

УДК 532.51

Моделирование течения жидкости в биологическом реакторе ротационного типа *

В.Л. Ганимедов¹, Е.О. Цибульская^{1,2}, Н.А. Маслов^{1,2}, П.М. Ларионов^{2,3}

¹Институт теоретической и прикладной механики
им. С.А. Христиановича СО РАН, Новосибирск

²Новосибирский государственный университет

³Новосибирский научно-исследовательский институт
травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна МЗ РФ

E-mail: euglenaria@gmail.com

Для решения задачи регенерации костной ткани перспективной является технология, использующая для замещения поврежденных тканей собственные клетки пациента, размещенные в трехмерном каркасе — скаффолде. Для разработки данной методики был сконструирован новый биологический реактор ротационного типа, в котором полотно скаффолда вращается в среде для выращивания клеток. Был построен вычислительный алгоритм на основе программы ANSYS, позволяющий оценивать в новом биореакторе уровень механической нагрузки на клетки, влияющей на их свойства. Алгоритм позволяет рассчитывать значения касательного напряжения и статического давления, действующих на поверхности скаффолда. Расчеты показали, что в предложенном ротационном биореакторе достигается необходимое касательное напряжение на внешней поверхности внутреннего цилиндра (0,002–0,1 Па) в диапазоне частот вращения $0,083 < f < 0,233$ Гц. В то же время результаты вычислений выявили наличие неоднородности в распределении механического воздействия вдоль полотна скаффолда, связанной с появлением в зазоре цилиндров двух вихрей Тейлора с противоположными направлениями вращения. Эксперименты по визуализации поля течения внутри ротационного биологического реактора показали качественное соответствие характера течения результатам численного расчета. Предложенный вычислительный алгоритм может с достаточной точностью моделировать течение жидкости в реальной системе. Полученные зависимости можно использовать на практике для создания оптимального микроокружения выращиваемых в биологическом реакторе клеток.

Ключевые слова: ротационный биореактор, математическое моделирование, соосные цилиндры, ламинарный режим течения, касательное напряжение, течение Куэтта, число Тейлора.

Введение

Современные методы гидродинамических расчетов могут находить применение во множестве смежных областей науки. Например, одной из актуальных проблем современной медицины является задача восстановления критических дефектов кости. В настоящее время интенсивно развивается технология, основанная на замещении поврежденных тканей заранее сформированным и заселенным стволовыми клетками пациента

* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 15-29-04849 «Тканеинженерные конструкции для замещения дефектов кости с оптическим контролем на основе лазерно-индуцированной флуоресцентной спектроскопии»).

трехмерным каркасом (скаффолдом) [1]. Одним из наиболее важных этапов данной технологии является создание необходимых условий для клеток после их размещения в трехмерном скаффолде. Для этого разрабатываются различные типы биологических реакторов, которые должны удовлетворять двум требованиям. Во-первых, биореактор должен создавать оптимальные условия для клеточного роста: обеспечивать равномерное распределение клеток, контролировать уровень кислорода, способствовать удалению продуктов клеточного метаболизма и повышению жизнеспособности клеточной культуры. Во-вторых, для клеток должно быть обеспечено соответствующее динамическое микроокружение, которое позволит применять эффект механотрансдукции — процесса трансформации силового механического воздействия в биологическое [2, 3]. Механические стимулы действуют на внутренний клеточный скелет [4], оказывают влияние на уровень апоптоза (запрограммированной смерти) в клеточной культуре [5], опосредованно участвуют в образовании сосудов [6] и оказывают регуляторное влияние на экспрессию ряда транскрипционных факторов [7], меняют уровень дифференцировки стволовых мезенхимальных клеток и их фенотип в направлении остеогенеза [8]. Таким образом, механические стимулы вместе с биохимическими факторами влияют на формирование костной ткани [9].

В настоящее время существует множество типов биореакторов: механические, аэрлифтные, газо-вихревые и т.д. Основным силовым воздействием на клетки для всех типов реакторов является касательное напряжение при движении жидкости (shear stress — касательное напряжение). Диапазон используемых значений касательного напряжения для воздействия на клетки, размещенные в скаффолде, в условиях перфузионных биореакторов достаточно широк: от 0,002 до 0,1 Па [10, 11]. В настоящее время ведутся исследования, направленные на уточнение пороговых значений воздействия касательного напряжения на клетки, где обязательно учитываются жесткость скаффолда, геометрия его поверхности и микроархитектура [12]. Более того, для предотвращения негативных эффектов при превышении пороговых значений касательного напряжения разрабатываются специальные рецептуры для подготовки клеток [13].

Специально для целей восстановления дефектов костных тканей с помощью скаффолд-технологии был сконструирован новый биореактор ротационного типа [14]. При создании образца для трансплантации скаффолд, представляющий собой полотно на основе поликапролактона с включением желатина и хитозана, заселяли мезенхимальными стволовыми клетками, а затем помещали в ротационный биореактор для культивирования, где под воздействием касательных напряжений и индуцирующих факторов стволовые клетки дифференцировались в остеообласты, формируя таким образом костную ткань.

Определение параметров режимов работы биореактора имеет большое значение. При этом уровень механического воздействия среды на размещенные в скаффолде клетки с трудом поддается непосредственному измерению, однако он может быть рассчитан с помощью математической модели. В настоящей работе с помощью вычислительного пакета ANSYS получены оценка значения касательного напряжения, действующего на клеточные культуры в условиях ротационного биореактора, и стабильность силового воздействия на клетки. Для экспериментальной проверки расчета течения была выполнена визуализация течения жидкости внутри биореактора.

Материалы и методы

Изображение ротационного реактора, используемого в настоящей работе, представлено на рис. 1а. Биореактор представляет собой стеклянный сосуд цилиндрической формы высотой 85 мм и диаметром 79 мм, заполненный питательной культуральной средой, в которую соосно установлен цилиндрический каркас для скаффолда. В качестве скаффолда использовали полотно на основе поликапролактона, желатина и хитозана,

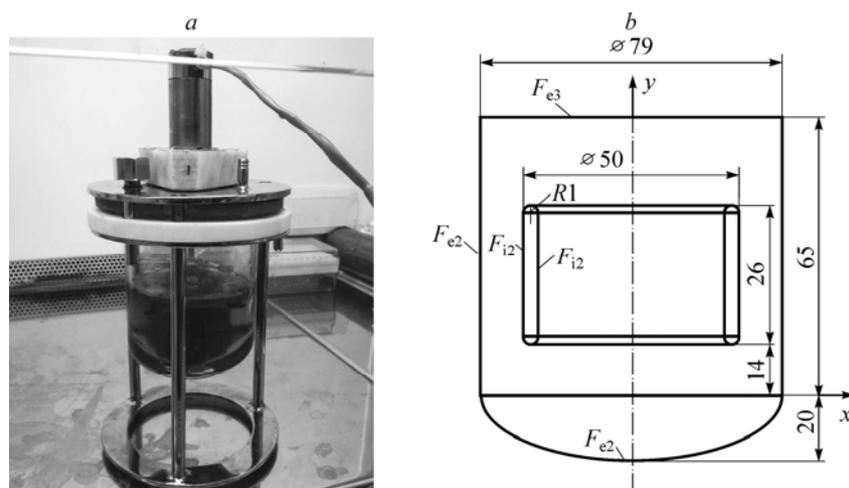


Рис. 1. Фотография (а) и геометрическая модель (b) ротационного биореактора.

F_{e1}, F_{e2}, F_{e3} — поверхности внешнего цилиндра;
 F_{i1}, F_{i2} — поверхности внутреннего цилиндра. Размеры указаны в миллиметрах.

а также микроэлементов, определяющих остеоиндукцию. Полотно скаффолда представляет собой пленку, формируемую на установке электроспиннинга [15]. Полотно заселяется мезенхимальными стволовыми клетками, натягивается на цилиндрический каркас заселенной стороной наружу и помещается в биореактор для культивирования. В реакторе каркас со скаффолдом вращается в питательной среде и стволовые клетки под действием индуцирующих факторов и механических напряжений дифференцируются в остеообласты — клетки, формирующие кость.

Геометрическая модель биореактора, используемая в численных расчетах, состоит из двух коаксиальных цилиндров разной высоты (рис. 1b). Дно реактора представляет собой поверхность сплюснутого эллипсоида вращения с указанными на рисунке параметрами. Основные размеры конструкции показаны на рисунке и соответствуют функционирующему экспериментальному образцу. При работе реактора вращаются только поверхности внутреннего цилиндра (F_{i1}, F_{i2}), а все поверхности внешнего цилиндра (F_{e1}, F_{e2}, F_{e3}) остаются неподвижными. Таким образом, течение жидкости в рассматриваемой области возникает вследствие вращения внутреннего цилиндра.

Для описания течения культуральной среды используется система уравнений Навье–Стокса для несжимаемой жидкости. Теплообмен и гравитационные силы в поставленной задаче не учитывались. В качестве жидкости при моделировании процесса для простоты сравнения с экспериментом рассматривалась вода при комнатной температуре с плотностью $998,2 \text{ кг/м}^3$ и динамической вязкостью $0,001 \text{ мПа}\cdot\text{с}$. На поверхностях внешнего цилиндра F_{e1} и F_{e2} (рис. 1b) ставились условия неподвижности стенки и прилипания жидкости; на поверхности F_{e3} — неподвижности и равенства нулю производной скорости по нормали ($\partial U/\partial n = 0$). На поверхностях внутреннего цилиндра F_{i1}, F_{i2} ставились условия вращения поверхности вокруг оси цилиндра и прилипания. В качестве начальных данных во всей области определения задачи задавались нулевые компоненты скорости $U_x = U_y = U_z = 0$, а режим течения постулировался ламинарным.

При дискретизации использовалась гибридная неструктурированная сетка с уменьшением размера шага вблизи поверхностей внутреннего цилиндра. Независимость решения от шага сетки оценивалась путем дробления шагов и сравнения значений усредненного по поверхности касательного напряжения. В результате проведенного анализа было выбрано количество элементарных объемов в размере $3,1 \cdot 10^6$ шт. Численное решение

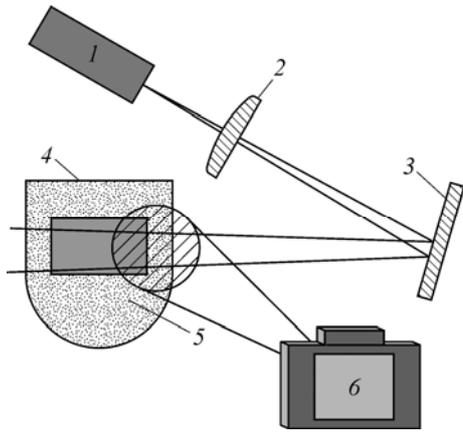


Рис. 2. Схема установки для визуализации течения жидкости внутри ротационного биореактора.
1 — лазер, 2 — цилиндрическая линза, 3 — зеркало,
4 — биореактор, 5 — вода, заселенная трассерами,
6 — фотокамера.

системы уравнений строилось с помощью газодинамического решателя «Fluent» пакета прикладных программ ANSYS, который широко применяется для расчета течений [16, 17].

Алгоритм решения верифицировался на примере задачи определения поля течения в зазоре между двумя бесконечными коаксиальными цилиндрами в случае, когда внешний цилиндр неподвижен, а внутренний

вращается. При сравнении число Тейлора лежало в диапазоне $41,3 < Ta < 400$, что соответствует ламинарному течению с вихрями Тейлора [18]. Сравнение окружной скорости показало, что предлагаемый алгоритм хорошо повторяет аналитические решения для ламинарного течения Куэтта. Более детально геометрическая модель биореактора, постановка задачи, описание области дискретизации и сравнение с тестовой задачей изложены в работе [14].

Для изучения течения жидкости внутри ротационного биореактора была использована установка для лазерной визуализации, схема которой представлена на рис. 2. Вместо полотна скаффолда использовался цилиндр из прозрачного 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 30×1 мм в сечении, который направлялся на стеклянные стенки биореактора 4. Плоскость лазерного ножа проходила через ось симметрии колбы 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.

Результаты и обсуждение

Для визуализации течения жидкости в биореакторе были проведены эксперименты с различной частотой вращения внутреннего цилиндра $f = 0,083, 0,167, 0,33, 0,5, 0,667, 0,83, 1$ Гц, что соответствовало 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 об/мин. Эксперименты показали, что на всех частотах вращения в зазоре между цилиндрами возникают вихри Тейлора. Вместе с тем, увеличение частоты вращения приводило к усилению хаотичности движения слоев жидкости, то есть вихри Тейлора становились нестабильными. Вследствие этого для визуализации была выбрана наименьшая частота $f = 0,083$ Гц. В результате экспериментов, проведенных с этой частотой вращения, были получены серии изображений движущихся в потоке трассеров с различными временами выдержки. В качестве примера на рис. 3 приведены фотографии области зазора между стеклянной стенкой реактора и внутренним цилиндром-держателем скаффолда. Все фотографии были выравнены по вертикали, красный канал изображения был переведен в черно-белый цвет, а затем полученное изображение было преобразовано в негатив с дополнительной коррекцией яркости и контрастности.

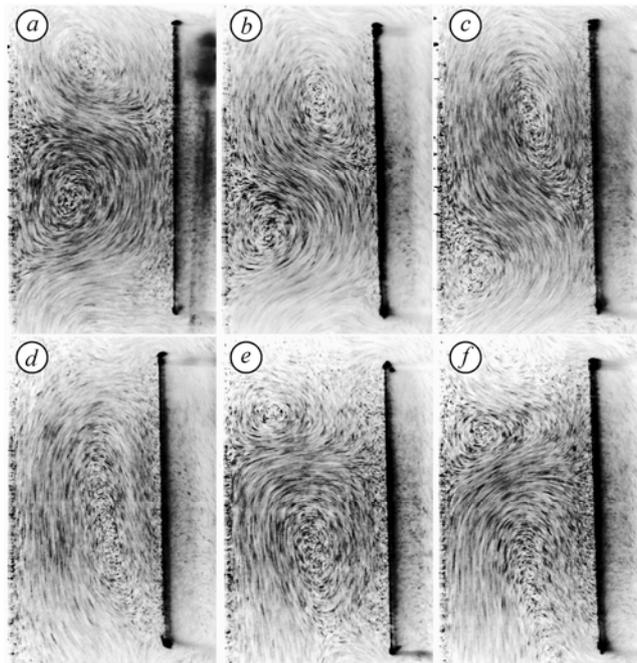


Рис. 3. Серия фотографий зазора между стеклянной стенкой реактора и внутренним цилиндром (держателем скаффолда) в разные моменты времени. Ось вращения расположена справа; время выдержки фотоаппарата $t = 0,5$ с; частота вращения внутреннего цилиндра $f = 0,083$ Гц.

Из рис. 3 видно, что структура вихрей Тейлора нестационарна во времени. Большую его часть в зазоре размещалось два несимметричных вихря, последовательность расположения которых повторялась с периодом в 1,5 минуты. Этот факт связан с несимметричностью реальной геометрии реактора, в отличие от математической модели. В результате имели место периодические биения внутреннего цилиндра и изменения ширины зазора между цилиндрами.

Для сравнения с расчетами в пакете программ ANSYS была выбрана фотография, соответствующая моменту, когда в экспериментальной установке на режиме вращения с частотой $f = 0,083$ Гц два вихря Тейлора симметрично заполняли полость зазора. Характерная фотография, полученная с выдержкой $t = 0,5$ с, представлена на рис. 4а. На рис. 4б изображена визуализация течения жидкости, полученная после расчетов в ANSYS, в представлении векторов при той же частоте вращения внутреннего цилиндра. Эксперимент показал, что в зазоре между цилиндрами вихри Тейлора качественно согласуются с расчетом вихрей, полученных в ANSYS, но в действующем реакторе вихри оказываются смещенными относительно середины зазора в разные стороны. Таким образом, несимметричность конструкции сильно влияет на реальную форму вихрей Тейлора. Наличие трассеров позволило оценить скорость потока в вертикальной плоскости uz для области, соответствующей максимальной скорости течения жидкости в вихре Тейлора.

Область, отмеченная на рис. 4а белым квадратом, соответствует максимальной скорости течения жидкости. Для этой области оценивалась скорость движения микросфер-трассеров. Внутри квадрата выбирались наиболее четкие треки, и затем измерялась их длина. При известном времени выдержки фотографии ($t = 0,5$ с) средняя скорость движения трассеров в выбранном участке $v_{\text{exp}} = 1,6 \pm 0,28$ мм/с. Максимальная скорость течения

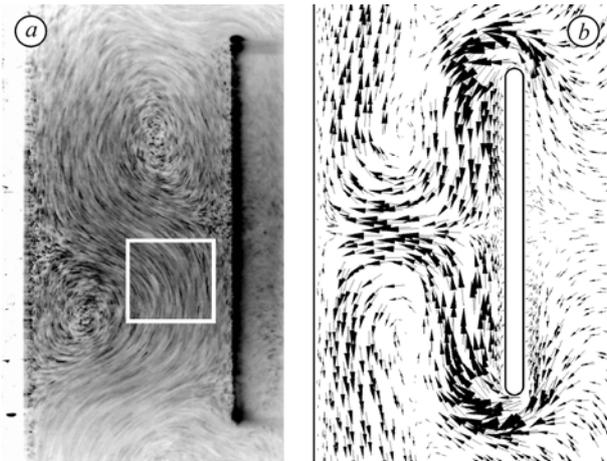


Рис. 4. Сравнение визуализаций течения жидкости в области зазора между двумя цилиндрами, полученных в эксперименте (а) и с помощью ANSYS (b).

Квадратом выделена область с максимальной скоростью течения жидкости; частота вращения внутреннего цилиндра $f = 0,083$ Гц.

жидкости в вертикальной плоскости yz , полученная в результате численного расчета, составила $v_{\text{calc}} = 1,785$ мм/с, что в пределах погрешности совпадает с экспериментальными данными. Это свидетельствует о том, что представленный вычислительный алгоритм на основе ANSYS может адекватно моделировать течение жидкости в биореакторе.

Главным достоинством построенного вычислительного алгоритма является возможность рассчитывать поля скоростей в полости биореактора, а также распределения касательного напряжения и статического давления на поверхностях внутреннего цилиндра. Информация о перечисленных параметрах помогает в выборе режима работы биореактора в зависимости от предоставляемых требований и используемых культуральных жидкостей.

На рис. 5 представлены визуализации статического давления P (Па) и касательного напряжения τ (Па), действующих на внешнюю поверхность внутреннего цилиндра F_{i1} . В реальной модели ротационного биореактора на этой поверхности закрепляется полотно скаффолда, заселенное клетками, поэтому информация о распределении механического напряжения на ней представляет особый интерес. Статическое давление представлено разностью $P = P_{\text{abc}} - 101325$ Па. Здесь P_{abc} — абсолютное давление, отсчитываемое от нуля. Из рис. 5 видно, что зона соединения вихрей Тейлора, расположенная в середине

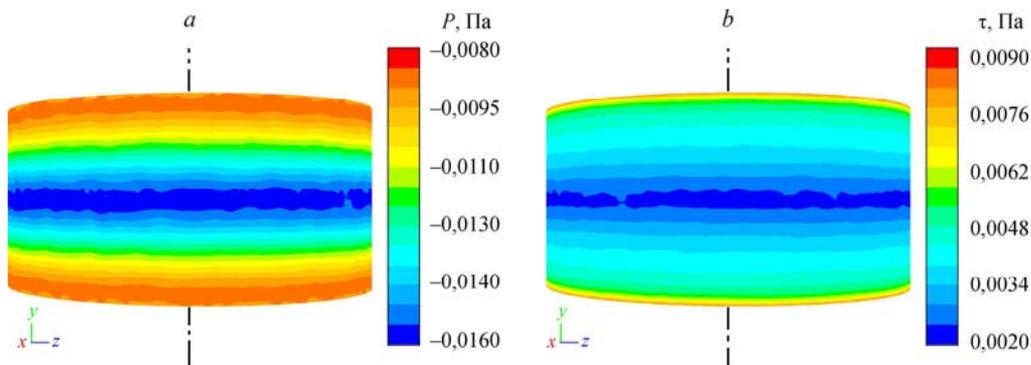


Рис. 5. Визуализация распределения статического давления P (a) и касательного напряжения τ (b), действующих на внешнюю поверхность внутреннего цилиндра (F_{i1}).

Ось вращения отмечена штрихпунктирной линией.

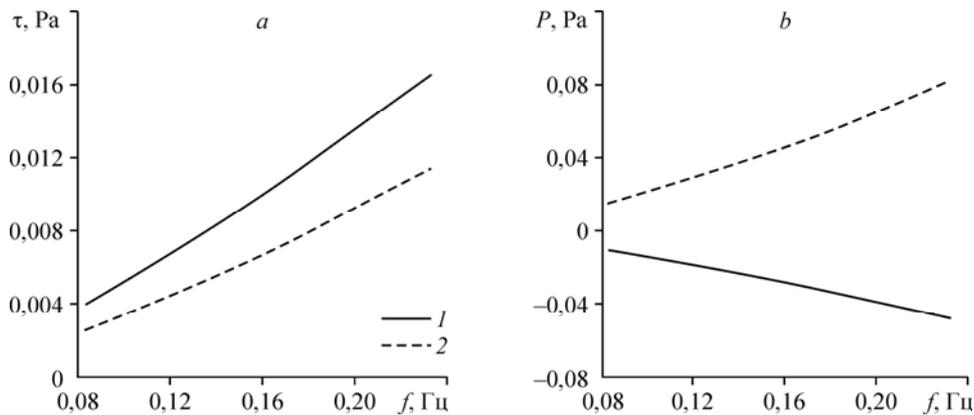


Рис. 6. Зависимости касательного напряжения τ (a) и статического давления P (b) от частоты вращения внутреннего цилиндра.
1 — поверхность F_{i1} , 2 — поверхность F_{i2} .

высоты цилиндра, имеет пониженные значения касательного напряжения и статического давления по сравнению с их значениями по краям. Эта неоднородность распределения механического воздействия усиливается с увеличением частоты вращения внутреннего цилиндра [19], что является наиболее важным фактором для выбранной геометрии системы. Кроме того, изменением частоты вращения проще всего регулировать силу механического воздействия. На рис. 6 представлены графики распределения усредненного по поверхности касательного напряжения (рис. 6a) и статического давления (рис. 6b) в зависимости от частоты вращения внутреннего цилиндра. Сплошная линия соответствует поверхности F_{i1} , штриховая — поверхности F_{i2} . По приведенным графикам можно оценить частоту вращения, требуемую для оптимальной дифференциации стволовых клеток в остеобласты. Расчеты выполнены для размеров, соответствующих экспериментальной модели биореактора. При этом предполагалось использование воды (при комнатной температуре) в качестве необходимой жидкости. Однако вычисления могут быть также выполнены для других геометрических параметров, а также для других параметров используемой культуральной среды, которые могут отличаться от использованных в выполненных расчетах в пределах 10–25 % [20]. Видно, что в диапазоне частот вращения внутреннего цилиндра ($0,083 < f < 0,233$ Гц) значения касательного напряжения попадают в диапазон, используемый в других известных реакторах (0,002–0,1 Па) [10, 11]. Представленные режимы работы нового биореактора могут быть применены для дифференциации стволовых клеток.

Заключение

Для регенерации костной ткани был сконструирован новый биореактор ротационного типа, позволяющий реализовывать механическое воздействие на культивируемые в нем клетки и регулировать его уровень, изменяя частоту вращения держателя полотна скаффолда. Для оценки локальных величин механического воздействия потока жидкости на поверхности скаффолда была построена упрощенная математическая модель биологического реактора, состоящего из двух коаксиальных цилиндров, и использован вычислительный алгоритм на основе пакета ANSYS «Fluent». Построенный вычислительный алгоритм позволяет определять значения касательного напряжения и статического давления, действующих на рабочие поверхности. Было показано, что в предложенной конструкции достигаются необходимые касательные напряжения на внешней поверхности внутреннего цилиндра 0,002–0,1 Па в диапазоне частот вращения $0,083 < f < 0,233$ Гц. Однако расчеты выявили наличие неоднородности в распределении механического воздействия вдоль полотна скаффолда, которая связана, прежде всего, с появлением в зазоре

цилиндров двух вихрей Тейлора с противоположными направлениями вращения. Соответственно, место соединения вихрей характеризуется понижением величины касательного напряжения. Визуализация течения жидкости внутри экспериментального образца ротационного биологического реактора при использовании нескольких частот вращения внутреннего цилиндра показала качественное соответствие характера течения результатам численного расчета. Сравнение скорости течения жидкости в вертикальной плоскости, вычисленной на основании результатов визуализации, со скоростью, полученной в результате математического моделирования, показало, что они совпадают в пределах точности измерений. Таким образом, показано, что предложенная конструкция реактора работоспособна и использованный вычислительный алгоритм может с достаточной точностью описывать течение жидкости в реальной системе. Полученные зависимости можно использовать на практике для создания оптимального микроокружения выращиваемых в биологическом реакторе клеток.

Список литературы

1. **Hutmacher D.W.** Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage // *Biomaterials*. 2000. T. 21, No. 24. C. 2529–2543.
2. **Cartmell S.H., Porter B.D., Garcia A.J., Guldberg R.E.** Effects of medium perfusion rate on cell-seeded three-dimensional bone constructs in vitro // *Tissue Eng.* 2003. Vol. 9, No. 6. P. 1197–1203.
3. **Varley M.C., Markaki A.E., Brooks R.A.** Effect of rotation on scaffold motion and cell growth in rotating bioreactors // *Tissue Eng. Part A*. 2017. Vol. 23, No. 11–12. P. 522–534.
4. **Hoey D.A., Torney S., Ramcharan S., O'Brien F.J., Jacobs C.R.** Primary cilia-mediated mechanotransduction in human mesenchymal stem cells // *Stem Cells*. 2012. Vol. 30, No. 11. P. 2561–2570.
5. **Cheung W.-Y., Liu C., Tonelli-Zasarsky R.M., Simmons S.A., You L.** Osteocyte apoptosis is mechanically regulated and induces angiogenesis in vitro // *J. Orthop. Res.* 2011. Vol. 29, No. 4. P. 523–530.
6. **Galie P.A., Nguyen D.H., Choi C.K., Cohen D.H., Janmey P.A., Chen C.S.** Fluid shear stress threshold regulates angiogenic sprouting // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2014. Vol. 111, No. 22. P. 7968–7973.
7. **Prahs C., Kasaai B., Moraes F., Jahnsen E.D. et al.** The H2.0-like homeobox transcription factor modulates yolk sac vascular remodeling in mouse embryos // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2014. Vol. 34, No. 7. P. 1468–1476.
8. **Shih Y.-R.V., Tseng K.-F., Lai H.-Y., Lin Ch.-H., Lee O.K.** Matrix stiffness regulation of integrin-mediated mechanotransduction during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells // *J. Bone Miner. Res.* 2011. Vol. 26, No. 4. P. 730–738.
9. **Jazayeri M., Shokrgozar M.A., Haghhighipour N., Mahdian R. et al.** Evaluation of mechanical and chemical stimulations on osteocalcin and Runx2 expression in mesenchymal stem cells // *Mol. Cell. Biomech.* 2015. Vol. 12, No. 3. P. 197–213.
10. **Bancroft G.N., Sikavitsas V.J., Vanden Dolder J., Sheffield T.L. et al.** Fluid flow increases mineralized matrix deposition in 3D perfusion culture of marrow stromal osteoblasts in a dose-dependent manner // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002. Vol. 99, No. 20. P. 12600–12605.
11. **Sailon A.M., Allori A.C., Davidson E.H., Reformat D.D., Allen R.J., Warren S.M.** A novel flow-perfusion bioreactor supports 3D dynamic cell culture // *J. Biomed. Biotechnol.* 2009. Vol. 2009. P. 1–7.
12. **Guyot Y., Smeets B., Odenthal T., Subramani R., Luyten F.P., Ramon H. et al.** Immersed boundary models for quantifying flow-induced mechanical stimuli on stem cells seeded on 3D scaffolds in perfusion bioreactors // *PLOS Comput. Biol.* 2016. Vol. 12, No. 9. P. e1005108.
13. **Lv Y., Hao X., Sha Y., Yang L.** Pretreatment with mechano-growth factor E peptide protects bone marrow mesenchymal cells against damage by fluid shear stress // *Biotechnol. Lett.* 2014. Vol. 36, No. 12. P. 2559–2569.
14. **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 Conf. Proc.* 2017. Vol. 1882, No. 1. P. 20020-1–20020-6.
15. **Larionov P.M., Maslov N.A., Papaeva E.O., Tereshchenko V.P. et al.** Designing the method for optical in vitro monitoring of the cell-mediated scaffold technology for bone regeneration based on laser-induced fluorescence spectroscopy // *AIP Conf. Proc.* 2016. Vol. 1760, No. 1. P. 20041-1–20041-6.
16. **Кириловский С.В., Поплавская Т.В.** О влиянии одиночной шероховатости на течение в сверхзвуковом пограничном слое на затупленном конусе // *Теплофизика и аэромеханика*. 2016. Т. 23, № 6. С. 971–974.
17. **Шолев Г.В., Бондарь Е.А., Облапенко Г.П., Кустова Е.В.** Разработка и апробация методики численного моделирования термически неравновесных диссоциирующих течений в ANSYS Fluent // *Теплофизика и аэромеханика*. 2016. Т. 23, № 2. С. 159–171.
18. **Шлихтинг Г.** Теория пограничного слоя. М.: Наука, 1974. 712 С.
19. **Ganimedov V.L., Papaeva E.O., Maslov N.A., Larionov P.M.** Numerical simulation of fluid flow in a rotational bioreactor // *AIP Conf. Proc.* 2017. Vol. 1893, No. 1. P. 30006-1–30006-7.
20. **Vacabac R.G., Smit T.H., Cowin S.C., Van Loon J.J., Nieuwstadt F.T., Heethaar R., Klein-Nulend J.** Dynamic shear stress in parallel-plate flow chambers // *J. Biomech.* 2005. Vol. 38, No. 1. P. 159–167.

Статья поступила в редакцию 13 ноября 2017 г.