через влияние потока жидкости на клетки.

Деформация кости приводит к усилению потока тканевой жидкости за счет сжатия одних и растяжения других областей, а разные типы клеток реагируют на него по-разному. Стволовые клетки начинают дифференцироваться в клетки кости, а клетки кости (остеобласты) в свою

очередь начинают уплотнять окружающее их пространство коллагеновыми волокнами и минералами, формируя костный матрикс [22].

Степень влияния потока на клетки принято определять через величину касательного напряжения жидкости, которое вызывает деформацию клеток. Величина касательного напряжения, которое требуется для оптимального преобразования стволовых клеток в клетки кости, все еще является предметом дискуссий. Для стимуляции и нормальной жизни клеток кости требуются касательные напряжения 0,8–3 Па (физиологическое значение в поровой структуре кости) [26]. На практике в известных работах применяют касательные напряжения в широком диапазоне: в перфузионных реакторах – от 2 до 100 мПа [27 – 29], а в параллельных проточных камерах – от 0,1 до 2 Па [22]. Мезенхимальные стволовые клетки в физиологических условиях могут испытывать касательное напряжение около 10–100 мПа, однако также известно, что даже достаточно маленькие по сравнению с ними касательные напряжения (менее 10 мПа) позволяют запустить процесс преобразования стволовых клеток в клетки костной ткани [30].

Известно, что циклически изменяющиеся потоки оказывают положительное влияние на рост ткани эндотелия сосудов [31]. Для тканей кости подобные эффекты также требуют отдельного изучения. Существуют работы, в которых исследуется влияние как постоянных, так и циклических потоков жидкости на рост костной ткани [22, 32, 33], однако из-за больших различий в используемых экспериментальных установках и материалах сравнивать результаты применения различных потоков сложно. Среди циклических потоков выделяют пульсационные и колебательные потоки. Оба варианта представляют собой поток в одном направлении, на который накладываются колебания, но в первом случае скорость основного потока намного выше.

Существуют работы, описывающие положительное влияние циклических потоков на рост клеток в перфузионных реакторах, однако, существует несколько исследований, в которых существенных различий не

было найдено [27]. Предполагается, что влияние сложно обнаружить из-за различий в конструкции перфузионных систем, типах каркасов и клеток, а также способах их засева.

Можно отметить, что выращивание костной ткани в динамических условиях является более физиологичным и способствует ее лучшему росту. Однако важен контроль касательных напряжений в процессе культивирования клеток.

1.3. Биореакторы для выращивания костной ткани на каркасах

Биореакторы применяются для создания оптимальных условий жизнедеятельности клеток. В реакторах к клеткам подводятся питательные вещества и удаляются отходы жизнедеятельности. В них поддерживается оптимальная температура и обеспечивается дыхание живых клеток. Каждая конструкция реактора имеет свои особенности, плюсы и минусы. Это высокоспециализированные устройства, часто под каждую отдельную задачу приходится разрабатывать новую конструкцию.

Для выращивания костной ткани на объемных каркасах под воздействием определенного касательного напряжения потока жидкости чаще всего используются перфузионные биологические реакторы [27]. В перфузионных биореакторах питательная среда продавливается через объемный пористый каркас, заселенный клетками. К минусам такой системы можно отнести сложность равномерного заселения больших трехмерных каркасов [10, 27], контроль равномерного питания клеток внутри поровой системы каркасов и усложненный расчет действующих в поровой сети касательных напряжений [27], ограничения по объему выращиваемого костного материала. Каркасы для перфузионных реакторов обычно имеют форму дисков с диаметрами и высотой от единиц до нескольких десятков миллиметров [34]. Для клинически значимых объемов сложно организовывать равномерную перфузию питательной среды. Чтобы увеличить объем, который можно в дальнейшем пересаживать, предлагается

культивировать одновременно в соседних перфузионных камерах несколько каркасов.

В итоге существует множество перфузионных реакторов для различающихся материалом и пористостью каркасов, с различным устройством перфузионной камеры, оптимизированной под конкретный тип каркаса [34]. Все это затрудняет прямое сравнение результатов этих исследований. Также реакторы отличаются скоростью перфузии через каркасы. Чаще всего применяют параметры потока, соответствующие касательному напряжению до 100 мПа [27]. Но насколько эти параметры реально соответствуют течению внутри пор, остается под вопросом.

Параллельные проточные камеры наиболее часто используются для исследования клеточных культур, расположенных на плоских подложках. В таких камерах слой клеток выращивается на прямоугольной поверхности под предметным стеклом в герметичной камере под воздействием ламинарного потока (числа Рейнольдса, как правило, очень малы). В камерах могут быть реализованы все виды течений: постоянное, колебательное, пульсационное. Можно реализовывать механическое воздействие в диапазоне касательных напряжений 0,001–3 Па [35]. За исключением областей вблизи входа и выхода, поток в проточных камерах создает равномерное касательное напряжение на поверхности клеток. К минусам таких систем можно отнести протечки из-за высокого давления на входе в камеру (4–6 кПа), создаваемого насосом, прокачивающим питательную среду [36, 37]. Часто такие системы подвергают клетки значительным давлениям, хотя эти значения не выходят за рамки физиологических значений и не вызывают повреждений клеток [36]. Образующиеся в процессе работы пузырьки воздуха могут значительно менять биохимическое и биомеханическое окружение клеток и приводить к отрыву клеток от подложки. В целом параллельные проточные камеры являются чисто исследовательскими инструментами, имеют ограниченное время работы и малые размеры рабочей поверхности – характерные размеры составляют единицы-десятки миллиметров [22].

По сравнению с объемными каркасами, выращивание клеток на тонких пленках позволяет более точно и контролируемо воздействовать потоком жидкости на клетки. Для реализации этого способа профессором Ларионовым П. М. был предложен новый тип реактора – ротационный биореактор [38, 39]. В данном реакторе тонкая пленка, заселенная мезенхимальными стволовыми клетками, натягивается на цилиндрический каркас, вращающийся в питательном растворе. В отличие от классических механических реакторов, в данной конструкции нет мешалки, которая перемешивает жидкость. Движение жидкости осуществляется только за счет вращения внутреннего каркаса. Частота его вращения определяет величину касательного напряжения, действующего на клетки. Такой подход к созданию тканеинженерных конструкций позволяет с меньшими трудозатратами выращивать крупные объемы костного материала по сравнению с перфузионными реакторами.

1.4. Методы исследования течения питательной среды в биологических реакторах

Величина касательных напряжений, действующих на мезенхимальные стволовые клетки в процессе культивирования, является ключевой для их жизнеспособности и корректной дифференцировки в клетки кости. Малые величины касательных напряжений и размеры реакторов, а также особенности их геометрии затрудняют экспериментальное определение касательных напряжений [40]. Для ограниченного набора культивируемых систем существуют формулы для их оценки, однако при такой оценке не учитываются пространственные неоднородности распределения касательных напряжений [22]. В случае перфузионных реакторов сложность также заключается в хаотичной структуре поровой сети. Для перфузионных реакторов могут быть оценены только средние касательные напряжения, действующие на клетки внутри каркаса, применяя цилиндрическую модель пор. Но эти расчеты оказываются некорректны для каркасов, имеющих структуру волокнистой сетки. В результате для определения структуры

потока и величины механической нагрузки часто применяются методы вычислительной гидродинамики. Численное моделирование проводится как в коммерческом (CFD-ACE+ [41], COMSOL Multiphysics [42], ANSYS CFX [43], ANSYS Fluent [30, 44–46]), так и в свободно распространяемом ПО (OpenFOAM [47]), либо моделирование проводится самостоятельно [48].

Клетки выращиваются в специальных питательных растворах, содержащих в себе аминокислоты, витамины, микроэлементы и другие вещества, необходимые для оптимального культивирования клеток. На практике применяется множество видов питательных сред с разными составами, плотность и вязкость которых могут сильно изменяться. Производители обычно не приводят данные параметры, а в исследовательских работах они измеряются редко. В работе [49] с помощью капиллярного вискозиметра измеряли динамическую вязкость питательной среды MEME (Minimal Essential Medium-Eagle) с содержанием 10 % эмбриональной бычьей сыворотки и 0–3 % декстрана. При температуре 37 °C динамическая вязкость составила от 1 до 2,4 мПа·с соответственно для указанного диапазона концентраций декстрана, что выше, чем вязкость воды при той же температуре (0,695 мПа·с).

В вычислительной гидродинамике при расчете течения питательной среды используются значения вязкости и плотности в широких диапазонах [41, 44]. В работе [50] для определения касательного напряжения, действующего на клетки, в параллельной проточной камере с питательной средой DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), использовали динамическую вязкость 0,78 мПа·с, плотность 990 г/м³ при 37 °C. В работе [51] приводят вязкость питательной среды DMEM с содержанием 10 % эмбриональной бычьей сыворотки равную 0,94 мПа·с при комнатной температуре. В части работ вместо параметров питательной среды применяют вязкость и плотность воды [30, 37]. Можно отметить, что при моделировании течения питательной среды в работах нет единообразия в выборе параметров, что затрудняет сравнение и интерпретацию результатов.

Для валидации расчетов используются оптические методы, например, лазерная доплеровская анемометрия [52] и визуализация PIV и PTV [37, 41, 44, 53]. В качестве трассеров используют стеклянные [44] и полимерные [41] микросферы. В работе [37] течение визуализировали флуоресцентными микрочастицами, скорость потока определяли по путям, пройденным трассерами за время выдержки камеры.

Проведение параметрических расчетов с различной частотой вращения каркаса перспективно для нового ротационного биореактора, поскольку позволяет определить уровень механической нагрузки на клетки и выбрать режим культивирования в соответствии с поставленными требованиями на диапазон касательных напряжений. Изменение геометрической модели системы позволяет найти альтернативные решения для преодоления многих проблем без дорогостоящих экспериментов (поиск течения с наиболее однородным распределением касательного напряжения, циклических режимов нагрузки на клетки). Сопоставление результатов численного моделирования и экспериментальной визуализации повышает уверенность в рассчитанных значениях касательного напряжения.

1.5. Метод лазерно-индуцированной флуоресценции

Стволовые клетки, выращиваемые в ротационном биореакторе, стимулируются потоком жидкости и преобразуются в костную ткань. При этом преобразовании клетки начинают выделять в окружающую среду минеральные вещества и коллаген для уплотнения своего микроокружения. Таким образом, слой клеток начинает менять свой химический состав на микроуровне. На данном этапе технологии важной задачей является контроль состояния выращиваемой ткани и динамики нарастания костного матрикса.

Классическим методом анализа состояния биологических тканей является гистологическое исследование. Данный способ включает сложную подготовку образцов, их окрашивание специальными красителями и последующее изучение под микроскопом. После анализа извлеченный биологический материал нельзя продолжить культивировать в биореакторе,

поскольку из-за окрашивания и проводимых манипуляций он теряет жизнеспособность. В подходе выращивания костной ткани на тонких пленках, возможен оптический контроль всех этапов биотехнологии (включая адгезию клеток и длительные сроки культивирования) методом лазерно-индуцированной флуоресцентной спектроскопии. Данный метод является высокочувствительным, не требует сложной пробоподготовки и потенциально может быть встроен в систему ротационного биореактора для постоянного контроля состояния биоматериала в процессе культивирования.

Метод ЛИФ нашел широкое применение в аэрофизике и физике горения для регистрации газовых потоков и пламён [54]. Вследствие высокой чувствительности флуоресцентного излучения к изменениям состава и структуры образца, а также возможности его неинвазивного применения, метод ЛИФ активно используется при исследовании биологических тканей в качестве метода оптической диагностики различных заболеваний и паталогических процессов [55, 56]. ЛИФ применялся в коммерчески эффективном сегменте тканевой инженерии хряща [57]. Для диагностики в флуоресцентной спектроскопии используют непосредственно сравнение и анализ спектров флуоресценции здоровых и пораженных биологических тканей.

Анализ образцов по спектрам флуоресценции можно применять наряду со стандартными гистологическими методами: метод не требует сложной подготовки образцов и дополнительного окрашивания. ЛИФ позволяет использовать аутофлуоресценцию – испускание света биологическими молекулами-флуорофорами, которые уже находятся в биологических тканях. К биологическим флуорофорам относятся аминокислоты триптофан, тирозин, фенилаланин, структурные белки коллаген и эластин, НАД-Н, флавины, липопигменты, различные витамины и т. д. Так как коллаген, который выделяют стволовые клетки, является флуорофором, изменение вида ткани отражается на спектрах флуоресценции. Другие распространенные флуорофоры, например, аминокислоты тирозин и

триптофан, также могут изменять свою концентрацию и спектры в процессе роста костной ткани. Хорошо известна способность аминокислоты триптофан менять положение максимума в спектре флуоресценции в диапазоне 320–360 нм в зависимости от ее микроокружения в белках [58]. Изменение содержания флуорофоров в образцах во время культивирования в биореакторе можно использовать для диагностики образцов и контроля процесса культивирования. Поэтому важной задачей является обратная задача определения состава образцов по их спектрам флуоресценции.

Из-за того, что большинство биологических молекул многоатомные, электронные энергетические уровни, расположенные близко друг к другу перекрываются. В результате спектры испускания становятся сплошными, и в них становится невозможно различить колебательную структуру уровней. Наличие в биологических образцах нескольких флуорофоров также может усложнить анализ спектроскопических данных из-за частичного перекрывания спектров флуоресценции отдельных компонент. Широкие спектры флуоресценции отдельных флуорофоров накладываются друг на друга, приводя к сложной форме итогового регистрируемого сигнала. Кроме того, в сложной биологической молекуле, имеющей несколько хромофорных групп, поглощающих излучение, особенности спектров могут определяться процессами передачи возбуждения между данными хромофорами [58]. В результате близко расположенные хромофорные группы могут образовывать каналы, по которым возбуждение передается с одной части молекулы на другую. Данные процессы приводят к тому, что интенсивность флуоресценции флуорофоров в спектре зависит от последовательности аминокислот и структуры белков в биологических тканях. Данные явления, а также тот факт, что в конденсированных средах из-за перекрывания энергетических уровней спектры флуоресценции становятся сплошными, значительно затрудняют возможность различать отдельные спектральные линии, соответствующие конкретным веществам. Поэтому во многих работах

для диагностики сложных органических и неорганических объектов используют непосредственно форму спектра флуоресценции.

1.6. Флуорофоры биологических тканей

Обычно в конденсированной фазе атомы и простые ионы не флуоресцируют. К исключениям можно отнести UO_2^{++} , Ti^+ , Pb^{++} , Sn^{++} , а также катионы металлов из группы лантаноидов (катионы европия и тербия), люминесценция которых вызвана переходами электронов между f -орбиталями, экранированными от растворителя высокими заполненными орбиталями [59]. В то же время биологические молекулы, обладающие свойством флуоресценции, имеют в своем составе ароматические и гетероциклические структуры с системой сопряженных двойных связей. Именно возбуждением делокализованных π -электронов в двойных связях объясняется поглощение ультрафиолетового света в области 240–300 нм и излучение флуоресценции в более длинноволновой области (270–400 нм). Ароматические аминокислоты, белки, порфирины, флавины, пуриновые и пиримидиновые основания, нуклеиновые кислоты, а также многие другие биологические вещества обладают свойством флуоресценции.

Основной вклад в спектры флуоресценции биологических тканей вносят белки, составляющие почти половину сухой массы всех живых организмов. Их флуоресценция обусловлена наличием в составе ароматических аминокислот: триптофана, тирозина и фенилаланина [60].

Триптофан

Ароматическая аминокислота триптофан – это наиболее распространенный флуорофор в биологических тканях. Она является гетероциклическим соединением и относится к ряду гидрофобных аминокислот, поскольку содержит ароматическое ядро индола. Именно электронный $\pi \rightarrow \pi^*$ переход в индольном кольце является причиной поглощения триптофана в области 200–310 нм (с максимумом на 280 нм). Максимум флуоресценции триптофана находится в диапазоне 308–355 нм и зависит от его микроокружения [61].

Чувствительность триптофана к рН и полярности окружающей среды позволяет использовать его для контроля изменений в белках в различных динамических процессах [61, 62]. В связанном состоянии в белках максимум флуоресценции триптофана сдвинут в коротковолновую область по сравнению со свободным триптофаном на 10–25 нм.

Тирозин

Аминокислота тирозин относится к производным фенола, его полоса поглощения лежит в области 200–290 нм и обуславливается переходом $\pi \rightarrow \pi^*$ в ароматическом кольце. В составе белков и в свободной форме тирозин имеет максимум флуоресценции в области 303 нм, который не сдвигается при денатурации белка. Также спектр флуоресценции тирозина практически не изменяется при изменении состава его растворителя. Квантовый выход свободной формы тирозина равен 0,21, однако при связывании с другими аминокислотами он уменьшается в 8–10 раз [58].

Фенилаланин

Аминокислота фенилаланин является производной бензола, что обуславливает различия спектральных характеристик его и тирозина от триптофана. Его спектр поглощения имеет полосу в диапазоне 200–275 нм. В водном растворе спектр флуоресценции фенилаланина проявляет колебательную структуру с набором пиков при 275, 282, 289 нм. Из-за того, что молярный коэффициент поглощения фенилаланина почти на порядок меньше по сравнению с тирозином и триптофаном, в белках, содержащих все три аминокислоты, практически невозможно зарегистрировать флуоресценцию фенилаланина из-за сильной флуоресценции триптофановых и, в меньшей степени, тирозиновых остатков. Флуоресценцию фенилаланина удалось определить для кальций-связывающих белков парвальбуминов, не содержащих тирозина и триптофана [63].

Коллаген и эластин

Коллаген и эластин – фибриллярные белки, составляющие основу соединительной ткани организма: ткани кости, хряща, сухожилий и т. д.

Эластин – белок, отвечающий за упругость соединительных тканей. Он близок по свойствам к коллагену и содержится в связках и стенках кровеносных сосудов.

Молекула коллагена состоит из трех полипептидных цепей. Эти три полипептида, известные как α -цепи, соединяются друг с другом в правозакрученную спираль, связанную поперечными связями. Для аминокислотного состава коллагена характерно отсутствие триптофана, низкое содержание серосодержащих аминокислот и высокое содержание глицина. Особенностью коллагена является содержание остатков нестандартных аминокислот: 3-гидроксипролина, 4-гидроксипролина и 5-гидроксилизина. Аминокислотный состав полипептидных цепей коллагена и эластина, а также их число зависит от типа ткани, а их спектральные свойства при этом могут значительно изменяться [64, 65]. Всего описано 28 типов коллагена, при этом большая его часть приходится на коллаген первых четырех типов. Коллаген I типа является самой распространенной и наиболее подробно описанной формой коллагена, он входит в состав костей, сухожилий, связок, кожи и других соединительных тканей.

Флуоресценция коллагена и эластина обусловлена поперечными связями между α -цепями – молекулярными группами лизилпиридинолина и гидроксизилпиридинолина. Их максимумы поглощения приходится на 325 нм, а максимумы флуоресценции – на область 390–400 нм [64]. В молекулах эластина также присутствуют производные пиридина, которые имеют максимумы поглощения в области 325 нм и максимумы испускания на 400–405 нм. Флуоресценцию с максимумом около 480–520 нм в коллагене также связывают с поперечными связями [66]. В крупных молекулах коллагена редко могут флуоресцировать аминокислоты (тирозин, триптофан, гидроксизин и т. д.), но их содержание видоспецифично, сильно различается в зависимости от вида ткани (кости, хрящи, сосуды) и часто не проявляется на спектрах. Несмотря на то, что обычно флуоресценция коллагена определяется поперечными связями пиридинолина, в некоторых

случаях проявляется флуоресценция мономеров с одним из максимумов на 350 нм [67].

Известно, что при увеличении длины волны спектр флуоресценции коллагена меняется [68], что связывают с неоднородным микроокружением флуорофоров коллагена в тканях. Энергии основных и возбужденных уровней флуорофоров отличаются, из-за чего нормированные спектры флуоресценции не повторяют себя при изменении длины волны возбуждающего излучения. Таким образом, при возбуждении флуоресценции в ультрафиолетовом диапазоне обычно наблюдается пик с максимумом около 380–400 нм. При увеличении длины волны возбуждающего излучения этот пик пропадает, и спектр флуоресценции сдвигается в длинноволновую область (до 520 нм).

В процессе культивирования в клеточном материале происходит изменение концентрации многих веществ, в том числе после превращения стволовых клеток в остеобласты, последние начинают синтезировать коллаген для заполнения и укрепления окружающей среды [22].

Другие флуорофоры

Рибофлавин (В2) является производным гетероциклического соединения диметилизоаллоксазина. Он является одним из наиболее важных водорастворимых витаминов, кофермент многих биохимических процессов. Водные растворы рибофлавина характеризуются желто-зеленой флуоресценцией, которая ослабевает при сдвиге рН в щелочную или кислую стороны. Максимум флуоресценции приходится на 530 нм, а максимумы поглощения – на 220–225, 266, 371, 444 и 475 нм [61].

Помимо перечисленных выше веществ, в биологических тканях так же флуоресцируют флаavin аденин динуклеотид (ФАД) и никотинамид аденин динуклеотид (НАД-Н, НАД⁺), которые являются коферментами и принимают участие во многих окислительно-восстановительных биохимических процессах. Молекулы НАД-Н поглощают в области 340 нм, флуоресцируют в диапазоне 440–450 нм [64]. Квантовый выход

флуоресценции НАД⁺ ниже, чем у НАД-Н [69]. ФАД поглощает на длине волны 450 нм, а флуоресцирует на 550 нм. В отличие от НАД-Н, восстановленная форма ФАД-Н₂ свет не испускает. По изменению концентрации НАД-Н и коллагена ЛИФ позволяет диагностировать различные виды опухолей [70].

1.7. Особенности флуоресценции в биологических тканях

Спектры возбуждения и флуоресценции основных флуорофоров биологических тканей приведены на Рис. 1. Спектры возбуждения разных флуорофоров значительно отличаются друг от друга, однако, видно, что использование лазерного излучения в ультрафиолетовой области позволяет одновременно возбуждать флуоресценцию большого числа флуорофоров в тканях.

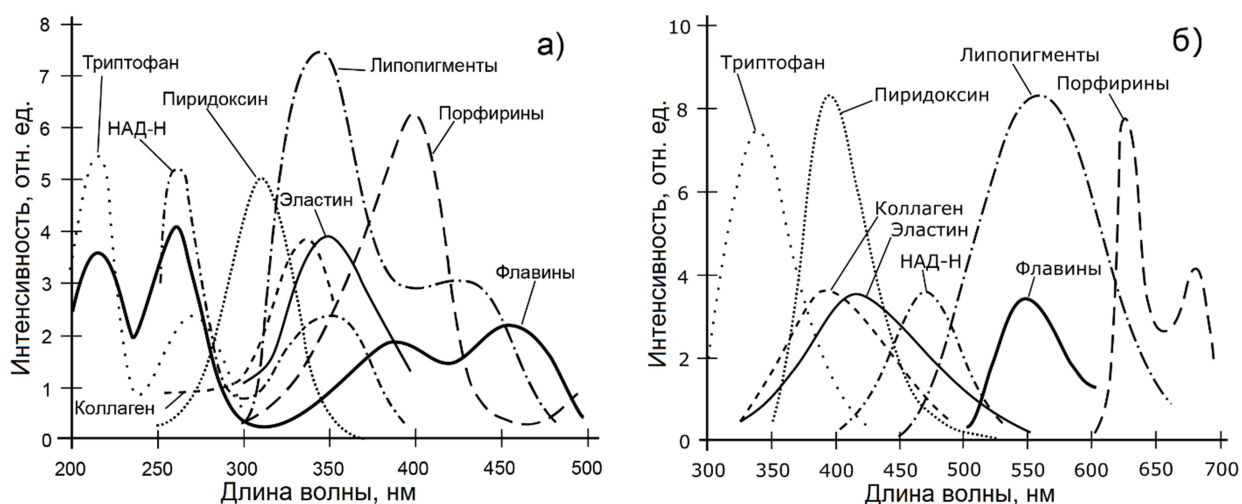


Рис. 1. Спектры возбуждения (а) и флуоресценции (б) некоторых эндогенных флуорофоров [71].

Аминокислота триптофан обладает наиболее интенсивной флуоресценцией из всех представленных тканевых флуорофоров, ее флуоресценция часто преобладает над остальными компонентами. Примером является белок – сывороточный альбумин человека, содержание триптофана в котором крайне мало: на один триптофан приходится 17–18 молекул тирозина и 33 молекулы фенилаланина [58]. В белках активно происходят процессы миграции энергии, происходящие в направлении

фенилаланин → тирозин → триптофан. Наибольшее количество работ посвящено исследованию переноса энергии от тирозина к триптофану. Для полипептидных цепей, содержащих тирозин и триптофан, был выявлен вклад тирозинового поглощения — сенсibilизированная флуоресценция. Для большинства исследуемых белков было показано, что процесс переноса энергии дает средний вклад около 10–20 % от общей интенсивности [58]. В то же время из-за низкого коэффициента поглощения фенилаланина, процесс передачи энергии с него игнорируется.

Поглощение и рассеяние

Биологические ткани являются оптически протяженными, поэтому в них большую роль играют процессы поглощения и рассеяния света. Эти процессы могут значительно изменять форму спектра флуоресценции, а также влиять на интенсивность испускания. Поэтому вклады данных эффектов также важно учитывать при выявлении флуоресцирующих компонент в смесях.

Оптические свойства биологической ткани во многом определяются ее типом, а также длиной волны распространяющегося в ней излучения. В обзоре [72], а также в книге [73] приведено сравнение известных коэффициентов поглощения и рассеяния для множества типов тканей, в том числе ткани аорты, мозга, мышцы и кожи человека. Полноценное сравнение данных затрудняет тот факт, что работы с разными тканями проводились с использованием лазеров с различными длинами волн. При этом диапазон ультрафиолета с длинами волн меньше 300 нм использовался крайне редко. Однако по данным, представленным в приведенных выше источниках, можно сделать вывод, что для большинства тканей коэффициент рассеяния больше коэффициента поглощения на длинах волн 600–1000 нм, то есть для образцов с достаточно большой толщиной (более 100 мкм) свет в ткани рассеивается полностью. При этом за счёт сильного рассеяния, лазерный пучок значительно уширяется при распространении в ткани. В диапазоне

длин волн 200–600 нм происходит обратная ситуация: коэффициент поглощения больше или сравним с коэффициентом рассеяния.

Ультрафиолетовое излучение проникает в биологические ткани на глубину до 100 мкм в зависимости от длины волны и типа ткани [74]. Чтобы избавиться от влияния рассеяния света и реабсорбции флуоресценции на пути его распространения необходимо подготовить оптически тонкие образцы, в которых лазерное излучение поглощается тканью на глубине значительно меньшей, чем глубина поглощения на длине волны флуоресценции. Оптическая прозрачность может быть достигнута тонкими срезами, либо сильным разведением для растворов. Для большинства флуорофоров форма спектра флуоресценции каждого флуорофора не зависит от длины волны возбуждения из-за колебательной релаксации. Для оптически тонкого образца это означает, что вклад каждого флуорофора пропорционален произведению спектров возбуждения и флуоресценции. Таким образом, для них можно воспользоваться следующей формулой для определения спектра флуоресценции многокомпонентной смеси [75]:

$$f(\lambda_{\text{в}}, \lambda_{\text{ф}}) = \sum_m^M a_m E_m(\lambda_{\text{в}}) F_m(\lambda_{\text{ф}}). \quad (1)$$

Здесь $f(\lambda_{\text{в}}, \lambda_{\text{ф}})$ – интенсивность флуоресценции на длине волны $\lambda_{\text{ф}}$ при возбуждении на длине волны $\lambda_{\text{в}}$, a_m – весовые коэффициенты, пропорциональные концентрации флуорофоров, $E_m(\lambda_{\text{в}})$ – спектр возбуждения, $F_m(\lambda_{\text{ф}})$ – спектр флуоресценции m -того флуорофора, M – общее число флуорофоров в ткани. При построении модели биологическая ткань предполагается однородной с равномерным распределением хромофоров.

Фотообесцвечивание

Параметры взаимодействия лазерного излучения с тканями зависят от оптических свойств ткани (однородность образца, коэффициенты поглощения и рассеяния), а также от характеристик источника излучения (интенсивность, длина волны, длительность и частота повторения импульсов и т. д.). Взаимодействие света с биологическими тканями представляет собой

отдельную область исследований. Низкоинтенсивное лазерное излучение используется для фотохимической биостимуляции изменяя биологическую активность молекул [73]. Фотодинамическая терапия является примером использования лазерного излучения для запуска цепи фотохимических реакции с образованием синглетного молекулярного кислорода, а затем гидроксилрадикалов, которые разрушают опухолевые клетки, взаимодействуя с биологическими молекулами. При высоком значении плотности мощности излучения происходят необратимые изменения и разрушения внутри- и межмолекулярных связей и, как следствие, жизненных функций биологического объекта из-за тепловых эффектов. Тепловое разрушение ткани происходит при времени воздействия 10^{-6} – 10^2 с и плотности 1 – 10^6 Вт/см², а взрывная абляция — при времени 10^{-8} – 10^{-6} с и плотности 10^7 – 10^9 Вт/см² [73].

Для каждого флуорофора среднее число циклов возбуждения и излучения, которые происходят до его фотообесцвечивания, зависит от молекулярной структуры и микроокружения. Некоторые флуорофоры обесцвечиваются достаточно быстро, испуская всего несколько фотонов, в то время как другие могут пройти тысячи или миллионы циклов возбуждения и флуоресценции. Поэтому спектры флуоресценции сложных смесей флуорофоров могут постепенно меняться в течение облучения. Существуют статьи посвященные исследованию выцветания ткани кожи [76] на длине волны 442 нм (гелий-кадмиевый лазер) и аорты на длинах волн 337 (азотный лазер) и 476 нм (аргоновый лазер) [77]. В статье [78] исследовалось фотообесцвечивание эндогенных флуорофоров в ткани кожи *in vivo* при лазерном облучении на 337, 532, 633 и 670 нм при разных мощностях. Особенности обесцвечивания тканей в диапазоне более коротких длин волн изучены довольно слабо. Поэтому из-за повышенной интенсивности излучения и фотообесцвечивания образцов работа с излучением в диапазоне 210–290 нм требует особого контроля.

1.8. Применение ЛИФ в биологии и медицине

Распространенным направлением работ с использованием метода ЛИФ является разработка методик диагностики рака, в частности опухолей головного мозга [79], толстой кишки [80], ротовой полости [81], шейки матки [70], кожи [82] и т. д., а также диагностики атеросклероза сосудов [83] и других заболеваний [55, 84]. Для возбуждения флуоресценции используют лазеры с различными длинами волн, и чаще всего приводится только сравнение спектров пораженных и здоровых тканей с минимальным анализом без количественного описания. Кроме того, в большинстве существующих работ используют лазерное излучение с длиной волны больше 300 нм. Между тем, коротковолновый ультрафиолетовый диапазон длин волн возбуждения представляет особый интерес. При работе в коротковолновом диапазоне (210–290 нм) можно одновременно возбуждать флуоресценцию большого числа тканевых флуорофоров, таких как аминокислоты триптофан, тирозин, а также частично структурные белки коллаген и эластин. Флуоресценция триптофана сильно зависит от его микроокружения, поэтому изменения в состоянии тканей способны отражаться на их спектрах. Благодаря тому, что в ультрафиолетовом диапазоне возбуждается также и коллаген, анализ спектров ЛИФ с длинами волн возбуждения 210–290 нм может быть использован при построении метода диагностики костной ткани, культивируемой в биореакторе.

Важным направлением является исследование заболеваний костной ткани, например, остеопороза [85] и остеосаркомы [86]. В работе [86] авторы показали, что интенсивность флуоресценции злокачественных костных клеток были меньше, чем у здоровых при возбуждении на длине волны 405 нм. Авторы соотнесли пики в спектрах флуоресценции на длинах волн 486 нм и 575 нм для здоровых клеток и на 482 нм и 586 нм для клеток опухоли с НАД-Н и рибофлавином.

Наряду с оптической когерентной томографией и Рамановской спектроскопией, метод ЛИФ как неразрушающий и неинвазивный метод

может быть использован для оценки качества биоинженерных тканей в процессе культивирования. Авторы известных работ в данной области используют метод ЛИФ с временным разрешением [87, 88]. Работа [87] была нацелена на мониторинг процесса преобразования жировых стволовых клеток лошади в хондрогенные ткани (ткани хряща) на каркасе на основе PLGA (poly(lactide-co-glycolide)). В работе [88] было показано, что метод ЛИФ с временным разрешением может быть применен для оценки качества биоинженерных тканей перед трансплантацией. Авторы показали, что с помощью метода флуоресцентной спектроскопии можно оценить относительную экспрессию коллагенов (типов I, III, IV и V) в формирующемся из стволовых клеток PLA (Processed Lipoaspirate Cells), выделенных из жировой ткани. В обеих работах использовался азотный лазер с длиной волны 337,1 нм.

В части вышеперечисленных работ для получения спектров флуоресценции использовались лазеры с постоянной длиной волны излучения. Однако больший интерес представляет возбуждение флуоресценции в биологических образцах последовательно несколькими длинами волн. Спектры флуоресценции многокомпонентных смесей меняют свою форму при смене длины волны возбуждающего излучения из-за разной эффективности возбуждения флуоресцирующих компонент. Зависимости спектров флуоресценции от длины волны возбуждающего излучения называются матрицами возбуждения-эмиссии. Анализ таких матриц дает дополнительную информацию о спектрах возбуждения флуорофоров в исследуемом образце, что также можно использовать в статистическом анализе спектров [89]. Так как все флуорофоры имеют свои уникальные спектры возбуждения и флуоресценции, то матрицы возбуждения-эмиссии, содержащие эту информацию, могут служить для точной идентификации компонент в сложных образцах. В существующих работах чаще всего применяют одну длину волны возбуждения [90], а в случаях, когда длин волн несколько, чаще всего диапазон между длинами волн не позволяет в полной

мере получить информацию о спектрах возбуждения компонент смеси [91]. Перспективным в данном моменте видится применение перестраиваемых лазеров с шагом между устанавливаемыми длинами волн в 5–10 нм [92]. В литературе известно использование анализа матриц возбуждения-эмиссии, полученных методом ЛИФ, для диагностики опухоли мочевого пузыря [93], легких [94], аденоматоза толстой кишки [80].

1.9. Обработка спектральных данных

Важной задачей является обратная задача определения состава образцов по их спектрам флуоресценции. В большинстве работ при описании флуорофорного состава биологической ткани и динамики изменения спектра флуоресценции ограничиваются визуальным анализом на основе информации о максимумах флуоресценции известных флуорофоров. Однако спектры флуоресценции отдельных компонент в многокомпонентных образцах накладываются друг на друга, приводя к сложной форме итогового регистрируемого спектра. Распознать отдельные флуоресцирующие компоненты визуально по таким спектрам сложно.

Иногда для определения состава образца, его спектр флуоресценции представляют в виде суммы спектров известных флуорофоров [75]. Однако данный подход неприменим для случая, когда в состав образца входят неизвестные заранее флуорофоры или в биологических тканях спектры веществ меняются непредсказуемым образом. Единственным способом остаётся физическое или химическое разделение образцов на составляющие с целью определить спектр неизвестной компоненты [95].

В хемометрике алгоритмы для расчета чистых спектров флуорофоров составляют группу методов разрешения многомерных кривых (MCR – Multivariate Curve Resolution) [96]. К наиболее часто используемым методам можно отнести алгоритм чередующихся наименьших квадратов (MCR-ALS) и алгоритмы факторного анализа (PARAFAC, EFA и т. д.). Они используют модель оптически тонких образцов (1) и позволяют вычислять спектральные и концентрационные профили двумерных массивов данных. Однако

алгоритмы MCR связаны с проблемой неоднозначности находимого решения для некоторых комбинаций чистых спектров [97]. Существуют теоремы, описывающие условия, при которых спектры не могут быть восстановлены точно этими алгоритмами [98]. Например, в соответствии с ними при полном наложении одного спектра флуоресценции на другой, у первого вещества не получится точно восстановить концентрационный профиль, а у второго – спектральный.

MCR-ALS (Alternating Least Squares) – мощный метод решения задач MCR [99]. С ограничением на неотрицательность решения он позволяет находить чистые спектры отдельных компонент. Однако, поскольку метод является итерационным, итог расчета зависит от начальной оценки спектров, в результате алгоритмом рассчитывается набор эквивалентных решений. Этот набор можно сократить, используя правильную начальную оценку векторов спектров [97]. Распространенный способ – определить спектральные окна (например, методом эволюционного факторного анализа EFA), в которых спектральные данные считаются ненулевыми. Оптимальный подбор спектральных окон позволяет находить решение, близкое к чистым спектрам. Но алгоритм EFA не подходит для данных, в которых один спектр флуоресценции полностью накладывается на другой. Таким образом, минимизировать неоднозначность получаемого решения можно, но полностью от нее избавиться невозможно. Кроме того, решение часто зависит от выбора начального приближения спектров. По этой причине нужен другой способ извлекать информацию о чистых веществах из регистрируемых спектров.

Наряду с алгоритмом MCR-ALS, одним из широко используемых исследовательских методов является метод главных компонент (МГК). МГК – статистический метод анализа, который позволяет найти основные закономерности в исходных данных и значительно сократить их объем [90, 91, 100, 101]. Помимо применения в спектроскопии, в настоящее время МГК используется для таких задач как распознавание лиц, походки и т. д.

Математически поиск главных компонент для данных, имеющих структуру двумерных матриц X_{ij} , может быть сведен к сингулярному разложению матриц и поиску левых и правых сингулярных векторов. Эти вектора ортогональны друг другу по построению и определяют направления наибольшей выборочной дисперсии (главные компоненты). Для уменьшения размерности исходных данных оставляют наиболее значимые компоненты, максимально описывающие дисперсию.

На практике для вычисления векторов главных компонент применяют итерационный алгоритм на основе метода наименьших квадратов. Главные компоненты вычисляются последовательно поиском наилучшего приближения исходных данных X_{ij} матрицей вида $a_i b_j$. Сначала ищется первое приближение (первая главная компонента) $P_1 = a_i^{(1)} b_j^{(1)}$. Далее, рассчитывается разность $X_{ij} - P_1$ и для остатка вычисляется следующая пара векторов $a_i^{(2)} b_j^{(2)}$. Процедура расчета новых векторов повторяется, пока доля необъяснённой дисперсии не станет достаточно малой. Аппроксимация левых и правых сингулярных векторов рассчитывается нормировкой векторов a_i и b_j и включением нормировочного коэффициента в сингулярное число. Матрицы, составленные из векторов a_i и b_j , называются матрицами счетов и нагрузок.

МГК позволяет определить число значимых флуоресцирующих компонент в наборе образцов, но не дает самих спектров флуоресценции. Счета и нагрузки в МГК представляют собой абстрактные профили концентрации и спектры флуоресценции спектральных данных. По построению (из-за ортогональности) главные компоненты знакопеременны, поэтому их невозможно сопоставлять с положительно определенными реальными спектрами веществ. Поэтому прямой качественный анализ невозможен. Однако главные компоненты являются линейными комбинациями чистых спектров, поэтому для восстановления чистых спектров можно решить обратную задачу. Для вычисления используются вектора нагрузок, которые представляют собой абстрактные спектры

флуоресценции. Поскольку положительно определенных линейных комбинаций много, для того, чтобы выбрать из-них единственную, следует привлекать дополнительные условия. Одним из таких условий может быть условие наименьшей ширины пика для каждого чистого вещества [102]. Данное условие проверяется по отношению максимума интенсивности спектра к его площади (чем оно больше, тем уже пик). В отличие от MCR-ALS такой метод позволяет получить единственное решение для любого набора спектральных данных, состоящих из одного набора флуорофоров. Однако чистые спектры флуоресценции не обязательно являются узкими сами по себе. Поэтому данный метод не всегда рассчитывает чистые спектры точно: в случае, когда один пик полностью лежит в спектральном диапазоне другого, первый будет восстанавливать точно, а второй будет рассчитан более узко, чем он есть на самом деле [102].

В статье [100] авторы разработали алгоритм, основанный на МГК для диагностики и оценки степени поражения плоского эпителия шейки матки. В [101] сравнили результаты МГК анализа, а также алгоритмов, основанных на сравнении соотношения сигнала флуоресценции при двух и трех длинах волн возбуждения, для классификации спектров аутофлуоресценции карциномы носоглотки. Их результаты показали, что МГК может достичь более высокой точности диагностики для обнаружения рака носоглотки, так как данный метод использует информацию со всех спектров флуоресценции в матрицах возбуждения-эмиссии.

В работе [90] авторы применили алгоритм, основанный на МГК, для анализа спектров флуоресценции опухоли яичников, полученных при возбуждении лазером на 325 нм. Эффективность анализа была оценена путем расчета статистических параметров специфичности, чувствительности и точности и составила 100 %, 90,9 % и 94,2 % соответственно. В статье [91] исследовались стадии фиброза печени методом флуоресцентной спектроскопии с использованием излучения лазеров на длинах волн 330, 365 и 405 нм. Была показана корреляция между формой спектров флуоресценции

и уровнем фиброза в образце печени, а анализ данных алгоритмом МГК показал способность дифференцировать различные стадии фиброза со специфичностью и чувствительностью, превышающими 90 % и 95 % соответственно.

МГК дает достаточно хорошие результаты при распознавании образцов, но во всех представленных работах, посвященных диагностике заболеваний, метод применяется только для дифференцировки здоровых и поврежденных тканей. Авторы не проводят разложение спектров флуоресценции на отдельные компоненты, ограничиваясь визуальным анализом спектров. В алгоритмах обработки используются отношения вкладов главных компонент, так как главные компоненты являются знакопеременными за счет ортогональности построения, и из-за этого их невозможно идентифицировать как относящиеся к конкретным флуорофорам.

1.10. Заключение

Технология тканевой инженерии является перспективной для решения множества медицинских задач, в том числе для восстановления крупных костных дефектов, когда организм пациента не способен восстановить ткани собственными силами. Как новый метод, создание тканеинженерных конструкций требует построения методов контроля всех этапов их изготовления: от создания и заселения каркасов, культивирования их в биореакторе, анализа качества получаемых композитных материалов до встраивания в организм пациента на место поврежденных тканей [103 – 105].

Складывание объемных каркасов из тонких листов представляет интерес благодаря простоте заселения плоской поверхности клетками и создания сложных форм. Для реализации этого метода был предложен способ культивирования стволовых клеток на тонких пленках из поликапролактона в новом биореакторе ротационного типа [38, 39]. Течение жидкости предлагается создавать только за счет вращения поверхностей каркаса, на который натягивается пленка. Поскольку конструкция реактора является

новой, обработка данной технологии включает в себя решение множества отдельных задач, связанных как с биологией и медициной, так и с механикой.

Первый важный аспект работы с новым биореактором связан с определением в нем структуры течения питательной среды и имеет большое практическое значение, поскольку величина касательного напряжения способна влиять на эффективность преобразования стволовых клеток в остеобласты за счёт эффекта механотрансдукции. Уровень механического воздействия со стороны среды на размещенные на поверхности пленки клетки с трудом поддается непосредственному измерению из-за малых значений касательного напряжения (от 2 до 100 мПа [28, 29]), однако, он может быть рассчитан с помощью численного моделирования. Для численного моделирования было выбрано ПО Ansys Fluent – мощный инструмент для расчета задач вычислительной гидродинамики. Расчеты, проводимые с различными частотами вращения внутреннего каркаса, позволяют определить диапазон, который может быть использован для реализации оптимальных касательных напряжений. Изменение геометрии системы позволяет быстро оценить перспективы конструктивных изменений, в частности определить режимы работы со стабильным равномерным течением, либо циклическим воздействием на клеточную культуру.

Вторым методом контроля работы биореактора является ЛИФ спектроскопия, применяемая для анализа качества тканеинженерных конструкций кости после культивирования. Для оценки эффективности преобразования стволовых клеток в клетки кости требуется алгоритм анализа спектров флуоресценции, дающий информацию об изменении уровня коллагена в культивируемых образцах. Настоящие методы оценки эффективности дифференцировки стволовых клеток основаны на методе ЛИФ с временным разрешением и не дают информацию о содержании конкретных флуорофоров в образцах тканей. Поэтому на данный момент актуальна разработка метода диагностики биологических тканей с неизвестным составом, которая включает в себя получение информации о

количестве флуоресцирующих компонент в образце, их спектрах возбуждения и флуоресценции. Применяющиеся в настоящее время алгоритмы MCR часто не позволяют точно восстановить чистые спектры из-за особенностей пересечения спектров.

Целью настоящей работы являлась разработка технологии тканевой инженерии костной ткани, заключающейся в выращивании костного материала на тонкой полимерной пленке в новом ротационном биореакторе. Исходя из представленного обзора, в данной работе были поставлены следующие задачи:

- с помощью численного моделирования определить параметры работы ротационного реактора, обеспечивающие оптимальную дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток в клетки кости за счет воздействия касательным напряжением потока жидкости

- определить рекомендаций по выбору режима работы реактора, структуры течения и по величине механической нагрузки на культивируемый материал;

- проверить возможности технологии тканевой инженерии костной ткани на основе тонких полимерных пленок;

- с помощью численного моделирования определить перспективы изменения конструкции ротационного биореактора для оптимизации технологии выращивания клеток на тонких пленках;

- разработать метод оптического контроля роста костной ткани из стволовых клеток в процессе культивирования в ротационном биореакторе методом ЛИФ.

ГЛАВА 2. ЧИСЛЕННОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ТЕЧЕНИЯ ЖИДКОСТИ В ПОЛОСТИ РОТАЦИОННОГО БИОЛОГИЧЕСКОГО РЕАКТОРА

В новом биореакторе движение жидкости генерируется вращающимися поверхностями каркаса пленки за счет эффекта вязкости, а уровень воздействия потоком жидкости на клетки определяется частотой вращения каркаса. Поэтому для нового биореактора необходимо определить тот диапазон частот вращения, который позволяет получить касательные напряжения на биоматериале, считающиеся подходящими для стимуляции стволовых клеток (около 10 мПа). Измерение касательных напряжений напрямую не представляется возможным из-за малости этих величин в биореакторе. Для решения этой задачи хорошо подходит численное моделирование, так как с его помощью можно достаточно просто оценить уровень механической нагрузки на клетки. Оно позволяет не проводить множество дорогостоящих и длительных медицинских экспериментов с клетками. Расчеты течения жидкости в реакторе с учетом геометрии системы позволяют охарактеризовать структуру течения питательной среды и определить количественные параметры (касательное напряжение жидкости, действующее на клетки, давление, скорость течения и т. д.), которые в дальнейшем можно использовать на практике.

2.1. Математическая модель ротационного биореактора

На Рис. 2а представлен рабочий образец ротационного биореактора с исходно предложенной конструкцией. Биореактор представляет собой стеклянный сосуд, заполненный питательной культуральной средой, в которую соосно на трех тонких проволоках погружен каркас, с закрепленной на нем пленкой с клетками. Полимер поликапролактон (PCL) используется как основа для тонкой пленки, которая формируется из нитей на установке для электроспиннинга [106]. Пленки заселяют стволовыми клетками и натягивают на каркас таким образом, чтобы заселенная поверхность была обращена наружу к стенке (Рис. 2б). Для поддержания герметичности и

стерильности аппарата во время работы вращение каркаса передается с двигателя через магнитную муфту. Замена питательной среды производится через специальное отверстие, расположенное выше уровня жидкости. При работе реактора течение жидкости возникает только вследствие вращения каркаса пленки, конструкция не имеет дополнительных лопастей для перемешивания среды. Таким образом, под воздействием индуцирующих факторов (специальных веществ, добавленных в питательную среду) и касательных напряжений стволовые клетки преобразуются в остеобласты, формируя костную ткань.

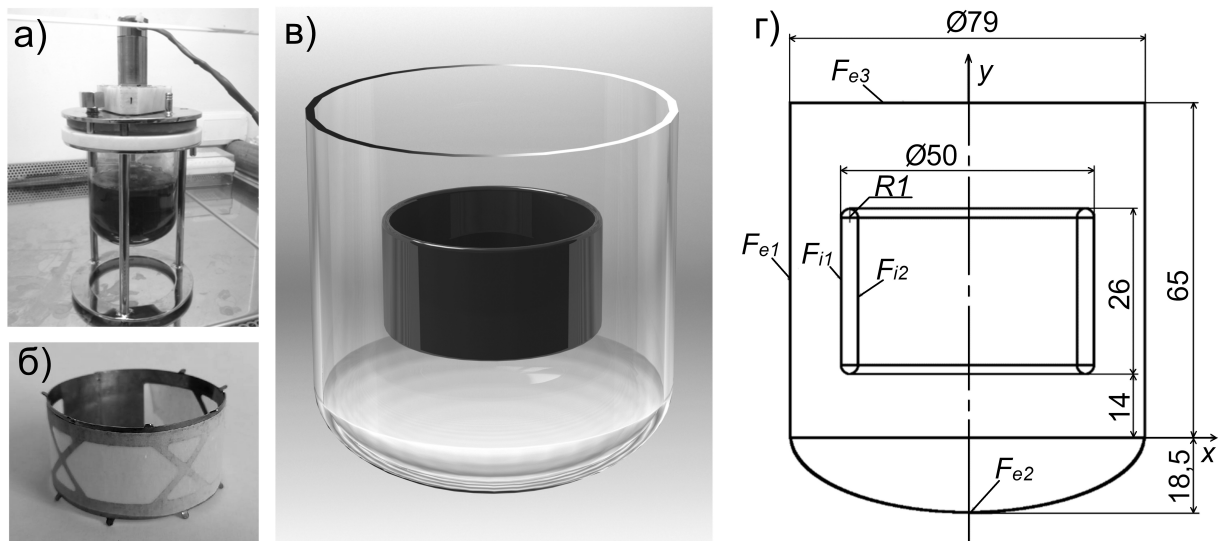


Рис. 2. Образец ротационного биореактора (а) и каркас для полимерной пленки (б). Принципиальная схема нового биореактора (в). Геометрическая модель нового биореактора (г). F_{e1} , F_{e2} , F_{e3} – внешние поверхности; F_{i1} , F_{i2} – поверхности каркаса для пленки. Размеры указаны в миллиметрах.

Для того чтобы оценить значение касательного напряжения, действующего на стволовые клетки, была построена упрощенная геометрическая модель. Область расчета течения соответствовала объему, который занимает питательная среда (Рис. 2в, г) в стеклянном корпусе. Схематически она состояла из цилиндрического объема (поверхность F_{e1}) со скругленным снизу дном (поверхность F_{e2}). Дно реактора представляло собой

поверхность сплюснутого эллипсоида вращения с отношением осей, равным 0,468. Поверхность питательной среды (граница с воздухом) моделировалась плоскостью (поверхность F_{e3}). Каркас для пленки (Рис. 2б) упрощенно моделировался отрезком трубы с высотой 25 мм, внешним диаметром 50 мм и толщиной 2 мм (поверхности F_{i1} , F_{i2}). Плоские торцевые поверхности сегмента трубы заменялись тороидальными поверхностями для упрощения расчета. Крепление каркаса пленки к оси двигателя не моделировалось. В данной модели условия вращения ставились только на поверхности внутреннего каркаса пленки (F_{i1} , F_{i2}), а все остальные поверхности оставались неподвижными. В исходной модели ротационного биореактора рабочая поверхность, на которой размещается пленка с биоматериалом, соответствует внешней поверхности каркаса F_{i1} (Рис. 2г). Ось y совпадала с осью вращения каркаса и была направлена вверх. Математическая модель реактора была объемной, так как планировалось проводить расчеты с несимметричной геометрией реактора. Это сделало схему расчета единообразной и упростило последующее сравнение результатов.

В медицинской практике для культивирования клеток вне организма (*ex vivo*) широко используется жидкая среда DMEM с различными добавками в зависимости от типа клеток. Плотность и вязкость питательных сред могут отличаться из-за больших различий в составе. Производители обычно не приводят данные параметры, а в исследовательских работах они измеряются редко. В численном моделировании течения жидкости в реакторах часто применяют параметры для воды [30, 37]. Поэтому в данной модели питательная среда тоже была заменена водой при комнатной температуре (плотность 998,2 кг/м³ и динамическая вязкость 1 мПа·с).

Для построения численного решения использовали пакет Ansys Fluent 18.0. Расчеты проводились на кластере Информационно-вычислительного центра НГУ. Для описания течения культуральной среды использовалась система уравнений Навье-Стокса для несжимаемой жидкости. Теплообмен и гравитационные силы в поставленной задаче не

учитывались. Для жидкости на внешних поверхностях F_{e1} и F_{e2} ставились условия неподвижности стенки и прилипания; на поверхности F_{e3} – неподвижности стенки и равенства нулю касательного напряжения. На поверхностях каркаса F_{i1} , F_{i2} ставились условия вращения поверхности вокруг оси реактора и прилипания. В качестве начальных данных во всей области определения задачи задавались нулевые поля скорости $U_x = U_y = U_z = 0$ и давление. Частоты вращения каркаса в данной модели: 0,083, 0,125, 0,167, 0,2 и 0,233 Гц, что соответствовало 5, 7,5, 10, 12, 14 об/мин. Режим течения полагался ламинарным. Численное решение строилось методом установления.

При дискретизации использовалась тетраэдрическая сетка с призматическими элементами в пристеночных областях, примыкающих к поверхностям каркаса F_{i1} , F_{i2} . Вблизи поверхностей каркаса дополнительно введено сгущение сетки из пяти слоев. На примыкающем непосредственно к поверхности цилиндра слое величина шага по направлению нормали к поверхности была в 10 раз меньше, чем в ядре потока и возрастала с коэффициентом роста 1,2. На Рис. 3 показан фрагмент сетки, построенной вокруг внутреннего каркаса пленки. При тестировании алгоритма была выполнена серия расчетов с числом элементарных объемов от $1 \cdot 10^6$ до $4 \cdot 10^6$. Поскольку основной целью работы является расчет касательных напряжений на внешней поверхности внутреннего каркаса (где расположены клетки), оценка качества дискретизации проводилась путем сравнения касательного напряжения, осредненного по этой поверхности. В результате оценки получено, что оптимальной является дискретизация с $3,1 \cdot 10^6$ элементарных объемов, с которой были выполнены представленные далее расчеты.

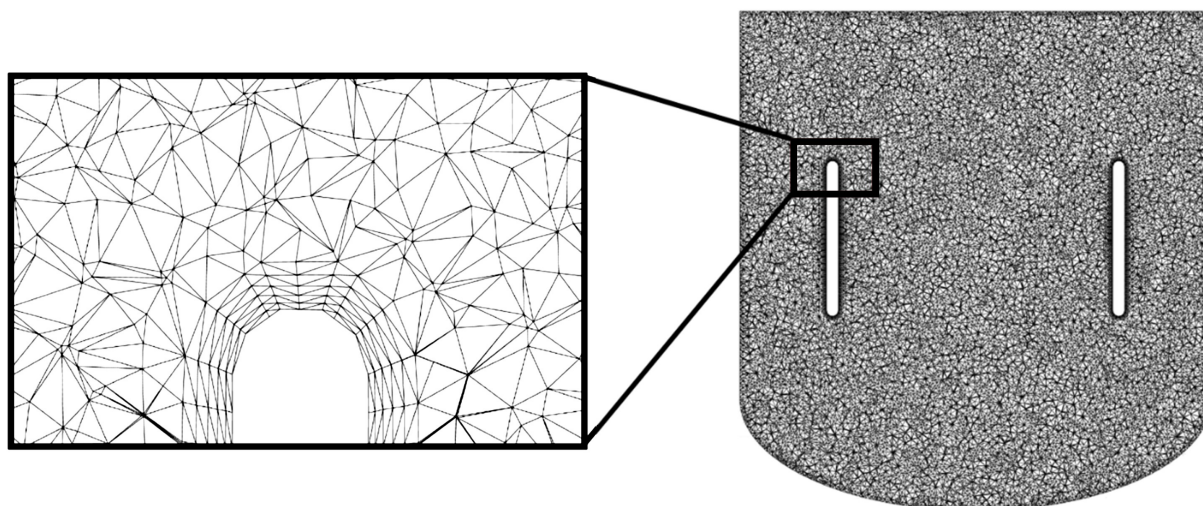


Рис. 3. Ступенчатое сужение сетки вблизи поверхностей каркаса пленки.

2.2. Верификация математической модели

Принципиально ротационный биореактор состоит из двух соосных цилиндрических поверхностей с неподвижным внешним цилиндром и вращающимся внутренним. Поэтому тип течения в нем схож с течением Куэтта-Тейлора (течение вязкой жидкости, возникающее под действием сил вязкого трения в кольцевом зазоре между двумя вращающимися соосными цилиндрами) [107]. Структуру течения в такой системе можно предсказать, ориентируясь на число Тейлора (Ta):

$$Ta = \frac{U_i \cdot d}{\nu} \sqrt{\frac{d}{R_i}} \quad (2)$$

Здесь R_i и U_i – радиус (м) и окружная скорость внутреннего цилиндра (м/с), d – зазор между цилиндрами (м), ν – коэффициент кинематической вязкости жидкости (м²/с).

Если $Ta < 41,3$, то существует устойчивое точное решение системы уравнений Навье-Стокса, которое называется ламинарным течением Куэтта. Если $41,3 < Ta < 400$, то течение теряет устойчивость, перестраивается, и в зазоре возникают вихри, имеющие чередующиеся направления вращения (ламинарное течение с вихрями Тейлора). Дальнейшее увеличение скорости вращения приводит к турбулентному течению [107].

Расчеты течения в биореакторе проводились в диапазоне частот вращения внутреннего каркаса $0,083 < f < 0,233$ Гц, что соответствовало ламинарному течению с вихрями Тейлора (Таблица 1). В таблице также указаны числа Рейнольдса для указанных частот вращения.

Таблица 1. Числа Тейлора (Ta) и Рейнольдса (Re) при использованных частотах вращения каркаса.

f , Гц	0,083	0,125	0,167	0,2	0,233
Ta	144,3	216,4	288,6	346,3	404
Re	189,5	284,2	378,9	454,7	530,5

Для верификации созданного вычислительного алгоритма использовалась задача определения поля течения в зазоре между вращающимися коаксиальными цилиндрами [39]. Когда вращается только внутренний цилиндр, а внешний неподвижен, точное решение для распределения скорости в ламинарном течении Куэтта имеет вид [108]:

$$U = \frac{\omega}{r \cdot (R_e^2 - R_i^2)} \cdot (-R_i^2 \cdot r^2 + R_i^2 \cdot R_e^2). \quad (3)$$

Здесь ω – угловая скорость внутреннего цилиндра (рад/с), R_e и R_i – радиусы внешнего и внутреннего цилиндров (м), r – текущее значение радиуса (м), при этом $R_i \leq r \leq R_e$.

Для сравнения с точным решением было рассчитано течение в зазоре между равновеликими по высоте цилиндрами высотой $h = 65$ мм, радиусом внутреннего цилиндра $R_i = 25$ мм, радиусом внешнего цилиндра $R_e = 30$ мм, угловой скоростью $\omega = 0,785$ рад/с. Число Тейлора Ta при этом было равно 40 (ламинарное течение Куэтта). Результаты сравнения представлены на Рис. 4. Здесь по оси абсцисс отложено значение текущего радиуса в зазоре, по оси ординат – модуля скорости. Сплошная кривая соответствует представляемым результатам расчета из ANSYS, точки – точному решению для ламинарного течения Куэтта (3), пунктирная линия соответствует

плоскому течению Куэтта. Сравнение окружной скорости показало, что используемый алгоритм хорошо повторяет аналитические решения для плоского и ламинарного течения Куэтта.

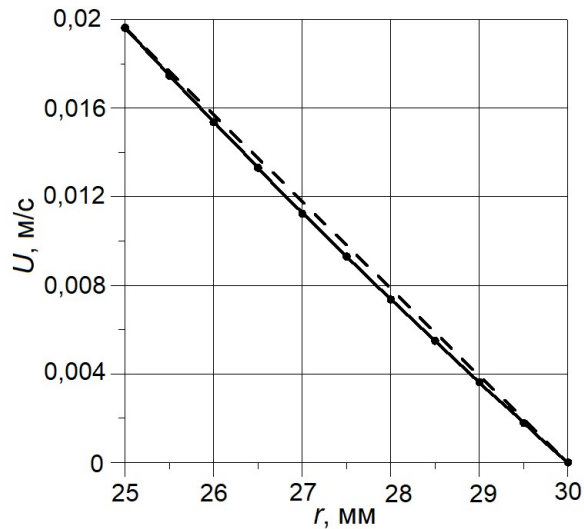


Рис. 4. Сравнение численного и точного решения. Сплошная линия – численное решение из ANSYS, точки – точное решение ламинарного течения Куэтта для задачи двух цилиндров, пунктирная линия – плоское течение Куэтта.

2.3. Валидация вычислительного алгоритма, оптическая визуализация течения в биореакторе

Для экспериментального изучения течения жидкости внутри ротационного биореактора была использована установка для лазерной визуализации, схема которой представлена на Рис. 5. Вместо каркаса пленки использовался цилиндр из пластика с той же геометрией (диаметром и высотой) и толщиной стенки 1 мм. В качестве источника освещения применялся гелий-неоновый лазер (1) (Melles Griot, США). При прохождении лазерного пучка через цилиндрическую линзу (2) формировался лазерный нож – пучок 30x1 мм в сечении, который направлялся на стеклянные стенки биореактора (4). Плоскость лазерного ножа проходила через ось симметрии стеклянного корпуса биореактора. Изображение области, освещенной лазерным излучением, регистрировали фотокамерой (6) (Canon EOS 700D,

Япония) в направлении, перпендикулярном плоскости лазерного ножа. Рабочая среда внутри реактора (5) представляла собой воду, заселенную трассерами: полыми стеклянными сферами диаметром 10 мкм (HGS-10, Dantec Dynamics, Дания). Пути, пройденные трассерами за время выдержки фотокамеры, использовались для визуализации вихрей Тейлора в течении.

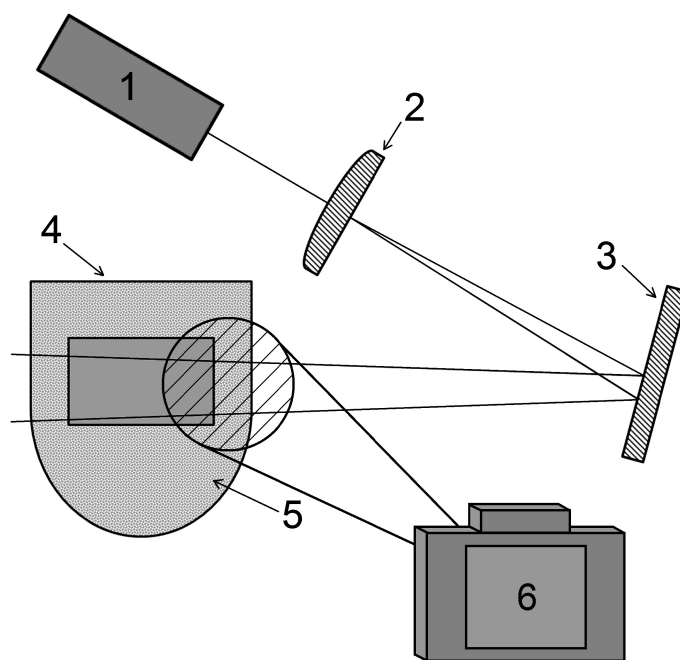


Рис. 5. Схема установки для визуализации течения жидкости внутри ротационного биореактора. 1 – лазер, 2 – цилиндрическая линза, 3 – зеркало, 4 – биореактор, 5 – вода, заселенная трассерами, 6 – фотокамера.

Эксперименты показали, что в широком диапазоне частот вращения в зазоре между внутренним цилиндром и стенкой реактора возникают вихри Тейлора. Характерная визуализация вихрей, полученная в результате численного моделирования, и фотография, полученная при частоте вращения внутреннего цилиндра $f = 0,083$ Гц с выдержкой $t = 1$ с, представлена на Рис. 6. Эксперимент показал, что в зазоре между цилиндром и стенкой течение качественно согласуется с расчетом в ANSYS Fluent, но в действующем реакторе вихри оказываются смещенными относительно середины зазора в разные стороны. То есть несимметричность реальной конструкции влияет на форму вихрей Тейлора.

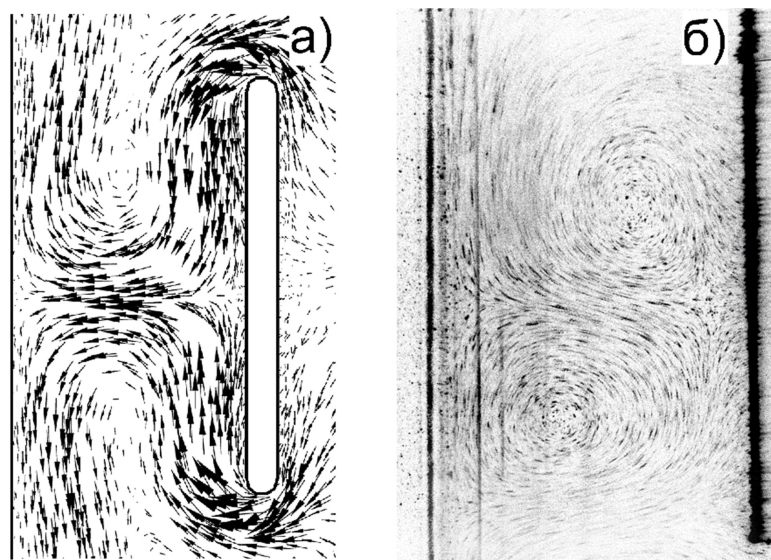


Рис. 6. Визуализации течения жидкости в области зазора между двумя цилиндрами: численное моделирование (а), эксперимент (б). Частота вращения внутреннего цилиндра $f = 0,083$ Гц.

Наличие трассеров позволило оценить скорость потока в вертикальной плоскости для области, соответствующей максимальной скорости течения жидкости в вихре. Для данной области по фотографии оценивали скорость движения микросфер-трассеров. Выбирали наиболее четкие треки, а затем измеряли их длину. При известном времени выдержки фотографии ($t = 1$ с) средняя скорость движения трассеров $U_{\text{эсп}} = 1,6 \pm 0,3$ мм/с. Максимальная скорость течения жидкости в вертикальной плоскости uz , полученная в результате численного расчета при той же частоте вращения внутреннего цилиндра, составила $U_{\text{рас}} = 1,785$ мм/с, что в пределах погрешности совпадает с экспериментальными данными. Это значит, что представленный вычислительный алгоритм на основе ANSYS может адекватно моделировать течение жидкости в биореакторе.

2.4. Результаты численного моделирования

Главным достоинством построенного вычислительного алгоритма является возможность рассчитывать поля скоростей в полости биореактора, а также распределения касательного напряжения и статического давления на поверхностях каркаса пленки [109]. Информация о перечисленных

параметрах помогает в выборе режима работы биореактора в зависимости от предоставляемых требований и используемых культуральных жидкостей.

Визуализации поля течения в плоскости симметрии реактора при разных частотах вращения каркаса пленки приведена на Рис. 7, 8. На Рис. 7 слева от вертикальной оси симметрии представлена проекция линий тока на осевое сечение (обозначение цветом отвечает за данные о вертикальной компоненте скорости U_y), справа – поле статического давления (Па). На Рис. 8 слева представлен модуль скорости (м/с), справа – вертикальная компонента скорости U_y (м/с). Масштаб изменения визуализируемых величин выбран одинаковым для всех частот и приведен на Рис. 7а и 8а.

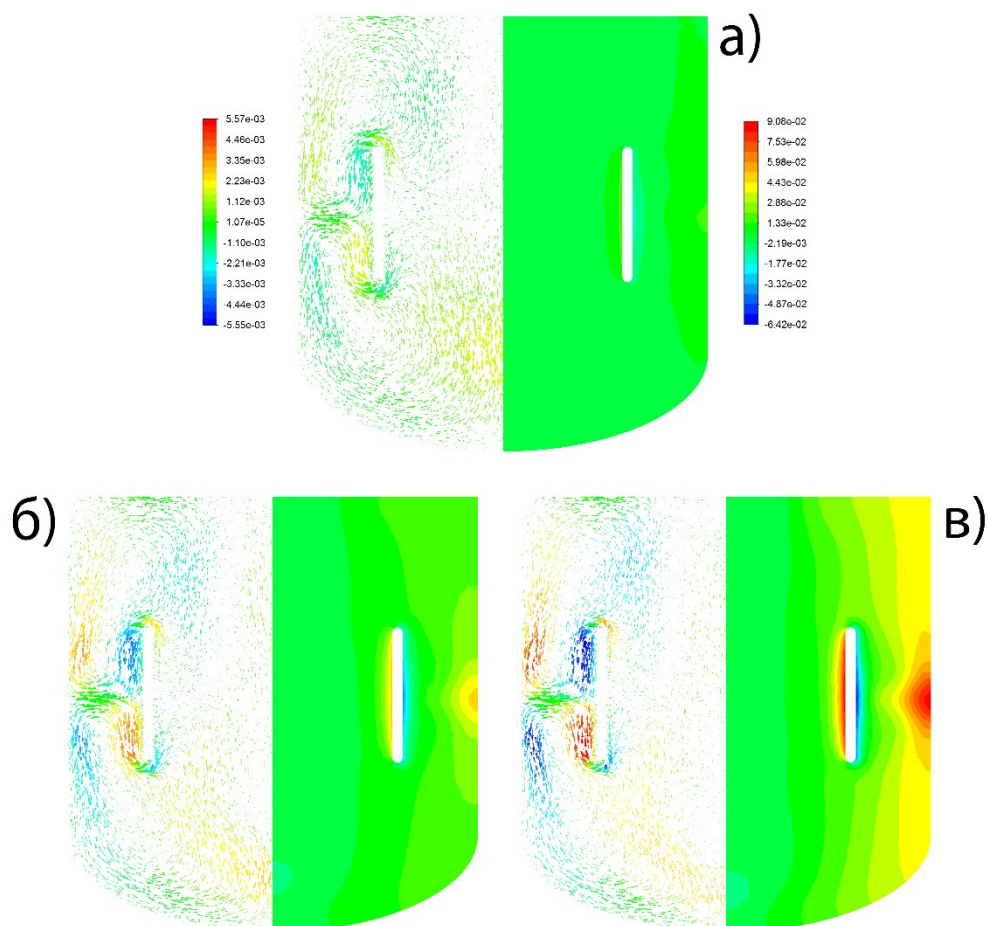


Рис. 7. Визуализация течения жидкости в биологическом ректоре. На каждой секции слева – визуализация линий тока, справа – визуализация статического давления. Частоты вращения каркаса: 0,083 (а), 0,167 (б), 0,233 Гц (в).

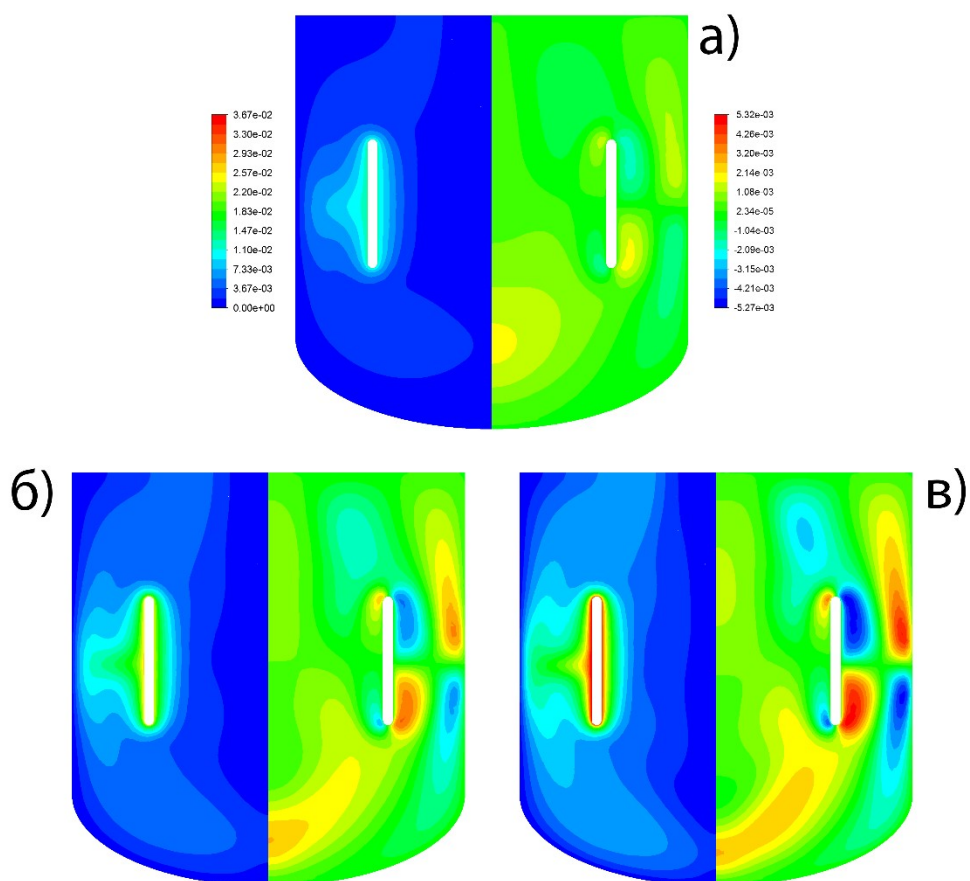


Рис. 8. Визуализация течения жидкости в биологическом реакторе. На каждой секции слева – визуализация модуля скорости, справа – визуализация вертикальной компоненты скорости. Частоты вращения каркаса: 0,083 (а), 0,167 (б), 0,233 Гц (в).

Из материалов визуализации видно, что в рассмотренном диапазоне частот вращения в зазоре между стенкой корпуса реактора и каркасом пленки возникает течение в виде двух вихрей Тейлора. При увеличении частоты вращения структурной перестройки течения не произошло, видимые отличия характеризуются количественными критериями. Визуализация по давлению дает информацию о положении зон с большими градиентами. Видно, что со стороны жидкости на каркас действует сила, направленная от центра к периферии. Визуализация по модулю скорости дает информацию об областях застойного течения, по линиям тока – о направлении вращения в вихревых образованиях. Для рассматриваемой задачи наиболее информативной о

тонкой структуре течения является визуализация по вертикальной компоненте скорости U_y .

На Рис. 9 представлены визуализации касательного напряжения τ (Па) и статического давления p (Па), действующих на рабочую поверхность каркаса F_{il} . В реальной модели ротационного биореактора на данной поверхности закрепляется пленка, заселенная клетками, поэтому информация о распределении механического напряжения на ней представляет особый интерес. Статическое давление представлено относительно нормального атмосферного (101325 Па, 1 атм, физическая атмосфера). Из рисунка видно, что зона соединения вихрей Тейлора, расположенная в середине высоты цилиндра, обладает пониженным значением касательного напряжения и статического давления по сравнению с краями.

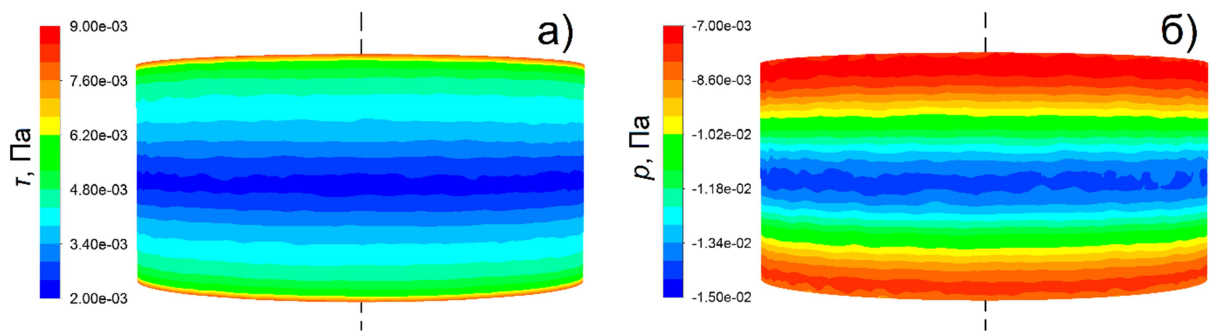


Рис. 9. Визуализация распределения касательного напряжения τ (а) и статического давления p (б), действующих на рабочую поверхность каркаса (F_{il}) при $f = 0,083$ Гц. Ось вращения отмечена штрихпунктирной линией.

Распределение касательного напряжения и статического давления вдоль образующей рабочей поверхности каркаса приведено на Рис. 10. На графиках по оси абсцисс отложено значение координаты в вертикальном направлении. Результаты приведены в однопараметрическом представлении для частот вращения f : 0,083, 0,125, 0,167, 0,2 и 0,233 Гц. Видно, что вихри Тейлора приводят к неравномерному распределению касательного напряжения в зоне их сопряжения. В середине поверхности касательное напряжение ниже, чем на краях. Те же закономерности наблюдаются для статического давления:

отсутствует монотонность. Данная неоднородность распределения механического воздействия сохраняется при изменении частоты вращения каркаса пленки [110].

Далее при оценке равномерности распределения механического воздействия по рабочей поверхности не учитывались крайние 2 мм, из-за краевых эффектов, кроме того эту зону перекрывают крепления пленки и биоматериала на ней не располагается. Количественный анализ показал, что 28–46 % зоны культивирования клеток имеет хорошую однородность распределения касательного напряжения (разброс в 10 % относительно среднего значения) при частоте вращения 0,083–0,233 Гц. 56–76 % поверхности подвергаются среднему касательному напряжению с приемлемым разбросом в 20 % при тех же частотах вращения. Для статического давления ситуация схожая: 29–35 % рабочей поверхности имеют хорошую однородность (до 10 %), а 61–71 % – приемлемую (до 20 %).

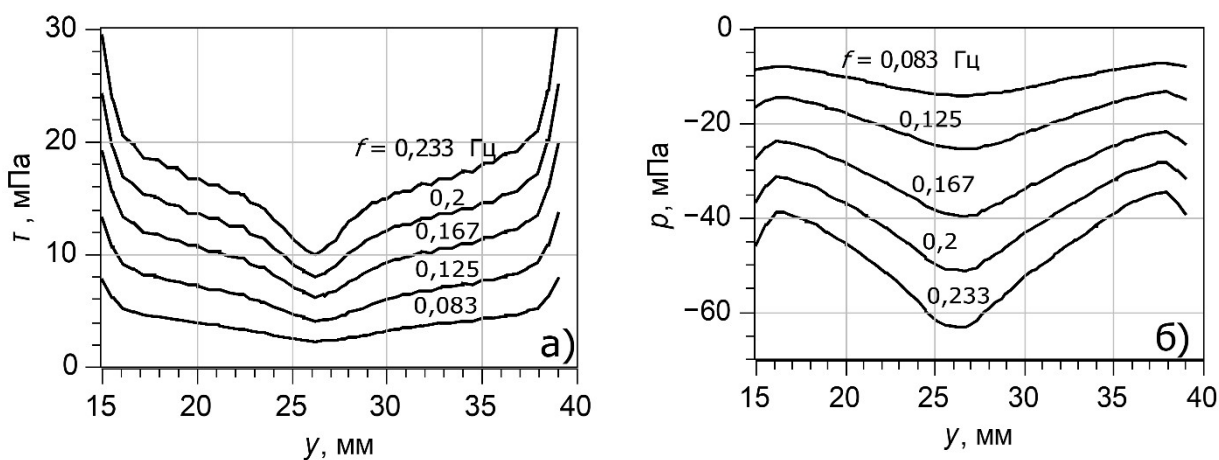


Рис. 10. Распределение касательного напряжения (а) и статического давления (б) вдоль образующей рабочей поверхности каркаса пленки (F_{ii}).

Можно отметить, что рабочая поверхность находится в зоне пониженного давления (зона разрежения). В различных типах биологических тканей *in vivo* могут достигаться отрицательные гидростатические давления от единиц до десятков кПа [111]. Известно также, что пониженные значения давления могут благотворно влиять на процесс восстановления костных

повреждений усиливая дифференцировку стволовых клеток [112, 113]. Относительно возможных физиологических значений и параметров, применяемых в лечении низкими давлениями, статическое давление в ротационном биореакторе незначительно, поэтому не следует ожидать, что оно окажет влияние на клетки.

Наиболее важным фактором, влияющим на силу механического воздействия на клетки, является частота вращения каркаса при выбранной геометрии системы. Кроме того, изменением частоты вращения проще всего регулировать силу механического воздействия. На Рис. 11 представлены графики распределения усредненного по поверхности касательного напряжения и статического давления в зависимости от частоты вращения каркаса. При частоте вращения от 0,083 до 0,233 Гц на поверхности, соответствующей заселенному стволовыми клетками каркасу, реализуются средние касательные напряжения от 4 до 17 мПа. Диапазон касательных напряжений, которым подвергаются стволовые клетки в других работах, достаточно широк: 2–100 мПа [28, 29]. Поскольку известно, что даже низкие касательные напряжения (менее 10 мПа) эффективно запускают процесс дифференцировки стволовых клеток [30], условия культивирования в новом биореакторе можно считать подходящими для их стимуляции.

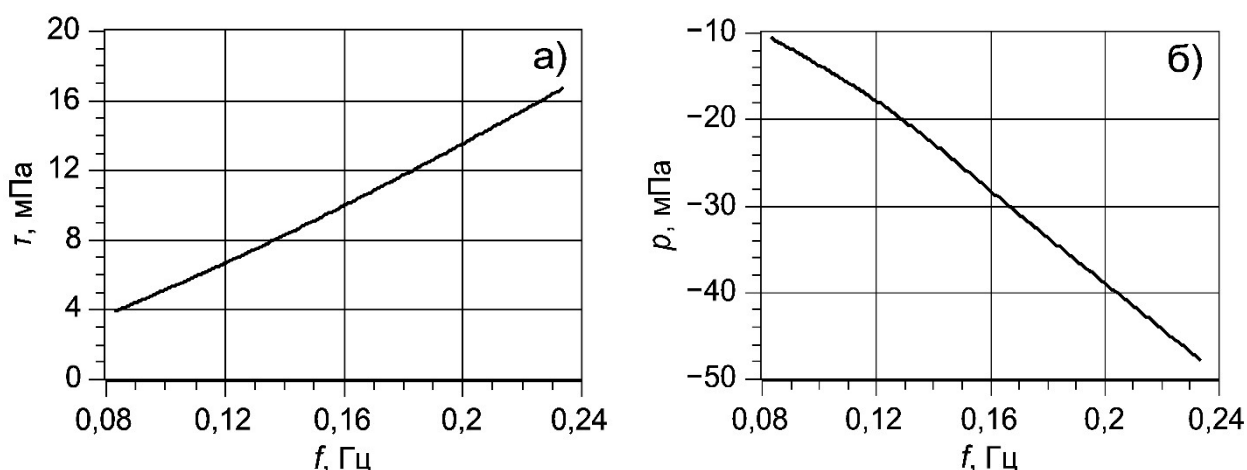


Рис. 11. Зависимости среднего касательного напряжения (а) и статического давления (б) от частоты вращения каркаса на рабочей поверхности F_{il} .

Эти расчеты выполнены для размеров, соответствующих экспериментальной модели биореактора, и воды при комнатной температуре в качестве жидкости, однако, они аналогично могут быть выполнены для другой геометрии и других параметров культуральной среды, которые могут отличаться от использованных в пределах 10–25 %. В медицинской практике для культивирования клеток *ex vivo* широко используется жидкая питательная среда DMEM с различными добавками [50, 51]. Был выполнен тестовый расчет течения жидкости в ротационном реакторе с характерными для DMEM динамической вязкостью 0,9 мПа·с и плотностью 990 кг/м³, чтобы провести сравнение с результатами для воды. Расчет показал, что осредненное по поверхности рабочей зоны реактора касательное напряжение отличается менее чем на 1 %, а давление – на 3,5 %. Этот результат дает основание полагать, что вода является приемлемым приближением для расчета касательного напряжения и давления в условиях моделируемого реактора.

Процесс культивирования биологической ткани сопровождается увеличением ее массы. В замкнутом объеме это может приводить только к уменьшению величины зазора между цилиндрами в рабочей зоне реактора и, соответственно, уменьшению числа Тейлора. Таким образом, отклонения от начальной конфигурации, вызванные накоплением в реакторе костной ткани, способствуют сохранению ламинарного режима течения.

2.5. Эксперименты по выращиванию костного материала

После этапа численного моделирования коллективом под руководством профессора Ларионова П. М. проводилось несколько экспериментов по выращиванию костной ткани в ротационном биореакторе для определения оптимального уровня механической нагрузки. Поскольку конструкция биореактора новая, требуется дополнительный контроль всех этапов данной технологии.

Для создания тонкой пленки был использован материал на основе поликапролактона и хитозана с низкой молекулярной массой. Формирование

полотна выполняли на установке электроспиннинга NF-103 (MECCO, Япония). Состав раствора для проведения электроформования: композит из 0,5 % раствора хитозана и 12 % раствора поликапролактона (80 кДа, Sigma-Aldrich, США). В качестве основного растворителя использовался хлороформ. Параметры электроспиннинга: ускоряющее напряжение – 21 кВ, расстояние от иглы до коллектора – 22 см, скорость подачи раствора полимера – 1 мл в час. У сформированной пленки были следующие структурные характеристики: пористость – 92 %, средний диаметр волокон – 860 ± 40 нм. Измерения размеров волокон и пористости, а также 3D моделирование с использованием методов конфокальной микроскопии представлено в предшествующей работе [114]. Толщина полотна из поликапролактона составляла 40 мкм.

В качестве клеточного материала использовали человеческие мезенхимальные стволовые клетки костномозгового происхождения. Образцы пленок, заселенные стволовыми клетками, культивировали в динамических условиях в ротационном биореакторе с исходно предложенной конструкцией и в статических условиях культурального планшета в качестве контроля. В процессе культивирования использовалась питательная среда DMEM с пониженным содержанием глюкозы 1 г/л (Gibco), дополненная 10 % эмбриональной бычьей сывороткой и антибиотиками. Питательная среда в биореакторе и планшете заменялась наполовину каждые два-три дня. Для всех типов культивирования (статического и динамического) в питательную среду вводили индукторы, стимулирующие остеоиндукцию: дексаметазон 100 нмоль, β -глицерофосфат 5 нмоль, аскорбиновая кислота 0,2 нмоль.

Были проведены эксперименты, в которых клеточный материал на пленках выращивался в ротационном биореакторе с частотами вращения каркаса 0,083, 0,133, 0,167, 0,25, 0,333 Гц в течение суток. Микроскопия показала, что при частотах вращения более 15 об/мин численная плотность клеток в процессе культивирования уменьшалась из-за их отрыва от

поверхности, а при 5–10 об/мин клетки оставались на пленках. Таким образом, частоты вращения до 10 об/мин (0,167 Гц) были признаны перспективными для дальнейших экспериментов по выращиванию костной ткани. Оптимальной была выбрана частота вращения 0,133 Гц (8 об/мин), для нее был проведен дополнительный расчет течения. Данная частота по результатам численного моделирования соответствует среднему касательному напряжению 8 мПа. Количественный анализ показал, что 33 % зоны культивирования клеток имеет хорошую однородность распределения касательного напряжения (с разбросом в 10 % относительно среднего значения). 66 % поверхности подвергаются среднему касательному напряжению с приемлемым разбросом в 20 % при тех же частотах вращения. Для статического давления 31 % площади культивируемого материала имеет хорошую однородность распределения (до 10 %), а 63 % – приемлемую (до 20 %).

Образцы культивировались в течение 5 недель статически (в культуральном планшете) и динамически (при частоте вращения 0,133 Гц в ротационном биореакторе). На второй, третьей и пятой неделе культивирования из реактора и планшета образцы вынимались для исследования гистофлуоресцентным методом [115]. Фрагменты пленок с клетками фиксировали в 10 % растворе нейтрального формалина, а затем осуществляли флуоресцентное окрашивание для последующего микроскопического исследования. Исследование образцов пленок проводили с помощью лазерного конфокального микроскопа «Zeiss LSM 710 HBO». Для возбуждения флуоресценции ядер, окрашенных раствором DAPI, использовали полупроводниковый лазер с длиной волны 405 нм. Его же использовали для возбуждения аутофлуоресценции поликапролактона. Для определения интенсивности флуоресценции метки, связанной с коллагеном первого типа (Alexa Fluor® 555), использовали диодный лазер с длиной волны 561 нм. Для определения интенсивности флуоресценции метки,

связанной с остеопоном (Phycocerythrin), использовали аргоновый лазер с линией 514 нм.

Микроскопия показала, что поверхность пленки представлена ячейстыми структурами овальной формы с максимальным диаметром ячейки около 120 мкм (Рис. 12). Численная плотность клеток при завершении этапа адгезии перед загрузкой тканеинженерных конструкций в реактор через 48 часов после заселения составляла $1,77 \cdot 10^5 \pm 10^2$ на 1 см^2 .

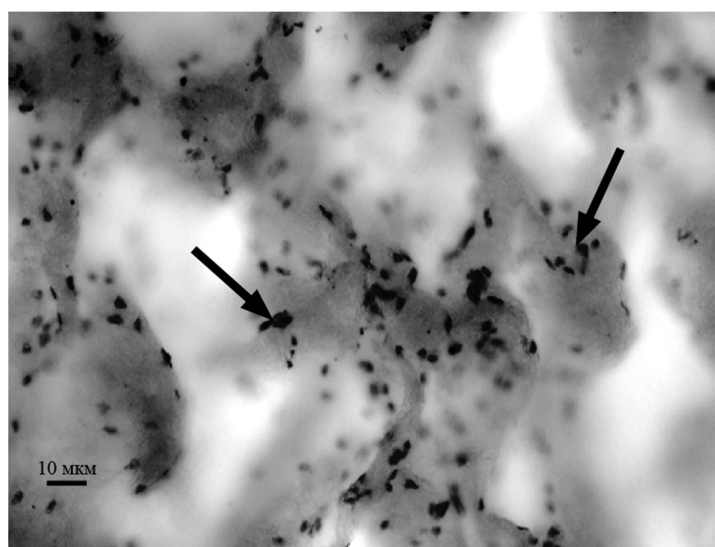


Рис. 12. Ячейстая структура пленки. На ее поверхности адгезирована культура человеческих мезенхимальных стволовых клеток (обозначены стрелками). Цитологическая окраска по Романовскому.

В результате трехнедельного культивирования пленки обнаружено эффективное образование костного матрикса (неоостеогенез). Оно проявляется в распространенной диффузной экспрессии остеопомина и представлено сплошным слоем коллагена первого типа (протоколлагена), состоящего из депозитов размерами от 10 до 25 мкм (Рис. 13). Наблюдалось статистически значимое увеличение численной плотности остеогенных клеток на 36 % ($P < 0,001$), относительно статического культивирования того же срока. Интенсивность флуоресценции метки, связанной с коллагеном была выше на 53 %.

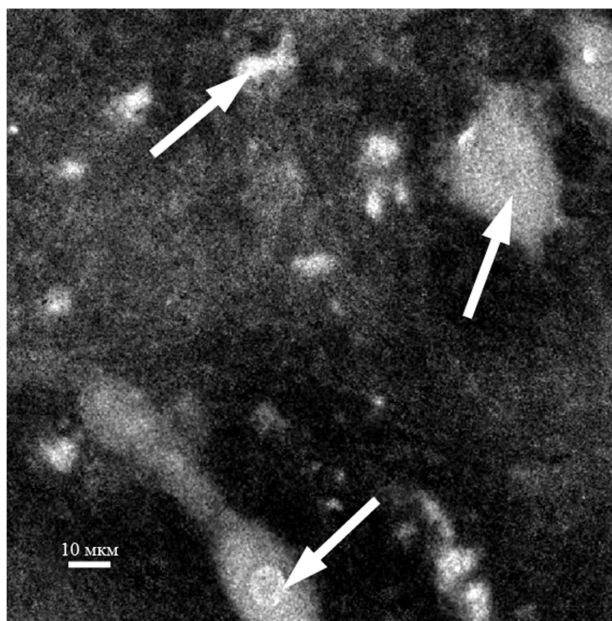


Рис. 13. Пространственное изображение пленки, культивированной три недели в условиях биореактора, лазерная конфокальная микроскопия. Стрелками обозначен коллаген первого типа.

Проведенное численное моделирование позволило оценить уровень механической нагрузки на клетки при различных условиях и значительно упростило медицинские эксперименты. Для используемой геометрии рабочего объема реактора оптимальной была выбрана частота вращения 0,133 Гц, что соответствовало среднему касательному напряжению 8 мПа в процессе культивирования. Лазерная конфокальная микроскопия подтвердила лучшее формирование костного матрикса в образцах, культивируемых в новом биореакторе при данной частоте, по сравнению со статическим культивированием, что говорит об эффективности новой конструкции биореактора. Для дальнейшего развития технологии создания тканеинженерных конструкций, данные результаты можно пересчитывать для реакторов данного типа с другой геометрией.

Выводы по Главе 2

Численное моделирование течения жидкости позволило визуализировать структуру течения в полости биореактора, который был исходно предложен для выращивания костной ткани на тонкой пленке.

Математическая модель состояла из стенки реактора в виде цилиндрической поверхности со скругленным дном и вставленного в него соосно каркаса для пленки. Построенный вычислительный алгоритм верифицировался на задаче определения поля течения между двумя вращающимися соосными цилиндрами и показал хорошие результаты при сравнении с известными аналитическими решениями.

При вращении внутреннего каркаса ротационного биореактора и неподвижной внешней стенке корпуса в зазоре между стенкой и каркасом реализуется течение с двумя вихрями Тейлора, имеющими противоположные направления вращения. С помощью экспериментальной визуализации течения в зазоре было подтверждено наличие вихрей Тейлора и показано, что максимальная скорость в потоке вихря хорошо согласуется с рассчитанной в численном моделировании.

При частоте вращения в диапазоне от 0,083 до 0,233 Гц на рабочей поверхности, соответствующей заселенному стволовыми клетками каркасу, реализуются средние касательные напряжения от 4 до 17 мПа. Вихри Тейлора приводят к пониженному значению касательного напряжения в зоне их сопряжения на рабочей поверхности. Данная неравномерность распределения сохраняется при увеличении частоты вращения каркаса. Количественный анализ показал, 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. 56–76 % рабочей поверхности подвергаются среднему касательному напряжению с разбросом 20 % при тех же частотах вращения. Численное моделирование показало, что используемый диапазон частот вращения является подходящим для стимуляции стволовых клеток, поскольку известно, что для данного процесса эффективны даже достаточно маленькие касательные напряжения (менее 10 мПа). Выбор конкретной частоты вращения каркаса зависит от особенностей конкретных медицинских экспериментов (состава пленок, типа клеток и т. д.).

Проведенные медицинские эксперименты позволили найти оптимальную частоту вращения каркаса пленки, равную 0,133 Гц (8 об/мин), что соответствовало среднему касательному напряжению 8 мПа. Количественный анализ показал, что 33 % рабочей зоны имеет хорошую однородность распределения касательного напряжения (с разбросом в 10 % относительно среднего значения). 66 % поверхности подвергаются среднему касательному напряжению с приемлемым разбросом в 20 % при тех же частотах вращения. Для статического давления ситуация схожая – 31 % площади культивируемого материала имеют хорошую однородность (до 10 %), а 63 % – приемлемую (до 20 %). Анализ выращенных в таких условиях образцов костной ткани показал, что культивирование пленки, заселенной мезенхимальными стволовыми клетками, в условиях ротационного реактора позволяет рассчитывать на эффективное формирование внеклеточного матрикса кости.

Таким образом, результаты численного моделирования были успешно применены в медицинском эксперименте. Поскольку зависимость касательного напряжения от частоты вращения была получена для конкретной геометрии биореактора, при дальнейшем развитии технологии результаты можно пересчитать для реакторов данного типа с другой геометрией.

ГЛАВА 3. ЧИСЛЕННОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ТЕЧЕНИЯ ЖИДКОСТИ В ПЕРСПЕКТИВНЫХ МОДИФИКАЦИЯХ РОТАЦИОННОГО БИОРЕАКТОРА

Численное и экспериментальное исследование течения жидкости в ротационном биореакторе, исходно предлагаемом для выращивания костной ткани, показало, что течение не является равномерным. Из-за вихрей Тейлора создается неодинаковая механическая нагрузка на рабочую поверхность с культивируемым клеточным материалом: на краях пленки касательное напряжение выше, чем в середине. Поэтому следующей задачей было определение перспективных изменений в конструкции, которые можно внести, чтобы создать более однородную механическую нагрузку на клеточный слой. Дополнительно был проведен поиск модификации реактора, позволяющей создавать циклическую нагрузку потока на клеточный материал. Схематично ротационный биореактор состоит из двух соосных цилиндрических поверхностей. Поэтому наиболее простой вариант поиска перспектив – рассмотреть варианты вращения разных поверхностей друг относительно друга и ввести смещение осей вращения.

Увеличение объема культивирования биологического материала может быть достигнуто увеличением диаметра каркаса пленки. Тестовый расчет, проведенный при диаметре каркаса 60 мм и частоте его вращения 0,167 Гц, показал, что в зазоре возникает течение в виде четырех вихрей Тейлора (Рис. 14а). Касательное напряжение и статическое давление на рабочей поверхности каркаса распределяются неравномерно (Рис. 14б, в). Хорошую однородность распределения касательного напряжения (с разбросом в 10 % относительно среднего значения) имеет 17 % поверхности культивирования клеток, а статического давления – 5 %. Таким образом, данный вариант хуже в сравнении с расчетом для диаметра каркаса 50 мм, результаты которого приведены в Главе 2 (Рис. 10).

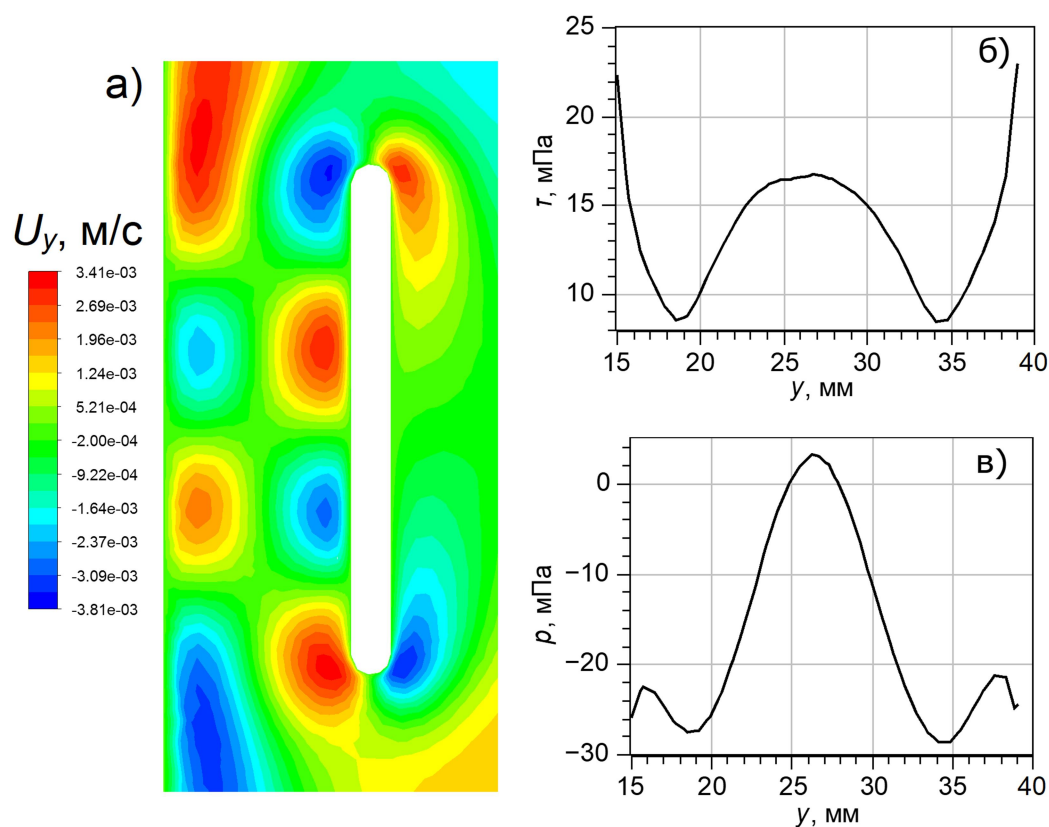


Рис. 14. Визуализация течения по вертикальной компоненте скорости в зазоре биореактора с диаметром каркаса 60 мм при частоте вращения 0,167 Гц (а). Распределение касательного напряжения (б) и статического давления (в) вдоль образующей рабочей поверхности F_{il} .

Уменьшение диаметра каркаса приводит к уменьшению неравномерности распределения механической нагрузки, но также уменьшается и полезная площадь, на которой можно выращивать биологический материал. Далее в расчетах был оставлен стандартный размер каркаса пленки (диаметр 50 мм), поскольку 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.

3.1. Модель реактора с размещением биологического материала на внутренней поверхности каркаса

При вращении каркаса в зазоре между ним и стенкой корпуса реактора реализуется течение в виде вихрей Тейлора, в то время как во внутренней полости каркаса течение более равномерно. Таким образом, изменение рабочей поверхности и размещение клеточного материала на поверхности каркаса, обращенной в полость реактора, представляет большой интерес. Для изучения данного варианта были использованы результаты расчета течения для исходной модели ротационного биореактора из Главы 2, поскольку постановка задачи для данных случаев совпадает. Обозначения поверхностей каркаса те же: F_{i1} – внешняя поверхность каркаса, F_{i2} – внутренняя (Рис. 2г).

Распределение касательного напряжения вдоль образующей рабочей поверхности каркаса в первой перспективной модели приведено на Рис. 15а. При этом его распределение практически симметрично относительно середины каркаса и монотонно. Хорошую однородность распределения имеет 83–88 % поверхности культивирования при частотах вращения от 0,083 до 0,233 Гц. Однако усредненное касательное напряжение меньше по величине по сравнению с исходной моделью. Аналогично изменяются графики для статического давления: оно более равномерно и монотонно (Рис. 15б). Хорошую однородность распределения давления имеет 97 % поверхности культивирования. По сравнению с исходной моделью (Рис. 10), рабочая поверхность в первой перспективной модели находится в зоне повышенного давления.

Сравнение усредненных величин статического давления и касательного напряжения, действующих на рабочие поверхности в исходной и первой перспективной моделях приведено на Рис. 16. Здесь по оси абсцисс отложена частота вращения каркаса f . Как видно из графиков, максимальное среднее касательное напряжение реализуется в исходной конструкции ротационного биореактора (поверхность F_{i1}), а максимальное среднее статическое давление – в первой перспективной модели (на поверхности F_{i1}). Статические

давления не превышают значения для нормальной жизнедеятельности клеток, несмотря на зону повышенного давления.

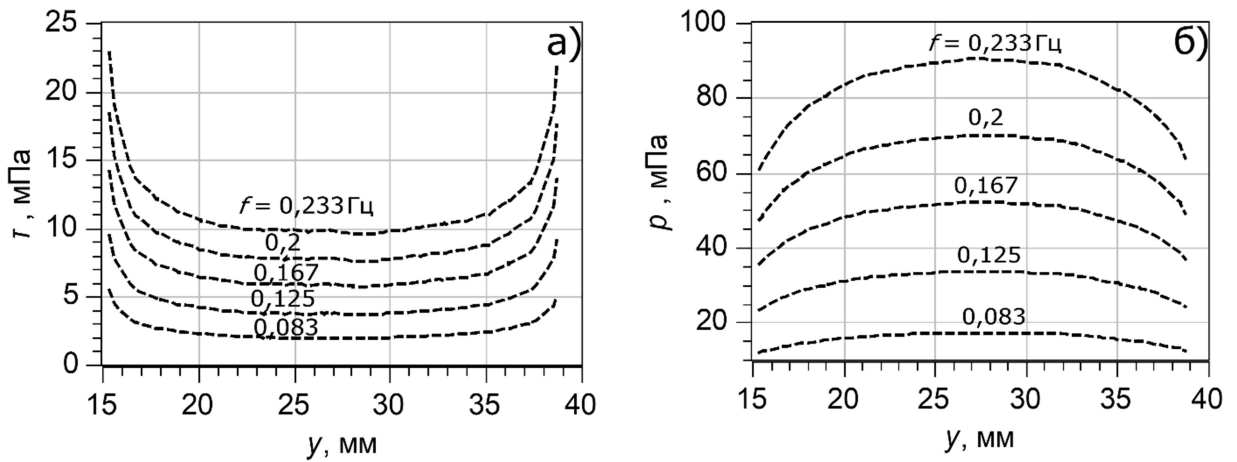


Рис. 15. Распределение касательного напряжения (а) и статического давления (б) вдоль образующей рабочей поверхности (F_{i2}) каркаса пленки в первой перспективной модели на основе ротационного биореактора.

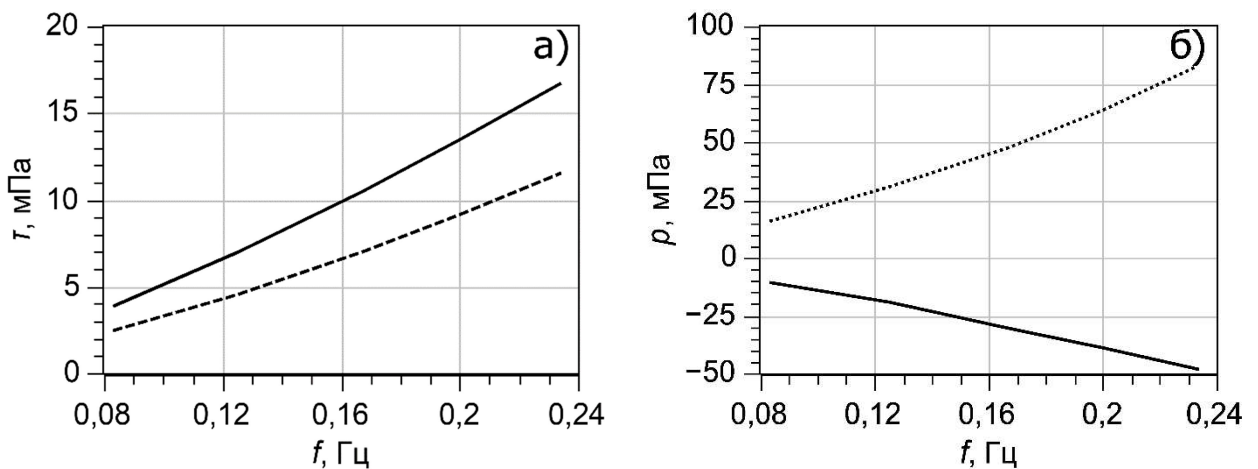


Рис. 16. Зависимости среднего касательного напряжения (а) и статического давления (б) на рабочей поверхности от частоты вращения каркаса в исходной (сплошная линия) и первой перспективной моделях биореактора (пунктирная линия).

Таким образом, модель с размещением культивируемого клеточного материала на внутренней поверхности каркаса может быть использована для дальнейших медицинских экспериментов. Среднее касательное напряжение ниже по величине в сравнении с исходной моделью (Глава 2), но его

распределение более равномерно. Регулировка уровня механической нагрузки в данной модификации также производится просто – частотой вращения каркаса. Однако, максимальное значение касательного напряжения ограничено значением 12 мПа при частоте вращения каркаса пленки 0,233 Гц.

3.2. Модель биореактора с вращением внешней стенки

При вращении каркаса в рабочей области реализуется течение в виде двух вихрей Тейлора. Известно, что течение, генерируемое вращением внешней стенки (стеклянного корпуса реактора) устойчиво, поэтому в зазоре не будет вихрей [108], в результате механическая нагрузка на культивируемый материал будет более равномерной. Рабочая поверхность в данной модификации соответствует поверхности F_{il} , как и в исходной модели. Для расчета данного варианта использовалась та же геометрия и расчетная сетка, что в Главе 2. Граничные условия были изменены на условие вращения поверхностей корпуса (F_{e1} , F_{e2}) вместо вращения поверхностей каркаса пленки. Частоты вращения корпуса для удобства сравнения были выбраны теми же, что и в случае вращения каркаса пленки: 0,083, 0,125, 0,167, 0,2 и 0,233 Гц. Остальные граничные условия и постановка задачи не изменялись.

На Рис. 17 представлено сравнение полей течений, генерируемых вращением поверхностей каркаса в исходной модели и корпуса во второй перспективной модели для частоты вращения $f = 0,167$ Гц. Из визуализации видно, что структура течения при представленных вариантах генерации движения жидкости значительно отличается. Во втором случае в зазоре между стенкой корпуса и каркасом реактора завихренность потока незначительна, а течение можно считать приближенным к ламинарному течению Куэтта. Зона максимальной завихренности потока для этого варианта расположена около внутренней поверхности каркаса пленки (в полости реактора).

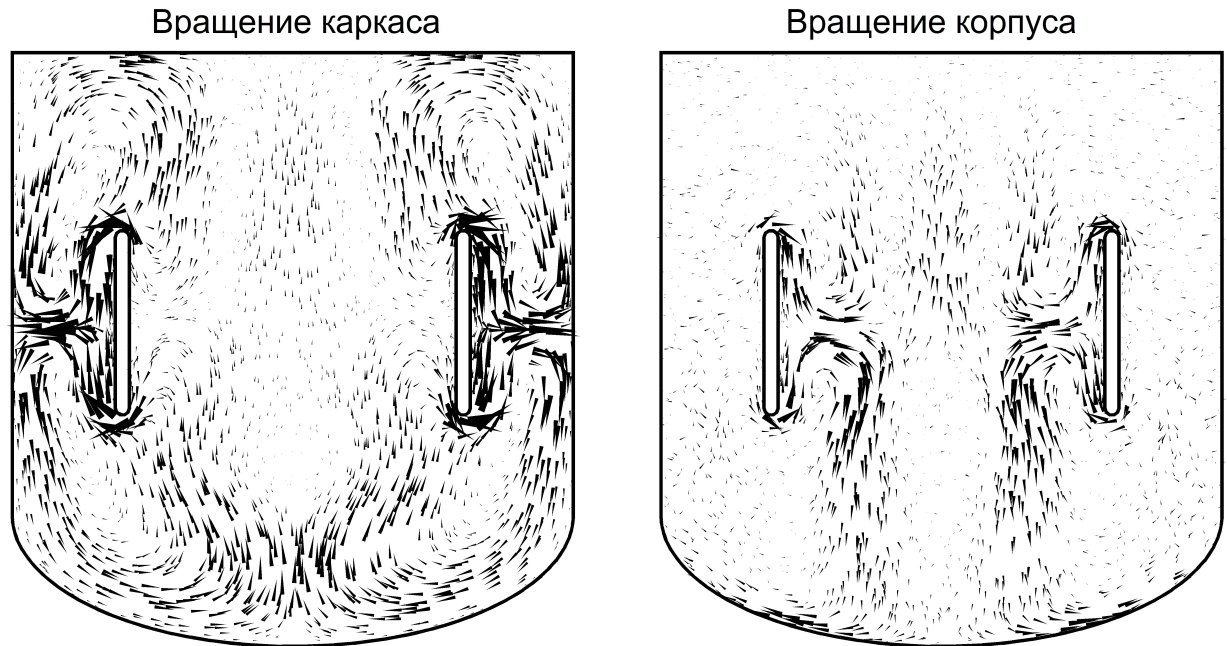


Рис. 17. Визуализация поля течения по проекции вектора скорости на плоскость симметрии при вращении внутреннего каркаса (исходная модель) и стенки корпуса (вторая перспективная модель) при частоте вращения $f = 0,167$ Гц.

На Рис. 18 для частоты вращения $f = 0,083$ Гц приведены вертикальная компонента скорости и статическое давление вдоль оси реактора для исходной и второй перспективной моделей. Результат расчета показывает, что в рассмотренных случаях направления вынужденной конвекции жидкости на оси симметрии противоположны. Если течение генерируется внутренним каркасом, то направление потока совпадает с положительным направлением координаты y , если внешним – то с отрицательным. Из графика видно, что на оси симметрии максимальное давление достигается при вращении внутреннего каркаса, а максимальное разрежение – при вращении поверхностей корпуса.

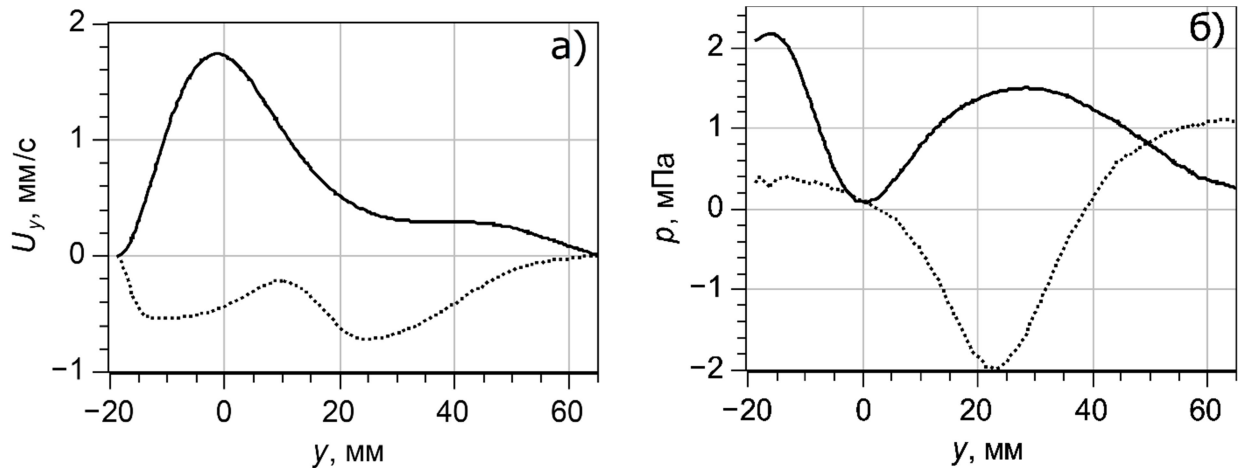


Рис. 18. Распределение вертикальной компоненты скорости (а) и статического давления (б) вдоль оси реактора в исходной (сплошная линия) и второй перспективной моделях биореактора (точки).

Распределение касательного напряжения и статического давления вдоль образующей рабочей поверхности в зависимости от частоты для исходной и второй перспективной моделей приведено на Рис. 19. Для касательного напряжения влияние торцевых поверхностей каркаса на распределение вдоль образующей является определяющим (Рис. 19а). На концах касательное напряжение имеет максимумы, значения которых практически не зависят от того, какая из поверхностей вращается. В случае, когда вращается корпус, влияние вихревых структур в зазоре пренебрежимо, и вне зоны влияния торцевых поверхностей величина касательного напряжения близка к константе. В случае, когда вращается каркас, распределение касательного напряжения формируют не только торцевые поверхности каркаса, но и вихри Тейлора, которые возникают в зазоре. Относительно давления рабочая поверхность находится в зоне разрежения, если вращается каркас, и в зоне повышенного давления, если вращается корпус (Рис. 19б). В рассмотренных режимах течения влияние торцевых поверхностей каркаса на распределение давления проявляется слабо, особенно в случае вращения корпуса. Влияние вихрей Тейлора на распределение давления заметно только при вращении каркаса и проявляется локальным минимумом в месте соприкосновения

вихрей. 96–100 % рабочей поверхности имеют хорошую однородность (разброс в 10 % относительно среднего значения) распределения касательного напряжения и статического давления в исследуемом диапазоне частот вращения.

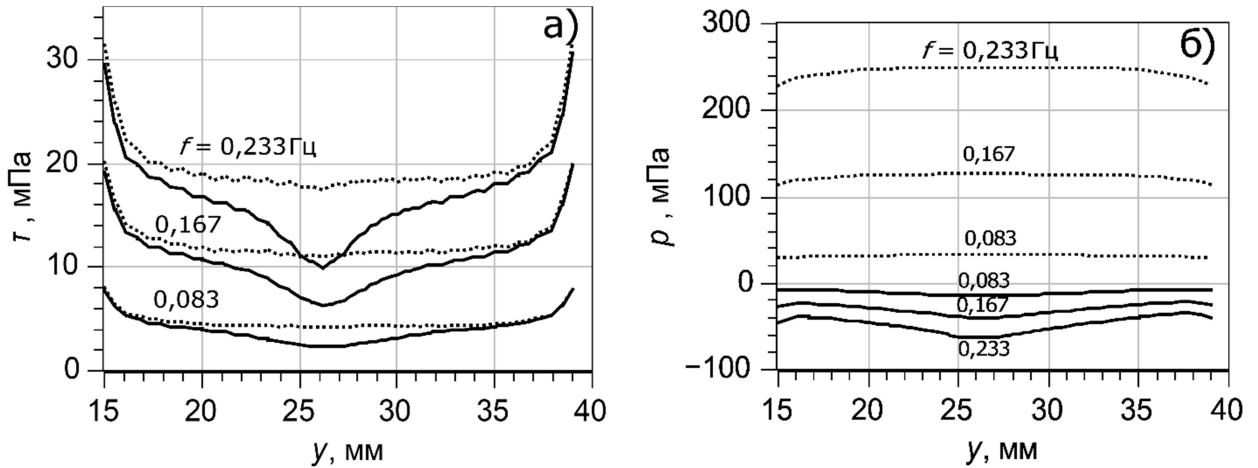


Рис. 19. Распределение касательного напряжения (а) и статического давления (б) вдоль образующей рабочей поверхности в исходной (сплошная линия) и второй перспективной моделях биореактора (точки).

Средние касательные напряжения в рассматриваемом варианте выше по величине, чем в исходной и первой перспективной модели (Рис. 20а). 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 (Рис. 20б), однако оно не превышает величины, которые могут реализовываться в физиологических условиях [111].

Таким образом, последний рассмотренный вариант организации течения через вращение корпуса при размещении культивируемого материала на внешней поверхности каркаса, является лучшей альтернативой существующей схеме, описанной в Главе 2. Данный способ позволяет наиболее равномерно распределять механическую нагрузку по поверхности культивируемого клеточного материала за счет отсутствия вихрей Тейлора.

Среднее касательное напряжение имеет наибольшую величину по сравнению с другими рассмотренными вариантами.

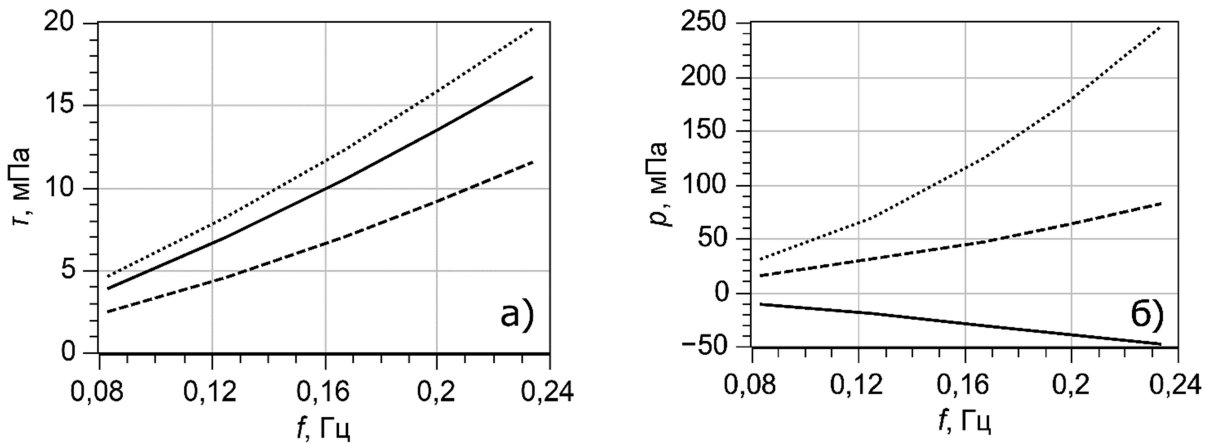


Рис. 20. Зависимость среднего касательного напряжения (а) и статического давления (б) от частоты вращения на рабочей поверхности в исходной (сплошная линия), первой перспективной (пунктирная линия) и второй перспективной моделях биореактора (точки).

3.3. Модель биореактора со смещенной осью вращения

Наряду с постоянными потоками, активно исследуется влияние циклической нагрузки на дифференцировку стволовых клеток. В ротационном реакторе цикличность можно ввести смещением оси вращения каркаса [116, 117].

Математическая модель

Третья рассматриваемая перспективная модель представляет собой асимметричную модель на основе ротационного реактора. Схематически асимметричный реактор состоит из цилиндрических поверхностей, вставленных одна в другую. На Рис. 21 приведена модель реактора со смещением осей и основные геометрические размеры (здесь F_1 , F_2 , F_3 – стенки биореактора и поверхность жидкости, φ – окружная координата). Все основные размеры стенок корпуса и каркаса пленки совпадали с исходной моделью, описанной ранее в Главе 2. В данной модели оси вращения внешнего и внутреннего цилиндров параллельны и смещены относительно

друг от друга на расстояние s (Рис. 21б). Вертикальная ось y совпадала с осью каркаса. Нижнее, относительно положительного направления координаты y , основание каркаса пленки лежит в плоскости $y = 0$ мм. Для улучшения условий дискретизации области определения задачи плоские торцевые поверхности каркаса также, как и в исходной модели были заменены на поверхность тора с радиусом образующей окружности 1 мм (на схеме не отмечены). Дополнительно каркас был секционирован в окружном направлении на 12 равновеликих цилиндрических панелей (Рис. 21б). Нижнее и верхнее основания внешнего цилиндра корпуса лежат в плоскостях $y = -15$ мм и $y = 50$ мм соответственно.

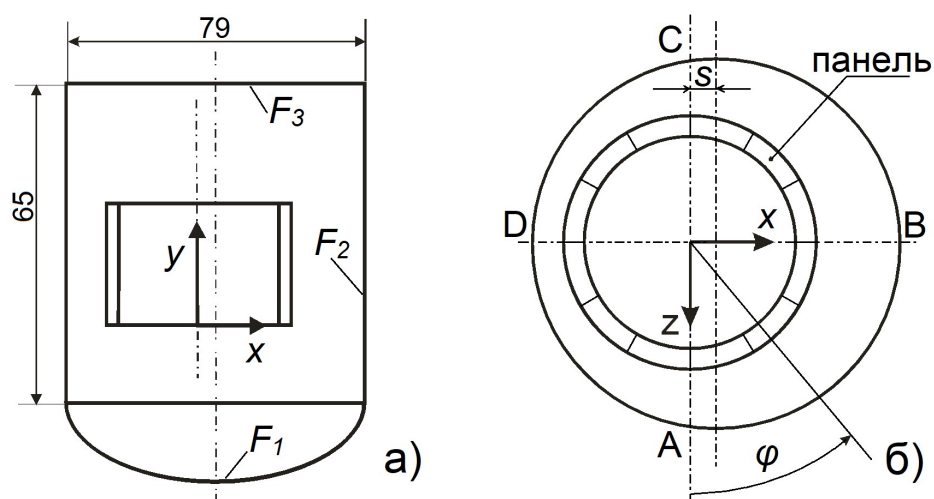


Рис. 21. Геометрия третьей перспективной модели – асимметричного ротационного биологического реактора: вид спереди (а), вид сверху (б). Размеры указаны в миллиметрах.

Рабочей поверхностью для размещения биологического материала, как и в исходной модели, была выбрана внешняя поверхность каркаса пленки. Таким образом, главным объектом математического моделирования являлась щель между стенкой корпуса реактора и каркасом. Движение жидкости генерировалось вращающимися поверхностями за счет вязкости. Далее постановка задачи совпадала с постановкой в Главе 2 (параметры рабочей среды, решаемые уравнения, начальные данные и т. д.) за исключением граничных условий.

В данном разделе исследовалось два способа генерации циклического потока в асимметричном реакторе: вращением каркаса пленки и корпуса. Поверхности вращались вокруг оси каркаса пленки, совпадающей с осью y . Дополнительно было проведено сравнение расчетов течения с симметричной моделью (для этого была использована геометрия и расчетная сетка, описанная в Главе 2). Как результат в данной части работы проведено сравнение четырех вариантов генерации движения жидкости в биореакторе. Вариант А: оси корпуса и каркаса совпадают, вращается каркас. Вариант В: оси корпуса и каркаса совпадают, вращается корпус – поверхности F_1 и F_2 (Рис. 21а). Вариант С: ось корпуса сдвинута параллельно вправо по оси x на расстояние $s = 5$ мм, что составляет 20 % относительно внешнего радиуса, при этом вращается только каркас вокруг своей оси. Вариант D: ось корпуса смещена аналогично варианту С, корпус (поверхности F_1 и F_2) вращается вокруг оси каркаса.

Когда корпус и каркас коаксиальны, щель между ними имеет форму кольца и распределение параметров потока не зависит от окружной координаты φ . В случае параллельного сдвига осей, величина зазора будет зависеть от угловой координаты φ . Плоскость $z = 0$ мм является плоскостью симметрии для геометрической фигуры, но не является таковой для решения уравнений Навье-Стокса. В представленных расчетах в зазоре поток движется по направлению от оси z к оси x (Рис. 21б).

Для всех четырех рассматриваемых случаев на поверхность F_3 ставились условия неподвижности стенки и равенства нулю касательного напряжения. Вариант А: на поверхностях корпуса F_1 и F_2 ставились условия неподвижности и прилипания; на поверхности каркаса – условия вращения и прилипания. Вариант В: на поверхностях корпуса ставились условия вращательного движения и прилипания; на поверхностях каркаса – условия неподвижности и прилипания. Вариант С: краевые условия аналогичны варианту А. Вариант D: краевые условия аналогичны варианту В. В представленной работе была проведена серия параметрических расчетов

параметров потока по частоте вращения f в диапазоне $0,05 < f < 0,233$ Гц (0,05, 0,083, 0,1, 0,117, 0,125, 0,133, 0,15, 0,167, 0,2, 0,233 Гц) для четырех вариантов генерации течения. Число Тейлора вычислялось для величины зазора, усредненной между его минимальным и максимальным значением. В рассматриваемом диапазоне частот в соответствии с числом Тейлора (2) реализуется режим ламинарного течения с вихрями Тейлора [107].

Была построена тетраэдрическая сетка с призматическими элементами в пристеночных областях вблизи поверхностей каркаса, около которых дополнительно сетка была измельчена (на пяти слоях). На примыкающем непосредственно к поверхности слое величина шага по направлению нормали к поверхности была в 10 раз меньше, чем в ядре потока, и возрастала с коэффициентом роста 1,2. На Рис. 22 показан фрагмент разностной сетки, построенной около поверхностей каркаса в плоскости симметрии. Тестовые расчеты показали, что оптимальной является дискретизация области определения задачи на $3,2 \cdot 10^6$ элементарных объемов.

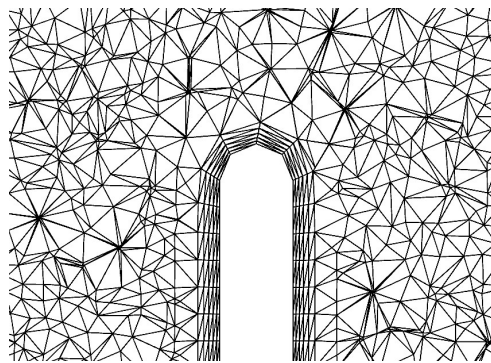


Рис. 22. Фрагмент разностной сетки в окрестности поверхности каркаса.

Результаты численного моделирования

На Рис. 23 представлена визуализация поля течения по проекции вектора скорости на плоскость $z = 0$ во всех четырех моделируемых случаях для частоты вращения $f = 0,167$ Гц. Из визуализации поля течения по скорости видно, что топология вихревых структур в сопоставляемых случаях генерации движения жидкости существенно различна. Из Рис. 23 можно

получить представление о схеме конвективного переноса питательных веществ и кислорода к культивируемому биологическому материалу.

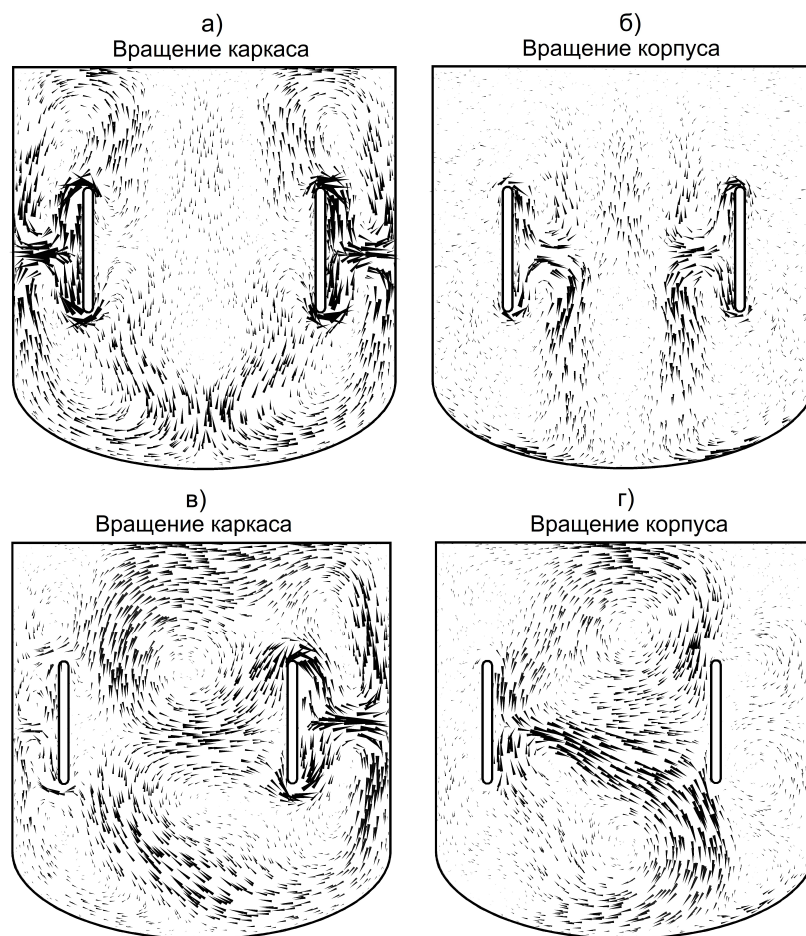


Рис. 23. Визуализация поля течения по проекции вектора скорости на плоскость симметрии для четырех вариантов генерации течения: а – оси коаксиальны, вращается каркас (А), б – оси коаксиальны, вращаются поверхности корпуса (В), в – ось стенки корпуса параллельно сдвинута вдоль оси x , вращается каркас (С), г – ось стенки корпуса параллельно сдвинута вдоль оси x , вращаются поверхности корпуса (D).

При сравнении вариантов А и С видно, что в симметричном реакторе в зазоре образуется два вихря, края которых вытягиваются из зазора в стороны дна и верхней поверхности. В асимметричном реакторе два вихря образуются в самом зазоре, и еще два вблизи верхней и нижней поверхностей. Подобная картина наблюдалась при экспериментальной визуализации течения трассерами (Рис. 6). Можно заключить, что данное несовпадение с расчетом

было вызвано подобной несимметричностью реальной геометрии биореактора.

В случаях С и D в плоскости рассматриваемого сечения величина зазора между стенкой корпуса и каркасом принимает минимальное и максимальное значения. Из визуализации видно, что в случае С завихренность потока более выражена по сравнению с остальными вариантами. Можно ожидать, что негативное влияние вихревых структур в щели на рабочую зону реактора и культивируемый материал будет сильнее, чем в других вариантах. Определяющим фактором в формировании течения является величина зазора: в рабочей зоне реактора с малым зазором завихренность минимальна, а с большим зазором – максимальна. В случае D в малом зазоре вихревая структура Тейлора отсутствует, а в большом зазоре она еще не сформировалась. Два основных вихря находятся в центральной части реактора, касаются внутренней поверхности неподвижного каркаса и, судя по графику, не оказывают негативного влияния на рабочую зону реактора.

Распределение среднего касательного напряжения и статического давления в окружном направлении на рабочей поверхности каркаса от частоты вращения каркаса f для вариантов А и С приведено на Рис. 24. Средние значения параметров получены путем усреднения по поверхностям цилиндрических панелей. На оси абсцисс отложено значение угловой координаты φ (Рис. 21б). Значение $\varphi = 270^\circ$ соответствует минимальному зазору между корпусом и каркасом, $\varphi = 90^\circ$ – максимальному зазору. Из графиков видно, что при вращении каркаса пленки смещение неподвижного корпуса сильнее сказывается на окружном распределении усредненного давления по сравнению с касательным напряжением. При этом усредненное по поверхности каркаса касательное напряжение при смещении оси отличается от симметричного случая в пределах 5 %, то есть асимметрия мало влияет на средние параметры. Можно отметить, что для варианта С экстремумы по φ функций давления и касательного напряжения не совпадают с положением минимального и максимального зазоров.

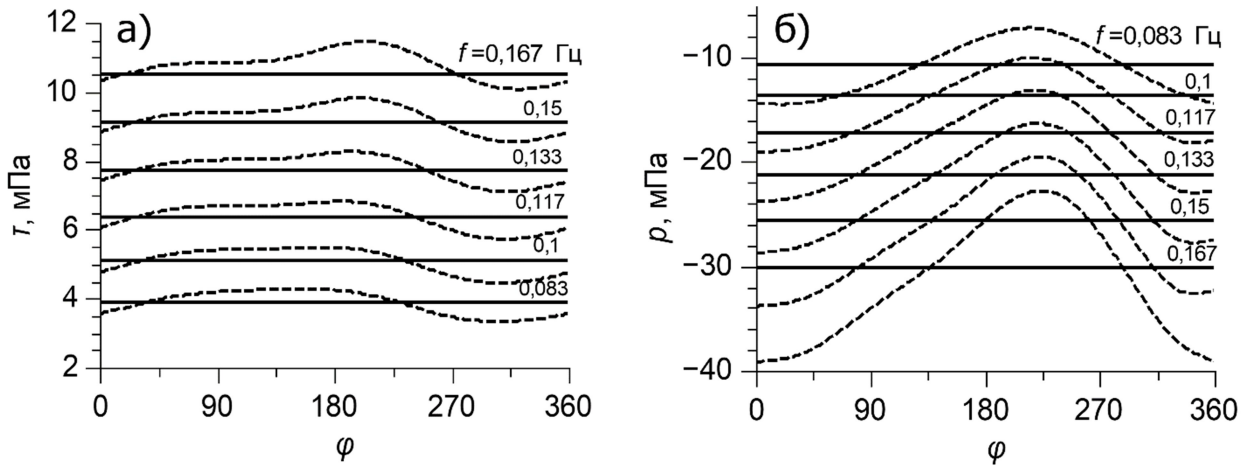


Рис. 24. Окружное распределение среднего касательного напряжения (а) и среднего статического давления (б) для вариантов А (сплошная линия) и С (пунктирная линия).

Сравнивая варианты В и D можно отметить, что при вращении корпуса асимметрия значительно усиливает расхождение между усредненными статическими давлениями при росте частоты вращения. Если при частоте 0,083 Гц в асимметричном случае статическое давление меньше на 15 %, то при частоте 0,233 Гц – на 34 %. Среднее касательное напряжение вновь достаточно хорошо совпадает с симметричным случаем (в пределах 5,5 %) на всех частотах.

Влияние смещения оси стенки корпуса на параметры течения в рабочей зоне реактора представлено на Рис. 25, где приведено распределение усредненных по поверхности цилиндрических панелей касательного напряжения и статического давления в окружном направлении для вариантов С и D. Для варианта D можно констатировать, что экстремумы функций давления и касательного напряжения не совпадают по координате φ ни между собой, ни с положением минимального ($\varphi = 270^\circ$) и максимального зазоров ($\varphi = 90^\circ$). Анализ графика показывает, что в варианте D реактор ротационного типа имеет принципиальную возможность создать циклическую нагрузку от потока жидкости на биоматериал по давлению и касательному напряжению.

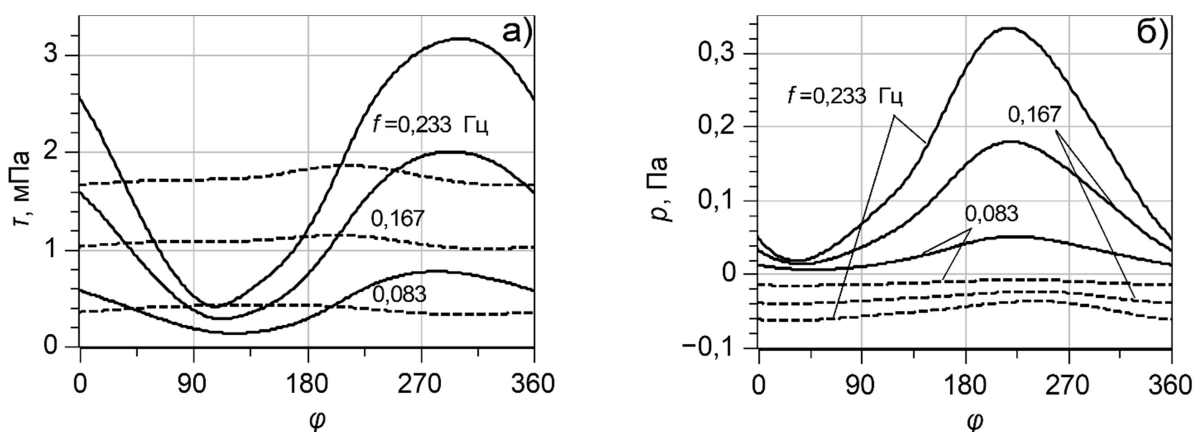


Рис. 25. Окружное распределение среднего касательного напряжения (а) и среднего статического давления (б) для вариантов D (сплошная линия) и C (пунктирная линия).

Границы возможного касательного напряжения и статического давления в моделях биореактора со смещенной осью вращения приведены на Рис. 26. Линии 1 и 2 соответствуют максимальному и минимальному значениям параметров при вращении корпуса, линии 3 и 4 – максимальному и минимальному значениям параметров при вращении каркаса пленки. Как видно из графиков, вариант С (линии 3 и 4) малоэффективен для создания циклической нагрузки.

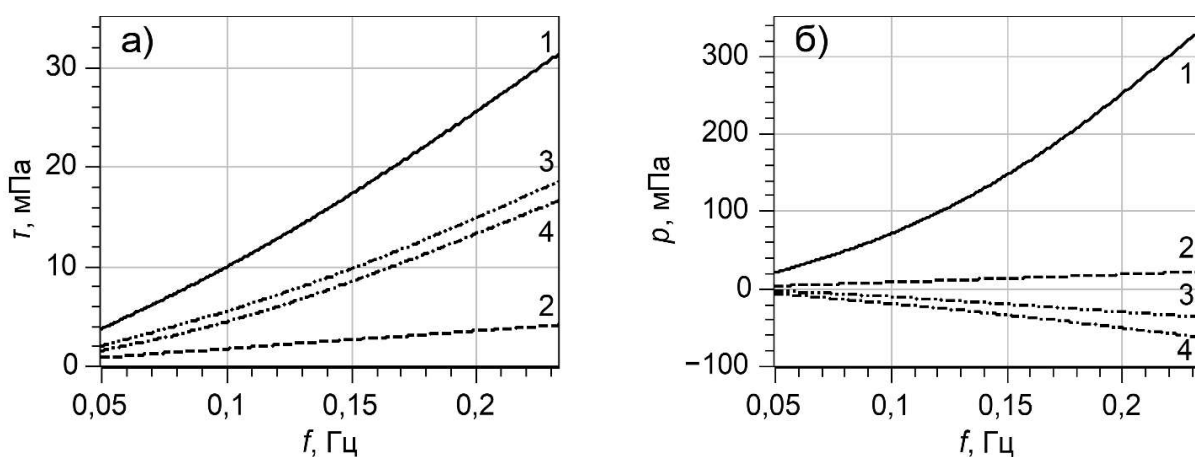


Рис. 26. Максимальные и минимальные значения касательного напряжения (а) и статического давления (б) для вариантов С и D. Максимальные: D (1), С (3), минимальные: D (2), С (4).

В моделях со сдвигом оси корпуса величину размаха колебаний параметров давления и касательного напряжения по угловой координате φ можно оценить с помощью графика на Рис. 27а. Здесь по оси ординат отложен размах колебаний ξ , являющийся разностью между максимальным и минимальным значениями функции, отнесенной к среднему значению функции в процентах, а по оси абсцисс отложена частота вращения. Размах колебаний давления для обеих конструкций оказывается больше, чем для касательного напряжения. Однако наибольшие размахи достигаются при вращении корпуса (кривые 1 и 2). Для касательного напряжения он составляет от 127 до 147 % при частоте вращения $0,05 < f < 0,233$ Гц. Размах статического давления тоже имеет тенденцию к увеличению.

На Рис. 27б для частоты вращения $f = 0,167$ Гц приведены распределения касательного напряжения вдоль образующей рабочей поверхности каркаса в минимальном зазоре ($z = 0, \varphi = 270^\circ$) для всех рассмотренных вариантов генерации течения жидкости. Можно констатировать, что в случаях вращения каркаса (варианты А и С) касательное напряжение на его поверхности не зависит от смещения оси корпуса.

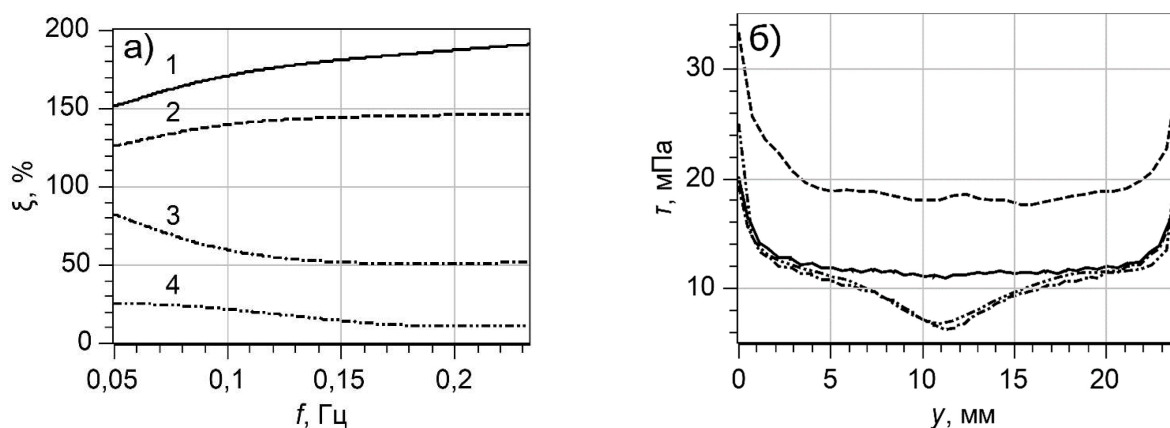


Рис. 27. Размах колебаний давления (1 – D, 3 – C) и касательного напряжения (2 – D, 4 – C) (а); распределение касательного напряжения вдоль образующей $\varphi = 270^\circ$ рабочей поверхности А (штрихпунктирная линия), В (сплошная линия), С (штрихпунктирная линия с двумя точками), D (штриховая линия) при $f = 0,167$ Гц (б).

Таким образом, именно вариант генерации течения вращением корпуса со смещенной осью вращения создает наиболее интенсивную циклическую нагрузку на культивируемый материал. Средние касательные напряжения в пределах 5 % совпадают с аналогичным симметричным случаем, а при увеличении частоты вращения усиливается размах колебаний.

Выводы по Главе 3

В данном разделе методом численного моделирования были изучены основные схемы генерации течения на основе модели ротационного биореактора.

В соответствии с первой перспективной модификацией, размещение культивируемого материала на внутренней поверхности каркаса позволяет избежать неравномерности в распределении механического воздействия, возникающей из-за наличия вихрей Тейлора. Хорошую однородность распределения касательного напряжения имеет от 83 до 88 % поверхности культивирования при частотах вращения от 0,083 до 0,233 Гц. 97 % поверхности культивирования имеет хорошую однородность распределения давления, его среднее значение не превышает значения для нормальной жизнедеятельности клеток. Однако среднее касательное напряжение при таком варианте ниже по величине в сравнении с исходно предложенным устройством биореактора. Его максимальное значение ограничено значением 12 мПа при частоте вращения каркаса пленки 0,233 Гц.

Во второй перспективной модели на основе ротационного биореактора с вращающимся корпусом в зазоре между стенкой и каркасом вихри Тейлора не образуются. Средние касательные напряжения на рабочей поверхности достигают от 5 до 20 мПа при частотах вращения от 0,083 до 0,233 Гц. От 96 до 100 % зоны культивирования клеток имеют хорошую однородность распределения как касательного напряжения, так и статического давления в исследуемом диапазоне частот вращения. Среднее статическое давление выше, чем в других рассчитываемых моделях, однако его величина не

превышает значения, которые могут реализовываться в физиологических условиях. Регулировка уровня механической нагрузки в данной модификации происходит просто – частотой вращения корпуса.

Генерация течения в третьей модели реактора со смещенной осью вращения создает циклическую нагрузку на культивируемый клеточный материал. Способ создания течения вращением поверхностей корпуса обеспечивает большую равномерность распределения касательного напряжения по рабочей поверхности. Размах колебаний касательного напряжения составляет от 127 до 147 % при частоте вращения $0,05 < f < 0,233$ Гц. В случаях вращения внутреннего каркаса постоянство распределения касательного напряжения вдоль его образующей не достигается.

Численное моделирование показало, что увеличение диаметра каркаса пленки приводит к увеличению числа вихрей в рабочей зоне реактора. Поскольку однородность распределения механического воздействия на клетки в зонах сопряжения вихрей ухудшается, то оптимизировать размер поверхности культивирования следует в зависимости от выбранного типа генерации течения и геометрии биореактора.

В ротационном биореакторе способ генерации вращательного движения жидкости и геометрические параметры влияют на гидродинамическое воздействие на биоматериал. Поэтому в зависимости от требований к потоку могут быть выбраны различные модификации его конструкции. Дальнейшее развитие технологии создания тканеинженерных конструкций может быть направлено в сторону реализации конструкции с вращающимся корпусом, обеспечивающей наиболее равномерную механическую нагрузку на клетки. Для циклического воздействия на клетки может быть реализована асимметричная модель.

ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА МЕТОДА АНАЛИЗА РОСТА КОСТНОЙ ТКАНИ В РОТАЦИОННОМ БИОРЕАКТОРЕ

В биореакторе с конструкцией, описанной в Главе 2, были выращены образцы костной ткани, и успешность была подтверждена классическим методом – лазерной конфокальной микроскопией. Однако, данный метод анализа состава и качества биологических образцов является инвазивным и трудоемким: для гистологии требуется извлечение биоматериала, вырезание образцов для исследования и их окрашивание, из-за чего ткани теряют свою жизнеспособность. Поэтому дальнейшая оптимизация технологии создания тканеинженерных конструкций может быть связана с модернизацией системы реактора для постоянного контроля состояния биоматериала в процессе культивирования. Подход выращивания костной ткани на тонких пленках, делает возможным оптический контроль всех этапов биотехнологии методом флуоресцентной спектроскопии. В отличие от гистологических методов он не требует сложной пробоподготовки. Поскольку помимо распространенных флуоресцирующих аминокислот триптофана и тирозина, в растущей костной ткани содержится флуорофор коллаген (важный компонент костного матрикса), метод лазерно-индуцированной флуоресценции становится возможным инструментом диагностики состояния выращиваемого материала. По изменению вкладов флуорофоров в спектры флуоресценции (увеличению содержания коллагена) в процессе культивирования в биореакторе можно оценивать эффективность нарастания костной ткани. Однако существующие алгоритмы анализа спектральных данных не всегда способны однозначно восстановить чистые спектры исходных веществ из смесей и определить их концентрации. По этой причине до сих пор актуален поиск метода анализа спектров флуоресценции многокомпонентных образцов, позволяющего вычислять чистые спектры и вклады всех входящих в образцы флуорофоров.

4.1. Метод измерения спектров ЛИФ

Схема экспериментальной установки для лазерно-индуцированной флуоресцентной спектроскопии представлена на Рис. 28.

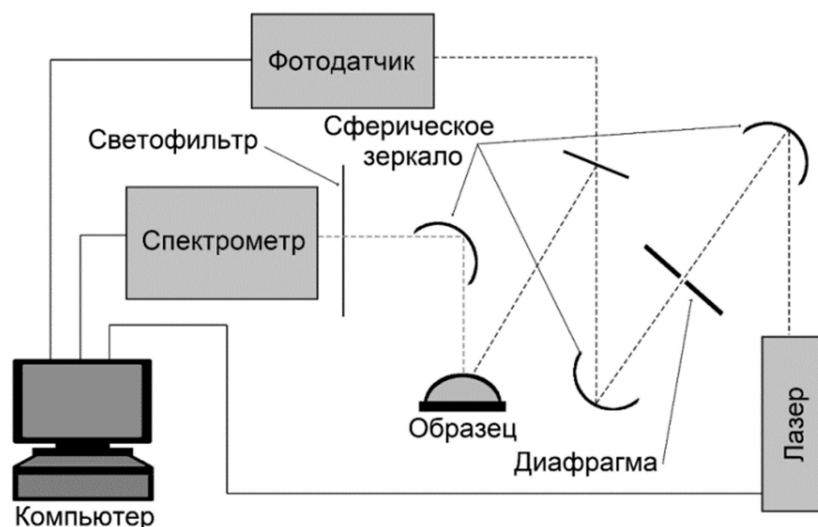


Рис. 28. Схема установки для лазерно-индуцированной флуоресцентной спектроскопии.

Для возбуждения флуоресценции использовалась импульсная лазерная система Vibrant (HE) 355 II + UV (Opotek Inc, США) с оптическим параметрическим генератором, позволяющим перестраивать длину волны в диапазоне ультрафиолета 210–350 нм с шагом 10 нм. Импульсы лазера следуют с частотой 10 Гц и длительностью 5 нс, размер пятна лазера составляет 6x10 мм.

Система сферических зеркал и диафрагма использовалась для удаления рассеянного света от лазерной системы. Для измерения энергии импульсов лазерный пучок делился на два, которые затем направлялись на исследуемый образец и фотодатчик на основе фотодиода ФД-24. Для регистрации спектров флуоресценции использовался монохроматор Acton SpectraPro SP2300 с матрицей Pixis 256 CCD (Princeton Instruments, США).

При регистрации спектров флуоресценции для матриц возбуждения-эмиссии в данной работе использовался диапазон длин волн лазера 210–290 нм. Полимерный фильтр, не пропускающий излучение с длиной волны

короче 300 нм, использовался для защиты матрицы спектрометра от излучения лазера. Энергия импульсов ограничивалась значением 200 мкДж на импульс, так как на данном участке интенсивность флуоресценции зависит от энергии линейно, а повышение энергии приводит к насыщению сигнала флуоресценции [118]. Спектры флуоресценции регистрировались в диапазоне длин волн 290–700 нм и нормировались на чувствительность матрицы. Для каждой длины волны возбуждения спектры флуоресценции регистрировались 5 раз, нормировались на суммарную поглощенную дозу излучения и усреднялись. Также во время измерений спектров контролировалась линейность зависимости интенсивности флуоресценции от поглощенной дозы.

4.2. Новый алгоритм на основе метода главных компонент

Если все исследуемые образцы имеют схожее происхождение (например, один тип биологической ткани), то можно предположить, что все они будут состоять из одного набора флуорофоров. Для оптически тонких образцов регистрируемый спектр флуоресценции определяется суммой интенсивностей отдельных компонент (1). Спектральные данные набора образцов, получаемые в результате измерений спектров ЛИФ перестраиваемым лазером, являются трехмерным массивом, который можно представить в виде тензора X_{ijk} (i, j, k – индексы, соответствующие количеству матриц и точкам в спектрах возбуждения и флуоресценции соответственно). В нем по трем направлениям распределяются значения интенсивности флуоресценции в зависимости от номера образца, длины волны возбуждения и флуоресценции. Структура подобных спектральных данных для оптически прозрачных образцов описывается формулой:

$$X_{ijk} = \sum_m^M a_i^{(m)} E_j^{(m)} F_k^{(m)}, \quad (4)$$

где M – общее число флуорофоров, a – концентрации, E – спектры возбуждения, F – спектры флуоресценции флуорофоров. Для анализа

подобного набора данных существует тензорный вариант метода главных компонент, основанный на сингулярном разложении тензоров.

Для вычисления спектров возбуждения и флуоресценции чистых веществ в данной работе был предложен алгоритм последовательных приближений на основе МГК [92]. За основу для вычисления векторов главных компонент был взят алгоритм NIPALS (Non-Linear Iterative Partial Least Squares) [119] в тензорном виде.

Стандартное вычисление главных компонент по МГК заключается в последовательном расчете некоторого числа векторов главных компонент. Это число определяется минимизацией остаточной дисперсии данных. Таким образом, по условию построения вектора главных компонент ортогональны друг другу и, соответственно, их графики знакопеременны. Чтобы перейти к компонентам, которые соответствуют чистым веществам, в алгоритм было внесено два основных изменения. Число главных компонент задавалось изначально исходя из предположения о составе образца. Далее вектора главных компонент последовательно уточнялись с использованием разностного тензора исходных данных и вкладов всех компонент кроме уточняемой.

Далее приведены этапы вычисления спектров чистых веществ по новому алгоритму.

1. Экспериментальные данные (матрицы возбуждения-эмиссии) представляются в виде тензора X_{ijk} , где i – номер матрицы возбуждения-эмиссии i -того образца, j и k – индексы длин волн возбуждения и флуоресценции. Для каждого конкретного типа образцов задается общее количество главных компонент M , исходя из первоначального предположения о составе образца. Начальные приближения векторов всех главных компонент задаются единичными векторами.

2. Для каждой главной компоненты ($l = 1, \dots, M$) последовательно следуют вычисления:

2.1. Рассчитывается тензор X'_{ijk} (из X_{ijk} вычитаются вклады всех компонент, кроме l -той, уточняемой на этом шаге):

$$X'_{ijk} = X_{ijk} - \sum_{m \neq l}^M a_i^{(m)} E_j^{(m)} F_k^{(m)}. \quad (5)$$

2.2. Далее следует процедура – поиск наилучшего приближения тензора X'_{ijk} тензором вида $a_i^{(l)} E_j^{(l)} F_k^{(l)}$. В основе расчета главных компонент лежит процедура минимизации функционала Φ методом наименьших квадратов:

$$\Phi = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J \sum_{k=1}^K \left(X'_{ijk} - a_i^{(l)} E_j^{(l)} F_k^{(l)} \right)^2 \rightarrow \min. \quad (6)$$

Решение этой задачи ищется последовательными итерациями по формулам из условия минимума функционала Φ :

$$a_i = \frac{\sum_{j=1}^J \sum_{k=1}^K X'_{ijk} E_j^{(l)} F_k^{(l)}}{\|E^{(l)}\|^2 \|F^{(l)}\|^2}, E_j = \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{k=1}^K X'_{ijk} a_i^{(l)} F_k^{(l)}}{\|a^{(l)}\|^2 \|F^{(l)}\|^2}, F_k = \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J X'_{ijk} a_i^{(l)} E_j^{(l)}}{\|a^{(l)}\|^2 \|E^{(l)}\|^2}. \quad (7)$$

В качестве критерия остановки используется малость относительного уменьшения значения минимизируемого функционала Φ за цикл. В результате расчета получается новое приближение l -той компоненты.

3. Шаги из пункта 2 повторяются до стабилизации остаточной дисперсии.

В отличие от стандартного алгоритма МГК в пункте 2.1. вычисляется новый тензор, из которого убираются вклады всех компонент, кроме уточняемой. Благодаря такому подходу при каждом последующем пересчете этой компоненты используются неучтенные ранее данные из остатка. В результате знакопеременные компоненты естественным образом начинают приближаться к положительно определенным и перестают быть ортогональными. Вычисленные положительные спектры можно затем сопоставлять со спектрами известных флуорофоров. Таким образом, благодаря специальной трехмерной структуре спектральных данных, представленный вычислительный алгоритм из матриц многокомпонентных образцов рассчитывает спектры возбуждения и флуоресценции исходных флуорофоров, а также концентрационные профили чистых веществ. В отличие от алгоритма MCR-ALS, представленный метод не зависит от

начального приближения векторов главных компонент (MCR-ALS часто требует предварительной оценки спектральных окон для уменьшения неоднозначности решения). В новом методе не используется какая-либо априорная информация о спектрах. Это свойство особенно важно для биологических тканей, точный состав которых неизвестен, а спектры флуоресцирующих компонент могут меняться в зависимости от микроокружения.

На Рис. 29 приведена визуализация того, как происходит уточнение спектров при увеличении числа итераций расчета для тестового набора трехкомпонентных матриц, который моделировался численно. Спектральные данные генерировались случайным образом по алгоритму, подробно описанному в разделе 4.3. Спектры флуоресценции чистых компонент моделировались кубическими полиномами, построенными по пяти точкам. Спектры возбуждения и профили концентраций генерировались случайным образом в диапазоне $[0, 1]$. Тестовый набор имел размерность $10 \times 10 \times 101$ (число матриц возбуждения-эмиссии, число точек данных в спектрах возбуждения и флуоресценции).

После первой итерации главные компоненты были знакопеременными, что соответствовало наилучшему описанию статистических различий спектров (Рис. 29). Далее, по мере роста числа итераций расчеты графики сдвигались в область положительных значений. В результате, для совпадения расчётных спектров с исходными данными хватило 52 итераций. Для данного примера ошибки вычисления спектров флуоресценции составили 3,1, 1,8 и 2,4 % для первого, второго и третьего пиков соответственно. Здесь и далее ошибка рассчитывалась как выраженное в процентах отношение нормы разности векторов чистого и рассчитанного спектров к норме вектора чистого спектра. Спектры возбуждения и весовые коэффициенты в виде профилей концентрации также рассчитывались с хорошей точностью. Ошибка расчета спектров возбуждения составляла 3,1, 2 и 2,5 % для трех

компонент соответственно. Весовые коэффициенты были рассчитаны со средней ошибкой 2,4 %.

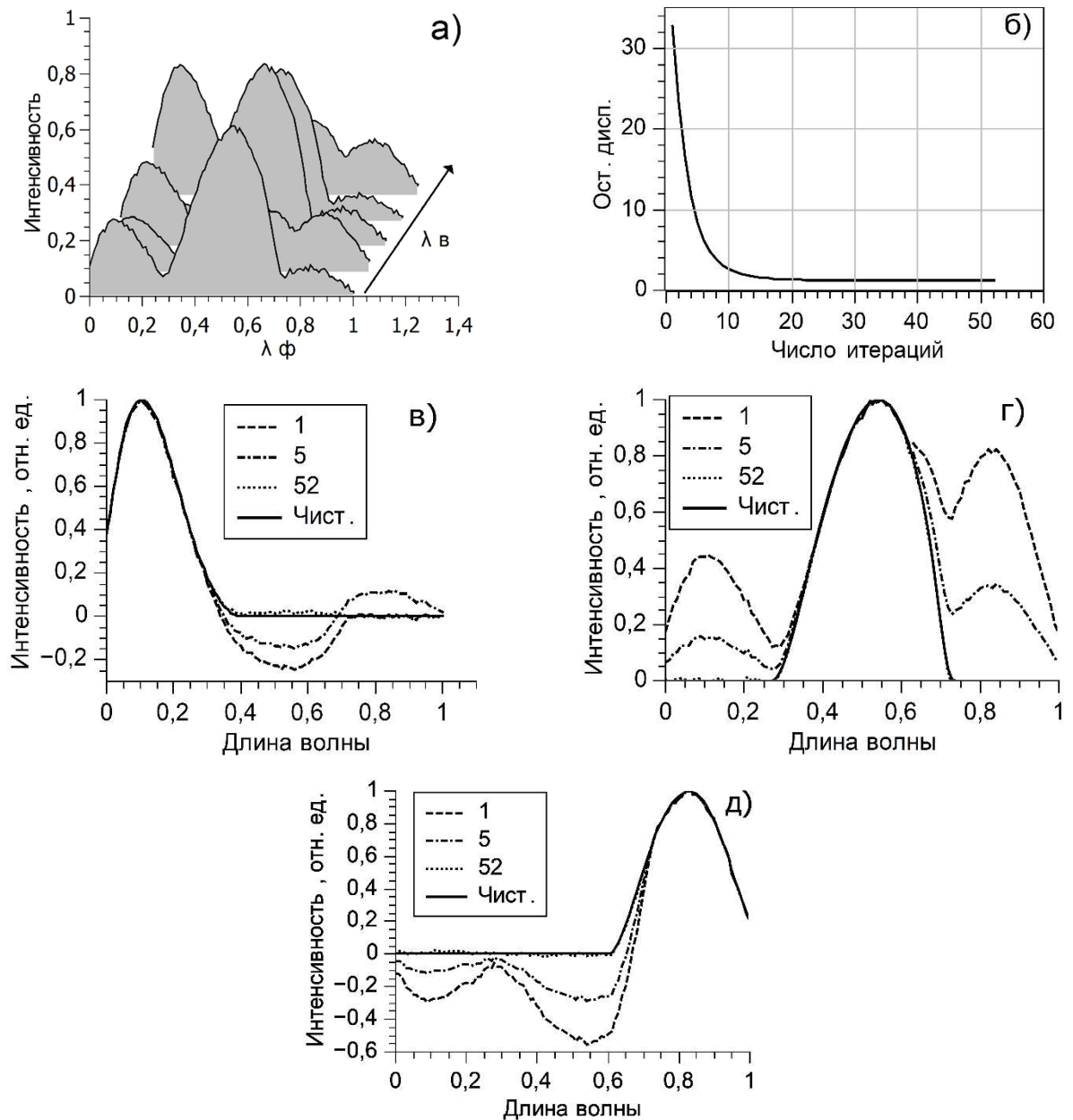


Рис. 29. Расчет спектров флуоресценции из трехкомпонентных матриц возбуждения-эмиссии. Характерная матрица (а), зависимость от числа итераций расчета: остаточной дисперсии (б) и спектров флуоресценции первой (в), второй (г), третьей (д) главных компонент.

Представленный алгоритм предполагает изначальный выбор определенного числа главных компонент. Исходя из опыта работы с матрицами биологических тканей, обычно 3–4 главные компоненты

описывают спектры с хорошей точностью. Если в алгоритме выбрано неверное число главных компонент, то решение будет иметь ряд особенностей, по которым можно определить правильно ли предположение. На Рис. 30 представлены примеры разложения предыдущего набора трехкомпонентных матриц на 2–4 главные компоненты. Видно, что при выборе двух компонент спектры положительны, но второй пик оказывается двойным, а доля необъяснённой дисперсии высока – 0,15 (Таблица 2). Доля необъясненной дисперсии – отношение остаточной дисперсии к выборочной (сумме остаточной и объясненной). Остаточная дисперсия вычислялась как квадрат нормы разности исходных данных и суммы рассчитанных главных компонент. Объясненная дисперсия вычислялась как квадрат нормы матриц суммы рассчитанных главных компонент.

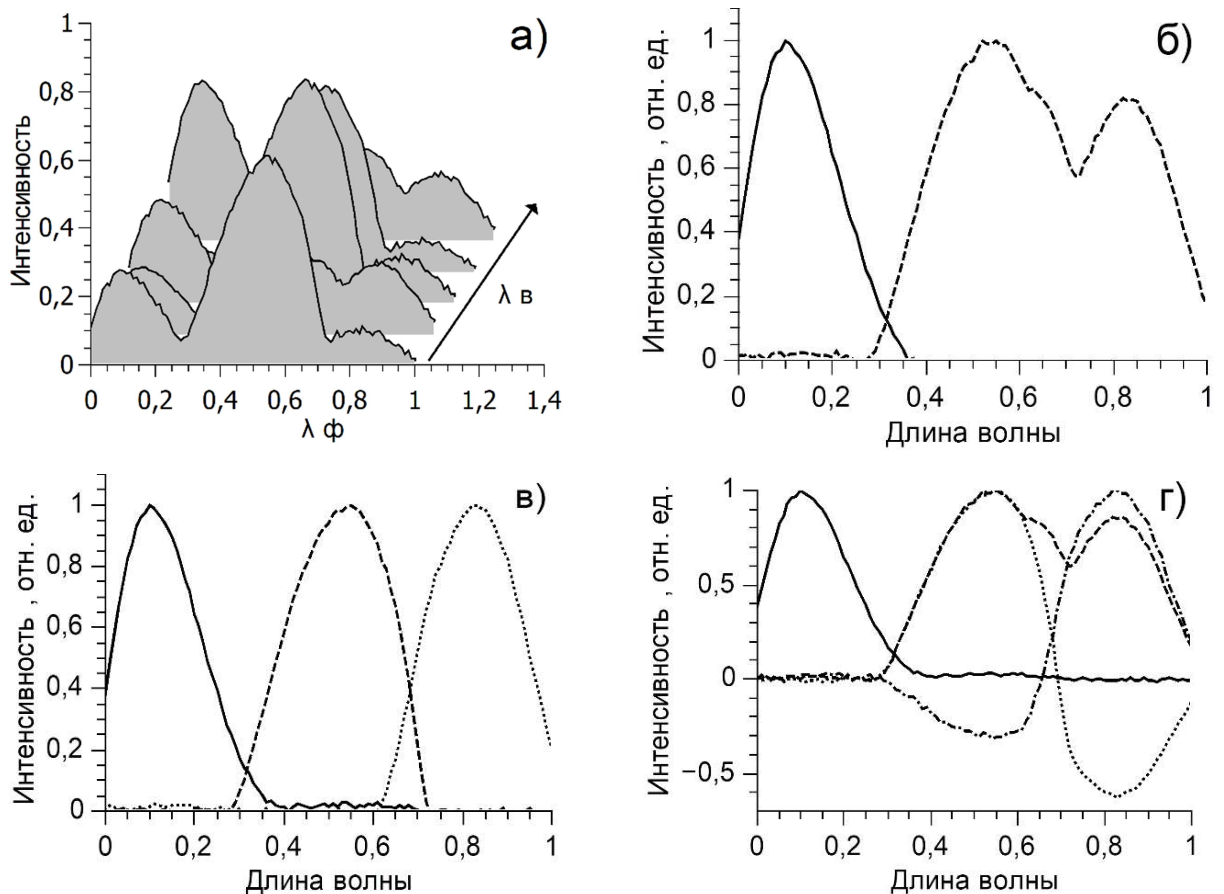


Рис. 30. Разложение трехкомпонентных матриц (а) на 2 (б), 3 (в) и 4 (г) главные компоненты по новому алгоритму.

Таблица 2. Зависимость доли необъясненной дисперсии от числа главных компонент.

Число гл. комп.	2	3	4
Доля необъясн. дисп.	0,15	0,003	0,0025

Если число компонент в расчете превышает истинное число компонент в матрицах, то рассчитанные спектры оказываются знакопеременными. При этом весовые коэффициенты некоторых компонент в среднем по величине оказывались меньше, чем коэффициенты остальных компонент. Данные факты могут служить показателем того, что при расчете выбрано большее число компонент, чем присутствует в образце. При выборе верного числа главных компонент все спектры и весовые коэффициенты рассчитываются с хорошей точностью. Истинное число главных компонент сложно предположить, не зная ничего о составе образца. Поэтому при выборе можно руководствоваться описанными выше особенностями.

4.3. Отработка алгоритма на модельных спектрах

Предложенный алгоритм был отработан на тестовых наборах матриц возбуждения-эмиссии, которые моделировались численно и составлялись из трех спектров возбуждения, флуоресценции и профилей концентраций по формуле (4), которые генерировались случайным образом по описанному ниже алгоритму [120]. В реальных образцах могут реализовываться различные варианты пересечения спектров флуоресценции, и в соответствии с теоремами о разрешимости не для всех случаев чистые спектры могут быть восстановлены точно стандартными алгоритмами MCR [98]. Поэтому для тестирования нового алгоритма было выбрано три основных комбинации чистых спектров флуоресценции (Рис. 31): попарно пересекающиеся пики, тройное пересечение (все три спектра флуоресценции имеют участок

ненулевой интенсивности) и случай, когда один пик полностью накладывается на другой. Последний вариант – самый сложный для задачи восстановления чистых спектров [98], ее решения, получаемые стандартными алгоритмами хемометрики, неоднозначны. Далее пики нумеруются и обозначаются по порядку расположения из максимумов.

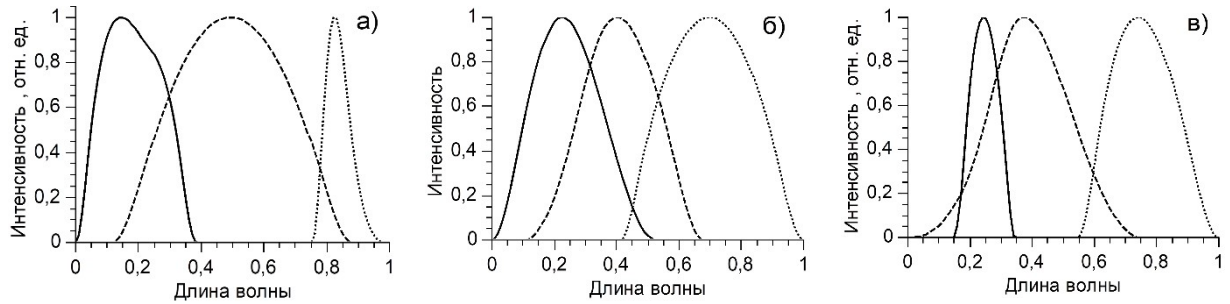


Рис. 31. Варианты пересечения спектров флуоресценции: попарное (а), тройное (б) и полное наложение первого пика на второй (в).

Каждый чистый спектр флуоресценции содержал 101 точку данных на отрезке $[0, 1]$ с шагом 0,01. Для их генерации на отрезке $[0, 1]$ случайно задавали 5 точек. Они соответствовали максимуму пика, полуширине слева и справа от максимума, а также точкам зануления интенсивности слева и справа. Итоговый набор из 5 точек можно представить в виде пар: $(x_{l0}, 0)$, $(x_l, 0,5)$, $(x_m, 1)$, $(x_r, 0,5)$, $(x_{r0}, 0)$. Эти точки соединялись кубическим полиномом, с условием зануления первых производных на концах отрезка. Спектры возбуждения содержали 11 точек на отрезке $[0, 1]$, и для каждой точки значение эффективности возбуждения задавалось случайно в диапазоне $[0, 1)$. Профили концентраций задавались случайными весовыми коэффициентами в диапазоне $[0, 1)$. Число матриц в каждом моделировании составляло 10 шт. На данные накладывался искусственный шум: для спектра возбуждения составлял $\pm 5\%$ (случайные числа в диапазоне $[-0,05, 0,05)$), и для спектра флуоресценции 2% (диапазон $[-0,02, 0,02)$).

Наборы матриц анализировались с использованием описанного выше модифицированного алгоритма на основе МГК, а рассчитанные спектры и весовые коэффициенты чистых компонент сравнивались с исходными.

Дополнительно результат работы нового алгоритма сравнивался с другими известными методами восстановления чистых спектров: MCR-ALS [99] и методом составления узких комбинаций главных компонент [102].

Модифицированный МГК одновременно рассчитывает спектры флуоресценции, возбуждения и весовые коэффициенты чистых веществ. Алгоритм MCR-ALS работает на двумерных массивах данных и вычисляет для них спектры флуоресценции и концентрационные профили. Из последних можно впоследствии вычислить спектры возбуждения и весовые коэффициенты. Метод составления узких линейных комбинаций также в первую очередь рассчитывает спектры флуоресценции чистых компонент, а затем, применяя линейную регрессию, можно рассчитать их спектры возбуждения и весовые коэффициенты. Далее приведено сравнение только векторов спектров флуоресценции, так как они наиболее информативны. По опыту спектры возбуждения и весовые коэффициенты рассчитываются с ошибками того же порядка.

Попарное пересечение спектров флуоресценции

При попарном пересечении спектров флуоресценции все три метода восстанавливают чистые спектры достаточно хорошо (Таблица 3, Рис. 32). В данном варианте в алгоритме MCR-ALS начальные вектора спектров флуоресценции для каждого флуорофора задавались спектральными окнами по алгоритму EFA [121]. EFA хорошо работает в случаях, когда спектральные окна появляются и исчезают в одном порядке при прохождении диапазона длин волн флуоресценции.

Таблица 3. Ошибки расчета чистых спектров флуоресценции.

Ошибки (%)	Модиф. МГК	Узк. комб.	MCR-ALS
1 комп.	2	2	2,4
2 комп.	2,4	4,8	5,8
3 комп.	3,4	3,3	5,3

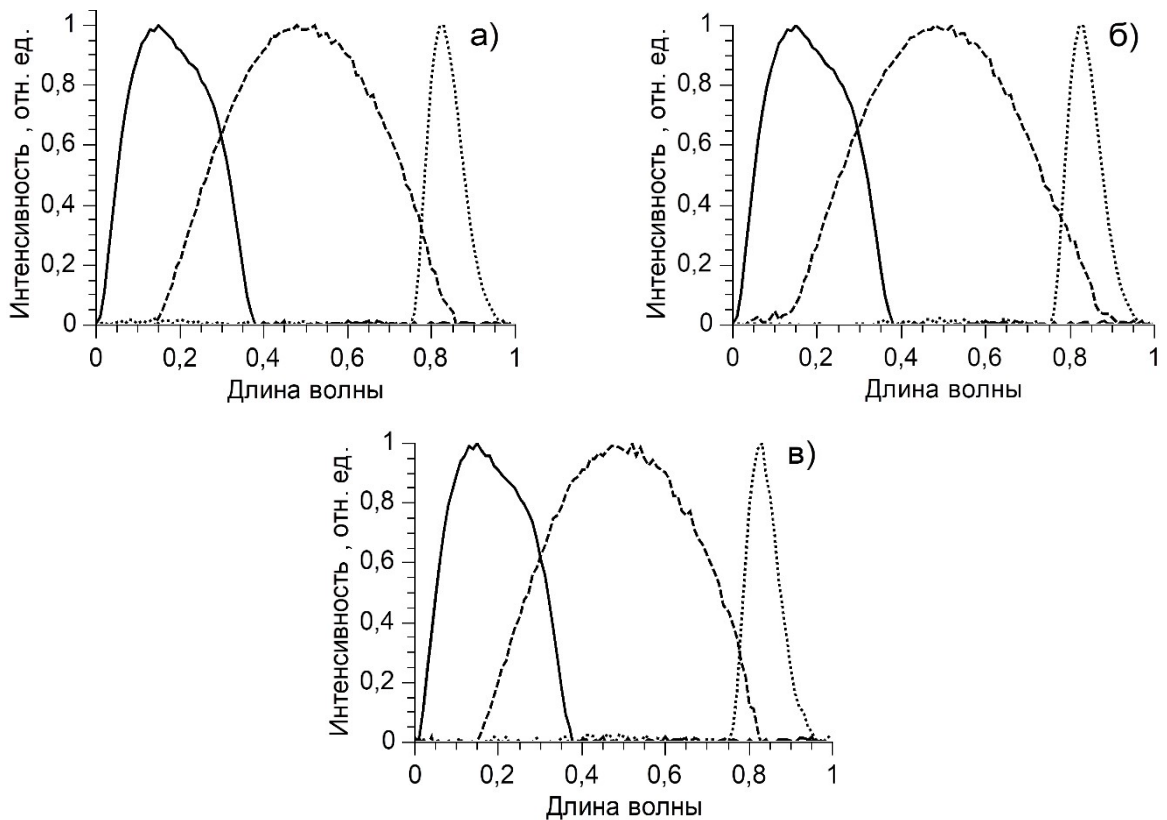


Рис. 32. Спектры флуоресценции чистых веществ, пересекающиеся попарно, вычисленные модифицированным МГК (а), методом узких комбинаций главных компонент (б) и MCR-ALS (в).

Тройное пересечение спектров флуоресценции

При тройном пересечении спектров флуоресценции все алгоритмы дают хорошие результаты (Рис. 33, Таблица 4). В MCR-ALS также применялись начальные вектора в виде спектральных окон, рассчитанные методом ЕФА. Подход поиска узких пиков в данном случае имеет особенность: комбинация векторов главных компонент для первого пика будет рассчитана со стороны правого плеча немного уже, чем она есть, и будет иметь небольшой вклад третьего пика (Рис. 33б). Эта особенность в виде дополнительного пика появляется из-за критерия выбора наиболее узкой компоненты (отношение максимума спектра к его площади) и тройного пересечения спектров [102].

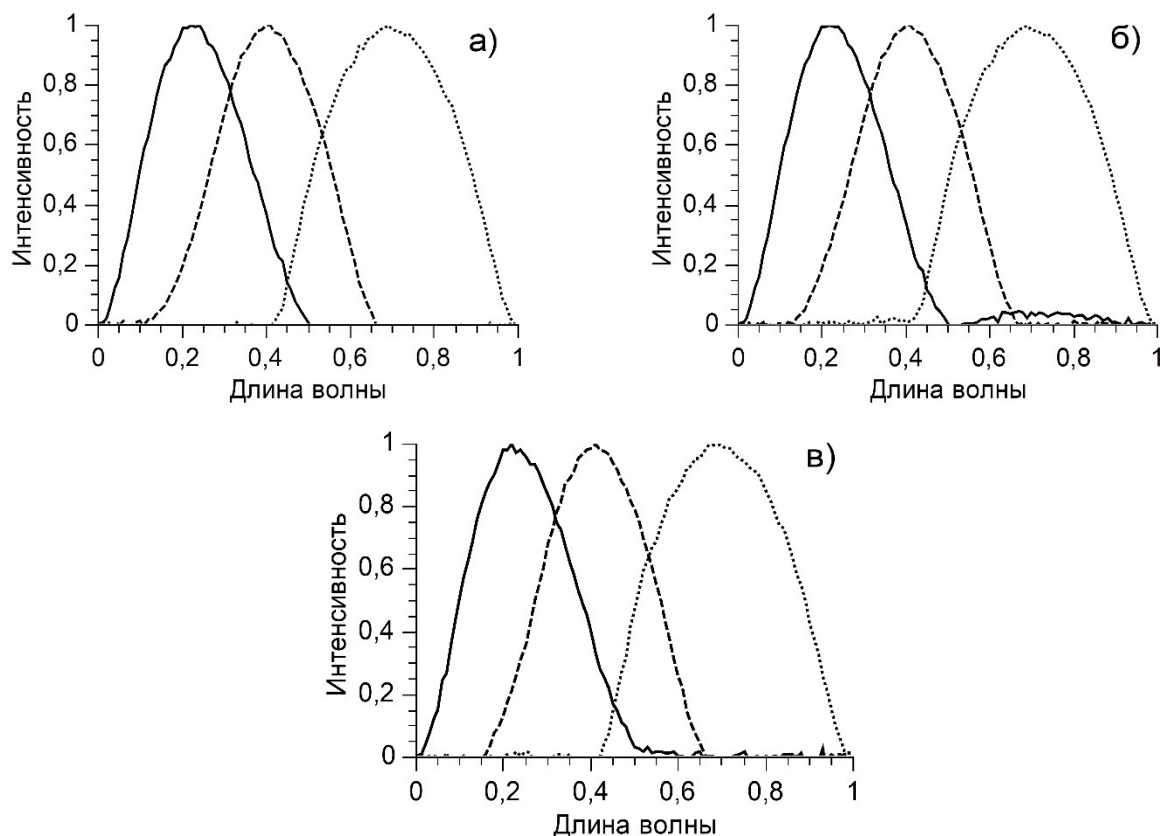


Рис. 33. Спектры флуоресценции чистых веществ, имеющие общий участок ненулевой флуоресценции, вычисленные модифицированным МГК (а), методом узких комбинаций главных компонент (б) и MCR-ALS (в).

Таблица 4. Ошибки расчета чистых спектров флуоресценции.

Ошибки (%)	Модиф. МГК	Узк. комб.	MCR-ALS
1 комп.	3,5	5	3,3
2 комп.	2,1	1,7	5,7
3 комп.	1,5	2	2

Полное наложение первого спектра флуоресценции на второй

Сравнение результатов работы всех алгоритмов представлено на Рис. 34. Данный вариант пересечения спектров является одним из самых сложных в задаче восстановления спектров. При таком пересечении спектров флуоресценции алгоритмы MCR проявляют сильную неоднозначность в решении [97]. Спектральные окна методом EFA оценить нельзя из-за

специфического расположения спектров. Поэтому в данном расчете методом MCR-ALS в качестве начальных данных взяты случайные вектора единичной длины. При выборе других начальных векторов решение поменяется. Выбрать из всего множества решений единственное не представляется возможным без знаний о реальных формах спектров. Метод узких пиков дает однозначное решение, но данная комбинация для второго пика не соответствует реальному, более широкому чистому спектру, на который накладывается первый пик. В результате только алгоритм МГК, работающий на матрицах возбуждения-эмиссии, рассчитывает чистые спектры с хорошей точностью (Таблица 5).

Таблица 5. Ошибки расчета чистых спектров флуоресценции.

Ошибки (%)	Модиф. МГК	Узк. комб.	MCR-ALS
1 комп.	4,8	3,8	4,4
2 комп.	1,7	25	26,3
3 комп.	4,3	2,4	7,6

Из приведенных примеров видно, что новый алгоритм успешно справляется с задачей восстановления чистых спектров. При пересечениях спектров флуоресценции, удовлетворяющих условиям теорем о разрешимости [98] все сравниваемые алгоритмы показывают хороший результат. Однако только новый алгоритм анализа матриц с хорошей точностью восстанавливает спектры в случае, когда один спектр флуоресценции полностью находится в спектральном диапазоне другого. Стандартные алгоритмы MCR не способны точно разрешить данную задачу.

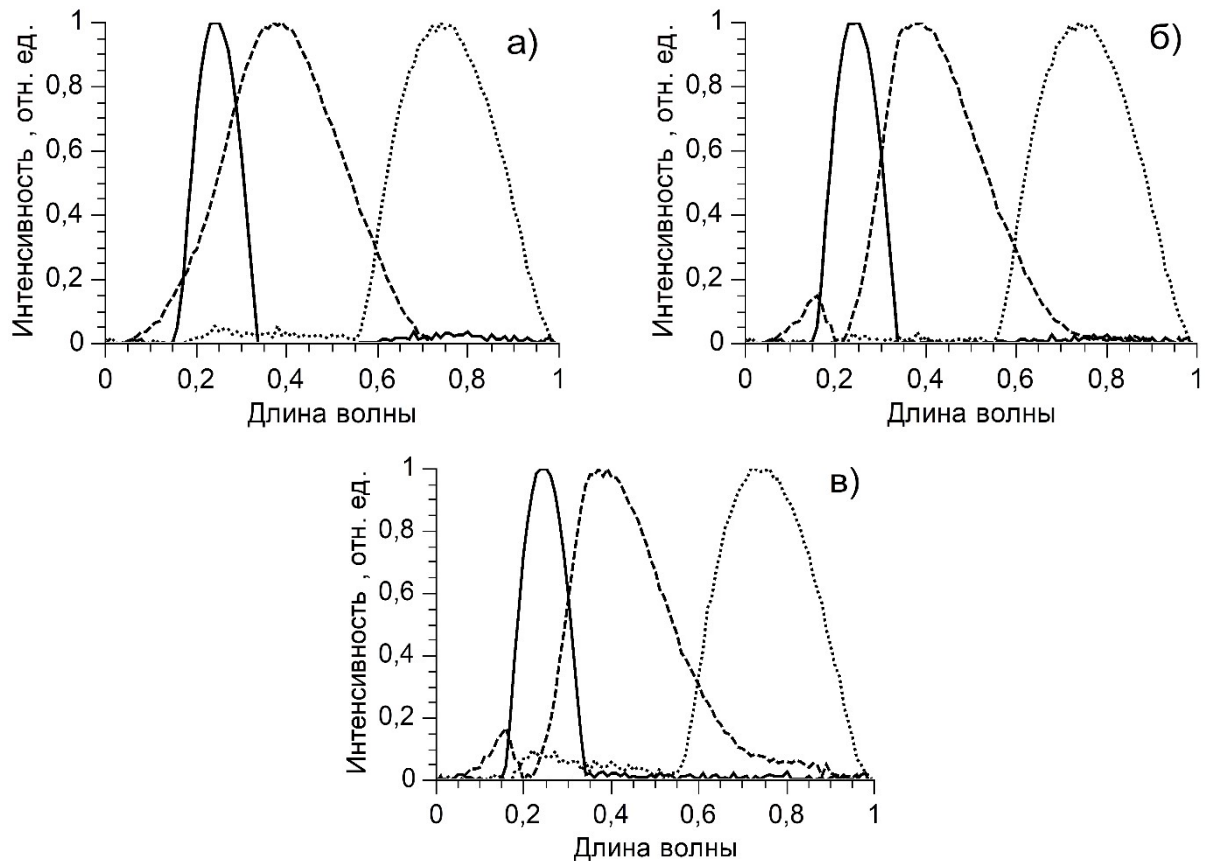


Рис. 34. Спектры флуоресценции чистых веществ, при полном пересечении двух пиков, вычисленные модифицированным МГК (а), методом узких комбинаций главных компонент (б) и MCR-ALS (в).

4.4. Отработка алгоритма на смесях флуоресцентных красителей

Алгоритм работы модифицированного МГК тестировался на оптических фантомах биологических тканей в виде двух- и трехкомпонентных смесей флуоресцентных красителей [92]. В модельных экспериментах для создания оптически прозрачных образцов использовались флуорофоры пиридоксин, флуоресцеин, этакридин лактат и родамин (Sigma-Aldrich, США) с максимумами флуоресценции, представленными в Таблице 6.

Концентрация флуорофоров подбиралась таким образом, чтобы итоговые смеси были оптически тонкими, то есть глубина поглощения лазерного излучения в них была больше толщины образца. Для этого изначально для каждого флуорофора определялся диапазон концентраций, в котором интенсивность флуоресценции зависела от концентрации вещества

линейно. Пример зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации при длине волны возбуждения 220 нм представлен на Рис. 35 для пиридоксина. По графику линейный участок соответствует концентрации меньше 0,05 мг/мл. При увеличении концентрации больше 0,5 мг/мл интенсивность флуоресценции падает из-за процесса концентрационного тушения (самотушения) [122]. Спектры возбуждения флуорофоров при уменьшении концентрации меняют свою форму. Это также учитывалось при выборе концентраций для создания оптически прозрачных образцов.

Таблица 6. Максимумы флуоресценции флуорофоров.

Флуорофор	Длина волны максимума флуоресценции, нм
Пиридоксин	395
Флуоресцеин	514
Этакридин лактат	513
Родамин	582

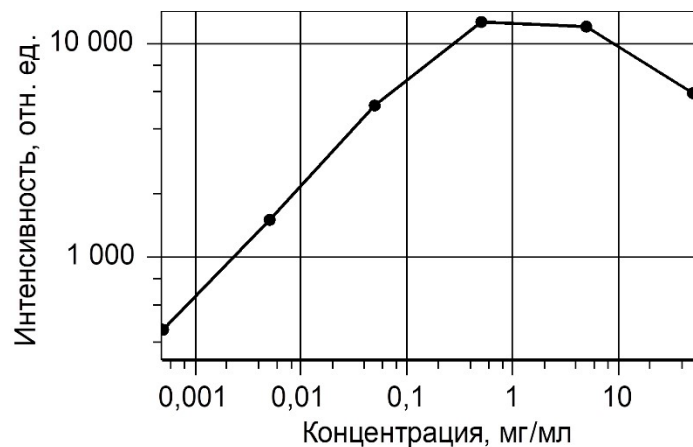


Рис. 35. Зависимость интенсивности флуоресценции пиридоксина от концентрации при длине волны возбуждения 220 нм.

Спектры флуоресценции и возбуждения флуоресцентных красителей после подбора концентраций представлены на Рис. 36.

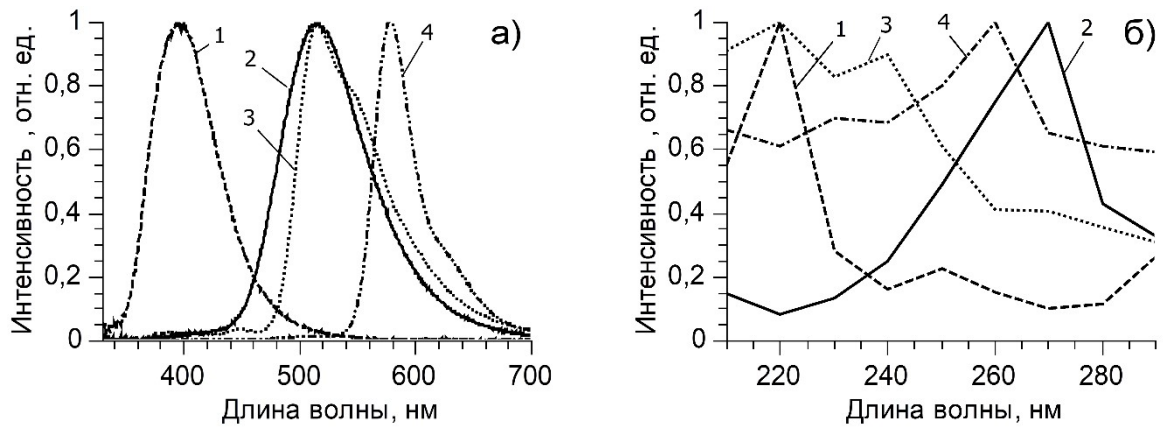


Рис. 36. Нормированные спектры флуоресценции (а) и возбуждения (б) флуоресцентных красителей: 1 – пиридоксин, 2 – этакридин лактат, 3 – флуоресцеин, 4 – родамин.

Двухкомпонентные смеси

Для приготовления смесей использовали два флуорофора: пиридоксин и флуоресцеин с максимумами флуоресценции на длинах волн 395 и 514 нм, соответственно. Пиридоксин был приобретен в виде водного раствора, флуоресцеин разводили из сухого порошка деионизированной водой. Исходные концентрации флуорофоров: пиридоксин – 50 мг/мл, флуоресцеин – 1,2 мг/мл. Всего было подготовлено 3 оптически прозрачные смеси с различными концентрациями составляющих компонент [123]. Характерная матрица возбуждения-эмиссии для одной из них представлена на Рис. 37 в виде каскадной диаграммы.

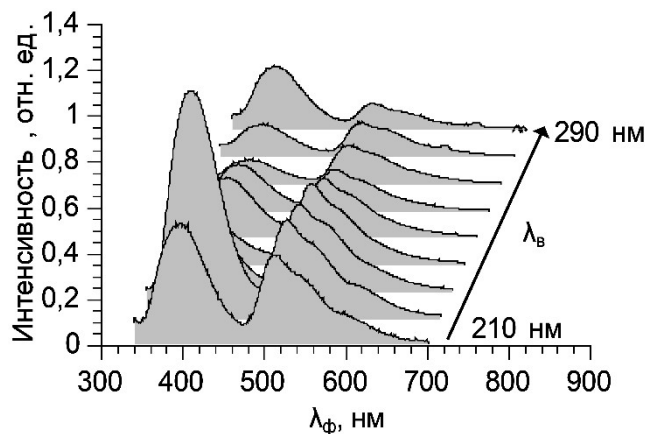


Рис. 37. Матрица возбуждения-эмиссии смеси пиридоксина и флуоресцеина.

Все полученные матрицы возбуждения-эмиссии подвергались анализу модифицированным МГК. Использованный в анализе диапазон по длинам волн возбуждения матриц составлял 220–290 нм, так как на длине волны 210 нм сигнал был сильно зашумлен.

Полученные в результате анализа МГК главные компоненты и их сравнение со спектрами исходных флуорофоров представлены на Рис. 38. Первая компонента соответствует пиридоксину, а вторая – флуоресцеину. Ошибка расчета спектров флуоресценции составила 2,8 % для пиридоксина и 11,5 % – для флуоресцеина. Пониженная точность расчета спектра флуоресцеина связана с завышенной интенсивностью флуоресценции рассчитанного спектра в диапазоне 350–480 нм, возникшей из-за загрязнения образцов смесей. Ошибка расчета спектров возбуждения составила 6 и 8 % соответственно.

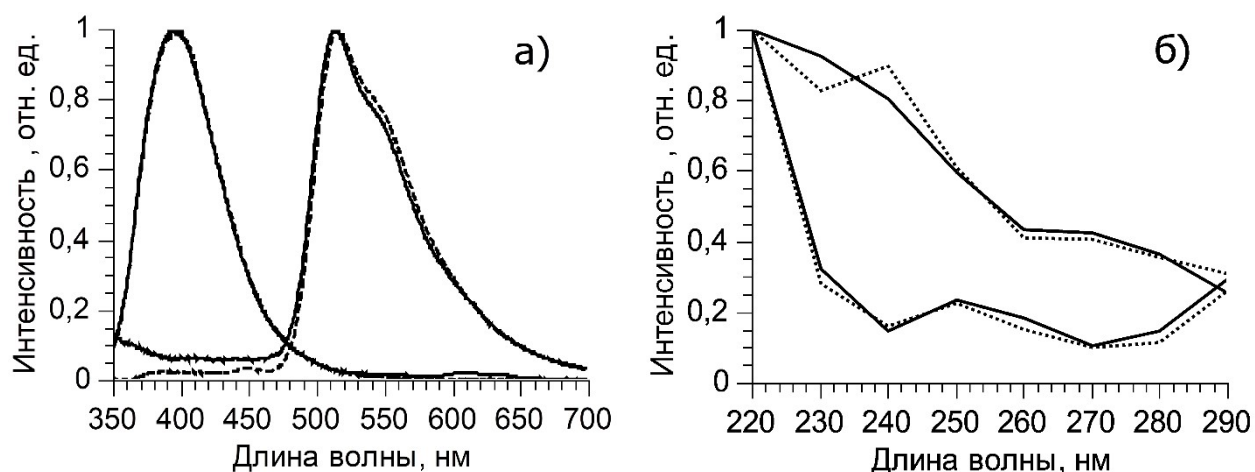


Рис. 38. Сравнение главных компонент (сплошная линия) и чистых спектров (пунктирная линия): спектры флуоресценции (а) и спектры возбуждения (б).

В первом и втором столбце Таблицы 7 представлены весовые коэффициенты, полученные в результате расчета МГК, и определяющие вклады соответствующих компонент в матрицы смесей. Точность вычисления вкладов компонент была оценена сравнением с информацией о концентрации исходных компонент в смесях. Для каждого образца было

рассчитано отношение весовых коэффициентов компоненты 2 к 1, что соответствовало отношению концентраций флуоресцеина и пиридоксина. Сравнение данных отношений, нормированных на отношение для первого образца, представлено в Таблице 7 в третьем и четвертом столбце. Видно, что отношения вкладов главных компонент и концентраций совпадают в пределах 5 %.

Таблица 7. Сравнение рассчитанных весовых коэффициентов с концентрациями.

Образец:	Весовые коэффициенты		Отношение компонент	
	ГК1	ГК2	ГК2/ГК1 к 1 образцу	Ф/П к 1 образцу
Смесь 1	3252,7	666,8	1	1
Смесь 2	3043,4	1280,6	2,05	2
Смесь 3	6071,1	592,8	0,47	0,5

Можно отметить, что модифицированный алгоритм МГК позволяет рассчитывать спектры флуоресценции и возбуждения исходных компонент из матриц двухкомпонентных смесей и оценивать относительные вклады этих компонент с достаточно хорошей точностью.

Трехкомпонентные смеси

Была проведена проверка работоспособности модифицированного алгоритма МГК на смесях, содержащих 3 флуорофора (пиридоксин, этакридин лактат, родамин), разведенных в физиологическом растворе (0,9 % NaCl), чтобы приблизить микроокружение к физиологическому.

Общее количество образцов – 5, концентрации флуорофоров не контролировались. Характерная матрица одного из образцов представлена на Рис. 39. При измерении матриц возбуждения-эмиссии использовали диапазон

длин волн возбуждения 210–290 нм, длину волны 210 нм из анализа исключали из-за низкой энергии импульсов лазера.

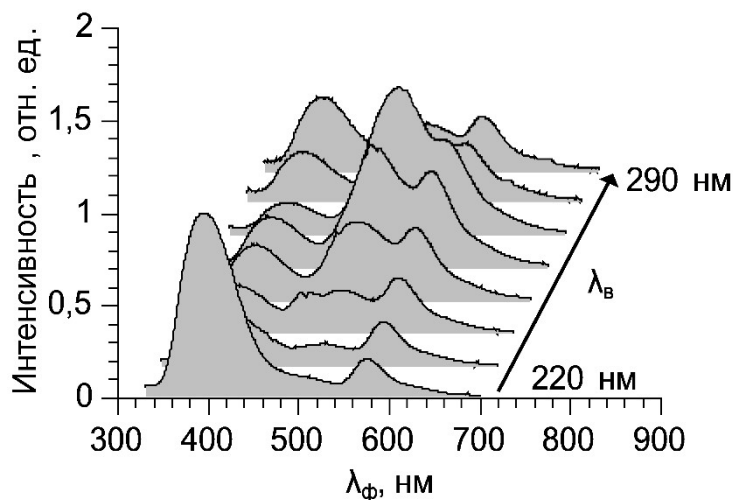


Рис. 39. Характерная матрица возбуждения-эмиссии смеси пиридоксина, этакридина лактата и родамина.

Все матрицы подвергались анализу МГК для расчета спектров флуоресценции и возбуждения главных компонент. Результаты анализа спектральных данных приведены на Рис. 40. Несоответствия спектров флуоресценции в областях 520–650 нм, 350–480 нм и 330–550 нм связаны с изначальным разбросом значения интенсивности флуоресценции от энергии импульса в пределах 5 % и малым количеством исследуемых образцов. Спектры возбуждения этакридина лактата и родамина имеют схожую с исходной форму, однако спектр пиридоксина плохо совпадает с исходным в области с малой интенсивностью флуоресценции (230–290 нм). Линейная регрессия показала, что спектры возбуждения компонент во всех смесях хорошо совпадают друг с другом при разных концентрациях. Это значит, что все образцы являются оптически тонкими, и эти изменения в спектрах возбуждения не связаны с оптической толщиной. Несовпадение может быть связано взаимодействием пиридоксина с другими флуорофорами, либо ионами натрия и хлора из физраствора, из-за чего его спектр возбуждения изменился.

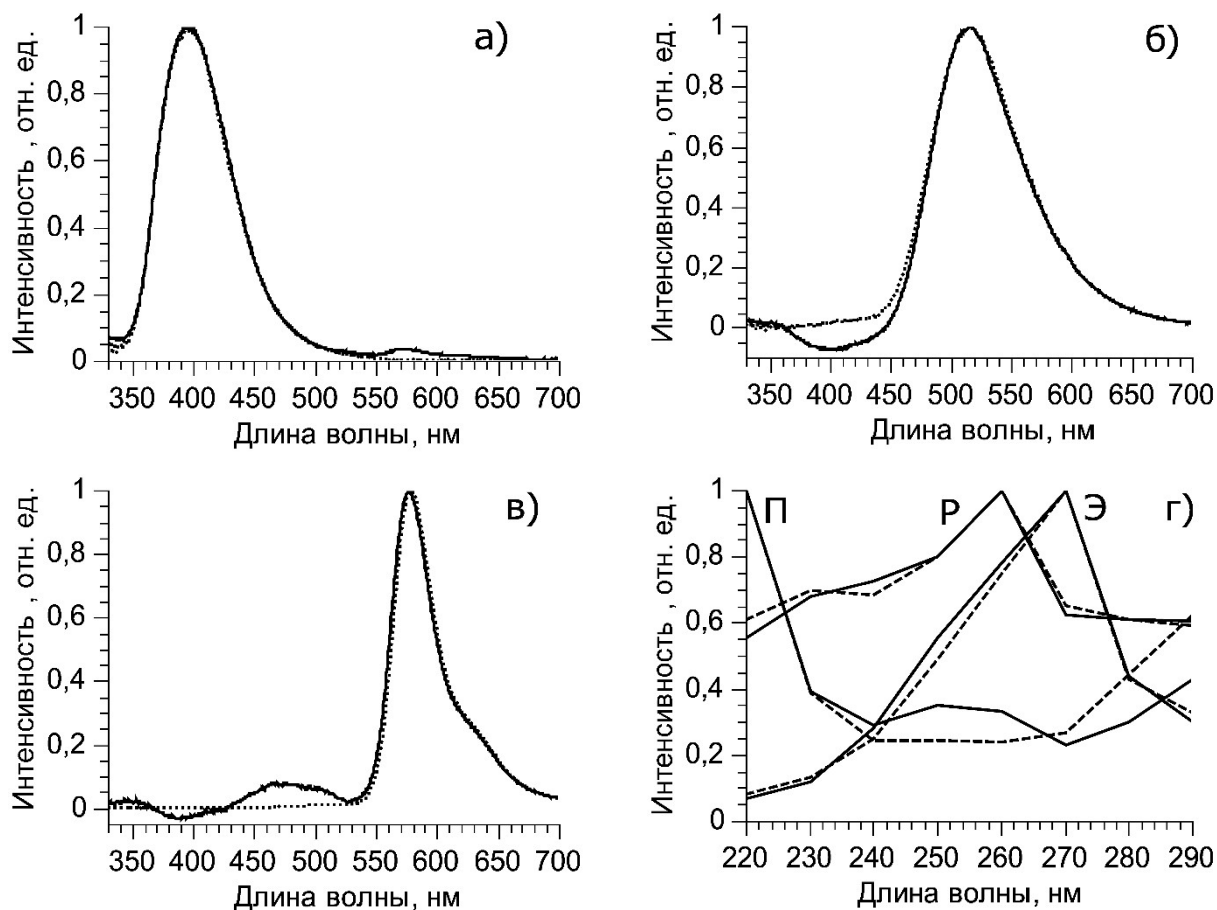


Рис. 40. Сравнение главных компонент (сплошные линии) и чистых спектров (пунктирные линии): спектры флуоресценции пиридоксина (а), этакридина лактата (б) и родамина (в), их спектры возбуждения (г).

Точности расчета спектров возбуждения и флуоресценции представлены в Таблице 8. Можно отметить, что спектры флуоресценции рассчитываются более точно, чем спектры возбуждения. Однако, и первые, и вторые можно использовать для идентификации веществ.

Таблица 8. Ошибки расчета спектров флуоресценции и возбуждения.

Флуорофор	Ошибка расчета спектра флуоресценции	Ошибка расчета спектра возбуждения
Пиридоксин	3,7	20,3
Этакридин лактат	9,2	5,9
Родамин	12,2	3,9

Двухкомпонентные смеси с близкими максимумами спектров флуоресценции

Для проверки способности модифицированного алгоритма МГК разделять вещества с близкими спектрами флуоресценции были подготовлены смеси флуорофоров этакридина лактата и флуоресцеина в физрастворе. Их максимумы флуоресценции находятся в области 513 и 514, однако непосредственно формы спектров разные (Рис. 36). Общее количество образцов – 4, концентрации веществ не контролировались. Характерная матрица одного из образцов представлена на Рис. 41. Остальные условия анализа совпадали с предыдущим случаем с тремя красителями.

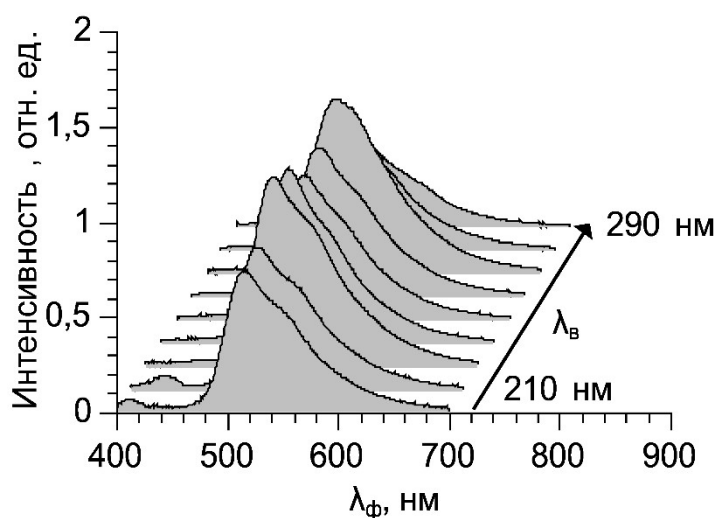


Рис. 41. Характерная матрица возбуждения-эмиссии двухкомпонентной смеси с близкими максимумами флуоресценции, состоящей из этакридина лактата и флуоресцеина.

После анализа матриц МГК было выявлено, что спектры раскладываются на две соответствующие отдельным флуорофорам компоненты (Рис. 42) после 20000 итераций расчета. При этом максимумы флуоресценции выделились достаточно хорошо за исключением области 520–650 нм для флуоресцеина и области 450–510 нм – для этакридина лактата. Точности расчета спектров представлены в Таблице 9.

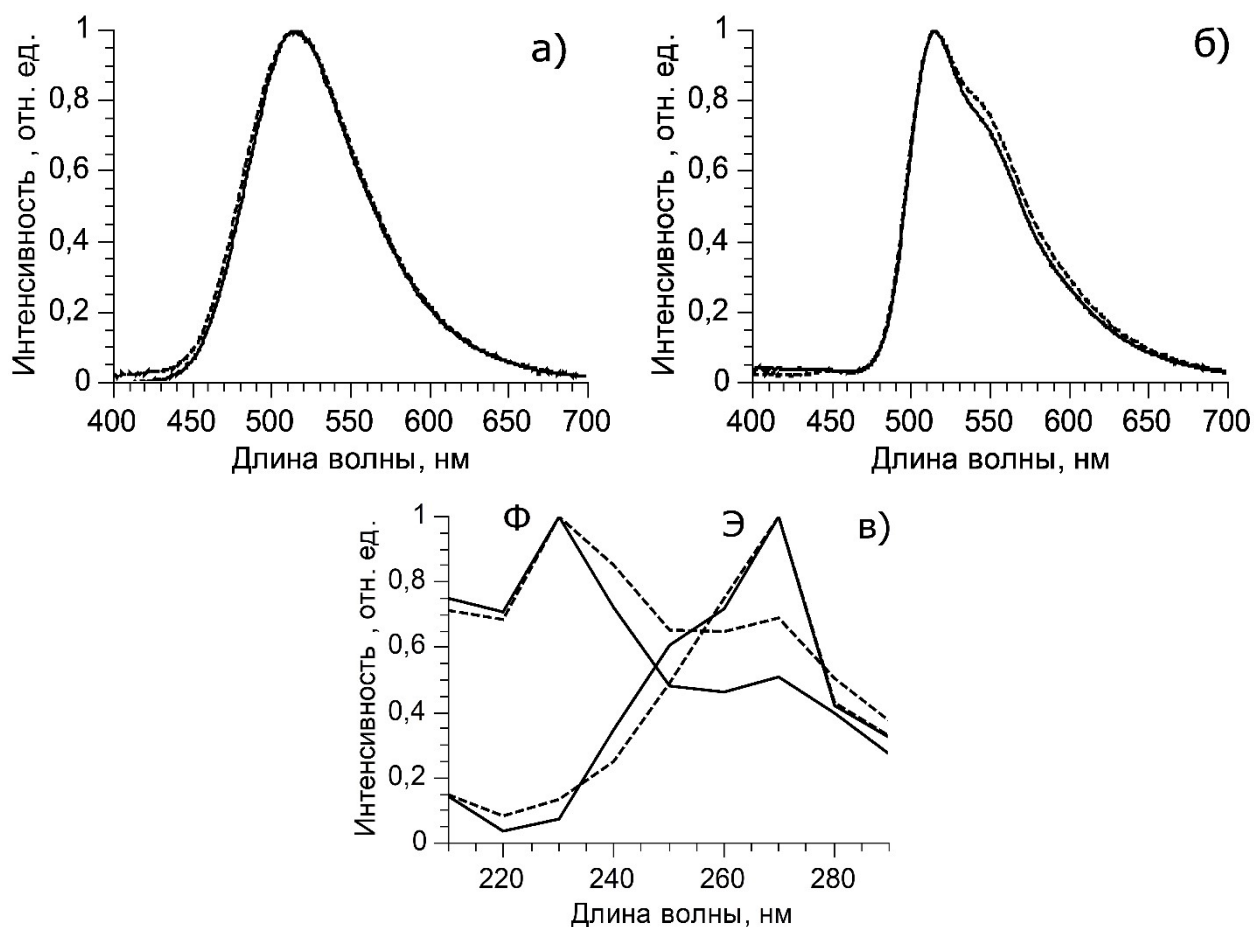


Рис. 42. Сравнение главных компонент (сплошные линии) и чистых спектров (пунктирные линии): спектры флуоресценции этакридина лактата (а), флуоресцеина (б), их спектры возбуждения (в).

Таблица 9. Ошибки расчета спектров флуоресценции и возбуждения.

Флуорофор	Ошибка расчета спектра флуоресценции	Ошибка расчета спектра возбуждения
Флуоресцеин	5	17,6
Этакридин лактат	4,4	11,5

Важно отметить, что, несмотря на близкие максимумы флуоресценции, с помощью МГК все же удалось их разделить. Спектр возбуждения этакридина лактата при этом схож с исходным, а спектр флуоресцеина приподнят относительно исходного. Данный эффект может быть связан с оптическим

перекрыванием областей флуоресценции данных флуорофоров и их реакцией друг с другом.

4.5. Исследование фотообесцвечивания биологических тканей

Работа с коротковолновым ультрафиолетовым излучением требует особого контроля при исследовании биологических образцов, из-за фотообесцвечивания. При взаимодействии с излучением часть молекул разрушается, приводя к постепенному изменению спектров флуоресценции, что может негативно повлиять на обработку данных. Существует множество работ, посвященных исследованию влияния ультрафиолетового излучения на ткани кожи и сетчатки глаз [124, 125], однако большинство из них посвящено диапазонам UVA (320–400 нм) и UVB (280–320 нм), поскольку они меньше всего рассеиваются атмосферной и представляют большую опасность, чем UVC (200–280 нм).

Были проведены эксперименты по исследованию влияния фотообесцвечивания в коротковолновом ультрафиолетовом диапазоне на итоговые матрицы возбуждения-эмиссии флуорофоров в биологической ткани [126]. В качестве объекта исследования были использованы ткани мозга крысы. Данный тип тканей характеризуется простотой их спектров флуоресценции (в них основным флуорофором является аминокислота триптофан с максимумом флуоресценции на длине волны 322 нм). Фотообесцвечивание проводилось на длинах волн 210–290 нм с шагом 10 нм, для каждой длины волны использовались отдельные срезы тканей.

В первом эксперименте фотообесцвечивание проводилось до тех пор, пока интенсивность флуоресценции на длине волны 322 нм не падала как минимум в 3 раза. Для каждой длины волны суммарная доза поглощенного излучения и общее время фотообесцвечивания были разными. Идея второго эксперимента заключалась в исследовании различий спектров возбуждения образцов до и после фотообесцвечивания. Так в начале работы для каждого образца регистрировалась матрица возбуждения-эмиссии. Затем образцы обесцвечивались, и после этого матрица возбуждения-эмиссии

регистрировалась снова. Во время второго эксперимента интенсивность флуоресценции также падала как минимум в 3 раза, и суммарные дозы поглощенного излучения не были равны первому эксперименту.

На Рис. 43 представлены зависимости интенсивности флуоресценции при фотообесцвечивании от дозы поглощенного излучения. Здесь энергия поделена на площадь лазерного пятна, которая составляла $0,6 \text{ см}^2$. Графики нормированы на единицу в начале координат для удобства сравнения. Горизонтальная линия на графике обозначает падение уровня интенсивности флуоресценции в e раз. Можно увидеть, что быстрее всего фотообесцвечивание происходило в диапазоне длин волн от 210 до 230 нм, а наиболее медленно ткани обесцвечивались, когда образец облучали излучением 250 нм.

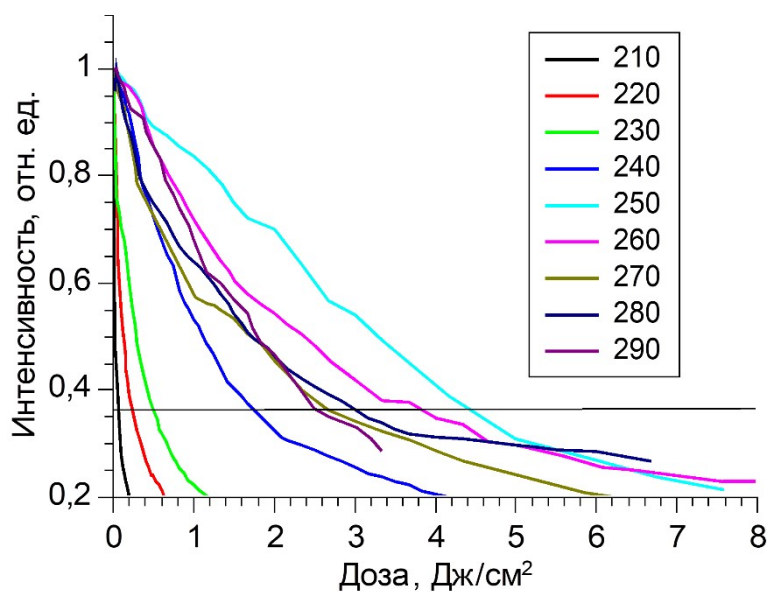


Рис. 43. Зависимости интенсивности флуоресценции от дозы поглощенного излучения на длинах волн 210–290 нм.

В Таблице 10 приведены дозы излучения, при которых интенсивность флуоресценции падает в e раз (D_e). Видно, что для этого уровня падения интенсивности на длине волны 250 нм общая поглощенная доза должна составлять $4,3 \text{ Дж/см}^2$, а для 290 нм — $2,55 \text{ Дж/см}^2$. Наименьшая доза требуется для длины волны 210 нм и составляет 58 мДж/см^2 . Также в таблице

приведены стандартные значения дозы излучения, поглощаемые в процессе стандартных измерений матриц возбуждения-эмиссии (D_m) при условии использования лазера Vibrant (HE) 355 П + UV с ограничением энергии импульсов до 200 мкДж/см^2 . В последней строке таблицы приведен процент падения интенсивности в процессе стандартных измерений матриц возбуждения-эмиссии. Видно, что при измерении спектров для матрицы на длинах волн 210–230 нм интенсивность флуоресценции может падать на 3,4 %. В то же время соответствующие значения энергии импульсов на длинах волн 240–290 нм, используемые в экспериментах с биологическими тканями, не приводят к значительному повреждению тканей (снижение интенсивности составляет менее 1,3%).

Таблица 10. Дозы излучения при падении интенсивности в e раз и стандартном измерении матриц.

Длина волны, нм	210	220	230	240	250	260	270	280	290
$D_e, \text{ Дж/см}^2$	0,058	0,24	0,5	1,74	4,33	3,7	2,65	3,2	2,55
$D_m, \text{ мДж/см}^2$	1,05	5,8	6,3	9,2	9,73	10,56	10,35	2,76	3,35
Пад. интенс., %	3,4	3,3	3,4	0,3	0,1	0,2	1,3	0,1	1,1

На Рис. 44 приведены нормированные на максимум спектры возбуждения образцов тканей до и после фотообесцвечивания. Спектр возбуждения образца, обесцвеченного на длине волны 220 нм, имеет ту же форму графика в диапазоне 260–290 нм. При этом фотообесцвечивание на длине волны 290 нм привело к значительному изменению формы кривой. Это явление связано с тем, что более коротковолновое излучение имеет меньшую глубину проникновения, чем длинноволновое [127]. Таким образом, фотообесцвечивание на коротких волнах в целом оказывает меньшее влияние на форму матриц возбуждения-эмиссии. В целом можно отметить, что

влияние фотообесцвечивания на форму матриц во всем исследуемом диапазоне мало.

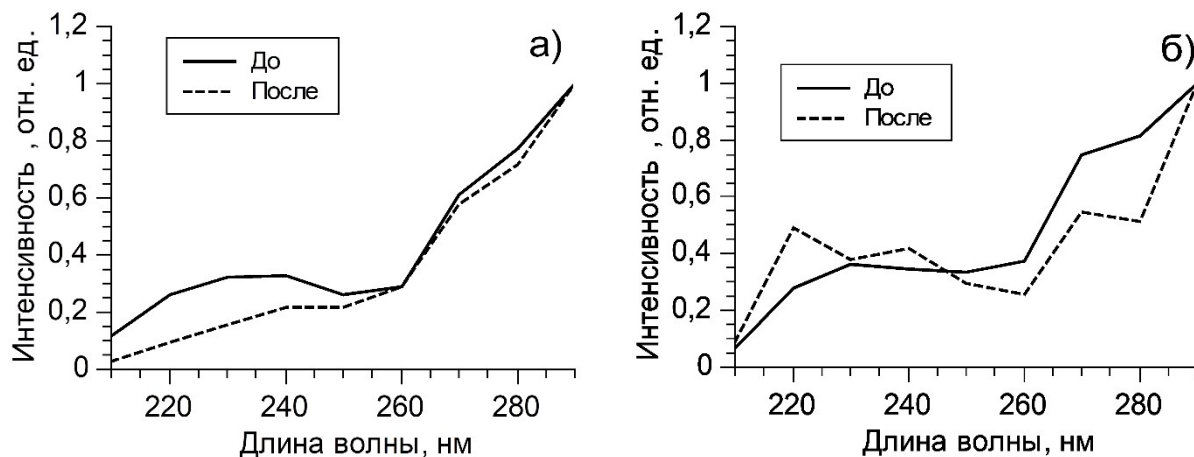


Рис. 44. Спектры возбуждения образцов ткани мозга крысы до и после фотообесцвечивания на длине волны 220 нм (а) и 290 нм (б).

4.6. Анализ спектров ЛИФ образцов костной ткани, выращенных в ротационном биореакторе

После этапа численного моделирования проводилось несколько экспериментов по выращиванию костной ткани в ротационном биореакторе для определения оптимального уровня механической нагрузки. Данная работа проводилась коллективом под руководством профессора Ларионова П. М. Перед выращиванием костного материала в новом биореакторе, метод ЛИФ был протестирован на поликапролактоновых пленках, заселенных клеточной культурой ВНК IR [128, 129]. Спектры флуоресценции регистрировались для клеточной культуры, незаселенных и заселенных пленок. Была показана принципиальная возможность применения ЛИФ для распознавания образцов благодаря характерным различиям в спектрах флуоресценции (для заселенных образцов – максимум на длине волны флуоресценции 305 нм при возбуждении в диапазоне 230–290 нм; повышенная интенсивность флуоресценции в диапазоне 400–580 нм при тех же длинах волн возбуждения). После этого проводилось

выращивание образцов костной ткани на тонкой пленке в ротационном биореакторе и их анализ методом ЛИФ [115].

Подготовка образцов

Подготовка образцов подробно описана в разделе 2.5. Пленки формировали из поликапролактона на установке электроспиннинга, их толщина составляла 40 мкм. В качестве клеточного материала, которым заселяли пленки, использовали человеческие мезенхимальные стволовые клетки костномозгового происхождения. Размер слоя из стволовых клеток достаточно тонок, поэтому он незначительно изменял общую толщину образцов.

Спектры ЛИФ регистрировались для нескольких типов пленок:

- П – незаселенные пленки;
- СК – заселенные стволовыми клетками пленки, культивируемые статически в культуральной планшете. Данный тип образцов являлся контрольным для оценки действия эффекта механотрансдукции в ротационном биореакторе;
- ДК – заселенные стволовыми клетками пленки, культивируемые динамически в ротационном биореакторе исходно предложенной конструкции. Частота вращения каркаса пленки в биореакторе составляла 0,133 Гц (среднее касательное напряжение 8 мПа по результатам численного моделирования) в течение 5 недель. На второй, третьей и пятой неделе культивирования из реактора и планшета вынимались образцы для исследования методами ЛИФ и стандартными гистофлуоресцентными методами.

Перед спектроскопическим исследованием все образцы отмывались от питательной среды в физиологическом растворе. Количество образцов незаселённых пленок – 4 шт. Количество образцов при статическом культивировании: после 3 недель – 2 шт, после 5 недель – 1 шт. Количество образцов при динамическом культивировании: после 2 недель – 4 шт, после 3

недель – 2 шт, после 5 недель – 2 шт. Так как пленка покрывалась клетками только с одной стороны, то матрицы регистрировались по два раза для двух сторон – заселённой и незаселённой клетками (обозначение А для заселенной стороны, Б – незаселенной).

Результаты анализа спектров ЛИФ

На Рис. 45 представлено сравнение спектров флуоресценции образцов разных типов во время культивирования на длине волны возбуждения 250 нм. Спектры были нормированы на длину волны флуоресценции 435 нм для удобства сравнения.

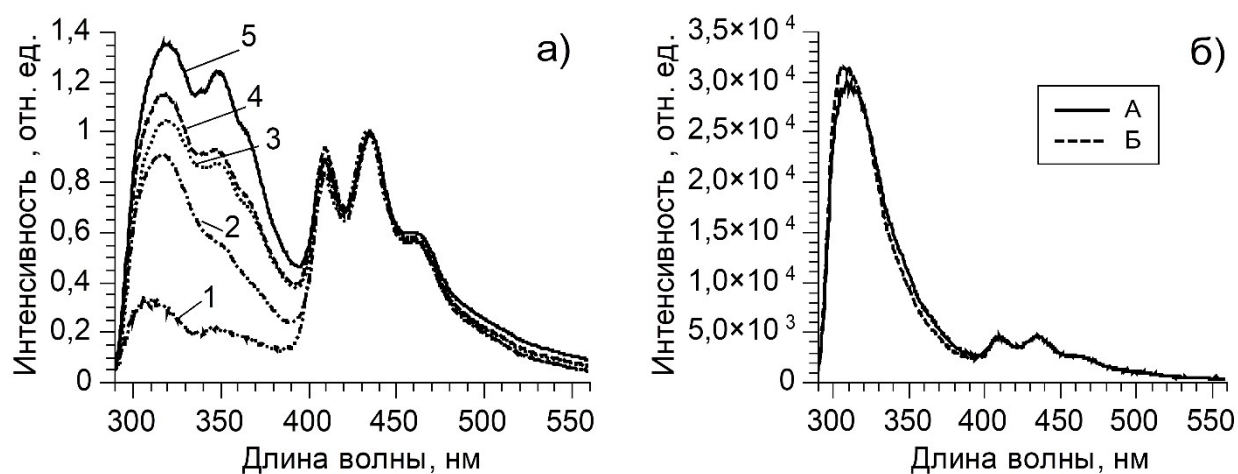


Рис. 45. (а) Спектры флуоресценции на длине волны возбуждения 250 нм: 1 – незаселенная пленка, 2 – статически выращиваемая пленка после трех недель культивирования, 3, 4, 5 – динамически выращиваемые в биореакторе пленки после двух, трех и пяти недель культивирования соответственно. (б) Сравнение спектров флуоресценции заселенной (А) и незаселенной (Б) сторон образца, культивированного две недели в биореакторе.

У пленок при культивировании в различных условиях (2–4) повышается интенсивность флуоресценции в области 300–360 нм при сравнении со спектром незаселенной пленки (1). При этом спектры образцов, к которым применялось вращение в биореакторе (3–5), отличаются в этой области от спектров, полученных при статическом культивировании (2), как по форме,

так и по относительной интенсивности. Таким образом, этот спектральный интервал несёт информацию о клетках и процессах, происходящих при их культивировании.

Спектры флуоресценции, измеренные с двух сторон пленки, хорошо согласуются (пример для одного из образцов с динамическим культивированием представлен на Рис. 45б). Нормы векторов отличаются на 7,4 %, косинус угла между векторами – 0,998. Исходя из близости спектров, измеренных с двух сторон полотна, образцы можно считать оптически тонкими: лазерное излучение на расстоянии, равном толщине образца ослабляется незначительно и возбуждает флуоресценцию клеток. На основании этого полученный набор матриц возбуждения-эмиссии образцов, культивированных статически и динамически, был проанализирован с помощью алгоритма, описанного в разделе 4.2.

Результирующие главные компоненты представлены на Рис. 46. Исходные матрицы возбуждения-эмиссии всех групп исследуемых пленок можно с достаточной точностью (в пределах 10 % по интенсивности) описать суммой представленных спектров с соответствующими весовыми коэффициентами. При этом выбор четырех компонент для описания спектров оправдан: выбор дополнительной пятой компоненты не привел к существенному увеличению точности подбора спектров.

Поскольку данные компоненты описывают флуоресценцию многосоставного образца, их характеристики из-за взаимодействия флуорофоров с окружением, оптических свойств ткани могут отличаться от таковых для чистых веществ. Из сравнения со спектром (1) на Рис. 45 можно заключить, что компонента ГК4 принадлежит флуоресцирующим структурам поликапролактона. Максимум флуоресценции компоненты ГК1 приходится на 305 нм, эффективность возбуждения при увеличении длины волны снижается, характеристики данной компоненты соответствуют аминокислоте тирозину. Максимум флуоресценции компоненты ГК2 приходится на 325 нм, эффективность возбуждения при увеличении длины волны возрастает,

характеристики данной компоненты соответствуют аминокислоте триптофану. Максимум флуоресценции компоненты ГК3 приходится на 350 нм, а эффективность возбуждения максимальна при 240 нм. Данную компоненту можно связать с коллагеном, который в зависимости от типа различается по молекулярной структуре. Обычно флуоресценция коллагена определяется поперечными связями пиридинолина, максимум интенсивности для которых приходится на 390–400 нм [64], однако, в некоторых случаях проявляется флуоресценция мономеров с одним из максимумов на 350 нм [67]. При этом компонента имеет двойной пик, что может быть связано с присутствием в образцах двух флуорофоров с одинаковыми спектрами возбуждения, либо специфической структурой коллагена, поскольку на данном этапе он только начинает формироваться.

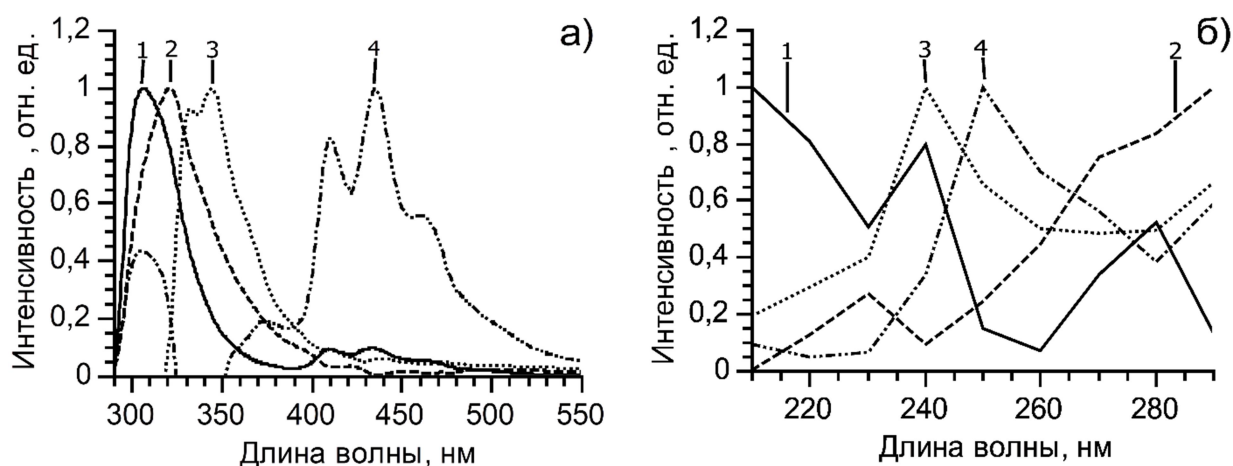


Рис. 46. Спектры флуоресценции (а) и возбуждения (б) главных компонент в образцах костных тканей на пленках: 1 – ГК1, 2 – ГК2, 3 – ГК3, 4 – ГК4.

В результате анализа полученной информации о весовых коэффициентах, пропорциональных концентрации вещества, было отмечено, что отношение весовых коэффициентов третьей компоненты ГК3 (коллаген) к четвертой ГК4 (поликапролактон) можно использовать для распознавания групп образцов. На Рис. 47 представлено разделение типов образцов пленок по указанному отношению параметров. Видно, что для образцов, к которым

применялось вращение в реакторе, отношение весовых коэффициентов ГК3/ГК4 значительно выше, чем для образцов контроля. При увеличении времени культивирования образцов в биореакторе до 5 недель, данное отношение продолжает возрастать, что говорит о росте биологического материала на пленке.

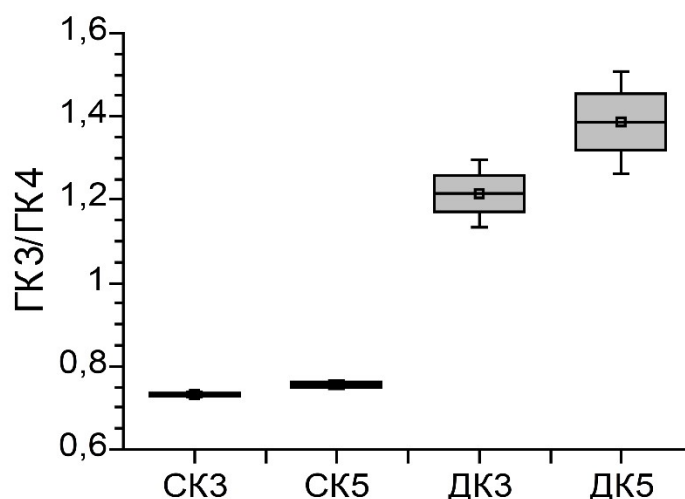


Рис. 47. Отношение весовых коэффициентов компонент ГК3/ГК4 для исследуемых групп пленок: СК3, СК5 – статическое культивирование после трех и пяти недель, ДК3, ДК5 – динамическое культивирование после трех и пяти недель.

Результаты анализа матриц ЛИФ сверялись с результатами стандартного метода – лазерной конфокальной микроскопии. Его также проводили на второй, третьей и пятой неделях в процессе культивирования параллельно с анализом ЛИФ. Микроскопия показала, что при трехнедельном динамическом культивировании плотность остеогенных клеток выше на 36 %, а интенсивность флуоресценции метки, связанной с коллагеном, выше на 53 % относительно статического культивирования (раздел 2.5). То есть к 21 суткам культура стволовых клеток в динамических условиях (с воздействием средним касательным напряжением 8 мПа при частоте вращения 0,133 Гц) трансформируется в неоматрикс кости. Учитывая эти

данные, можно полагать, что возрастание коэффициента ГКЗ/ГК4 (Рис. 47) свидетельствует о формирующемся неоматриксе кости, а величина этого соотношения говорит о степени сформированности ткани. Таким образом, можно констатировать, что анализ спектров лазерно-индуцированной флуоресценции применим при оценке динамики роста костного материала в процессе культивирования, и возможны дальнейшие модификации системы ротационного биореактора для его реализации.

Выводы по Главе 4

Для анализа образцов костного материала, выращенных на тонких пленках в ротационном биологическом реакторе, был предложен новый алгоритм анализа спектров ЛИФ оптически тонких образцов на основе МГК. Данный алгоритм способен определять число флуоресцирующих компонент в образцах с неизвестным составом, а также с высокой точностью рассчитывать спектры флуоресценции и возбуждения чистых компонент, не используя какую-либо априорную информацию о чистых веществах. Весовые коэффициенты пропорциональны концентрации исходных веществ в смеси, и их отношения могут быть использованы для оценки содержания флуорофоров в образцах. Новый алгоритм был протестирован на модельных спектрах и оптических фантомах биологических тканей. В отличие от алгоритма MCR-ALS и подхода составления узких комбинаций из главных компонент, новый алгоритм с высокой точностью восстанавливает спектры флуоресценции и возбуждения чистых компонент в случае, когда один спектр флуоресценции полностью накладывается на другой.

Процесс измерения спектров флуоресценции в диапазоне длин волн возбуждения 210–290 нм с ограничением энергии импульса до 200 мкДж мало влияет на форму матриц возбуждения-эмиссии и последующий анализ спектральных данных. При стандартном измерении спектров для матриц на длинах волн 210–230 нм интенсивность флуоресценции биологических образцов падает до 3,4 %. Наиболее медленно фотообесцвечивание происходит на длине волны 250 нм, самое быстрое обесцвечивание

происходит в диапазоне длин волн 210–230 нм. Для падения интенсивности флуоресценции в e раз на длине волны 210 нм требуется доза 58 мДж/см², на длине волны 290 нм – 2,55 Дж/см², на 250 нм – 4,3 Дж/см².

Метод анализа спектров флуоресценции модифицированным алгоритмом на основе метода главных компонент позволил оценить количество флуоресцирующих компонент в нарастающей костной ткани. Анализ образцов костной ткани, выращенной в ротационном биореакторе на тонком каркасе из поликапролактона, содержат четыре компонента с максимумами флуоресценции на длинах волн 305, 325, 350, 435 нм, что соответствуют тирозину, триптофану, коллагену и поликапролактону. В образцах, культивируемых в ротационном биореакторе, увеличивается интенсивность флуоресценции коллагена относительно интенсивности поликапролактона по сравнению с образцами, выращенными статически. Это увеличение согласуется с гистологическим исследованием, которое показало, что в динамически культивируемых образцах более эффективно образуется костный матрикс. Таким образом, метод лазерно-индуцированной флуоресценции можно рассматривать как альтернативу стандартным гистологическим методам, как простой неинвазивный инструмент, не требующий сложной пробоподготовки.

Анализ матриц возбуждения-эмиссии модифицированным алгоритмом на основе МГК показал себя перспективным инструментом для исследования оптически тонких образцов. Поскольку в алгоритме не используется информация о форме чистых спектров, его можно применять не только к биологическим тканям, но и к другим образцам, состав которых не известен.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработка технологии тканевой инженерии для замещения дефектов костной ткани с использованием тонких полимерных пленок требует решения множества задач. В частности, для выращивания биологического материала в новом ротационном биореакторе являются важными определение параметров культивирования для оптимального роста клеточного материала и диагностика динамики роста костной ткани в процессе выращивания.

В данной работе численное моделирование помогло упростить сложный медицинский эксперимент. Моделирование течения жидкости в полости ротационного биореактора позволило визуализировать структуру течения и показать наличие вихрей Тейлора, которые вызывают неравномерность распределения параметров течения, отвечающих за механическое воздействие жидкости на клетки. Методом оптической визуализации было подтверждено наличие вихрей, а также оценена скорость течения жидкости в вихрях. Численное моделирование показало, что в исходной конструкции ротационного биологического реактора с заданной геометрией на рабочей поверхности при частоте 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 дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток в клетки кости. Медицинские эксперименты позволили найти оптимальную частоту вращения каркаса пленки, равную 0,133 Гц (8 об/мин), что соответствовало среднему касательному напряжению 8 мПа. Проведенные в данных условиях эксперименты показали, что длительное динамическое культивирование пленки, заселенной мезенхимальными стволовыми клетками, в условиях исходной конструкции ротационного реактора позволяет рассчитывать на эффективное формирование матрикса кости в сроки от двух до трех недель.

Благодаря численному моделированию течения жидкости были определены перспективные изменения, которые можно внести в геометрию

биореактора ротационного типа. В зависимости от требований к потоку могут быть выбраны различные модификации его конструкции. Конструкция реактора с вращающимся корпусом позволяет воздействовать на выращиваемые клетки равномерным потоком без вихрей. Средние касательные напряжения на внешней поверхности каркаса составляют от 5 до 20 мПа при частотах вращения от 0,083 до 0,233 Гц. При использовании геометрии со смещенной осью вращения в реакторе можно создавать циклическую нагрузку. При смещении каркаса на 5 мм и вращении стенок корпуса в диапазоне частот вращения 0,05–0,233 Гц размах колебаний касательного напряжения составляет от 127 до 147 %. Вычислительный алгоритм расширяет спектр возможностей для достижения требуемого гидродинамического воздействия на костную ткань в условиях ротационного реактора.

Метод лазерно-индуцированной флуоресценции можно применять для диагностики нарастания костной ткани на тонкой пленке в новом биореакторе. Для обработки спектральных данных был разработан модифицированный алгоритм на основе метода главных компонент в тензорном виде. 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 спектры флуоресценции и возбуждения чистых компонент в случае, когда один спектр флуоресценции полностью накладывается на другой.

Новый алгоритм позволил оценить количество основных флуоресцирующих компонент в образцах костного материала, выращенных в ротационном биореакторе, и рассчитать их спектры возбуждения и флуоресценции. С его помощью также были рассчитаны весовые

коэффициенты основных флуорофоров, пропорциональные концентрации этих веществ. 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. Гистофлуоресцентное исследование образцов подтвердило формирование костного матрикса.

Данные результаты демонстрируют эффективность механической стимуляции стволовых клеток потоком жидкости для образования костного матрикса, перспективность применения биологических реакторов ротационного типа для тканевой инженерии и лазерной флуоресцентной спектроскопии для диагностики растущей ткани.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Giannoudis P. V., Dinopoulos H., Tsiridis E. Bone substitutes: an update //Injury. – 2005. – Т. 36. – №. 3. – С. S20-S27.
2. Щаницын И. Н. и др. Современные концепции стимуляции регенерации костной ткани с использованием биологически активных скаффолдов //Цитология. – 2019. – Т. 61. – №. 1. – С. 16-34.
3. Hutmacher D. W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage //Biomaterials. – 2000. – Т. 21. – №. 24. – С. 2529-2543.
4. Giannoudis P. V., Einhorn T. A., Marsh D. Fracture healing: the diamond concept //Injury. – 2007. – Т. 38. – С. S3-S6.
5. Turnbull G. et al. 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering //Bioactive Materials. – 2018. – Т. 3. – №. 3. – С. 278-314.
6. Kuboki Y., Jin Q., Takita H. Geometry of carriers controlling phenotypic expression in BMP-induced osteogenesis and chondrogenesis // Journal of Bone & Joint Surgery. – 2001. – Т. 83. – №. A Suppl 1(Pt 2). – С. S105-S115.
7. Puppi D. et al. Polymeric materials for bone and cartilage repair //Progress in Polymer Science. – 2010. – Т. 35. – №. 4. – С. 403-440.
8. Woodruff M. A., Hutmacher D. W. The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century //Progress in Polymer Science. – 2010. – Т. 35. – №. 10. – С. 1217-1256.
9. Sill T. J., Von Recum H. A. Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering //Biomaterials. – 2008. – Т. 29. – №. 13. – С. 1989-2006.
10. Sobral J. M. et al. Three-dimensional plotted scaffolds with controlled pore size gradients: effect of scaffold geometry on mechanical performance and cell seeding efficiency //Acta Biomaterialia. – 2011. – Т. 7. – №. 3. – С. 1009-1018.
11. Song J. et al. Origami meets electrospinning: a new strategy for 3D nanofiber scaffolds //Bio-Design and Manufacturing. – 2018. – Т. 1. – №. 4. – С. 254-264.

12. Jakus A. E. et al. Hyperelastic “bone”: A highly versatile, growth factor-free, osteoregenerative, scalable, and surgically friendly biomaterial //Science Translational Medicine. – 2016. – Т. 8. – №. 358. – С. 358ra127.
13. Caplan A. I., Bruder S. P. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century //Trends in Molecular Medicine. – 2001. – Т. 7. – №. 6. – С. 259-264.
14. Пыко И. В. и др. Мезенхимальные стволовые клетки костного мозга: свойства, функции, возможность использования в регенеративной и восстановительной терапии //Медицинский журнал. – 2007. – Т. 4. – С. 18-22.
15. Jaiswal N. et al. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro //Journal of Cellular Biochemistry. – 1997. – Т. 64. – №. 2. – С. 295-312.
16. Holtorf H. L., Jansen J. A., Mikos A. G. Flow perfusion culture induces the osteoblastic differentiation of marrow stromal cell-scaffold constructs in the absence of dexamethasone //Journal of Biomedical Materials Research Part A. – 2005. – Т. 72. – №. 3. – С. 326-334.
17. Yourek G. et al. Shear stress induces osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells //Regenerative Medicine. – 2010. – Т. 5. – №. 5. – С. 713-724.
18. Temiyasathit S., Jacobs C. R. Osteocyte primary cilium and its role in bone mechanotransduction //Annals of the New York Academy of Sciences. – 2010. – Т. 1192. – №. 1. – С. 422-428.
19. Cheung W. Y. et al. Osteocyte apoptosis is mechanically regulated and induces angiogenesis in vitro //Journal of Orthopaedic Research. – 2011. – Т. 29. – №. 4. – С. 523-530.
20. Galie P. A. et al. Fluid shear stress threshold regulates angiogenic sprouting //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2014. – Т. 111. – №. 22. – С. 7968-7973.
21. Shih Y. R. V. et al. Matrix stiffness regulation of integrin-mediated mechanotransduction during osteogenic differentiation of human mesenchymal

stem cells //Journal of Bone and Mineral Research. – 2011. – T. 26. – №. 4. – C. 730-738.

22. Wittkowske C. et al. In vitro bone cell models: impact of fluid shear stress on bone formation //Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2016. – T. 4. – C. 87.

23. Mullender M. et al. Mechanotransduction of bone cells in vitro: mechanobiology of bone tissue //Medical and Biological Engineering and Computing. – 2004. – T. 42. – №. 1. – C. 14-21.

24. Owan I. et al. Mechanotransduction in bone: osteoblasts are more responsive to fluid forces than mechanical strain //American Journal of Physiology-Cell Physiology. – 1997. – T. 273. – №. 3. – C. C810-C815.

25. You J. et al. Substrate deformation levels associated with routine physical activity are less stimulatory to bone cells relative to loading-induced oscillatory fluid flow //Journal of Biomechanical Engineering. – 2000. – T. 122. – №. 4. – C. 387-393.

26. Weinbaum S., Cowin S. C., Zeng Y. A model for the excitation of osteocytes by mechanical loading-induced bone fluid shear stresses //Journal of Biomechanics. – 1994. – T. 27. – №. 3. – C. 339-360.

27. Gaspar D. A., Gomide V., Monteiro F. J. The role of perfusion bioreactors in bone tissue engineering //Biomatter. – 2012. – T. 2. – №. 4. – C. 167-175.

28. Bancroft G. N. et al. Fluid flow increases mineralized matrix deposition in 3D perfusion culture of marrow stromal osteoblasts in a dose-dependent manner //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2002. – T. 99. – №. 20. – C. 12600-12605.

29. Sailon A. M. et al. A novel flow-perfusion bioreactor supports 3D dynamic cell culture // Journal of Biomedicine and Biotechnology. – 2009. – T. 2009. – C. 1-7.

30. Kim K. M. et al. Shear stress induced by an interstitial level of slow flow increases the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells through TAZ activation //PloS one. – 2014. – Т. 9. – №. 3. – С. e92427.
31. Barakat A. I., Lieu D. K. Differential responsiveness of vascular endothelial cells to different types of fluid mechanical shear stress //Cell Biochemistry and Biophysics. – 2003. – Т. 38. – №. 3. – С. 323-343.
32. Li J. et al. Effect of oscillating fluid flow stimulation on osteocyte mRNA expression //Journal of Biomechanics. – 2012. – Т. 45. – №. 2. – С. 247-251.
33. Jacobs C. R. et al. Differential effect of steady versus oscillating flow on bone cells //Journal of Biomechanics. – 1998. – Т. 31. – №. 11. – С. 969-976.
34. Sladkova M., De Peppo G. M. Bioreactor systems for human bone tissue engineering //Processes. – 2014. – Т. 2. – №. 2. – С. 494-525.
35. Yu W. et al. A microfluidic-based multi-shear device for investigating the effects of low fluid-induced stresses on osteoblasts //PloS one. – 2014. – Т. 9. – №. 2. – С. e89966.
36. Huesa C., Helfrich M. H., Aspden R. M. Parallel-plate fluid flow systems for bone cell stimulation //Journal of Biomechanics. – 2010. – Т. 43. – №. 6. – С. 1182-1189.
37. Anderson E. J. et al. The imperative for controlled mechanical stresses in unraveling cellular mechanisms of mechanotransduction //Biomedical Engineering Online. – 2006. – Т. 5. – №. 1. – С. 1-14.
38. 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.
39. 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. – T. 1882. – №. 1. – C. 020020.

40. Naughton J. W., Sheplak M. Modern developments in shear-stress measurement //Progress in Aerospace Sciences. – 2002. – T. 38. – №. 6-7. – C. 515-570.

41. Tucker R. P. et al. See-saw rocking: an in vitro model for mechanotransduction research //Journal of The Royal Society Interface. – 2014. – T. 11. – №. 97. – C. 20140330.

42. Meneses J. et al. A multimodal stimulation cell culture bioreactor for tissue engineering: a numerical modelling approach //Polymers. – 2020. – T. 12. – №. 4. – C. 940.

43. Singh H., Hutmacher D. W. Bioreactor studies and computational fluid dynamics //Bioreactor Systems for Tissue Engineering. – 2009. – T. 112. – C. 231-249.

44. Sucusky P. et al. Fluid mechanics of a spinner-flask bioreactor //Biotechnology and Bioengineering. – 2004. – T. 85. – №. 1. – C. 34-46.

45. Singh H. et al. Flow modeling in a novel non-perfusion conical bioreactor //Biotechnology and Bioengineering. – 2007. – T. 97. – №. 5. – C. 1291-1299.

46. Maes F. et al. Modeling fluid flow through irregular scaffolds for perfusion bioreactors //Biotechnology and Bioengineering. – 2009. – T. 103. – №. 3. – C. 621-630.

47. McCoy R. J., Jungreuthmayer C., O'Brien F. J. Influence of flow rate and scaffold pore size on cell behavior during mechanical stimulation in a flow perfusion bioreactor //Biotechnology and Bioengineering. – 2012. – T. 109. – №. 6. – C. 1583-1594.

48. Porter B. et al. 3-D computational modeling of media flow through scaffolds in a perfusion bioreactor //Journal of Biomechanics. – 2005. – T. 38. – №. 3. – C. 543-549.

49. Lakhota S., Papoutsakis E. T. Agitation induced cell injury in microcarrier cultures. Protective effect of viscosity is agitation intensity dependent: experiments and modeling // *Biotechnology and Bioengineering*. – 1992. – Т. 39. – №. 1. – С. 95-107.
50. Bacabac R. G. et al. Dynamic shear stress in parallel-plate flow chambers // *Journal of Biomechanics*. – 2005. – Т. 38. – №. 1. – С. 159-167.
51. Fröhlich E. et al. Comparison of two in vitro systems to assess cellular effects of nanoparticles-containing aerosols // *Toxicology in vitro*. – 2013. – Т. 27. – №. 1. – С. 409-417.
52. Begley C. M., Kleis S. J. The fluid dynamic and shear environment in the NASA/JSC rotating-wall perfused-vessel bioreactor // *Biotechnology and Bioengineering*. – 2000. – Т. 70. – №. 1. – С. 32-40.
53. Venkat R. V., Stock L. R., Chalmers J. J. Study of hydrodynamics in microcarrier culture spinner vessels: a particle tracking velocimetry approach // *Biotechnology and bioengineering*. – 1996. – Т. 49. – №. 4. – С. 456-466.
54. Lozano A., Yip B., Hanson R. K. Acetone: a tracer for concentration measurements in gaseous flows by planar laser-induced fluorescence // *Experiments in Fluids*. – 1992. – Т. 13. – №. 6. – С. 369-376.
55. Ражев А. М., Исаков 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.
56. 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. – Т. 2125. – №. 1. – С. 020007.
57. Haudenschild A. K. et al. Nondestructive fluorescence lifetime imaging and time-resolved fluorescence spectroscopy detect cartilage matrix

depletion and correlate with mechanical properties //European Cells & Materials. – 2018. – Т. 36. – С. 28-41.

58. Steiner R. F., Weinryb I. Excited states of proteins and nucleic acids – New York: Plenum Press, 1971.

59. Векшин Н. Флуоресцентная спектроскопия биополимеров – Пущино: Фотон-век, 2014.

60. Бурштейн Э. И. Люминесценция белка. Природа и применение //Итоги науки и техники. Сер. Молекулярная биология. – 1973. – Т. 3. – С. 126.

61. Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии. Пер. с англ. — М.: Мир, 1986.

62. Власова И. М., Салецкий А. М. Флуоресценция триптофана сывороточного альбумина человека при денатурации под действием додецилсульфата натрия //Химическая физика. – 2009. – Т. 28. – С. 66-71.

63. Permyakov E. A. et al. Luminescence of phenylalanine residues in superoxide dismutase from green pea //Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure. – 1977. – Т. 491. – №. 1. – С. 149-154.

64. Richards-Kortum R., Sevick-Muraca E. Quantitative optical spectroscopy for tissue diagnosis //Annual Review of Physical Chemistry. – 1996. – Т. 47. – №. 1. – С. 555-606.

65. 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. – Т. 9. – №. 5. – С. 537.

66. Borisova E. et al. Polarization sensitive excitation-emission matrices for detection of colorectal tumours—initial investigations //Journal of Physics: Conference Series. – 2015. – Т. 594. – №. 1. – С. 012031.

67. Fujimori E. Changes induced by ozone and ultraviolet light in type I collagen: bovine achilles tendon collagen versus rat tail tendon collagen //European Journal of Biochemistry. – 1985. – Т. 152. – №. 2. – С. 299-306.

68. Сарычева И. Н. и др. Лазерно-индуцированная флюоресценция твердых тканей зуба //Российский стоматологический журнал. – 2013. – №. 1 – С. 17-21.
69. Lakowicz J. R. et al. Fluorescence lifetime imaging of free and protein-bound NADH //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1992. – Т. 89. – №. 4. – С. 1271-1275.
70. Georgakoudi I. et al. NAD (P) H and collagen as in vivo quantitative fluorescent biomarkers of epithelial precancerous changes //Cancer Research. – 2002. – Т. 62. – №. 3. – С. 682-687.
71. Wagnieres G. A., Star W. M., Wilson B. C. In vivo fluorescence spectroscopy and imaging for oncological applications //Photochemistry and Photobiology. – 1998. – Т. 68. – №. 5. – С. 603-632.
72. Cheong W. F., Prahl S. A., Welch A. J. A review of the optical properties of biological tissues //IEEE Journal of Quantum Electronics. – 1990. – Т. 26. – №. 12. – С. 2166-2185.
73. Тучин В. Лазеры и волоконная оптика в биомедицинских исследованиях – М: Физматлит, 2010.
74. Avci P. et al. Low-level laser (light) therapy (LLLT) in skin: stimulating, healing, restoring //Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery. – 2013. – Т. 32. – №. 1. – С. 41-52.
75. Richards-Kortum R. et al. A model for extraction of diagnostic information from laser induced fluorescence spectra of human artery wall //Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy. – 1989. – Т. 45. – №. 1. – С. 87-93.
76. Zeng H. et al. The dynamics of laser-induced changes in human skin autofluorescence — Experimental measurements and theoretical modeling //Photochemistry and Photobiology. – 1998. – Т. 68. – №. 2. – С. 227-236.
77. Marcu L., Grundfest W. S., Maarek J. M. I. Photobleaching of arterial fluorescent compounds: Characterization of elastin, collagen and cholesterol time-

resolved spectra during prolonged ultraviolet irradiation //Photochemistry and Photobiology. – 1999. – Т. 69. – №. 6. – С. 713-721.

78. Stratonnikov A. A., Polikarpov V. S., Loschenov V. B. Photobleaching of endogenous fluorochroms in tissues in vivo during laser irradiation //Saratov Fall Meeting 2000: Optical Technologies in Biophysics and Medicine II. – 2001. – Т. 4241. – С. 13-25.

79. Butte P. V. et al. Fluorescence lifetime spectroscopy for guided therapy of brain tumors //Neuroimage. – 2011. – Т. 54. – С. S125-S135.

80. Li B. H., Xie S. S. Autofluorescence excitation-emission matrices for diagnosis of colonic cancer //World Journal of Gastroenterology. – 2005. – Т. 11. – №. 25. – С. 3931.

81. Mallia R. J. et al. Laser-induced autofluorescence spectral ratio reference standard for early discrimination of oral cancer //Cancer. – 2008. – Т. 112. – №. 7. – С. 1503-1512.

82. Drakaki E. et al. Laser induced autofluorescence for diagnosis of non-melanoma skin cancer //18th International School on Quantum Electronics: Laser Physics and Applications. – 2015. – Т. 9447. – С. 94470Y.

83. Cutruzzola F. W. et al. Change in laser-induced arterial fluorescence during ablation of atherosclerotic plaque //Lasers in Surgery and Medicine. – 1989. – Т. 9. – №. 2. – С. 109-116.

84. Thomas S. S. et al. Characterization of dental caries by LIF spectroscopy with 404-nm excitation //Lasers in Medical Science. – 2011. – Т. 26. – №. 3. – С. 299-305.

85. Фомичев Н. Г. и др. Лазерно-индуцированная флюоресценция как метод диагностики остеопороза при переломах грудных и поясничных позвонков //Хирургия позвоночника. – 2004. – Т. 3. – С. 53-59.

86. Khosroshahi M. E., Rahmani M. Detection and evaluation of normal and malignant cells using laser-induced fluorescence spectroscopy //Journal of Fluorescence. – 2012. – Т. 22. – №. 1. – С. 281-288.

87. Fite B. Z. et al. Noninvasive multimodal evaluation of bioengineered cartilage constructs combining time-resolved fluorescence and ultrasound imaging //Tissue Engineering Part C: Methods. – 2011. – Т. 17. – №. 4. – С. 495-504.
88. Ashjian P. et al. Noninvasive in situ evaluation of osteogenic differentiation by time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy //Tissue Engineering. – 2004. – Т. 10. – №. 3-4. – С. 411-420.
89. Ramanujam N. et al. Spectroscopic diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) in vivo using laser-induced fluorescence spectra at multiple excitation wavelengths //Lasers in Surgery and Medicine. – 1996. – Т. 19. – №. 1. – С. 63-74.
90. Kamath S. D. et al. Autofluorescence of normal, benign, and malignant ovarian tissues: a pilot study //Photomedicine and Laser Surgery. – 2009. – Т. 27. – №. 2. – С. 325-335.
91. Fabila-Bustos D. A. et al. Fluorescence spectroscopy as a tool for the assessment of liver samples with several stages of fibrosis //Photomedicine and Laser Surgery. – 2018. – Т. 36. – №. 3. – С. 151-161.
92. 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.
93. Zheng W. et al. Optimal excitation-emission wavelengths for autofluorescence diagnosis of bladder tumors //International Journal of Cancer. – 2003. – Т. 104. – №. 4. – С. 477-481.
94. Tang G. C., Pradhan A., Alfano R. R. Spectroscopic differences between human cancer and normal lung and breast tissues //Lasers in Surgery and Medicine. – 1989. – Т. 9. – №. 3. – С. 290-295.
95. Larionov P. M. et al. Influence of mineral components on laser-induced fluorescence spectra of calcified human heart-valve tissues //Applied Optics. – 2000. – Т. 39. – №. 22. – С. 4031-4036.

96. Ruckebusch C., Blanchet L. Multivariate curve resolution: a review of advanced and tailored applications and challenges // *Analytica Chimica Acta*. – 2013. – Т. 765. – С. 28-36.
97. Akbari M., Abdollahi H. Investigation and visualization of resolution theorems in self modeling curve resolution (SMCR) methods // *Journal of Chemometrics*. – 2013. – Т. 27. – №. 10. – С. 278-286.
98. Manne R. On the resolution problem in hyphenated chromatography // *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. – 1995. – Т. 27. – №. 1. – С. 89-94.
99. Tauler R. Multivariate curve resolution applied to second order data // *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. – 1995. – Т. 30. – №. 1. – С. 133-146.
100. Ramanujam N. et al. Cervical precancer detection using a multivariate statistical algorithm based on laser-induced fluorescence spectra at multiple excitation wavelengths // *Photochemistry and Photobiology*. – 1996. – Т. 64. – №. 4. – С. 720-735.
101. Chang H. et al. Light-induced autofluorescence spectroscopy for detection of nasopharyngeal carcinoma in vivo // *Applied spectroscopy*. – 2002. – Т. 56. – №. 10. – С. 1361-1367.
102. Tsibulskaya E., Maslov N. Decomposition of multi-component fluorescence spectra by narrow peak method based on principal component analysis // *Journal of Chemometrics*. – 2021. – Т. 35. – №. 6. – С. e3343.
103. Цибульская Е. О. Оптимизация режимов работы ротационного биологического реактора и оптический контроль выращенных в нем образцов // Тезисы докладов XII Всероссийской школы-конференции молодых ученых «Проблемы механики: теория, эксперимент и новые технологии» – 2018. – С. 152-153.
104. Цибульская Е. О. Численное моделирование течения жидкости в биореакторе и оптическая диагностика выращенной в нем костной ткани // Тезисы докладов XIV Всероссийской школы-конференции молодых ученых

«Проблемы механики: Теория, эксперимент и новые технологии» – 2020. – С. 198-199.

105. 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. – Т. 2027. – №. 1. – С. 030100.

106. 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.

107. Шлихтинг Г., Теория пограничного слоя – М.: Наука, 1974.

108. Ландау Л.Д., Лифшиц Е.М. Гидродинамика – М.: Наука, 1986.

109. 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. – Т. 1893. – №. 1. – С. 030006.

110. 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.

111. Sven K., Josipa F. Interstitial hydrostatic pressure: a manual for students //Advances in Physiology Education. – 2007. – Т. 31. – №. 1. – С. 116-117.

112. Zhang Y. G. et al. Effect of negative pressure on human bone marrow mesenchymal stem cells in vitro //Connective Tissue Research. – 2010. – Т. 51. – №. 1. – С. 14-21.

113. Zhu J. et al. Effects of negative pressure wound therapy on mesenchymal stem cells proliferation and osteogenic differentiation in a fibrin matrix //PLoS One. – 2014. – Т. 9. – №. 9. – С. e107339.

114. 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. – Т. 1882. – №. 1. – С. 020042.

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

116. 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. – Т. 2027. – №. 1. – С. 030020.

117. 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.

118. Maslov N. A. Ultraviolet pulsed laser-induced fluorescence nonlinearity in optically thick organic samples //Journal of Fluorescence. – 2018. – Т. 28. – С. 689-693.

119. Geladi P., Kowalski B. R. Partial least-squares regression: a tutorial //Analytica Chimica Acta. – 1986. – Т. 185. – С. 1-17.

120. Цибульская Е. О., Маслов Н. А. Декомпозиция модельных многокомпонентных матриц возбуждения-эмиссии алгоритмом на основе метода главных компонент //Тезисы докладов XV Всероссийской школы-конференции молодых ученых «Проблемы механики: Теория, эксперимент и новые технологии» – 2021. – С. 236-237.

121. Maeder M., Neuhold Y. M. Practical data analysis in chemistry. – Elsevier, 2007.

122. Константинова-Шлезингер М. А. Люминесцентный анализ. – Физматгиз, 1961.

123. 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. – Т. 1404. – С. 012046.
124. Meinhardt M. et al. Wavelength-dependent penetration depths of ultraviolet radiation in human skin //Journal of Biomedical Optics. – 2008. – Т. 13. – №. 4. – С. 044030.
125. Rozanowska M., Sarna T. Light-induced damage to the retina: role of rhodopsin chromophore revisited //Photochemistry and Photobiology. – 2005. – Т. 81. – №. 6. – С. 1305-1330.
126. 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. – Т. 2125. – №. 1. – С. 030005.
127. Ash C. et al. Effect of wavelength and beam width on penetration in light-tissue interaction using computational methods //Lasers in Medical Science. – 2017. – Т. 32. – №. 8. – С. 1909-1918.
128. 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. – Т. 1760. – №. 1. – С. 020041.
129. Ларионов П. М., Маслов Н. А., Папаева Е. О., Терещенко В. П., Хлесткин В. К., Богачев С. С., Проскурина А. С., Титов А. Т., Филипенко М. Л., Павлов В. В., Кудров Г. А., Оришич А. М. Оптический контроль биотехнологии скаффолда для регенерации кости на основе лазерно-индуцированной флуоресцентной спектроскопии //Российский иммунологический журнал. – 2016. – Т. 10 (19). – № 2 (1). – С. 582-584.