

## RECENZJA

pracy doktorskiej mgr inż. Przemysława Smakulskiego  
pt. „A use of the cryogenic particulate spray cooling method for biological material long-term preservation”

### 1. Informacje ogólne

Praca wykonana została na Wydziale Mechaniczno-Energetycznym Politechniki Wrocławskiej pod kierunkiem promotora dr. hab. inż. Sławomira Pietrowicza, prof. PWr. Pracę opublikowano jako raport serii PREPRINT nr 3/2018 na Wydziale Mechaniczno-Energetycznym Politechniki Wrocławskiej.

Recenzję opracowano w oparciu o decyzję Rady Wydziału Mechaniczno-Energetycznego PWr z dnia 04.07.2018 r.

Praca doktorska została przedstawiona na 168 stronach i zawiera siedem rozdziałów, dwa załączniki oraz wykaz ważniejszych oznaczeń. Dysertacja zawiera 59 rysunków i 13 tabel oraz wykaz literatury (188 pozycji).

### 2. Omówienie treści pracy

Praca napisana jest w języku angielskim. Pracę rozpoczyna spis treści i wykaz ważniejszych oznaczeń. W pracy brakuje streszczenia.

W rozdziale pierwszym (24 strony), zatytułowanym *Introduction*, autor dokonuje szczegółowego przeglądu literatury oraz wprowadza zagadnienia związane z niskotemperaturowym przechowywaniem materiału biologicznego, w szczególności opartego na chłodzeniu ciekłym azotem. Zwraca uwagę na szerokie i ważne zastosowanie niskotemperaturowego przechowywania i konserwacji materiału biologicznego do celów transplantacji, czy zachowania materiału genetycznego. Zwraca uwagę na zalety przechowywania w temperaturach kriogenicznych, wymienia także główne problemy z tym związane: wstrząs osmotyczny, Wewnątrz komórkowe formowanie się lodu, rekryształizacja

Wydział Mechaniczno-Energetyczny  
Data .....

49/PW/1252/2018  
Wydział Mechaniczno-Energetyczny  
Wpłynęło dnia 29.08.2018

oraz dewitryfikacja, toksyczność dodatkowych substancji CPA (*Cryoprotectant agents*), naprężenia mechaniczne wywierane na błonę komórkową, szok termiczny.

W podrozdziałach *Slow freezing* oraz *Vitrification* dokładnie przedstawia dwie obecnie stosowane metody do konserwacji niskotemperaturowej. Pierwsza metoda jest oparta na zasadzie wolnego zamrażania, co pozwala na równoczesne odwadnianie komórki i unikanie powstawania kryształków lodu wewnątrz komórki. Druga metoda jest oparta na szybkim zamrażaniu, które prowadzi do witryfikacji materiału biologicznego. W podrozdziale *Spray cooling as a method of fast heat removal* autor zwraca uwagę, że problemy klasycznego zamrażania polegającego na znużeniu próbki w ciekłym azocie, można uniknąć poprzez zastosowanie zamrażania strumieniem zawiesiny lodowej azotu. Odpowiednio dobrany strumień mieszaniny ciekłego azotu oraz drobnych cząsteczek lodu znacząco intensyfikuje wymianę ciepła oraz szybkość chłodzenia. W podrozdziale *Short introduction to the MSN<sub>2</sub> spray cooling* autor omawia zasadę działania generatora azotowej zawiesiny lodowej, opartej na dyszy de Lavalą (MSN<sub>2</sub>), którą używa w prowadzonych badaniach eksperymentalnych.

W rozdziale 2 *Doctoral thesis and scope of the dissertation* autor przedstawia cele, zakres oraz główną tezę pracy. Píše, że celem pracy jest zrozumienie fizyki zamrażania komórek wykorzystującej nowatorską metodę MSN<sub>2</sub>, chłodzenia strumieniem gazowo-ciekłego zawierającym cząsteczki zestalonego azotu. Wiedza ta pozwoli na zidentyfikowanie wad i zalet zamrażania strumieniowego w kontekście zamrażania wolnego oraz witryfikacji.

Autor rozprawy stawia następującą tezę: Chłodzenie strumieniem zawierającym zestalone cząstki azotu redukuje niekorzystny wpływ wrzenia błonowego na wymianę ciepła, intensyfikuje wymianę ciepła oraz pozwala uniknąć zestalania się kryształków lodu wewnątrz komórki (efekt IIF – *Intracellular Ice Formation*).

Autor wylicza także siedem szczegółowych celów:

1. Zrozumienie zamrażania metodą MSN<sub>2</sub> oraz jej wpływu na strukturę materiału biologicznego.
2. Wykonanie pomiarów termicznych dla metody chłodzenia MSN<sub>2</sub> dla zakresu temperatur najbardziej newralgicznych z punktu widzenia konserwacji kriogenicznej materiału biologicznego.
3. Przetestowanie nowatorskich pojemników kriogenicznych służących do witryfikacji próbek biologicznych o dużej objętości.
4. Przebadanie procedur wolnego zamrażania oraz witryfikacji w celu zwiększenia sukcesu konserwacji kriogenicznej (utrwalenia kriogenicznego).
5. Rozwinięcie metodologii pomiarowej dla chłodzenia strumieniowego MSN<sub>2</sub>.

6. Dokładne zrozumienie mechanizmu wymiany ciepła w chłodzeniu strumieniowym MSN2.
7. Zamodelowanie odpowiedzi błony komórkowej na propagację frontu zamarzania oraz oszacowanie zdolności do przetrwania po zamarznięciu.

Autor przedstawił także szczegółowo zakres pracy, formułując następujące sześć punktów:

1. Systematyzacja obecnej wiedzy związanej z utrwalaniem kriogenicznym.
2. Zaprojektowanie i wykonanie stanowiska badawczego do pomiaru transportu ciepła.
3. Zaprojektowanie i wykonanie stanowiska badawczego do wizualizacji propagacji frontu zamarzania.
4. Zaprojektowanie i wykonanie stanowiska badawczego do przeprowadzenia witrifikacji zawiesiny pozbawionej komórek.
5. Rozwinięcie narzędzia numerycznego do modelowania propagacji frontu zamarzania w warunkach niestacjonarnych oraz przechłodzonych, z wykorzystaniem metody typu *phase-field*.
6. Walidacja zaproponowanego modelu numerycznego poprzez porównanie z wynikami eksperymentu.

W rozdziale 3 *Experimental research*, liczącym 16 stron, autor omówił metodologię prowadzonych badań eksperymentalnych oraz szczegółowo opisał stanowisko badawcze, którego poszczególne elementy zostały przedstawione na rysunku 3.1. Podstawą wyboru badanych parametrów przez autora było stwierdzenie, że podstawowym parametrem decydującym o udanym utrwaleniu kriogenicznym jest odpowiednia szybkość chłodzenia. Autor wymienił następujące obszary, które będą tematem pomiarów eksperymentalnych: krzywa chłodzenia dla metody MSN2, współczynniki wymiany ciepła dla temperatur poniżej 300K, pomiary strumienia ciepła, możliwości użycia metody MSN2 do witrifikacji, dynamika propagacji frontu zamarzania, pomiary dla wody destylowanej, czystego roztworu soli oraz roztworu soli z dodatkiem CPA (tabela 3.1).

W podrozdziale 3.2 *Specific design features* autor dokładnie opisuje dwa autorskie kriogeniczne pojemniki pomiarowe w których umieszczone są przyrządy pomiarowe oraz badane próbki. Autor dokładnie opisuje i przedstawia projekt poszczególnych pojemników pomiarowych oraz przedstawia procedurę wypełniania zasobników badanym materiałem. W podrozdziale 3.3 *Measurement methodology* autor przedstawia dokładnie urządzenia pomiarowe użyte w eksperymencie do mierzenia: temperatury (czujnik Pt100 firmy Netsushin, termopara Cu-CuNi), gęstości strumienia ciepła (czujnik firmy Captec), propagacji frontu zamarzania oraz witrifikacji (szybka kamera CCD Redlake MotionPro X3 o matrycy 1600x1200) oraz rozkładu cząstek (laser Nd-YAG).

W rozdziale czwartym *Results of experiments* autor przedstawia wyniki pomiarów. Na rysunku 4.2 przedstawia krzywe chłodzenia dla ceramicznego płaskiego grzejnika, ogrzanego wstępnie do temperatur: 298 K, 313 K oraz 373 K i chłodzone metodą MSN2. Widoczne są 3 odmienne regiony na krzywych chłodzenia, które odpowiadają różnym prędkościom chłodzenia ceramicznego grzejnika. Następnie przeprowadza podobny pomiar ale dla próbki wypełnionej wodą umieszczonej w pierwszym rodzaju kriogenicznego pojemnika pomiarowego. Autor stwierdza, że przebiegi krzywych chłodzenia dla wody oraz płytek ceramicznych są jakościowo podobne. Ponadto na krzywej chłodzenia identyfikuje skokową zmianę dla temperatury ścianki z 80K na 115 K, świadcząca o zlokalizowanym maksymalnym strumieniu ciepła. Autor odnosi to do punktu CHF (krytyczny strumień ciepła) z krzywej wrzenia dla ciekłego azotu.

W podrozdziale *4.2.2 Spray boiling curve* autor przedstawia wyniki strumienia ciepła (*Heat flux*) w funkcji przegrzania ścianki (rozumianej jako temperaturę ścianki pomniejszoną o temperaturę saturacji dla ciekłego azotu). Autor zwraca uwagę na istnienie charakterystycznego punktu POS (*point of separation*), który oddziela dwa różne reżimy wymiany ciepła, rysunek 4.4 oraz 4.5. Autor (nie wyjaśnia dokładnie jak) identyfikuje, że w punkcie POS temperatura wynosi około 90 K. Na lewo od POS, funkcja jest rosnąca, a wymiana ciepła jest kontrolowana przez wrzenie błonowe, natomiast na prawo od punktu POS, funkcja jest malejąca, a wymiana ciepła kontrolowana jest przez bezpośrednią sublimację cząsteczek zestalonego azotu.

Główny wniosek płynący z przeprowadzonych pomiarów jest zaprezentowany w podrozdziale *4.2.3 Heat transfer coefficient*, rysunek 4.9, gdzie autor porównuje strumień ciepła w przypadku odparowania ciekłego azotu oraz uzyskane wyniki dla metody MSN2 i  $T_{ini} = 373$  K, widoczne jest że metoda chłodzenia MSN2 zapewnia znacząco wyższe strumienie ciepła (tym samym szybsze chłodzenie) dla badanego zakresu temperatur przegrzania ścianki.

W podrozdziale *4.3 Ice front propagation* autor przedstawia wyniki eksperymentalne dotyczące szybkości propagacji frontu zamarzania dla wody destylowanej oraz wodnego roztworu soli o stężeniu 0.9%. Wyniki są zestawione na rysunku 4.12, gdzie naniesiona jest także krzywa teoretyczna będąca rozwiązaniem problemu Stefana. Wyniki eksperymentu znacząco odbiegają od krzywej teoretycznej. Autor nie wyjaśnia tej różnicy zbyt dokładnie. Ponadto, widać iż szybkość zamarzania dla wody oraz roztworu jest bardzo zbliżona. W końcowym etapie szybkość zamarzania dla roztworu jest wolniejsza.



W podrozdziale *4.4 Vitrification experiment* autor przedstawia wyniki eksperymentu chłodzenia roztworów wodnych o różnej zawartości gliceryny oraz czynnika DMSO (dodatek przeciw zamarzaniu). Wraz ze wzrostem stężenia gliceryny obserwuje się inny przebieg zamarzania. Dla stężenia gliceryny oraz DMSO 7 mol/dm<sup>3</sup> autor uzyskał pełną witrifikację, która była możliwa dzięki przyspieszeniu procesu chłodzenia powyżej 240 K/min. Wartość ta jest około 6 razy większa niż w przypadku standardowych metod stosowanych do kriogenicznego utrwalania próbek o większych rozmiarach.

W rozdział piątym *Numerical simulations* autor definiuje model matematyczny, którego będzie używał do modelowania procesu wolnego zamarzania pojedynczej komórki. Model jest ograniczony do dyfuzyjnego modelowania propagacji frontu zamarzania (przemiany fazowej) w mieszaninie jednoskładnikowej (woda) z uwzględnieniem anizotropii oraz dynamiki odkształcenia błony komórkowej wynikającej z różnicy ciśnienia osmotycznego. Model oparty jest na dyskretyzacji objętości skończonych (FVM) i jest zaimplementowany w otwartym oprogramowaniu OpenFOAM. Poprzez zdefiniowanie powyższego modelu matematycznego i jego numerycznej implementacji, autor stara się odpowiedzieć na pytanie, czy technika chłodzenia oparta na MSN2 pozwoli uniknąć powstawania wewnątrz komórkowej krystalizacji lodu (IIF). Jednak zaproponowany model matematyczny nie uwzględnia modelu metody MSN2 w sposób jawny (co byłoby bardzo trudne) tylko w bardzo uproszczony sposób jest on uwzględniony w warunku brzegowym opisującym szybkość chłodzenia jednej ze ścianek rozważanego obszaru obliczeniowego. Warunek brzegowy jest zdefiniowany w oparciu o uzyskane wyniki eksperymentalne co w pewnym stopniu podnosi jego wiarygodność.

W pierwszej kolejności autor definiuje problem Stefana (podrozdział 5.3) który posłuży do walidacji zaproponowanego modelu matematycznego. Następnie autor dokonuje przeglądu kilku metod numerycznych, pozwalających na śledzenie frontu zamarzania: metoda Volume-of-Fluid, Level Set Method oraz Phase Field Method (PFM). Ostatecznie do swojego modelu wybiera metodę PFM, która używa rozmytego/dyfuzyjnego interfejsu międzyfazowego, co pozwala na uniknięcie modelowania frontu przemiany fazowej w sposób jawny (jako ruchomy brzeg z odpowiednimi warunkami brzegowymi). Podstawowe równania definiujące metodę PFM są opisane w pracy równaniami 5.10 oraz 5.11. Model PFM wymaga dalszego wyboru i zdefiniowania występujących w nim funkcji i parametrów, co jest tematem podrozdziałów 5.5 oraz 5.6 autor kolejno wprowadza funkcję energii swobodnej Landaua 5.12 (*free energy function*) funkcjonal 5.13 oraz zależność 5.14, która wynika z żądania minimalizacji funkcjonalu 5.14. Ostatecznie zaproponowany model jest zdefiniowany

równaniami 5.16 – 5.21 i opisuje izotermiczną przemianę fazową jednoskładnikowej substancji.

Zaproponowany model został sprawdzony w oparciu o analityczne rozwiązanie problemu Stefana, rysunek 5.7, gdzie widać dobrą zgodność dla rozpatrywanego przedziału czasowego. Rozpatrywany przedział czasowy jest bardzo mały rzędu  $1e-7$  sekundy. Następnie autor dopasowuje zaproponowany model numeryczny do wyników eksperymentalnych poprzez odpowiednie dobranie szybkości zmiany warunku brzegowego (parametr B w równaniu 5.23). Z замыśle autora ten warunek brzegowy ma odpowiadać szybkość chłodzenia ścianki (zmiany jej temperatury na skutek działania strumienia chłodzącego MSN2). Ostatecznie parametr B został dobrany jako równy 1200 K/min, co zapewniło dobrą zgodność z eksperymentem, rysunek 5.8. Warunek brzegowy 5.23 jest jedynym miejscem gdzie uwzględniono w modelu numerycznym sposób chłodzenia MSN2. Można więc stwierdzić, że zaproponowany model numeryczny nie modeluje chłodzenia metodą MSN2. Uwzględnienie tego byłoby bardzo trudne, niemniej jednak nie jest to konieczne w przypadku śledzenia frontu zamarzania oraz modelowania sposobu zamarzania komórki.

W podrozdziale 5.8 autor rozszerza zaprezentowany model o wpływ anizotropii oraz fluktuacji termicznych na proces zamarzania. Pozwala to na jakościowo poprawne oddanie kształtu frontu zamarzania, co jest przedstawione na rysunku 5.11. Autor modeluje proces zestalania się niklu, który porównuje jakościowo z wynikami dostępnymi w literaturze. Zaproponowany model dobrze oddaje dendrytyczne struktury krzepnięcia. Dodatkowe efekty są uwzględnione poprzez dodanie członów źródłowych. do równania opisującego ewolucję paramentu porządku. zapewniających losowość fluktuacji oraz zmienność przestrzeni współczynnika gradientu energii.

Zaproponowany model matematyczny jest następnie rozwinięty o możliwość modelowania mieszaniny jednoskładnikowej, podrozdział 5.9. Pozwoliło to na zamodelowanie procesu zamarzania roztworu soli o zadanym stężeniu. Wiąże się to z dodaniem kolejnego równania modelującego zmianę koncentracji soli, równanie 5.30 oraz uwzględnieniem dodatkowego członu w równaniu porządku uwzględniającego zmianę stężenia roztworu w okolicy frontu zamarzania. W podrozdziale 5.10 autor opisał metodologię modelowania ścianki błony komórkowej. Autor zdecydował się na zamodelowanie błony komórkowej czerwonej krwinki (RBC), motywując to jej wysoką przeżywalnością dla szybkości chłodzenia 1200 K/min. Autor założył, że zmiana kształtu membrany może być spowodowana jedynie zmianą lokalnej koncentracji soli w roztworze. Powoduje to lokalny przepływ wody poprzez półprzepuszczalną membranę, aż do wyrównania stężeń wewnątrz i na zewnątrz komórki.

Przepływ wody został zamodelowany w oparciu o prawo Darcy'ego, równanie 5.35. Końcowe równanie zmiany koncentracji soli w obszarze obliczeniowym przedstawia równanie 5.39, w którym dodatkowo autor uwzględnił zmianę współczynnika dyfuzji masy w zależności od lokalizacji w obszarze obliczeniowym (obszar poza komórką, błona komórki, obszar wewnątrz komórki).

W rozdziale szóstym *Numerical simulations results* autor przedstawia serię wyników obliczeniowych opartych na modelu przedstawionym w poprzednim rozdziale. Badania numeryczne skupiają się na modelowaniu zachowania pojedynczej komórki krwinki zanurzonej w roztworze solnym w odpowiedzi na zbliżający się front zamrażania. Zwiększanie się zamrażanego obszaru w pobliżu komórki powoduje wzrost koncentracji soli w roztworze otaczającym komórkę, co w konsekwencji prowadzi do dehydratacji komórki. Autor w tym kontekście nadużywa pojęcia *cryo-freezing*, gdyż cały symulowany proces zachodzi w znacznie wyższych temperaturach niż kriogeniczne.

Autor zakłada, że przetrwanie komórki zależy tylko od temperatury wewnątrz komórki, jaka się ustala po procesie zamrażania. A sam proces zamrażania wewnątrz komórki jest homogeniczny. Dyskusyjne może być założenie, że koncentracja soli wewnątrz komórki się nie zmienia podczas dehydratacji komórki. Autor rozpatruje cztery różne scenariusze symulacji, które głównie różnią się początkową temperaturą roztworu otaczającego komórkę. Dla temperatur początkowych, poniżej 255K, autor zaobserwował zamrażanie wewnątrz komórki (IFF). Wyniki zostały podsumowane na rysunku 6.9, gdzie przedstawiona jest zmiana objętości komórki (dehydratacja) w funkcji temperatury w komórce. Widoczne jest, że dla dobranych przez autora parametrów (przypadki 2, 3 i 4) proces dehydratacji przebiega prawidłowo i wewnątrz komórki nie dochodzi do zamrażania.

Autor kończy dysertację rozdziałem *Summary*, gdzie przedstawia główne osiągnięcia swojej pracy. Zalicza do nich:

1. Zidentyfikowanie trzech różnych reżimów chłodzenia, występujących w chłodzeniu metodą MNS2, charakteryzującymi się znacząco różnymi szybkościami chłodzenia.
2. Zidentyfikowanie trzech różnych reżimów wymiany ciepła podczas chłodzenia metodą MNS2: wymiana ciepła poprzez sublimację bardzo drobnych cząsteczek lodowego azotu, wrzenie błonowe, jednofazowa wymuszona konwekcja.
3. Zidentyfikowanie temperatury ścianki (90 K), dla której występuje maksymalna wymiana ciepła dla rozważanej metody MNS2. Dla temperatur poniżej 90 K wymiana ciepła była kontrolowana przez wrzenie błonowe (i rosła wraz z temperaturą), powyżej 90 K wymiana

ciepła była kontrolowana przez sublimację cząsteczek zestalonego azotu (i malała wraz ze wzrostem temperatury ścianki).

4. Szybkość chłodzenia metodą MNS2 była średnio 3 krotnie wyższa niż dla krzywej wrzenia LN2.

5. Obserwacja, że w przypadku wody destylowanej front zamarzania jest stabilny i prostopadły do gradientu temperatury, natomiast w przypadku roztworu soli tworzą się charakterystyczne niestabilności na froncie zamarzania.

6. Porównanie wyników eksperymentalnych z rozwiązaniem analitycznym problemu Stefana. Wykazanie błędu na poziomie 30-40%.

7. Przeprowadzenie udanego eksperymentu witrifikacji. Witrifikacja zaszła dla próbek o wyższym stężeniu: 7 M glicerol oraz 7 M DMSO oraz dla szybkości chłodzenia 249 K/min.

8. Stworzenie modelu matematycznego zamarzania opartego na metodzie *Phase Field Method* PFM uwzględniającego fluktuacje termiczne frontu zamarzania, zmianę koncentracji roztworu soli oraz półprzepuszczalną membranę modelującą komórkę czerwonej krwinki (RBC).

9. Zdefiniowanie zmiennego w czasie warunku brzegowego modelującego szybkość chłodzenia metodą MNS2 (na podstawie dopasowania do wyników eksperymentalnych).

10. Przeprowadzenie serii obliczeń numerycznych modelujących proces wolnego zamarzania komórki RBC w celu identyfikacji warunków dla których może wystąpić niekorzystne zjawisko zamarzania wewnątrzkomórkowego. Pokazanie, że homogeniczne zamarzanie wewnątrzkomórkowe może zajść dla przechłodzenia poniżej 7.7 K.

11. Badania numeryczne nie pokazały formowania się struktur dendrytycznych na froncie zamarzania w roztworze soli otaczającej komórkę RBC.

12. Badania numeryczne nie pokazały wpływu anizotropii zamarzania na proces dehydratacji komórki RBC.

### **3. Ocena pracy**

#### **3.1. Wybór tematu rozprawy**

Problem utrwalania kriogenicznego (zamrażania) materiału biologicznego jest ważnym i aktualnym tematem w obecnych czasach. Pozwala na długoterminowe przechowywanie zarówno pojedynczych komórek jak i całych organów. Krytyczne dla udanego procesu utrwalenia termicznego (niskotemperaturowego) jest zachowanie odpowiednich warunków zamrażania, co wiąże się z wyborem odpowiedniej metody chłodzenia. Autor w swojej pracy skupia się na metodzie utrwalenia kriogenicznego opartej na natryskowym chłodzeniu



mieszaniną gazowo-ciekłego azotu wypełnionego drobnymi zestalonymi cząsteczkami azotu o rozmiarach rzędu kilku mikrometrów (metoda MNS2). Zastosowanie tej metody pozwala na intensyfikację wymiany ciepła i dzięki temu możliwe jest szybsze słodzenie niż w klasycznych metodach zanurzeniowych, w których wymiana ciepła jest kontrolowana przez wrzenie błonowe. Zastosowanie metody MNS2 może być w szczególności obiecujące do przeprowadzenia udanego procesu witrifikacji.

Identyfikacja sposobów wymiany ciepła oraz charakterystyka chłodzenia dla metody MNS2 jest ważnym zagadnieniem, gdyż może pomóc w dokładniejszym kontrolowaniu procesu zamrażania. Dodatkowo, o międzynarodowym znaczeniu przeprowadzonych badań świadczy fakt, że część eksperymentalna rozprawa doktorskiej została wykonana na Uniwersytecie Tohoku w Japonii.

Charakterystyka trybu przekazywania ciepła dla metody MNS2 jest wciąż mało poznana, dlatego wybór tematu pracy doktorskiej uważam za trafny i ważny z naukowego oraz aplikacyjnego punktu widzenia. Temat stworzył również możliwość wykazania się umiejętnościami technicznymi, badawczymi, analitycznymi oraz numerycznymi.

### 3.2. Metodologia prowadzonych badań

Warsztat badawczy Doktoranta składał się zarówno z badań doświadczalnych oraz analityczno-numerycznych. Należy podkreślić, że w trakcie realizacji pracy autor przeprowadził autorskie badania na bardzo specyficznym i kosztownym stanowisku badawczym znajdującym się na Uniwersytecie Tohoku w Japonii. Autor poprawnie zaplanował i przeprowadził badania dla szerokiego zakresu parametrów, co pozwoliło mu na uzyskanie ciekawych i ważnych wyników. Ponadto autor stworzył model matematyczny, w oparciu o metodę *Phase Field Method*, do symulacji zamrażania roztworu jednoskładnikowego wraz z uwzględnieniem dynamicznie zmieniającej się membrany, modelującej proces dehydratacji komórki czerwonej krwinki. Autor zaimplementował zaproponowany model matematyczny w środowisku OpenFOAM. Warto podkreślić, że stworzony model oraz szereg przeprowadzonych obliczeń numerycznych pozwoliły znacząco rozszerzyć wiedzę zebraną podczas eksperymentu.

Obszar badań, jako bardzo szeroki wymagał poznania i wnikliwych analiz zachodzących procesów oraz znaczącego zapoznania się z metodologią tworzenia wieloaspektowych modeli matematycznych. Podsumowując należy zauważyć, że wkład Doktoranta w rozwój metodologii badań w wybranym obszarze jest wielokierunkowy i znaczny.

### 3.3. Ocena wyników badań

Praca wyróżnia się kompleksowym podejściem do omawianego problemu. Równomiernie rozkłada akcenty na część eksperymentalną oraz teoretyczno-obliczeniową (model matematyczny oraz numeryczny). W części eksperymentalnej autor skupia się na efektywności chłodzenia metodą MSN2 oraz identyfikacją trybu wymiany ciepła. Jednak w samym eksperymencie autor nie bada próbek z materiałem biologicznym. W drugiej części, autor prezentuje model matematyczny oraz wyniki obliczeń. Mimo iż, w zaproponowanym modelu autor nie uwzględnia samego urządzenia MSN2 (rozumianego jako strumień mieszanki gazowego, ciekłego i zestalonego azotu), z sukcesem używa swoich wyników eksperymentalnych do zdefiniowania empirycznego warunku brzegowego. W konsekwencji, cały proces chłodzenia metodą MSN2 jest zredukowany do zmiennego w czasie warunku brzegowego. Model matematyczny opisujący propagację frontu zamrażania uwzględnia dodatkowo (uproszczony) model materiału biologicznego (pojedyncza czerwona krwinka, zredukowana do błony komórkowej) oraz zjawisko dehydratacji. Rozszerza to wyniki eksperymentalne autora w kierunku wstępnego badania wpływu zamrażania na materiał biologiczny i w rezultacie daje pewien wgląd w sam proces bezpiecznego zamrażania. Dodatkowo przeprowadzona analiza numeryczna może być pomocna w procesie projektowania eksperymentu z użyciem materiału biologicznego. Za najważniejsze osiągnięcia omawianej dysertacji uważam:

1. Zidentyfikowanie trzech różnych reżimów chłodzenia, występujących w chłodzeniu metodą MNS2, charakteryzującymi się znacząco różnymi szybkościami chłodzenia.
2. Zidentyfikowanie trzech różnych reżimów wymiany ciepła podczas chłodzenia metodą MNS2: wymiana ciepła poprzez sublimację bardzo drobnych cząsteczek lodowego azotu, wrzenie błonowe, jednofazowa wymuszona konwekcja.
3. Pokazanie, że szybkość chłodzenia metodą MNS2 może być średnio 3 krotnie wyższa niż w przypadku wrzenia LN2.
4. Przeprowadzenie udanego eksperymentu witrifikacji. Witrifikacja zaszła dla próbek o wyższym stężeniu: 7 M glicerol oraz 7 M DMSO oraz dla szybkości chłodzenia 249 K/min.

5. Stworzenie modelu matematycznego zamarzania opartego na metodzie *Phase Field Method* PFM uwzględniającego fluktuacje termiczne frontu zamarzania, zmianę koncentracji roztworu soli oraz proces dehydratacji komórki czerwonej krwinki (RBC).

6. Przeprowadzenie serii obliczeń numerycznych modelujących proces wolnego zamarzania komórki RBC w celu identyfikacji warunków dla których może wystąpić niekorzystne zjawisko zamarzania wewnątrzkomórkowego. Pokazanie, że homogeniczne zamarzanie wewnątrzkomórkowe może zajść dla przechłodzenia poniżej 7.7 K (dla zadanych parametrów).

7. Założenia, cele i teza dysertacji zostały zrealizowane oraz zweryfikowane na podstawie przeprowadzonego eksperymentu oraz obliczeń numerycznych.

### 3.4. Uwagi krytyczne

1. W tekście często brakuje opisu poszczególnych stałych i zmiennych w prezentowanych równaniach. Niektóre rysunki są nieczytelne, gdyż mają zbyt małą czcionkę co uniemożliwia ich dokładne analizowanie (np. rysunki 4.13, 5.10, 5.11 i inne.)
2. W części 4.2.1, opis rysu 4.2 nie jest jasny, bo nie wiadomo, czy autor odnosi się do jednego wybranego przypadku, czy do wszystkich naraz. Jeżeli do wszystkich naraz, dobrze by było przedstawić wyniki dodatkowo na jednym rysunku i znormalizowane przez odpowiadającą temperaturę  $T_{ini}$ .
3. W części 4.2.2 nie do końca wiadomo jak autor wyznaczył wartość 90 K dla punktu POS. Czy wartość 90 K dla wszystkich przypadków została wyznaczona "na oko" ? Jeżeli tak to może to w znacznym stopniu wpływać na dalsze wnioski. Należało by wyznaczyć tą wartość w oparciu o narzędzia matematyczne i/lub statystyczne. Jest to uzasadnione tym bardziej, iż widać, że punkt POS ma tendencję do przesuwania się w prawo wraz ze wzrostem  $T_{ini}$  (z zastrzeżeniem, że wybranie jako POS punktu pomiarowego o maksymalnej wartości Heat flux nie będzie odpowiednie w tym przypadku.)
4. Nie jest wiadome, czy przytaczana prędkość  $u_m = 78.66$  m/s odnosi się do prędkości kryształków lodu, czy średniej prędkości mieszaniny? Prędkości te mogą być różne, a kryształki lodu mogą poruszać się szybciej niż faza gazowa i/lub ciekła ?
5. Autor korzysta z uproszczonej wersji korelacji 4.2, którą chwilę wcześniej krytykuje jako nieodpowiednią do warunków panujących w eksperymencie. Nie jest to do końca jasne.

6. Wydaje się, że korelacja 4.3 była by bardziej dokładna gdyby uwzględnić w niej jako parametr także  $T_{ini}$ .
7. Używanie tysięcznych części dla stałej oraz dziesięciotysięcznych części w wykładniku we wzorze 4.4 jest nieuzasadnione, gdyż praktycznie nie wpływa to na wyniki tej korelacji w badanym zakresie temperatur.
8. Uwaga 7. odnosi się także do wzorów z tabeli 4.2.
9. Konkluzja ze strony 66 „... Data shows tendency of heat transfer coefficient to be strongly dependent on wall temperature. ...” nie pokrywa się w wynikami z rysunku 4.10, gdzie wyraźnie widać, że na lewo od POS współczynnik *Heat flux* słabiej zależy od temperatury niż na prawo od POS, a dla  $T_{ini} = 373$  jest nawet w przybliżeniu stały z temperaturą.
10. Opis w ostatnim paragrafie podrozdziału 4.2.3 nie jest do końca jasny. W szczególności, nie jest jasne do czego odnosi się zakres 249-911 W/m<sup>2</sup>K.
11. W części 4.2.4, jako jeden z głównych wniosków jest napisane, że strumień ciepła ma charakter funkcji potęgowej. Czy były sprawdzane inne możliwe korelacje? Czy dla nich parametr R<sup>2</sup> był większy/mniejszy od dobranych funkcji potęgowych ?
12. Na rysunku 4.13 przedstawiona jest propagacja frontu zamarzania dla wody oraz wodnego roztworu soli. Rysunki przedstawiają wyniki dla różnych czasów: 26.877 sek dla wody oraz 15.3 sek dla roztworu oraz sugerują, że dla tych czasów, front zamarzliny jest w tej samej lokalizacji dla obu próbek. Czy oznacza to, że proces zamarzania jest szybszy w przypadku wodnego roztworu soli? Z tekstu wynika, że jest odwrotnie. Nie zgadza się to także z wynikami z rysunku 4.12 na którym widać iż prędkość zamarzania jest bardzo podobna do czasu około 30 sekund.
13. Rysunek 4.12, jak wytłumaczyć, że prędkość zamarzania dla obu badanych próbek jest podobna, a spowolnienie zamarzania dla roztworu soli jest widoczne dopiero po 30 sek ?
14. Na rysunku 4.14 przedstawiony jest proces zamarzania próbek roztworu gliceryny 3M i 5M. W tekście napisane jest, że zbiornik pomiarowy był wypełniony w 70%. Jest to widoczne na rysunku dla roztworu 3M, lecz nie dla 5M. Czy w przypadku roztworu 5M zbiornik był wypełniony w 100% ? Jeżeli tak to porównanie tych dwóch przypadków może być nieuzasadnione.
15. W części 5.3 autor przedstawia równania definiujące problem Stefana, równania 5.1 do 5.8. Pisze że mają one nieliniowy charakter, co jest niezgodne z przedstawionymi równaniami, które są liniowe. Gdzie jest ta nieliniowość, o której wspomina autor ?

16. Wzór 5.12 jest najprawdopodobniej błędnie przytoczony. Jakie są wartości stałych  $A_2$  oraz  $A_4$ , i co one oznaczają ?
17. We wzorze 5.13 jest błąd, z takiego wzoru nie da się przejść do 5.14.
18. Jakie jest źródło wartości 1.364 dla stałej we wzorach 5.18 oraz 5.19 ?
19. Użycie we wzorze 5.25 tych samych symboli ( $g$   $g(teta)$ ) do oznaczenia całkowicie różnych zmiennych, czyni go bardzo nieczytelny.
20. We wzorze 5.41 jest błąd. W pierwszym wyrazie powinno być:  $(1-f_{ave1})$  lub  $f_{ave2}$ .
21. Nigdzie nie jest wyjaśnione co oznaczają wielkości widoczne na rysunku 5.11d (CPFM oraz  $\delta = 0.1$ ). Czy porównanie wyniku widocznego na rysunku 5.11d z eksperymentem jest dla tego samego kroku czasowego ?
22. Autor nigdzie nie opisał sposobu numerycznej implementacji zaproponowanego modelu matematycznego. Czy był to schemat jawny, nie jawny, rząd dyskretyzacji itd.
23. Dane początkowe do symulacji przedstawione w tabeli 6.2 nie zgadzają się z opisem w tekście. Jakie dane zostały użyte w symulacjach ?
24. Przeprowadzanie symulacji dla różnych wartości  $B$  (tabela 6.2) wydaje się nieuzasadnione, gdyż dla tak krótkich czasów symulacji dla  $B = 1200$  K/min, wartość temperatury na ściance zmniejszy się o mniej niż 0.5K. Proszę o komentarz w tej kwestii, wydaje się, że dla  $B = 0$ , wyniki byłyby bardzo zbliżone.
25. Nie jest jasne jakie było kryterium zatrzymania symulacji z rysunków 6.2 i 6.7 ? Czy system osiągnął stan równowagi ?
26. Na wynikach przedstawionych na rysunkach 6.3 oraz 6.8 nie widać aby zmieniała się koncentracja soli w komórce. Podczas procesu dehydratacji (zmniejszania się komórki) stężenie powinno w komórce rosnać.

### 3.5. Uwagi redakcyjne

Praca została napisana w języku angielskim. W pracy występują błędy językowe, jednak nie wpływają one znacząco na zrozumienie treści pracy. Mogą one utrudniać poprawne zrozumienie pracy dla osób posługujących się tylko językiem angielskim (w niektórych miejscach autor stosuje kalki językowe z języka polskiego). Ponadto kilka rysunków jest nieczytelnych ze względu na zbyt małą czcionkę użytą do ich opisu. Autor często nie tłumaczy w tekście znaczenia symboli w przytaczanych wzorach.



#### 4. Podsumowanie

Biorąc pod uwagę przedstawione wyżej opinie uwzględniające wybór tematu rozprawy, sposób jego analizowania, osiągnięte wyniki i zastosowane metody badawcze, stwierdzam, że Pan mgr inż. Przemysław Smakulski wykazał, że jest naukowcem dojrzałym, o dużym doświadczeniu badawczym. Stwierdzam także, że posiadana wiedza oraz umiejętności pozwalają mu na prowadzenie badań w dziedzinie nauk technicznych w dyscyplinie budowa i eksploatacja maszyn, dlatego też spełnia warunki do ubiegania się o stopień doktora nauk technicznych.

Wnoszę, zgodnie z Ustawą o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z 14. 03. 2003 r., o dopuszczenie Pana mgr inż. Przemysława Smakulskiego do obrony pracy i nadanie stopnia doktora nauk technicznych.

Dr hab. inż. Ziemowit MALECHA

