

Российский химико-технологический университет им. Д. И. Менделеева

На правах рукописи

Сафаров Руслан Рафиг оглы

**МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПОЛОВОЛОКОННОГО
МЕМБРАННОГО БИОРЕАКТОРА ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК
МЛЕКОПИТАЮЩИХ**

05.17.08 – Процессы и аппараты химической технологии

Диссертация на соискание ученой степени кандидата технических наук

Научный руководитель

доктор технических наук,
профессор
Н.В. Меньшутина

Москва - 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	5
Литературный обзор	11
1.1. Биореакторы для культивирования клеток млекопитающих	11
1.1.1 Биореакторы для суспензионных культур клеток	14
1.1.2 Биореакторы для адгезивных культур клеток.....	18
1.1.3 Мембранные биореакторы для адгезивных культур клеток	25
1.2 Математическое моделирование биореакторов.....	29
1.2.1 Особенности построения математических моделей в биореакторах	29
1.2.2 Кинетические модели популяции клеток млекопитающих.....	30
1.2.3 Примеры моделирования кинетики популяций клеток млекопитающих ..	41
1.2.4 Особенности моделирования роста клеток на подложках.....	43
1.2.5 Некоторые аспекты моделирования гидродинамики и тепломассообмена в биореакторах для культивирования клеток млекопитающих	53
1.3 Использование вычислительной гидродинамики (CFD) для моделирования биотехнологических процессов	57
2.1 Особенности роста культуры клеток Chinese Hamster Ovary в половолоконном биореакторе.....	63
2.2 Исследование пористости половолоконной мембраны	67
2.3 Экспериментальные исследования по изучению кинетики роста клеток СНО	68
2.3.1 Методика культивирования клеток в чашках Петри.....	70
2.3.2 Методика определения концентрации глюкозы в питательной среде	73
2.3.3 Результаты экспериментов культивирования клеток СНО в чашках Петри	76

2.4 Технологическая схема для культивирования клеток СНО в половолоконном мембранном биореакторе	78
3 Математическая модель для расчета гидродинамики половолоконного биореактора.....	88
3.1 Этапы моделирования в рамках вычислительной гидродинамики	88
3.2 Математическая модель гидродинамики потоков и массообмена в половолоконном мембранном биореакторе	92
3.3 Построение электронной геометрической модели половолоконного мембранного биореактора	96
3.4 Построение расчётной сетки.....	99
3.5 Численные методы решения дифференциальных уравнений	105
4 Моделирование гидродинамики и массообмена в половолоконном мембранном биореакторе (20 волокон).....	109
4.1 Обработка экспериментальных данных по кинетике роста клеток СНО в чашках Петри.....	109
4.1.1 Моделирование кинетики роста клеток СНО	109
4.1.2 Расчет скоростей потребления глюкозы и выделения метаболитов	114
4.2 Моделирование внутриволоконного пространства биореактора.....	119
4.2.1 Расчет коэффициента проницаемости мембранного волокна.....	119
4.2.2 Расчет объемного расхода питательной среды, потребляемого клетками	121
4.2.3 Выбор режима подачи питательной среды во внутриволоконное пространство	130
4.2.4 Сравнение энергоэффективности предложенных режимов подачи питательной среды	140
4.3 Моделирование межволоконного пространства биореактора.....	145

4.3.1 Расчет необходимой скорости потока.....	145
4.3.2 Оценка гидродинамического режима течения среды	146
4.3.4 Расчет распределения потоков в межтрубном пространстве биореакторе	149
4.4 Сопоставление расчетных и экспериментальных данных для проверки адекватности разработанной модели для половолоконного мембранного биореактора.....	153
5 Моделирование гидродинамики и массообмена в половолоконном мембранном биореакторе: масштабирование процесса (60 волокон).....	157
5.1 Результаты расчета количества клеток и времени культивирования.....	157
5.2 Результаты расчета гидродинамики и массообмена во внутриволоконном пространстве биореактора.....	158
5.3 Результаты расчета гидродинамики и массообмена в межволоконном пространстве биореактора.....	163
Выводы	169
Список литературы	170

Введение

В настоящее время вопросам совершенствованию аппаратного оформления химико-технологических и биотехнологических процессов придается большое значение. Большое внимание уделяется созданию эффективных технологических схем и производств на основе использования новых современных машин и аппаратов. Одним из таких современных аппаратов является мембранный биореактор, использование которого позволяет проводить химические, фармацевтические и биологические продукты, поэтому актуальным является исследование гидродинамики, тепло- и массообменных процессов, протекающих в нем. Применение полуволоконного мембранного биореактора позволяет достичь высокой плотности клеток и высокой объемной производительности при отсутствии сильного гидродинамического воздействия на клетки.

Использование математического моделирования для исследований биотехнологических микрообъектов позволяет анализировать и прогнозировать характеристики химико-биологических систем для получения представления о процессах и явлениях, происходящих внутри аппарата. Кроме того, актуальной задачей является построение электронной модели, которую легко модернизировать под задачи масштабирования реактора и под разные типы клеток млекопитающих, а также минимизировать затраты на использование питательной среды и энергосбережение.

В первой главе проведен анализ научно-технической литературы. Рассмотрены различные типы биореакторов, используемые для культивирования суспензионного и адгезивного типов клеток млекопитающих. Особое внимание уделено мембранным биореакторам, одному из наиболее перспективных типов оборудования. Рассмотрены особенности построения математических моделей в биореакторах, включая кинетические модели популяции клеток, аспекты гидродинамики и тепломассообмена. В последней части обзора приведены примеры использования вычислительной гидродинамики (CFD) для

моделирования биотехнологических процессов. На основании литературного обзора сформулированы задачи диссертационной работы и предложена стратегия их решения.

Во второй главе представлены экспериментальные и аналитические исследования роста культуры клеток Chinese Hamster Ovary (CHO) в чашках Петри. Приведены исследования пористости половолоконной мембраны методом сканирующей электронной микроскопии, выполненные в Центре коллективного пользования университета. Кроме того, была разработана технологическая схема, на основе которой была собрана экспериментальная установка для культивирования клеток CHO в половолоконном мембранном биореакторе. Экспериментальные исследования были выполнены в ФГБУН Институте биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН.

Третья глава посвящена разработке математической модели гидродинамики потоков питательной среды в половолоконном биореакторе. Рассмотрены этапы математического моделирования аппарата. Приведены основные уравнения математического описания для расчета гидродинамики потоков внутриволоконного и межволоконного пространств половолоконного биореактора. Особое внимание уделено построению расчетной сетки аппарата, от чего зависит время сходимости каждой итерации и точность решения. В качестве метода решения был выбран метод конечных объемов. Построена электронная модель биореактора.

В четвертой главе рассматривается моделирование гидродинамики и массообмена в половолоконном мембранном биореакторе, содержащем 20 волокон. На основе подобранных кинетических зависимостей для клеток CHO рассчитано необходимое количество питательных веществ, приходящихся на одну клетку. На основе монослойного заполнения клетками волокон мембраны был проанализирован коэффициент проницаемости мембраны в зависимости от заполнения клетками поверхности волокна. Проведено моделирование внутриволоконного пространства биореактора и расчет расхода питательной среды, необходимого для обеспечения питания клеток. Рассмотрены три режима

подачи субстрата (максимальный неизменный расход, ступенчатая подача среды и схема посуточного изменения расхода среды), и рассчитано энергопотребление установки для каждого из вариантов. Наиболее оптимальным с точки зрения энергии явился третий вариант с посуточным изменением расхода среды. Был определен необходимый расход питательной среды на вход в межволоконное пространство, исходя из заполненности волокон клетками в течение процесса культивирования. На основании расчетов был выбран прямоточный режим подачи среды в межволоконное пространство относительно подачи среды внутрь волокон.

В пятой главе приведены результаты моделирования половолоконного мембранного биореактора большего размера с 60-ю волокнами. Были проведены расчеты для внутриволоконного и межволоконного пространств, и на основе методики расчета, предложенной в главе 4, были определены необходимые расходы подачи питательной среды.

Целью диссертационной работы является математическое моделирование половолоконного мембранного биореактора для культивирования клеток млекопитающих.

Для достижения заданной цели поставлены следующие научно-технические задачи:

1. Проведение экспериментальных исследований культивирования клеток млекопитающих на примере культуры клеток Chinese Hamster Ovary (CHO) в половолоконном биореакторе и моделирование кинетических зависимостей.
2. Анализ возможности использования вычислительной гидродинамики (CFD) для расчета гидродинамики потоков в мембранных биореакторах. Выбор геометрии сетки для оптимизации времени расчетов и точности решения.
3. Математическое моделирование гидродинамики потоков в половолоконном мембранном биореакторе при помощи CFD (20 волокон).
4. Проведение вычислительного эксперимента по модели с целью определения оптимального способа подачи питательной среды во внутриволоконное пространство (ВП) и его выбор на основе оценки энергоэффективности процесса.

5. Анализ возможности противоточного и прямоточного режимов подачи питательной среды в межволоконное пространство (МП).
6. Создание технологической схемы процесса культивирования клеток в мембранном биореакторе.
7. Проведение масштабирования процесса в большем по размеру половолоконном биореакторе (60 волокон).

Научная новизна:

Разработана математическая модель половолоконного мембранного биореактора, позволяющая исследовать гидродинамику движения жидкости во внутриволоконном и межволоконном пространствах, процесс микрофльтрации через мембрану с учетом увеличения числа клеток на ее поверхности. Получены эпюры распределения скоростей и давления в каждой точке аппарата. Доказана применимость модели Ферхюльста для расчета кинетики роста клеток СНО, которая была использована для описания процессов массопереноса в биореакторе.

Исследованы разные способы подачи питательной среды во внутриволоконное и межволоконное пространства биореактора. Предложены прямоточный способ подачи питательной среды в межволоконное пространство и экспоненциальная зависимость подачи питательной среды во внутриволоконное пространство.

Проведен выбор геометрии сетки для оптимизации времени расчетов. Доказана применимость и масштабируемость модели половолоконных мембранных биореакторов с различным количеством волокон.

Создана электронная модель, в которой возможна визуализация процессов гидродинамики, массопереноса и кинетики роста клеток на мембране в реакторе.

Практическая значимость:

Разработана программа расчета половолоконного мембранного биореактора для культивирования клеток млекопитающих, позволяющая исследовать режимы работы, выбрать наиболее оптимальный с учетом энергозатрат. Разработанная программа может быть использована как в проектных и научных организациях, так и в университетах для обучения магистров.

Для культуры клеток СНО подобран оптимальный режим работы биореакторов половолоконного типа различного масштаба с использованием расчётов по математической модели. Оценена энергоэффективность при различных способах подачи питательной среды во ВП. Проведен анализ способа подачи питательной среды в МП половолоконного биореактора.

Создана технологическая схема процесса культивирования клеток млекопитающих в половолоконном мембранном биореакторе и собрана лабораторная установка, позволяющая соблюдать требуемые условия культивирования, с учетом экономии питательной среды.

Методология и методы исследования:

Для достижения целей диссертационной работы были использованы: методики по определению кинетики роста клеток СНО и концентрации основных компонентов культуральной жидкости; метод сканирующей электронной микроскопии для определения пористости половолоконных мембран; метод математического моделирования с использованием механики сплошных сред; метод конечных объемов; методы и инструменты графического и численного анализа полученных результатов, включающие графическое представление полей векторов и построение профилей различных характеристик потока на произвольных поверхностях.

На защиту выносятся:

- Экспериментальные исследования кинетики роста клеток СНО и математическое описание кинетики с использованием модели Ферхюльста.
- Математические модели гидродинамики потоков питательной среды в половолоконном мембранном биореакторе, являющиеся основой моделирования движения жидкости во внутриволоконном и межволоконном пространствах биореактора.
- Вычислительный эксперимент и результаты математического моделирования для биореактора с 20-ю половолоконными мембранами: визуализация гидродинамической обстановки в половолоконном биореакторе на

разных этапах культивирования; анализ способов подачи питательной среды во ВП и сравнение их энергоэффективности; рекомендации по способу подачи потока питательной среды в МП относительно потока во ВП; зависимости изменения расхода питательной среды в полуволоконном биореакторе и численные рекомендации по объемным расходам для биореакторов различного масштаба.

- Масштабирование процесса культивирования клеток млекопитающих.
- Технологическая схема и экспериментальная лабораторная установка для культивирования клеток млекопитающих в полуволоконном биореакторе.

Обоснованность и достоверность полученных результатов:

Применена процедура итеративной адаптации расчетной сетки, позволяющая добиться независимости решения системы уравнений математической модели численными методами от топологии и структуры расчетной сетки. Проведена проверка адекватности разработанной математической модели с использованием лабораторных исследований, включающих в себя современные средства аналитического измерения параметров экспериментальных исследований (ВЭЖХ, автоматический счетчик плотности клеточной культуры, сканирующая электронная микроскопия), высокоточные датчики регистрации основных показателей процесса культивирования (концентрации растворенного кислорода, CO_2 , температуры, pH).

Апробация:

Результаты исследований представлены на различных Международных и Всероссийских научных конференциях, среди которых Международная научно-практическая конференция «Биотехнология и качество жизни» (Москва, 2014г.), Международная научно-практическая конференция «Биотехнологии в комплексном развитии» (Москва, 2016г.), 10, 11 Международные конгрессы молодых ученых по химии и химической технологии (Москва, 2014 г., 2015г.), 21 Международный конгресс химико-технологических процессов CHISA (Прага, Чехия, 2014), 10 Европейский конгресс по химической технологии и прикладной биотехнологии (Ницца, Франция, 2015г.).

Литературный обзор

1.1. Биореакторы для культивирования клеток млекопитающих

Центральным элементом биотехнологического процесса является биореактор. Развитие современной науки и техники позволяет использовать практически уникальное устройство для каждого биотехнологического производства или исследования. В большинстве случаев от конструкции биореактора зависит техническое и экономическое исполнение процесса. Биореактор представляет собой емкость, в которой осуществляется биологическая реакция или превращение. Его основная функция – обеспечение оптимальных внешних условий для достижения максимальной эффективности процесса в биологической системе.

Биореакторы можно классифицировать [1 - 8]:

- по принципу работы - реакторы периодического, полунепрерывного и непрерывного действия;
- по гидродинамическому режиму реакторы идеального перемешивания, реакторы идеального вытеснения, реакторы с промежуточным гидродинамическим режимом;
- по наличию стерильности - стерильные и нестерильные реакторы;
- по конструкционным особенностям – реакторы емкостного, колонного, трубчатого, пленочного, мембранного типов, реакторы с псевдоожиженным слоем;
- по способу подвода энергии и аэрации в аппарате - реакторы с вводом энергии в газовую фазу (барботажные, эрлифтные и барботажно-эрлифтные), с вводом энергии в жидкую фазу (с циркуляционным перемешиванием, с самовсасывающей турбиной и с эжекционной системой) и с комбинированным вводом энергии (реакторы с механическим перемешиванием и барботажем, с роторным перемешиванием и аэрацией и барботажные с циркуляционным перемешиванием).

Что касается клеток млекопитающих, которым уделяется в настоящее время огромное внимание [9 - 12], то они во многом отличаются от клеток других микроорганизмов: скорость роста таких клеток ниже, они обладают большей чувствительностью к механическим повреждениям и пузырькам воздуха, поэтому к биореакторам для их культивирования предъявляют особые требования по конструкционному исполнению, так как системы перемешивания и аэрации во время работы не должны создавать стрессовых условий для культуры [4, 5, 13, 14]. В работе [5] предложена следующая классификация биореакторов для культивирования клеток млекопитающих (рисунок 1.1) на основе принципа ввода энергии: все реакторы были разделены на реакторы, находящиеся в статическом (без движения) и динамическом режимах.



Рисунок 1.1 - Классификация биореакторов для культивирования клеток млекопитающих

Стоит отметить, что культивирование в статическом режиме чаще всего протекает на этапах исследовательских работ в лабораторных условиях. Лабораторные биореакторы имеют объем от 0,1 до 10 литров и применяются для разработки новых способов получения биотехнологической продукции и

проведения медико-биологических научных исследований в области клеточных технологий, стимулирования регенерации органов и тканей млекопитающих, в том числе, человека.

Для культивирования в динамическом режиме исследователи стремятся к обеспечению гомогенного режима перемешивания, чтобы избежать градиентов температуры и pH, повышенных концентраций субстрата и продуктов в застойных зонах реактора [5]. В реакторах смешения перемешивание чаще всего осуществляется большими лопастными мешалками при низких скоростях, что позволяет избегать механических повреждений клеток.

Кроме того, используются виброперемешивание, приводы с эксцентриками, пневматическое (воздушное) перемешивание в эрлифтных реакторах или гидравлическое перемешивание с помощью внешних насосов в реакторах с взвешенной твердой фазой (микроносителями) (fluidized bed reactors). С целью уменьшения или предотвращения пенообразования и повреждения клеток пузырьками воздуха можно уменьшить объем подаваемой газовой смеси при использовании, например, поверхностной продувки или безпузырьковой аэрации через полупроницаемые мембраны. При сокращении объема подаваемого газа концентрация кислорода в нем должна быть выше. Оптимальное снабжение кислородом, азотом, воздухом и углекислым газом обеспечивается при помощи систем перемешивания газов.

Для культивирования клеток млекопитающих используются биореакторы периодического (batch), периодического с подпиткой (feed-batch) или непрерывного (continuous) действия с задержанием биомассы или без. Проведение процесса культивирования в периодическом режиме осуществляется без добавления питательного субстрата после посева культуры в реактор. Продуктивность процесса обычно лимитируется недостатком субстрата и накоплением продуктов метаболизма, которые могут быть токсичными для клеток. Организация периодического режима с подпиткой позволяет частично избежать этих проблем. Добавление субстрата происходит периодически определенными порциями, либо непрерывно. Непрерывное культивирование проводят при

постоянном добавлении питательной среды и одновременном удалении продуктов метаболизма, ингибирующих рост клеток. В связи с низкой скоростью роста клеток млекопитающих чаще используют так называемый непрерывный процесс культивирования с задержанием клеток (перфузионная система). Для задержания биомассы и предотвращения ее уноса с удаляемыми объемами культуральной жидкости используют различные системы фильтрации, например, роторные или вращающиеся фильтры, полупроницаемые мембраны [5, 13 - 18].

Различают суспензионные и адгезивные культуры клеток млекопитающих. К суспензионным относятся культуры клеток, растущих во взвешенной среде в неприкрепленном состоянии, например, культуры гибридом. Адгезивные культуры клеток растут, только будучи прикрепленными к какой-либо поверхности (подложка, носитель) за счет сил адгезии, например, клетки почки человека НЕК 293. Адгезивные клетки растут на поверхностях из различного материала: стекла, целлюлозы, коллагена, желатина или пластика. Если поверхность пористая, то клетки могут расти в порах, тем самым меньше подвергаясь механическим воздействиям, что позволяет использовать более жесткие режимы по перемешиванию и аэрации. Существуют клетки, растущие как во взвешенной среде, так и на подложке, например, культура клеток яичников китайского хомячка СНО (Chinese Hamster Ovary).

1.1.1 Биореакторы для суспензионных культур клеток

Для культивирования суспензионной клеточной культуры чаще всего используются биореакторы смешения или эрлифтные. Увеличение клеточной массы достигается за счет увеличения объема реактора. Биореактор смешения обычно оснащен низкоскоростной лопастной мешалкой для минимизации стресса при перемешивании (рисунок 1.2, 1.3) [17, 19, 20].

С целью снижения риска механического повреждения клеток для аэрации используют барботеры, систему поверхностной аэрации или беспузырьковую аэрацию через полупроницаемые мембраны. В эрлифтных реакторах

перемешивание осуществляется потоком воздуха, а не лопастью мешалки, обеспечивая эффективный массоперенос (рисунок 1.4) [21].

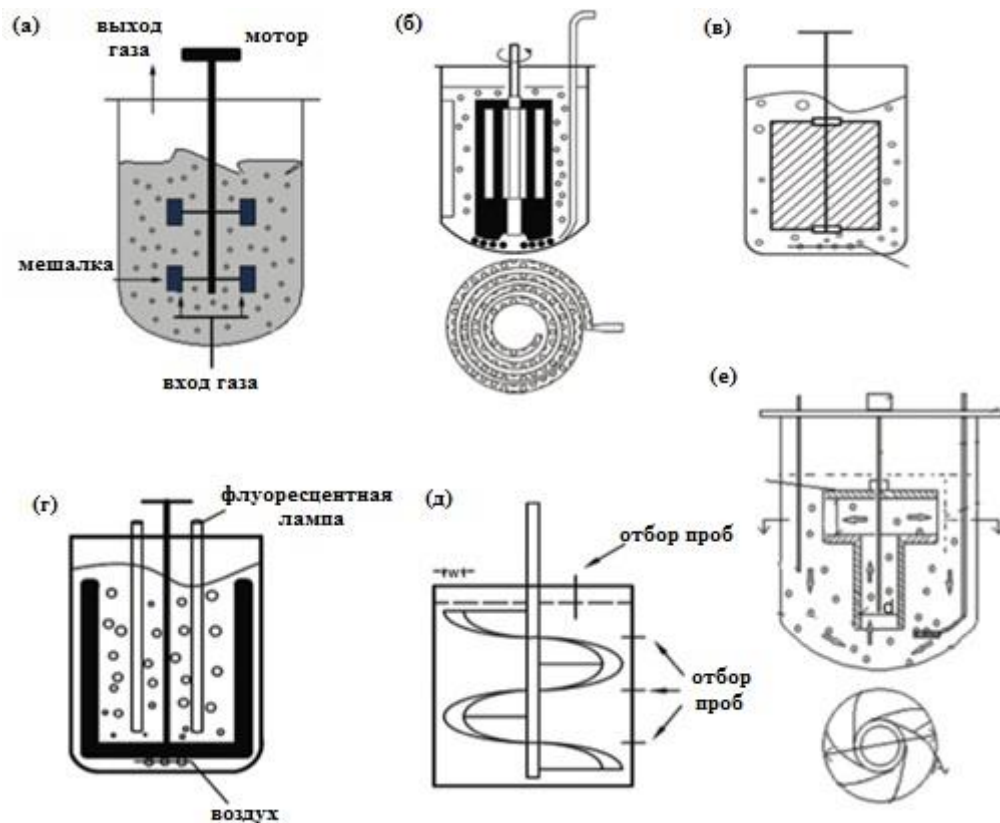


Рисунок 1.2 - Схематичное изображение биореакторов смешения с разными типами перемешивающих устройств: (а) с турбинной мешалкой; (б) со спиральным разбрызгивателем; (в) с мешалкой-плоскостью; (г) с внутренним освещением; (д) с винтовой мешалкой; (е) с мешалкой-центрифугой

Для контроля за циркуляцией жидкости можно установить центральную трубу для направления потока пузырьков по центру. Распределение газа осуществляется с помощью перфорированных, пористых или гидрофобных трубок, а также путем системы беспузырьковой аэрации.

Одним из распространенных видов биореакторов для суспензионных культур являются волновые биореакторы. Конструкция данных биореакторов представляет собой металлический или пластиковый корпус с одноразовым пакетом, в которых находится питательная среда и культивируемые клетки [22].

Корпус биореактора расположен на платформе, которая посредством качающих движений вызывает волновое движение жидкости с культурой клеток (рисунок 1.5). Эти волны обеспечивают перемешивание и перенос кислорода, в результате создавая идеальную среду для роста клеток, легко поддерживающую более 10×10^6 клеток/мл.



а



б

Рисунок 1.3- Биореакторы смешения: (а) установка лабораторного и полупромышленного масштаба LP351 (компания Bioengineering AG, Швейцария), (б) установка лабораторного и полупромышленного масштаба BIOSTAT® Cplus со стерилизацией на месте (компания Sartorius AG, Германия)

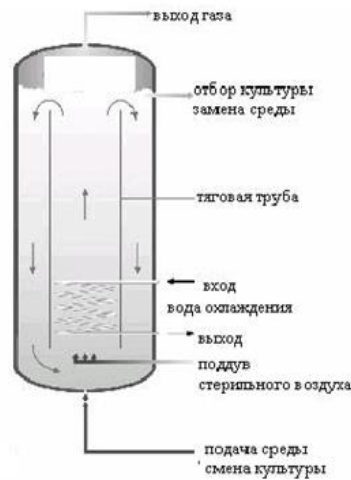
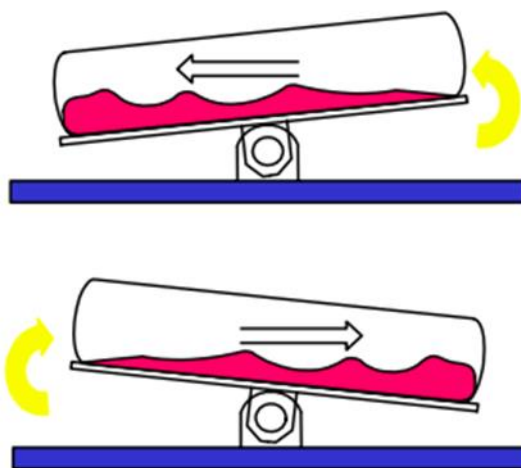


Рисунок 1.4 - Схема эрлифтного биореактора для выращивания суспензионных культур клеток



а



б

Рисунок 1.5 - Волновой биореактор: (а) схема процесса культивирования, (б) волновой биореактор 20/50с одноразовым мешком (компания GE Healthcare Life Sciences, США) [22]

В последнее время для биофармацевтического производства с суспензионными культурами актуально использование одноразовых технологий. На рисунке 1.6 приведен одноразовый биореактор с орбитальным перемешиванием CultiBag® ORB с рабочим объемом от 10 до 2500 л, применяемый в полупромышленном и промышленном масштабах (компания Sartorius, Германия) [20]. Наличие орбитального перемешивания обеспечивает хороший массоперенос

по кислороду за счет поверхностной аэрации и эффективного перемешивания. Данная технология упрощает масштабирование процесса культивирования, начиная от колбы-качалки и заканчивая промышленным биореактором.

1.1.2 Биореакторы для адгезивных культур клеток

При культивировании адгезивных культур клеток производительность биореактора значительным образом зависит от площади поверхности подложки, на которой растут клетки. К оборудованию такого типа относят:



Рисунок 1.6 - Одноразовый биореактор с орбитальным перемешиванием CultiBag® ORB (компании Sartorius, Германия)

- чашки Петри;
- роллерные установки, в которых выращивание клеток проводится на внутренней поверхности вращающихся цилиндров – роллеров (рисунок 1.7);
- биореакторы на основе многослойных культуральных флаконов (матрасы) (рисунок 1.8);
- биореакторы, в которых культивирование клеток осуществляется на поверхности микроносителей различной формы, чаще всего сферических или

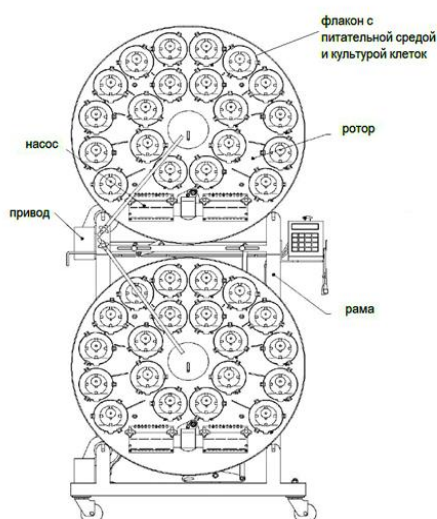
макропористых частиц, находящихся во взвешенном или закрепленном состоянии в емкости реактора с питательной средой;

- мембранных биореакторах, где в качестве подложки могут быть использованы полупроницаемые мембраны.

Роллерные установки – это аппараты, в которых клетки выращиваются в цилиндрических сосудах - бутылках, обычно из боросиликатного стекла, с небольшим количеством питательной среды. Бутылки вращаются в горизонтальном положении с небольшой скоростью (около 12 оборотов/мин). При этом обеспечивается постоянное перемешивание питательной среды и интенсивный рост клеток. С целью увеличения эффективности роста клеток роллерные установки снабжены системой для замены питательной среды и удаления продуктов метаболизма без остановки вращения.

На рисунке 1.7 приведен пример автоматической системы культивирования клеток в роллерных бутылках RollerCell (группа компаний «БИОТЕХНО», Россия) [21], которая может быть использована в научно-исследовательских лабораториях, так и для крупномасштабного промышленного производства, например, для получения человеческих и животных вакцин, «чистых клеток» для ферментации и факторов роста для различных терапевтических применений.

В систему RollerCell входят 200 стандартных роллерных бутылей, прошедших предварительную стерилизацию гамма-излучением. Наличие круговых складок на боковой стенке бутылей позволяет создать дополнительную поверхность. Ротор может вращаться в две стороны со скоростью от 0,1 до 12 оборотов в минуту, что обеспечивает равномерное обеспечение клеток питательными веществами.



а



б

Рисунок 1.7 - Роллерный биореактор для культивирования адгезивных клеточных культур: (а) схема, (б) система роллерного культивирования RollerCell 40, группа компаний «БИОТЕХНО»



Рисунок 1.8 - Флакон культуральный 5-ти уровневый, компания NEST Scientific, США [23]

Биореакторы, в которых культивирование клеток осуществляется на поверхности микроносителей различной формы, находящихся во взвешенном или закрепленном состоянии в емкости реактора с питательной средой в настоящее время достаточно широко используются в биофармацевтической промышленности. Изначально метод культивирования, сочетающий элементы монослойного (пленочного) и суспензионного выращивания клеток, названный методом "микроносителей" был предложен в 1967 г. [24]. Согласно этому методу, клетки прикрепляются и размножаются на поверхности полимерных шариков-частиц - "микроносителей" (МН), которые находятся в суспензионном

биореакторе, оснащенном перемешивающим устройством, например, мешалкой. Исследования были сделаны для фибробластов, полученных из эмбриональных клеток кролика (H-cells) и для человеческих диплоидных клеток легкого (HEL-cells). Была достигнута примерно такая же удельная максимальная скорость роста клеток на микроносителях, как и в монослое, но конечная концентрация клеток была выше.

Этот метод дал толчок развитию технологии выращивания различных клеток на микроносителях. Например, в [25] был получен микроноситель из декстрана, который может быть заряжен положительно или отрицательно, что влияет на его адгезионные свойства. Микроноситель, покрытый слоем магнитного материала, был предложен в [26]. Многочисленные исследования возможности выращивания различных клеток на различных микроносителях подтвердили, что данный метод является достаточно перспективным [27]. Одним из направлений стало получение макропористых микроносителей, содержащих поры размеров до 30 мкм, что позволило выращивать клетки не только на поверхности, но и внутри пор, тем самым увеличивая конечную концентрацию клеток [28].

Одна частица микроносителя в среднем имеет диаметр от 100 до 250 мкм, так что на ней может поместиться не менее 300 клеток, максимально свыше 600 клеток. Другими словами, в 1 мл среды можно суспензировать до нескольких тысяч частиц микроносителя, общей площадью до 50 см²/мл. Поскольку большинство клеток млекопитающих обладают небольшим отрицательным зарядом, микроносителям могут придавать слабый положительный заряд до 1.5-1.8 МЭКВ/г для улучшения адгезии. В зависимости от вида адгезивных клеток и цели культивирования могут использоваться как микроносители с гладкой поверхностью, так и содержащие макропоры. Огромное значение уделяется подбору материалов для их изготовления, исключающих токсичность для клеток, незначительное впитывание компонентов среды, возможность повторного использования (т.е. их стерилизация). Кроме того, свойство универсальности дает возможность использовать один тип микроносителей для культивирования различных клеток [29, 30].

Среди материалов, используемых для выращивания клеток млекопитающих, стоит упомянуть микроносители из поперечно-сшитых декстрана, агарозы, поливинилпиролидона, полиакрилонитрита, а также пористого силикагеля, полистирола, капрона, нейлона, алюмосиликата и т.д. [29, 30].

Адгезивные клетки могут расти как монослоем (2D) на непористых подложках (например, на микроносителях Cytodex 1 и 3, компания GE Healthcare's, США) или в иммобилизованном виде (3D) на макропористых подложках (например, на Cytopore 2 от GE Healthcare или Cultisphere S от Sartorius Stedium, Германия) [31]. Для роста монослоем был получен хороший выход для мезенхимальных [32, 33] и панкреатических [34] стволовых клеток.

Культуры клеток, растущих в 3D виде, иммобилизованы в макропоры подложки и оказываются более защищенными от сдвиговых напряжений при худшем обеспечении питательными веществами и кислородом. Такие системы успешно использовались как для получения и дифференцирования эмбриональных стволовых клеток мышей [35, 36], так и для размножения человеческих мезинхимальных стволовых клеток [37].

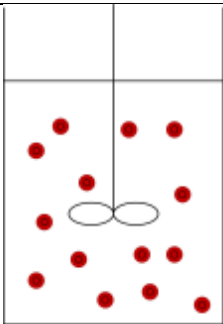
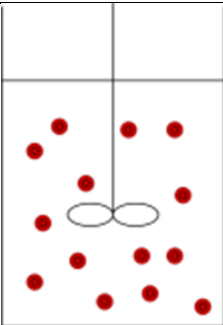
В качестве примера на рисунке 1.9 приведен биореактор с жестко закрепленными микроносителями BioFlo® 510 компании New Brunswick Scientific [38]. Рабочий объем допускается: 15.6 и 32.0 литров.

В таблице 1.1 собраны и приведены схемы различных конструкций биореакторов, используемых для выращивания клеток млекопитающих и человека [5, 39-45].

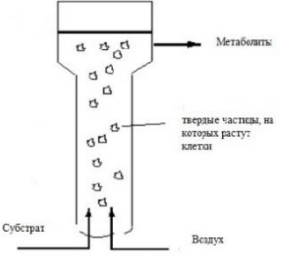
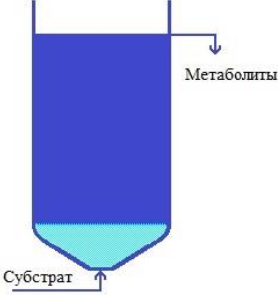
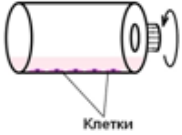
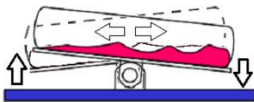
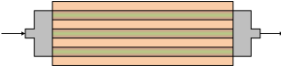


Рисунок 1.9 - Биореактор с жестко закрепленными микроносителями BioFlo® 510 компании New Brunswick Scientific, США

Таблица 1.1 – Типы биореакторов для культивирования клеток млекопитающих

Тип реактора	Схема	Суспензион- ные	Адгезивные	
			Независимые от типа подложки	Зависимые от типа подложки
Биореактор смешения		Без носителя	Микрокапсул ы	Микроносител и, макропористые частицы
Одноразовые биореакторы смешения		Без носителя	Микрокапсул ы	Микроносител и, макропористые частицы

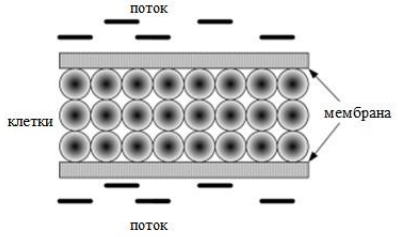
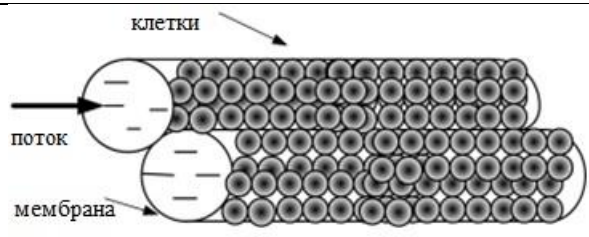
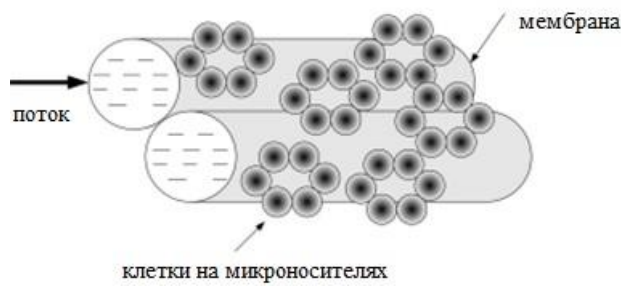
Продолжение таблицы 1.1

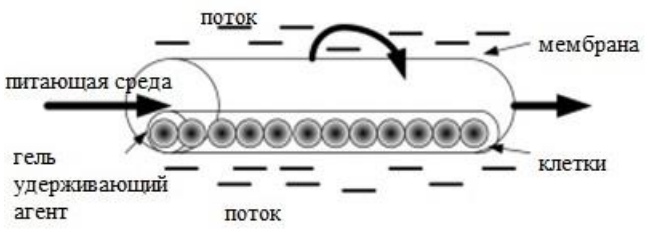
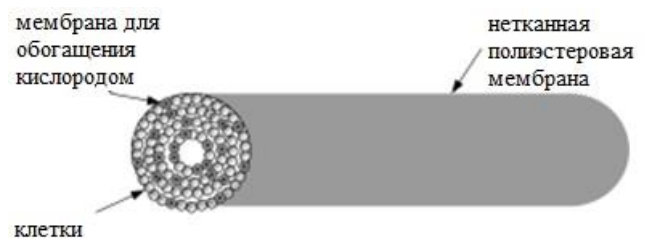
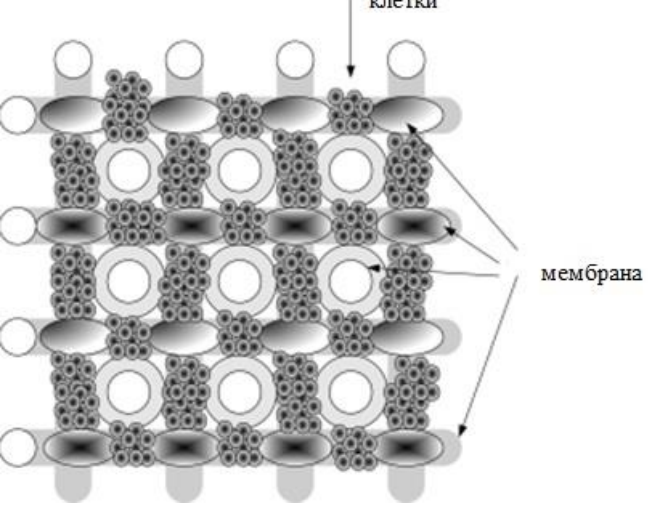
Тип реактора	Схема	Суспензион- ные	Адгезивные	
			Независимые от типа подложки	Зависимые от типа подложки
Эрлифтный биореактор	 Выход газа Культуральная среда Центральная труба Подача воздуха Без носителя	-	-	-
Биореактор со взвешенным слоем	 Метаболиты твердые частицы, на которых растут клетки Субстрат Воздух	-	Микрокапсулы	Микроносители, макропористые частицы
Биореактор со слоем насадки	 Метаболиты Субстрат	-	Макропористые частицы, макропористые кубы	
Роллерный биореактор с бутылками	 Клетки	-	Внутренняя поверхность бутылей	
Волновой биореактор (одноразовый)		Без носителя	-	Микроносители и
Мембранный биореактор		Без носителя	-	Пористые стенки

1.1.3 Мембранные биореакторы для адгезивных культур клеток

В последнее время большое внимание уделяется мембранным биореакторам, используемым для выращивания клеток млекопитающих и человека. Существует несколько типов наиболее распространенных конструкций, в которых мембрана либо выполняет свою основную функцию полупроницаемой перегородки, позволяющей пропускать жидкие компоненты культуральной среды и задерживать клетки, либо она служит в качестве пористой стенки, способствующей более равномерному распределению питательной среды или организации безпузырьковой аэрации (таблица 1.2) [18, 39, 41 - 49].

Таблица 1.2 – Типы конструкций мембранных биореакторов для культивирования клеток млекопитающих

Тип	Схема
Мембранный биореактор с двумя плоскими мембранами	
Мембранный биореактор с пучком полых волокон с расположением клеток на внешней поверхности волокон	
Мембранный биореактор с пучком полых волокон с клетками, прикрепленными к микроносителям	

Тип	Схема
Мембранный биореактор с пучком полых волокон с расположением клеток на внутренней поверхности волокна	 поток питательная среда гель удерживающий агент мембрана клетки поток
Мембранный биореактор с рулонным мембранным элементом для аэрации	 мембрана для обогащения кислородом нетканная полиэфирная мембрана клетки
Мембранный биореактор с половолоконными мембранами, перекрестно расположенными в виде сетки	 клетки мембрана

Мембранные биореакторы для культивирования клеток млекопитающих обладают рядом преимуществ, среди которых стоит упомянуть следующие:

- высокая продуктивность по клеточной массе (например, в половолоконном мембранном биореакторе можно создать плотность клеток до 10^8 /мл в отличие от классического биореактора смешения - плотность клеток до 10^6 /мл);
- постоянный отвод продуктов метаболизма, которые могут негативно влиять на рост клеток, и постоянный подвод питательной среды за счет организации непрерывного или полунепрерывного процесса;

- развитая поверхность для адгезии клеток;
- снижение риск механических повреждений клеток за счет адгезии в порах;
- использование мембраны с определенными физико-химическими свойствами, улучшающими адгезию клеток.

Одним из перспективных и часто используемым мембранных биореакторов является половолоконный мембранный биореактор с расположением клеток на внешней поверхности мембраны (рисунок 1.10). В таблице 1.3 приведено сравнение ряда биореакторов, используемых для культивирования клеток млекопитающих, из которой видны преимущества половолоконного мембранного биореактора [5].

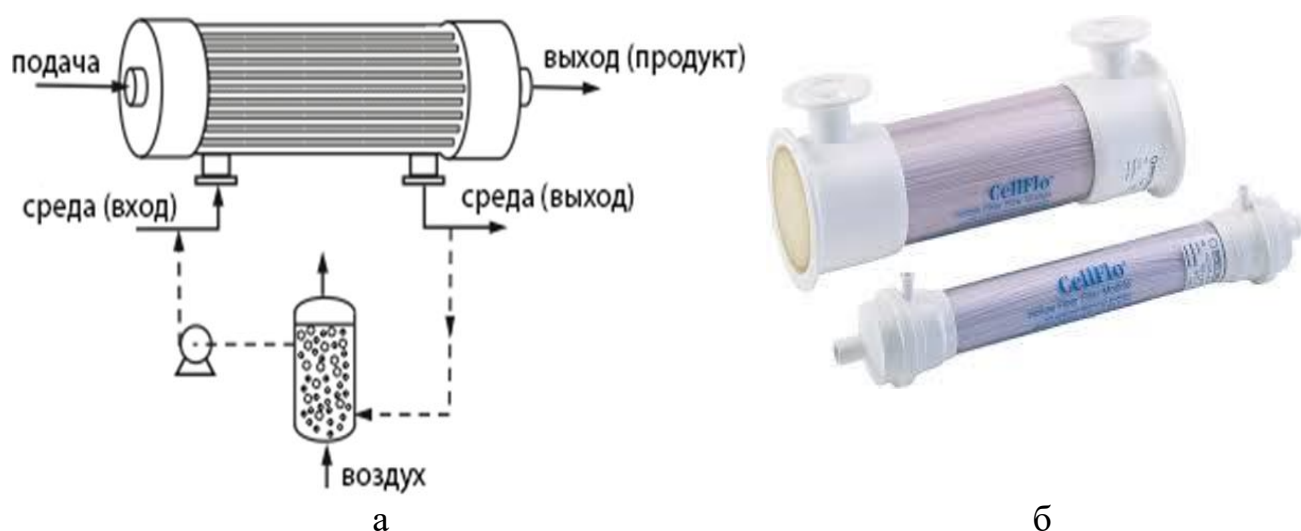


Рисунок 1.10 - Мембранный биореактор с полыми параллельными волокнами:
(а) схема, (б) модуль Spectrum CellFlo, компания Spectrumlabs, США [50]

Анализируя таблицу, стоит отметить, что половолоконный мембранный биореактор позволяет получить достаточно большую плотность и концентрацию клеток, в нем практически отсутствует вероятность механического повреждения клеток из-за больших сдвиговых напряжений. Однако для больших промышленных объёмов рекомендуется использовать суспензионные биореакторы. В настоящее время половолоконный мембранный реактор широко

используется как для лабораторных и пилотных исследований, так и для выращивания и дифференциации стволовых клеток для целей персонифицированной медицины.

Таблица 1.3 – Основные характеристики систем и биореакторов для культивирования клеток млекопитающих

Параметр	Колба/ бутылки в роллере/ одноразовые мешки	Мембранный биореактор (половолокон- ный)	Суспензион- ный биореактор (смешения, аэрлифтовый)	Биореактор со взвешенным слоем или слоем насадки
Плотность клеток	1	3	2	2-3
Гомогенность	1	1	3	2
Напряжения сдвига	нет	нет	да	нет
Концентрация продукта	1	3	2	2
Производительность	1	3	2	2
Эффективность использования среды	3	1	3	2
Непрерывный процесс	нет	да	да/нет	да
Контроль	0	1	2	3
Выделение целевого продукта	1	3	2	2
Стерилизация паром	нет	нет	да	да
Повторность использования	нет	нет	да	да

0 - невозможно, 1 – 3 эффективность

На основе вышеизложенного можно сделать выводы о том, что вопросы, связанные с культивированием клеток млекопитающих и человека, достаточно остро стоят в современном обществе. Клетки млекопитающих широко применяются в различных биофармацевтических производствах. Клетки суспензионного типа в основном используются для получения моноклональных

антител и рекомбинантных белков [51 - 58], в то время как промышленное производство вакцин и вирусных векторов для генной терапии [59 - 62] в значительной степени базируется на адгезивных клеточных культурах, например, выращиваемых на микроносителях. Кроме того, клетки адгезивного типа широко используются в целях клеточной терапии и тканевой инженерии [63 - 66], например, для восстановления поврежденных в силу разных причин органов и тканей (ткани сердца – при инфаркте миокарда, головного мозга – при инсульте, печени – при отравлениях или гепатитах, кожи – при ожогах).

Для стабильного функционирования любого биореактора с целью увеличения его производительности большое внимание уделяется вопросам расчета и оптимизации условий его работы, что проще и быстрее сделать, используя методы математического моделирования, что будет рассмотрено в следующем разделе.

1.2 Математическое моделирование биореакторов

1.2.1 Особенности построения математических моделей в биореакторах

Процессы, протекающие в биореакторах, особенно с участием клеток млекопитающих, отличаются большой сложностью, поэтому вопросам моделирования, оптимизации и масштабирования биореакторов уделяется большое внимание. Если базироваться на позициях системного анализа, все явления в биореакторе можно разделить на 2 уровня: микроуровень (микрокинетика процессов) и макроуровень (макрокинетика процессов) [1-3, 6].

К микроуровню относятся различные физические, химические и биохимические явления, которые происходят на уровне единичных клеток, клеточных агломератов, колоний, клеточных пленок. При этом определяющими параметрами являются скорость роста и гибели клеток, накопление целевых продуктов клеточного метаболизма, эффекты диффузионного транспорта питательных веществ из окружающей культуральной жидкости в клетки и из

клеток в среду, диффузия газообразного субстрата (например, O_2) и выделение продуктов жизнедеятельности клеток, тепловые эффекты и т.д.

На макроуровне рассматриваются факторы, отвечающие за рост и перемещение клеток в объеме биореактора в зависимости от его конструкции, такие как гидродинамические характеристики (режим перемешивания, возникающие напряжения сдвига в реакторе, поля скоростей газовых и жидкостных потоков в аппарате и др.), массообменные показатели, определяющие скорость транспорта растворенных и газообразных питательных веществ; параметры теплообмена, зависящие от применяемых систем и устройств теплообмена (внутренние, внешние); конструкционные особенности биореактора, определяющие способ культивирования клеток (суспензионное глубинное, поверхностное на стационарных или подвижных элементах в виде пленок, выращивание клеток на микроносителях).

На основе позиций системного анализа математическая модель биореактора может быть представлена из следующих блоков (рисунок 1.11).

При моделировании биореактора необходимо в первую очередь учитывать кинетическую модель, включающую в себя уравнения, описывающие рост клеток, образование продуктов метаболизма и расхода субстрата. Учет гидродинамики и тепломассообмена позволяет создать и поддерживать в реакторе определенные условия культивирования, позволяющие обеспечить высокую производительность по целевому продукту и нивелировать различные стрессовые воздействия на клетки. В зависимости от конструкции биореактора возможно подключение мембранного модуля. Рассмотрим более подробно некоторые отдельные блоки.

1.2.2 Кинетические модели популяции клеток млекопитающих

Существуют различные виды и классификации моделей роста клеток [1-3, 5, 67, 68]. Для конкретного процесса культивирования вид кинетических закономерностей и значения кинетических констант находятся, как правило, эмпирическим путем. При подборе кинетической зависимости чаще всего используют феноменологический подход, на основании которого математический

вид уравнения определяется его пригодностью для описания вида зависимости (обычно выраженной в графической форме) кинетической характеристики от изучаемого фактора внешней среды.

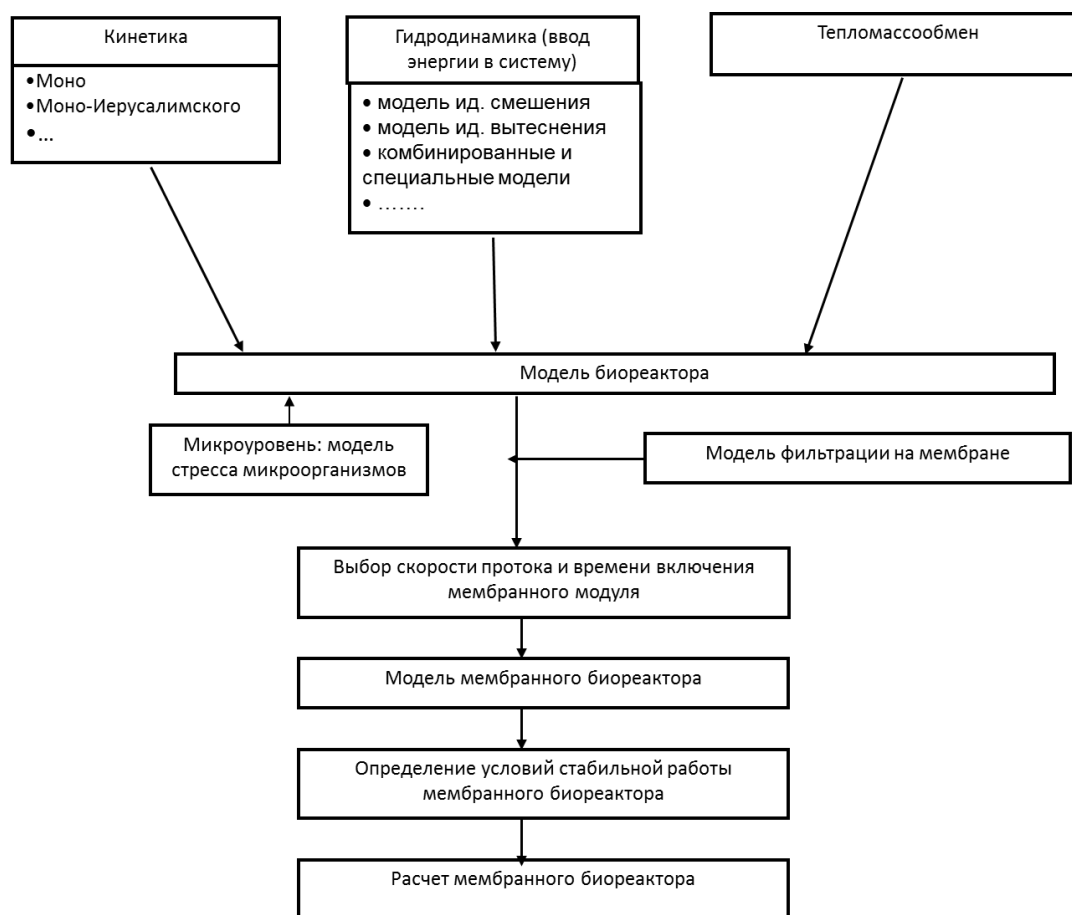


Рисунок 1.11 Стратегия построения математической модели биореактора

При составлении кинетической зависимости можно рассматривать влияние различных факторов, например, концентрации лимитирующего субстрата, ингибирования роста клеток продуктами метаболизма. Существуют модели, в которых рост клеток, например, зависит от температуры, давления, pH, но они используются гораздо реже. Чаще всего используют однофакторные зависимости, в которых в качестве влияющего фактора принимается только одна из переменных процесса (например, концентрация лимитирующего субстрата). Более сложный вариант – это использование многофакторных кинетических уравнений при

моделировании работы биореакторов периодического и/или непрерывного действия.

В общем виде кинетическую модель популяции клеток можно представить, как приведено на рисунке 1.12.

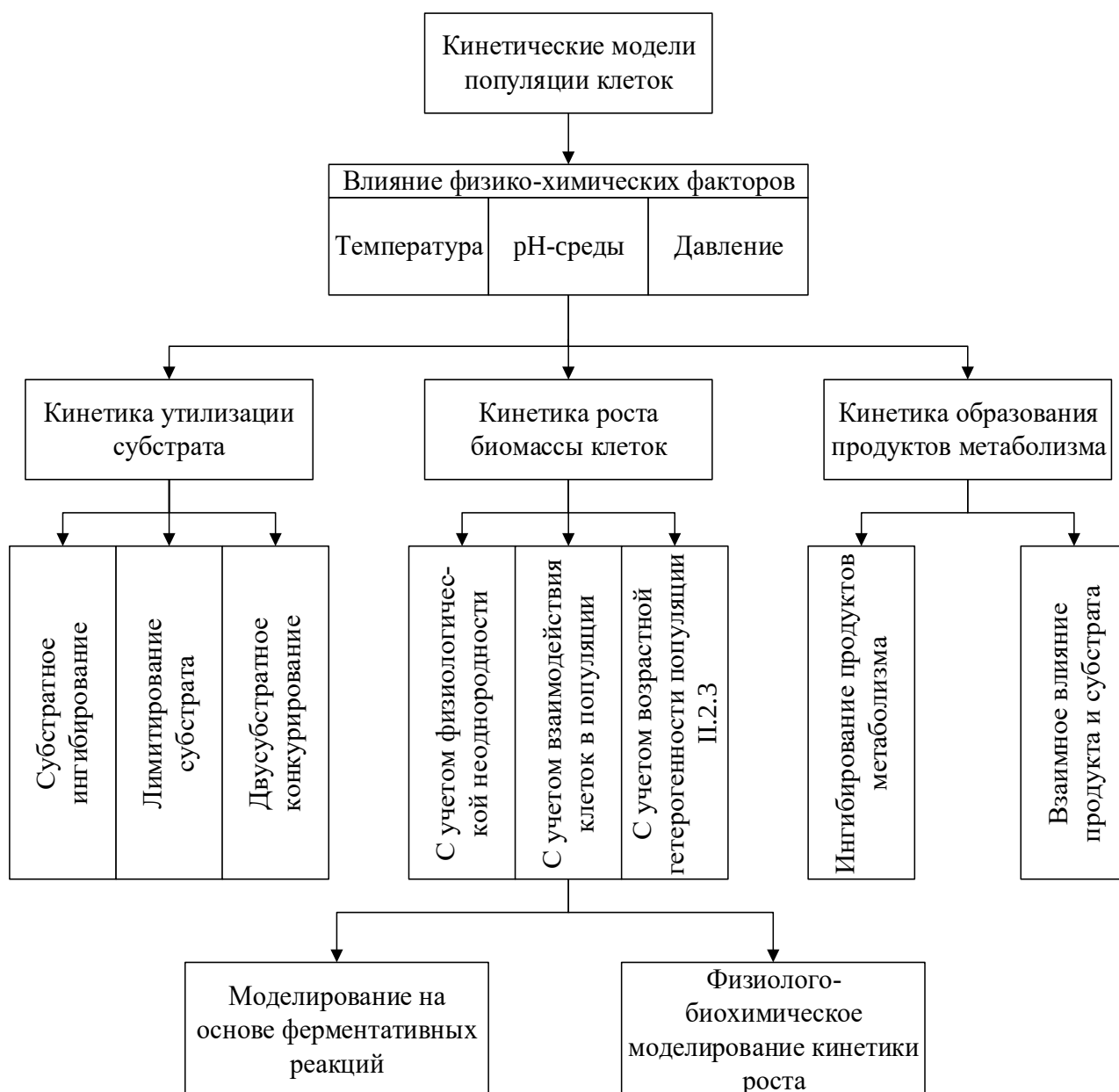


Рисунок 1.12 - Схема кинетической модели популяции клеток

В работах [5, 7, 9, 67 - 70] приводится классификация кинетических моделей, согласно которой их можно разделить на структурированные, неструктурированные, сегрегированные, несегрегированные.

Структурированные кинетические модели также широко используются для описания роста и развития культивируемых клеток, учитывая при этом внутриклеточные процессы [68 – 72]. Такие модели сосредоточены на физиологии клетки, клеточном метаболизме и взаимодействии клетки с окружающей средой и строятся исходя из соответствующих материальных балансов [73 - 75]. Однако они достаточно сложные, потому что учесть концентрации всех метаболитов в модели невозможно. Помимо этого, экспериментально определенные значения кинетических констант, описывающих активность ферментов, известны для небольшого количества ферментов, и число ферментативных реакций, протекающих в клетке, достаточно велико. Эту проблему решают на основе концепции об «узком месте» в цепи таких реакций, что означает, что в каждый определенный момент времени общая скорость процесса будет лимитироваться одной самой медленной реакцией [1 – 3, 5, 68, 70]. Достаточно часто структурированные модели объединяют с описанием кинетики процесса на основе простых и известных кинетических моделей типа, чаще всего уравнения Моно.

Неструктурированные модели рассматривают клетку как «черный ящик», и внутриклеточные взаимодействия детально не анализируются. Предполагается, что рост клетки зависит только от внеклеточных параметров. Использование таких моделей с учетом некоторых аспектов внутриклеточных взаимодействий позволяет сделать их более информативными, тем более, что они проще, хотя менее точные по сравнению со структурированными моделями. Для большинства клеточных линий, например, для клеток CHO [76, 77], структурированный тип зависимостей обычно не применим.

Сегрегированные модели в отличие от несегрегированных описывают поведение клетки через клеточные циклы или учитывают физиолого-биохимическую неоднородность клеточной культуры, например, размер, возраст, скорость роста и другие свойства клеток [78 - 80].

Исходя из вышеизложенного, можно сказать, что кинетические модели на основе анализа ферментативных реакций можно представляют собой структурированные модели, и модели с учетом возрастной и физиолого-биохимической неоднородности популяций относятся к сегрегированным моделям.

Таким образом, в связи со сложностью процессов, протекающих с участием клеток млекопитающих, и большим количеством параметров, которые необходимо учитывать для их оптимизации, целесообразность использования математического моделирования значительно возрастает. Математические модели можно использовать [71 – 81, 82]:

- для обобщения больших объемов экспериментальных данных;
- для характеристики различных фенотипов и потребностей клеток млекопитающих [83];
- отработки различных концепций и гипотез;
- предсказания поведения систем в различных условиях для идентификации механизмов, протекающих в клетках;
- как инструмент для моделирования и оптимизации процессов;
- подбора оптимальных условий для реализации процесса.

Кинетические модели роста клеток

Самое простое дифференциальное уравнение, которое используется для описания скорости роста клеток имеет вид [1, 2, 63-65, 67, 69, 84]:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X(t) \quad (1.1)$$

где $X(t)$ - концентрация клеток в данный момент времени, кг клеток/м³, μ - удельная скорость роста, измеряемая в единицах, обратных времени, t - время эксперимента.

Данное дифференциальное уравнение (1.1) выражает скорость роста популяции при одинаковых условиях культивирования. При этом процессы деления и роста микроорганизмов происходят одновременно и непрерывно. В

работе [67] приведена зависимость роста клеток мышинных фибробластов, изменяемая по линейному закону.

Интегрирование уравнения (1.1) дает уравнение (1.2), в котором рост клеток подчиняется экспоненциальному закону, соблюдаемому обычно в идеальных условиях, когда все клетки имеют одинаковую вероятность размножения.

$$X = X_0 e^{\mu t} \quad (1.2),$$

где X_0 -концентрация биомассы в нулевой момент времени (кг клеток/м³), X -концентрация биомассы в кг клеток/м³, μ - кинетическая константа роста, измеряемая в единицах, обратных времени, t - время эксперимента.

Данная модель называется *моделью Мальтуса* и достаточно широко используется для описания роста клеток млекопитающих [1 - 3, 67, 77, 85, 86]. В этой модели не учитывается ограниченное количество субстрата.

Однако в периодической культуре окружающая среда со временем изменяется, и рост клеток перестает подчиняться этому закону, т.е. удельная скорость роста μ не является константой, а зависит от различных внешних факторов, например, концентрации питательного субстрата или концентрации продуктов метаболизма. Кроме того, необходимо учитывать взаимовлияние клеток, выражающееся прежде всего в эффекте стесненности, что в свою очередь может привести к недостатку субстрата для ряда клеток. Дифференциальное уравнение, описывающее данную ситуацию, имеет вид [1]:

$$\frac{dX}{dt} = \varepsilon \cdot X - \beta \cdot X^2 \quad (1.3),$$

где ε характеризует максимальную скорость роста клеток при отсутствии взаимного влияния, β учитывает эффект тесноты (или взаимное влияние клеток) из-за недостатка питательных веществ.

Решение данного дифференциального уравнения представляет собой следующую зависимость:

$$X = \frac{\varepsilon \cdot X_0}{\varepsilon e^{-\varepsilon t} + \beta X_0 (1 - e^{-\varepsilon t})} \quad (1.4),$$

где $X=X_0$ в начальный момент времени (это исходная или засевная концентрация клеток).

В зависимости от факторов, влияющих на изменение удельной скорости роста клеток в процессе культивирования, которые чаще всего учитываются в кинетических моделях, можно выделить следующие группы моделей:

1. Математические модели удельной скорости роста клеток, зависящие от концентрации субстрата.
2. Математические модели удельной скорости роста клеток, зависящие от концентрации продукта метаболизма.
3. Многофакторные кинетические модели удельной скорости роста клеток.
4. Математические модели удельной скорости роста клеток, зависящие от других факторов, например, температуры и величины pH.

Самой известной кинетической моделью, учитывающей влияние концентрации лимитирующего субстрата на удельную скорость роста популяции клеток, является модель Моно:

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_S + S} \quad (1.5),$$

где μ - удельная скорость роста биомассы (ч^{-1}), μ_{max} - максимальная удельная скорость роста (ч^{-1}), S - концентрация субстрата (г/л), K_S - константа насыщения (связывания) субстрата.

Максимальная удельная скорость роста μ_{max} отражает максимально возможную способность размножения всех клеток изучаемой биомассы в условиях, когда не ограничивается потребление питательных веществ. Константа K_S , имеющая название константы Михаэлиса – Ментена, обратно пропорциональна сродству организма и субстрата, что подчеркивает сходство модели с кинетикой ферментативной реакции [1, 5, 67, 86].

В случае использования более чем одного субстрата согласно [1, 5], используют модифицированный вариант модели Моно.

$$\mu = \mu_{max} \left(\frac{S_1}{K_{S_1} + S_1} \right) \left(\frac{S_2}{K_{S_2} + S_2} \right) \quad (1.6),$$

где μ_{max} – максимальная удельная скорость роста клеток (ч^{-1}), K_{S_1} – константа насыщения субстрата (г/л) с концентрацией S_1 (г/л), K_{S_2} – константа насыщения субстрата (г/л) с концентрацией S_2 (г/л).

Зависимость Моно широко используется для описания роста клеток млекопитающих, например, клеток CHO [86 - 89], при производстве моноклональных антител [90, 91], человеческих нервных клеточных линий AGE1.HN [92] и т.д.

Другой распространённой кинетической моделью, используемой для описания роста клеток млекопитающих, является модель Мозера, изначально основанная на предположении о том, что изменение популяций микроорганизмов совершается благодаря генным мутациям [1, 5, 67].

$$\mu = \mu_{max} \frac{S^K}{K_S + S^K} \quad (1.7),$$

где K – постоянный коэффициент, значение которого равносильно числу молекул субстрата, вступающих в реакцию с ферментом с образованием одной молекулы продукта, $K > 1$.

Полученное уравнение (1.7) используется в составе математического описания увеличения численности популяции с ярко выраженным сигмоидальным характером зависимости скорости роста от концентрации субстрата [86, 93].

В некоторых случаях субстрат не только обеспечивает возрастание скорости роста биомассы, но является одновременно ингибирующим веществом. Это явление можно описать моделью Андрюса [1]:

$$\mu = \mu_m \frac{S}{K_S + S + S^2/K_{iS}} \quad (1.8),$$

где K_{iS} – кинетическая константа ингибирования субстратом.

Рост клеток зависит не только от концентрации питающего субстрата S , но и от продуктов метаболизма P . Причем чаще всего их накопление является ингибирующим фактором для роста биомассы. Это ингибирование учитывается различными видами моделей.

Среди математических моделей зависимости удельной скорости роста клеток от концентрации продукта метаболизма наиболее простым уравнением является:

$$\mu = \mu_m - K \cdot P \quad (1.9),$$

где K – кинетическая константа ингибирования продуктом, л/(г·ч).

Модель (1.9) предполагает линейное уменьшение μ от концентрации продукта в среде.

Н.Д. Иерусалимским была предложена более сложную модель [94], которая, подобно модели Моно, базируется на ферментативной кинетике:

$$\mu = \frac{\mu_m}{1+P/K_P} \quad (1.10),$$

где K_P – кинетическая константа ингибирования продуктом, г/л.

Более сложная зависимость для учета сигмовидного характера кривой удельной скорости роста клеток от концентрации продукта имеет вид [3]:

$$\mu = \frac{\mu_m}{1+P^k/K_P} \quad (1.11),$$

где k – новый по сравнению с уравнением Иерусалимского параметр, причем $k > 1$.

В качестве многофакторных зависимостей наиболее известными считаются уравнение Моно-Иерусалимского, отражающее зависимость удельной скорости роста клеток как от концентрации питающего субстрата, так и от концентрации продукта (1.12), и уравнение конкурентного торможения продуктом метаболизма (1.13):

$$\mu = \mu_m \frac{S}{(K_S+S) \cdot (1+P/K_P)} \quad (1.12)$$

$$\mu = \mu_m \frac{S}{K+S+P/K_{iP}} \quad (1.13)$$

Кинетические модели образования продуктов метаболизма

Процессы биосинтеза продуктов издавна делятся на два больших класса – связанные с ростом клеток и не связанные с ростом клеток или, другими словами, сопряженное и несопряженное образование продуктов метаболизма [1]. При

составлении математических зависимостей образования продуктов метаболизма клеток достаточно часто используется удельная скорость роста μ .

Удельная скорость образования продуктов может быть выражена простым соотношением [1]:

$$q_P = Y_{P/X} \cdot \mu \quad (1.14)$$

Аналогично кинетическим моделям роста клеток образование продуктов метаболизма может описываться однофакторными или многофакторными уравнениями. Помимо этого, что структуры зависимостей q_P от S , P , температуры и величины pH аналогичны структурам таких же уравнений для роста биомассы, например: Моно (1.5), Андрюса (1.8) и т.д.

Вот как, например, будет выглядеть кинетическая зависимость скорости роста продуктов метаболизма, зависящая от субстрата по Андрюсу (1.8):

$$q_P = \frac{q_{mS}}{K_S + S + S^2/K_{iS}} \quad (1.15)$$

Кинетические модели расхода субстрата

При составлении кинетических зависимостей расхода субстрата чаще всего используют запись через расходные коэффициенты, исходя из того, что в биореакторе субстрат тратится на две цели – прирост клеточной массы и образования продуктов метаболизма [1, 95]. Иногда добавляют третий член, на что тратится субстрат, на поддержание жизнедеятельности клеток. Дифференциальные уравнения имеют вид:

$$\frac{dS}{dt} = -Y_{S/X} \frac{dX}{dt} - Y_{S/P} - mX \quad (1.16),$$

где $Y_{S/X}$ – расходный коэффициент по биомассе, кг субстр./кг клеток; $Y_{S/P}$ – расходный коэффициент по продукту, кг субстр./кг продукта; m – коэффициент расхода субстрата на поддержание жизнедеятельности клеток.

Кинетические модели, учитывающие логистические уравнения

Первое логистическое уравнение для описания роста популяции было разработано [96] на основе работ Мальтуса. В уравнение был добавлен

коэффициент K , названный обобщенной константой насыщения, для описания ингибирования роста определённой концентрацией клеток.

$$\frac{dX}{dt} = r \cdot X(t) \cdot \left(1 - \frac{X(t)}{K}\right) \quad (1.17)$$

где r – удельная скорость роста, $X(t)$ – концентрация клеток к моменту времени t .

Данная модель не учитывает смертность животных клеток. Рост и смерть клеток можно учесть посредством так называемого обобщенного четырех-параметрического логистического уравнения, описывающего плотность клеток в реакторах периодического действия и с подпиткой, как приведено в [97].

$$X(t) = \frac{A}{e^{Bt} + C e^{-Dt}} \quad (1.18)$$

где $X(t)$ – концентрация клеток к моменту времени t , A – начальная концентрация клеток, B , C – максимальные скорость смерти и роста соответственно.

В работе [97] было применено логистическое моделирование для периодического и периодического с подпиткой процессов получения моноклональных антител при помощи СНО клеток. Ниже приведены уравнения для роста клеток и продукта.

$$X = \frac{a_1}{e^{a_2 t} + a_3 e^{-a_4 t}} \quad (1.19)$$

где $X_0 = \frac{a_1}{1+a_3}$ – начальная концентрация клеток, $a_1 - a_4$ – параметры модели.

$$P = \frac{b_1}{1 + b_2 e^{-b_3 t}} \quad (1.20)$$

где $b_1 - b_2$ – параметры модели.

Аналогичным образом можно описать логистическим уравнением и расход субстрата, например, глюкозы [76, 98, 99].

$$N(t) = \frac{A}{e^{Bt} + C} \quad (1.22)$$

Главное отличие логистического уравнения для описания роста клеток от зависимости Моно состоит в том, что не требуется данных по лимитирующему субстрату. Кроме того, уравнение не учитывает никакой информации по метаболизму.

1.2.3 Примеры моделирования кинетики популяций клеток млекопитающих

На основании вышеизложенной классификации кинетических моделей, используемых для моделирования популяции клеток млекопитающих, рассмотрим некоторые примеры математических моделей популяции клеток.

Предложенная в работе [89] неструктурированная и несегрегированная модель культивирования культуры СНО в биореакторе непрерывного действия включает в себя дифференциальные уравнения роста клеток СНО, продукта метаболизма и расхода субстрата.

Кинетика роста клеток была описана уравнением по типу Моно, куда были введены модификации в виде дополнительного учета концентрации клеток при константе насыщения раствора субстратом (зависимость Конта):

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_s X + S}. \quad (1.23)$$

Совместно со скоростью потребления субстрата и скоростью синтеза метаболитов математическое описание культивирования СНО имеет следующий вид:

$$\begin{cases} \frac{dX}{dt} = \mu_{max} \frac{S}{K_s X + S} X \\ \frac{dS}{dt} = -q_s X + \frac{F_0}{V} (S_0 - S) \\ \frac{dP}{dt} = q_p X + \frac{F_0}{V} P \end{cases} \quad (1.24),$$

где F_0 - расход питательной среды в биореакторе (л/ч), P - концентрация продукта (моль/л), S_0 - концентрация субстрата в сырье (моль/л), S - концентрация субстрата в биореакторе (моль/л), q_s - удельная скорость потребления субстрата (моль/клеток*ч⁻¹), q_p - удельная скорость производства продукта (моль/клеток*ч⁻¹).

В работе [75] разработана обобщенная структурированная модель для описания роста клеток млекопитающих и получения моноклональных антител. Данная модель рассматривает около 50 различных составляющих по трем областям (среда культивирования, цитоплазма и митохондрии). Она включает в себя балансовые уравнения по некоторым аспектам гликолиза, циклу трикарбоновых

кислот, образованию и расходу жирных и аминокислот. Кроме того, в модели учитывается трансмембранный транспорт питательных веществ в клетку, рост клеток и образование продукта при ингибировании продуктами метаболизма.

В [88] проведено исследование скорости метаболических процессов при росте клеток СНО в периодическом реакторе. Ниже представлены основные уравнения материального баланса для клеточного роста, потребления субстрата и образования продукта:

$$\begin{cases} \frac{dX}{dt} = r_X \\ \frac{dC_{Glc}}{dt} = -r_{Glc} \\ \frac{dC_{Lac}}{dt} = r_{Lac} \\ \frac{dC_{Amm}}{dt} = r_{Amm} \end{cases} \quad (1.25),$$

где X – концентрация биомассы (клеток/л), C_{Glc} – концентрация глюкозы (г/л), C_{Lac} – концентрация лактата (г/л) и C_{Amm} – концентрация аммония (г/л).

Для удельных скоростей роста клеток были использованы формулы по типу Моно и Иерусалимского, где в знаменателе учитывается влияние ингибирования метаболитами скорости образования продукта:

$$r_X = \mu_{max} \frac{C_{Glc}}{(K_{Glc} + C_{Glc})K} X \quad (1.26)$$

$$K = \left(\frac{C_{Amm}}{K_{Amm}} + 1 \right) \left(\frac{C_{Lac}}{K_{Lac}} + 1 \right) \quad (1.27),$$

где μ_{max} – предельная скорость роста клеток ($ч^{-1}$), K_{Glc} – константа Моно для глюкозы (г/л), C_{Amm} и C_{Lac} – концентрации метаболитов аммония и лактата (г/л), K – общая константа ингибирования (г/л), K_{Amm} и K_{Lac} – константы ингибирования продукта (г/л).

Потребление субстрата рассчитывается на основании расходных коэффициентов $Y_{X/S}$:

$$r_{Glc} = \frac{1}{Y_{X/Glc}} r_X \quad (1.28)$$

$$r_{Lac} = Y_{\frac{Lac}{Glc}} r_X \quad (1.29)$$

$$r_{Amm} = \frac{1}{Y_{X/Amm}} r_X, \quad (1.30),$$

где $Y_{X/Glc}$ - коэффициент, показывающий эффективность преобразования биомассы на глюкозе (клеток/л), $Y_{Lac/Glc}$ - коэффициент, показывающий эффективность преобразования лактата относительно глюкозы (г/г), $Y_{X/Amm}$ - производительность биомассы на аммонии (клеток/л).

1.2.4 Особенности моделирования роста клеток на подложках

Математическое моделирование роста адгезивных клеток имеет свои особенности в отличие от суспензионных культур, которые проявляются в том, что важно учитывать начальные условия для прикрепления клеток к подложке и инициирования их роста (лаг-фаза), стадию экспоненциального роста клеток до наступления контактного торможения, стадию роста клеток с ограничением в пространстве с уменьшением удельной скорости роста из-за их слияния [67, 100].

В частности, начальная стадия прикрепления клеток к микроносителям и начало пролиферации (размножение клеток путем деления) имеют решающее значение для последующего успешного культивирования. Для большинства клеточных линий перенос от одного микроносителя к другому не возможен при обычных условиях культивирования. Низкая эффективность прикрепления и неоднородное распределение клеток на микроносителях в момент инокуляции (засева) может привести к пустым носителям и, соответственно, к уменьшению максимальной клеточной плотности на выходе. Клетки, оставшиеся в суспензии после нескольких часов, умирают из-за апоптоза (регулируемый процесс программируемой клеточной гибели, в результате которого клетка распадается на отдельные тельца, ограниченные плазматической мембраной), вызванного потерей их внеклеточной подложки [67].

При моделировании лаг-фазы для адгезивных клеток одним из вариантов является возможный сдвиг экспериментальных данных, принимая во внимание только стадию активного роста клеток. Для этого необходимо определить долю

суспензионных клеток, которые прикрепились к микроносителям в течение первых часов культивирования (около 20 ч). Однако, не представляется возможным оценить экспериментальные данные, например, по концентрациям метаболитов, парциальному давлению кислорода и т.д., полученных в ходе рассмотренного интервала. Другим вариантом учета лаг-фазы может быть использование дифференциальных уравнений с запаздыванием для описания пролиферации клеток или введение экспоненциального звена, чтобы снизить удельную скорость роста в начальной точке до нуля. Однако, и в данном случае не удастся корректно описать уменьшение жизнеспособных клеток, наблюдаемое непосредственно после начала культивирования [67, 100, 101].

Моделирование роста клеток на микроносителях

В [102] рассматривается рост клеток на единичном носителе, принимая во внимание ограничение по росту только из-за геометрии носителя. Влияние плотности клеток на микроносителях на скорость роста может быть описано следующим образом: удельная скорость роста постоянна до тех пор, пока число клеток является низким по сравнению с максимально возможным количеством клеток. Удельная скорость роста равна нулю в момент времени, когда клетки образуют полностью слитный монослой. Между этими двумя крайними точками удельная скорость роста должна сделать плавный переход. В [103] представлена детерминированная модель, в которой происходит замена линейного уменьшения скорости роста на модель в виде логистического уравнения. В работе [104] были предложены стохастические модели для учета топологии клеточных колоний. В [105 - 112] для описания динамики популяций неподвижных клеток с контактным ингибированием были рассмотрены дискретные модели, основанные на клеточных автоматах.

В [101] была предложена детерминированная неструктурированная сегрегированная модель для роста клеток Madin Darby Canine Kidney (MDCK) (клетки почки собаки Майдин-Дэрби), которые используются для получения вакцин против гриппа.

В основе данной математической модели лежит разделение популяции находящихся в биореакторе клеток млекопитающих на 4 группы: жизнеспособные клетки в суспензии ($x_{СУСП}$), пролиферирующие клетки на микроносителях ($x_{МН}$), мертвые клетки ($x_{МЕРТ}$) и лизирующие (распадающиеся) клетки ($x_{ЛИЗ}$). В процессе культивирования имеют место ряд таких процессов жизнедеятельности клеток, как истощение субстратов – глюкозы (Γ_L) и глутамина (Γ_T), главных источников углерода и энергии для культур, и получение метаболитов, ингибирующих рост клеток – лактата (L) и аммиака (A). Эти процессы рассматриваются как факторы, ограничивающие рост клеток млекопитающих, поэтому изменения их концентраций также учитываются в математической модели.

Начальное число клеток млекопитающих с питательной средой поступает в культуральную систему в качестве инокулята, далее наступает период лаг-фазы – большая часть клеток оседает на поверхности микроносителей ($k_{МН}$), оставшаяся же часть, оставшаяся в суспензии, вымирает ($k_{МЕРТ}$) с дальнейшим протеканием лизиса ($k_{ЛИЗ}$). Клетки размножаются на микроносителях (μ) и постепенно заполняют их до формирования монослоя с достижением максимальной концентрации в системе. Однако часть клеток во время культивирования подвергается распаду и теряет свои адгезивные свойства, возвращаясь в первоначальное взвешенное состояние ($k_{ЛИЗ}$). Общее число жизнеспособных клеток соответствует числу живых клеток на микроносителях и в суспензии: $x = x_{МН} + x_{СУСП}$. В модели рассматривается вариант, что только клетки на микроносителях могут потреблять глюкозу (Γ_L) и глутамин (Γ_T) и способны к размножению. В качестве продуктов метаболизма рассмотрено образование лактата (L) и аммиака (A), которые могут выступать в виде ингибиторов. Критерием окончанием роста клеток является образование монослоя на поверхности (достижение максимального числа клеток X_{max}) с учетом контактного ингибирования клеток.

Удельная скорость роста клеток была описана модифицированным уравнением Моно и имеет вид:

$$\mu = \mu_{max} \cdot \min \left(\frac{\Gamma_L}{K_{\Gamma_L} + \Gamma_L}, \frac{\Gamma_T}{K_{\Gamma_T} + \Gamma_T} \right) \cdot \frac{K_L}{K_L + L} \cdot \frac{K_A}{K_A + A} \cdot \frac{x_{max} - x_{МН}}{x_{max}} \quad (1.31),$$

где μ – удельная скорость роста биомассы (ч^{-1}); $\mu_{\max}$ – предельное значение скорости роста (ч^{-1}); G_L, G_T, L, A – концентрации глюкозы, глутамина, лактата и аммиака соответственно ($\text{кг}/\text{м}^3$); $K_{G_L}, K_{G_T}, K_L, K_A$ – константа насыщения (связывания) глюкозы, глутамина, лактата и аммиака соответственно ($\text{кг}/\text{м}^3$); $x_{\max}$ – предельная концентрация клеток на микроносителях ($\text{кг клеток}/\text{м}^3$), $x_{\text{МН}}$ – текущая концентрация клеток на микроносителях ($\text{кг клеток}/\text{м}^3$).

В основу данного дифференциального уравнения положено допущение о том, что на скорость роста клеток ингибирующее влияние будет оказывать то питательное вещество, содержание которого в системе минимально. Таким образом, для описания кинетики роста клеток используется лимитирующая стадия, что соответствует экспериментальным данным.

Концентрация клеток в суспензии увеличивается с откреплением клеток от микроносителей и, соответственно, уменьшается с их прикреплением на поверхность, что было отражено:

$$\frac{dx_{\text{СУСП}}}{dt} = k_{\text{ОТКР}} \cdot x_{\text{МН}} - k_{\text{ПРИКР}} \cdot \frac{x_{\max} - x_{\text{МН}}}{x_{\max}} \cdot x_{\text{СУСП}} - k_{\text{МЕРТ}}(1 + K_L \cdot L + K_A \cdot A) \cdot x_{\text{СУСП}} \quad (1.32),$$

где $x_{\text{СУСП}}$ – текущая концентрация клеток в суспензии ($\text{кг клеток}/\text{м}^3$), $k_{\text{ОТКР}}$ – константа скорости открепления клеток от микроносителей (ч^{-1}), $k_{\text{ПРИКР}}$ – константа скорости прикрепления клеток к микроносителям (ч^{-1}), $k_{\text{МЕРТ}}$ – константа скорости гибели клеточной массы (ч^{-1}).

Концентрация клеток на микроносителях возрастает с увеличением скорости роста клеток и их прикрепления и снижается с их откреплением от поверхности, что видно из следующего уравнения:

$$\frac{dx_{\text{МН}}}{dt} = \mu \cdot x_{\text{МН}} + k_{\text{ПРИКР}} \cdot \frac{x_{\max} - x_{\text{МН}}}{x_{\max}} \cdot x_{\text{СУСП}} - k_{\text{ОТКР}} \cdot x_{\text{МН}} \quad (1.33)$$

Для скорости поглощения глюкозы и глутамина клетками было приведено уравнение:

$$\frac{dG_L}{dt} = -\frac{1}{Y_{x/G_L}} \cdot \mu_{\max} \cdot \frac{x_{\max} - x_{\text{МН}}}{x_{\max}} \cdot \frac{G_L}{K_{G_L} + G_L} \cdot \frac{K_L}{K_L + L} \cdot \frac{K_A}{K_A + A} \cdot x_{\text{МН}} - m_{G_L} \cdot \sigma(G_L) \cdot x \quad (1.34)$$

$$\frac{d\Gamma_T}{dt} = -\frac{1}{Y_{x/\Gamma_T}} \cdot \mu_{max} \cdot \frac{x_{max} - x_{MH}}{x_{max}} \cdot \frac{\Gamma_T}{K_{\Gamma_T} + \Gamma_T} \cdot \frac{K_L}{K_L + L} \cdot \frac{K_A}{K_A + A} \cdot x_{MH} - m_{\Gamma_T} \cdot \sigma(\Gamma_T) \cdot x - k_{дек} \Gamma_T \quad (1.35)$$

$$\sigma(S) = \begin{cases} 1 & \text{для } S > 0, \\ 0 & \text{для } S = 0. \end{cases} \quad (1.36),$$

где Y_{x/Γ_L} , Y_{x/Γ_T} – расходные коэффициенты, которые отражают эффективность расходование глюкозы и глутамина на рост клеток, соответственно, $(Y_{XS} = \frac{dX}{dS})$; m_{Γ_L} , m_{Γ_T} – предельные скорости поглощения глюкозы и глутамина клетками (ч^{-1}); $\sigma(S)$ – функция, вводимая для избегания отрицательных концентраций субстрата; $k_{дек}$ – константа скорости химического разложения глутамата в процессе культивирования клеток (ч^{-1}).

Содержание аммиака и лактата в процессе культивирования увеличивается со временем за счёт метаболизма клеток млекопитающих, и на определенном этапе они начинают вести себя как ингибиторы роста клеточных культур, что было выражено как:

$$\frac{dL}{dt} = \alpha_L \cdot \mu \cdot x_{MH} \quad (1.37)$$

$$\frac{dA}{dt} = \alpha_A \cdot \mu \cdot x_{MH} + k_{дек} \cdot \Gamma_T \quad (1.38),$$

где α_L , α_A – коэффициенты образования лактата и аммиака, соответственно.

Скорости гибели клеточной массы и ее лизиса были описаны следующими дифференциальными уравнениями:

$$\frac{dx_{МЕРТ}}{dt} = k_{МЕРТ} (1 + K_L^{-1} \cdot L + K_A^{-1} \cdot A) \cdot x_{СУСП} - k_{ЛИЗ} \cdot x_{МЕРТ} \quad (1.39)$$

$$\frac{dx_{ЛИЗ}}{dt} = k_{ЛИЗ} \cdot x_{МЕРТ} \quad (1.40)$$

Данная модель является полуэмпирической, и, соответственно, для установления некоторых ее параметров необходимо проведение ряда экспериментов. Эмпирически определяются концентрации метаболитов и клеточной массы в системе и константы скоростей процесса ($k_{ПРИКР}$, $k_{ОТКР}$, $k_{ЛИЗ}$ и др.).

Рассмотренная сегрегированная математическая модель может быть использована для описания роста и гибели адгезивных клеток млекопитающих и для изменения концентраций их основных метаболитов, принимая в расчет ингибирующие факторы в системе (геометрические ограничения, контактное ингибирование, уменьшение концентраций питательных веществ и возникновение замедляющих рост клеток метаболитов). Кроме того, в ней учитывается начальная лаг-фаза культивирования при помощи описаний процессов прикрепления и открепления клеток с поверхности микроносителей. С помощью данной модели можно предсказать время жизнедеятельности и описать поведение клеток млекопитающих в процессе их культивирования.

Моделирование роста клеток в скаффолде клеточными автоматами

Клеточные автоматы являются дискретными динамическими системами, моделирование в которых производится на N -мерной дискретной сетке, каждая ячейка которой представляет собой часть моделируемого пространства. Состояние каждого элемента сетки изменяется последовательно шаг за шагом в соответствии с некоторыми локально определенными правилами перехода [106].

В работе [112] клеточные автоматы были использованы для моделирования роста фибробластов в виде монослоя. В результате моделирования было определено время засева клеток, их адгезия и время пролиферации. Полученная модель может быть использована для предсказания более быстрого роста клеток при различных местах их засева.

В работе [113] клеточные автоматы были использованы для моделирования заполнения модельного скаффолда клеточной культурой. В модели рассматривалось поведение клеточных культур на поверхности скаффолда, а именно процессы их деления и перемещения с учетом возможности их столкновения между собой и остановки. В модели не учитывалось лимитирование по субстрату. Динамика перемещения и деления клеточных культур описывалась дискретным методом при помощи клеточного автомата, состоящего из N двумерных квадратных ячеек со стороной ΔL . В рассматриваемой модели у ячейки

возможны два состояния: когда в ней находится клетка, которая в данный момент ее жизненного цикла движется в определенном направлении или неподвижна, либо ячейка пуста и доступна для перемещения или деления в нее клетки. В данной модели была реализована окрестность Мура - восемь соседних ячеек, расположенных вокруг центральной ячейки, куда клетка может переместиться или поделиться (рисунок 1.13). Расчет осуществлялся итеративно, рассматривая квазистационарный процесс на каждой итерации.



Рисунок 1.13 – Схематическое изображение клеточного автомата

В качестве кинетической модели роста клеток было взято уравнение Моно, из которого было определено среднее значение времени клеточного цикла $t_{д.ср}$:

$$\frac{1}{t_{д.ср}} = \mu = \mu_{max} \frac{C}{C+K_C} \quad (1.40)$$

где C – текущая концентрация питательных веществ (кг/м³), K_C – константа насыщения питательных веществ (кг/м³).

В описанной математической модели последовательно рассматривались следующие процессы: деление, перемещение, столкновение и контактное ингибирование клеточных культур по поверхности подложки, которые далее будут описаны более подробно.

Деление: для описания процесса пролиферации клеток счетчик k_d , определялся как:

$$k_D = \text{Int} \left(\frac{t_D}{\Delta t_c} \right) \quad (1.41)$$

где t_D – время клеточного цикла (ч), которое задается случайным образом.

Значение счетчика на каждом временном шаге Δt_c уменьшается на единицу, до тех пор, пока его значение не составит $k_D = 0$. В этом случае материнская клетка находится в состоянии деления: одна дочерняя клетка остается в текущей ячейке клеточного автомата, а вторая клетка занимает случайное вакантное место из ее окрестности. Вероятность занять вертикально и горизонтально отстраненные от центральной ячейки (север, юг, запад, восток) в два раза больше, чем занять угловые ячейки окрестности. Далее определялись счетчики деления для двух дочерних клеток.

В ходе цикла размножения клетка может перемещаться из одного положения в другое, и время ее деления может меняться. Это учитывалось через поправочный коэффициент:

$$\Delta k_D = \frac{\text{Int}(t_D(t) - t_D(t - \Delta t_c))}{\Delta t_c} \quad (1.42)$$

где t – текущее время деления клетки (ч).

Поправка счетчика необходима в тех случаях, когда могут быть приняты во внимание локальные изменения поля питательной среды. Соответственно, если коэффициент Δk_D отрицательный, то скорость деления клетки будет быстрее, в обратном случае клетки будут делиться медленнее из-за нехватки питательных веществ.

Перемещение: счетчик k_{Π} , отвечающий за случайное перемещение клетки по поверхности, был записан как:

$$k_{\Pi} = \text{Int} \left(\frac{t_{\Pi}}{\Delta t_c} \right) \quad (1.43)$$

где t_{Π} – время перемещения клетки (ч) выбирается случайным образом (от 1 до 4 часов).

Клетки перемещаются по сетке клеточного автомата с постоянной скоростью v , учитывая которую, рассчитывался временной интервал Δt_c :

$$\Delta t_c = \frac{\Delta L}{v} \quad (1.44)$$

В модели учитывалось, что каждая клетка рассматриваемой системы обладала индексом ее состояния m , который изменялся от 1 до 10. При $m = 1 - 8$ клетка подвергается постоянному перемещению в одном из 8 направлений (1 – север, 2 – восток, 3 – юг, 4 – запад, 5 – северо-восток, 6 – юго-восток, 7 – юго-запад, 8 – северо-запад). С каждой итерацией по Δt_c счетчик перемещения клетки уменьшался на единицу. При $k_{\Pi} = 0$ клетка меняла направление своего движения в зависимости от наличия свободных ячеек в своей окрестности.

Клеточное столкновение: при перемещении клеток по клеточному автомату две клетки могут сталкиваться и некоторое время не совершать никаких движений. Это было учтено при помощи времени столкновения t_{CT} , значение которого было взято за константу, равную 4 ч. В этом случае индекс состояния клетки $m = 9$, и время перемещения клетки t_{Π} в формуле 1.43 заменялось на величину t_{CT} . Тогда счетчик k_{Π} равен:

$$k_{\Pi} = \text{Int} \left(\frac{t_{CT}}{\Delta t_c} \right) \quad (1.45)$$

По истечению времени столкновения t_{CT} по достижению значения $k_{\Pi} = 0$, клетка продолжает случайным образом совершать перемещение по клеточному автомату по описанным выше правилам перехода состояний.

Контактное ингибирование: при достижении значения $k_{\Pi} = 0$ (клетка готова к делению) в системе происходит проверка на присутствие свободных ячеек в ее окрестности, куда бы дочерняя клетка могла переместиться. При отсутствии вакантных ячеек клетка начинает испытывать контактное ингибирование, которое математически выражается изменением счетчика деления $k_{\Pi} = 1$ и индексом состояния клетки $m = 10$. В этом случае клетка не будет делиться, а будет ждать возникновения вакантной ячейки в окрестности. То же самое происходит и в случае отсутствия свободных ячеек для перемещения клетки при значении счетчика перемещения $k_{\Pi} = 0$. В этой ситуации клетка также находится в состоянии контактного ингибирования, а счетчик перемещения принимает значение $k_{\Pi} = 1$.

При решении описанной математической модели затрачивалась большая вычислительная мощность, и соответственно на процесс расчета должно было

отводиться длительное время, поэтому рассматриваемая область моделирования (поверхность подложки) была разбита на 4 одинаковые части, и расчет для каждой из подсистемы проводился отдельно с использованием *открытых* и *закрытых граничных условий*. Например, для подсистемы в правом верхнем углу (рисунок 1.14) были реализованы закрытые граничные условия (1 и 2), в которых происходит накопление клеток на границах предоставленной площади поверхности подложки, и открытые граничные условия (3 и 4), где клетки не накапливаются, а переходят в другую часть рассматриваемой системы.

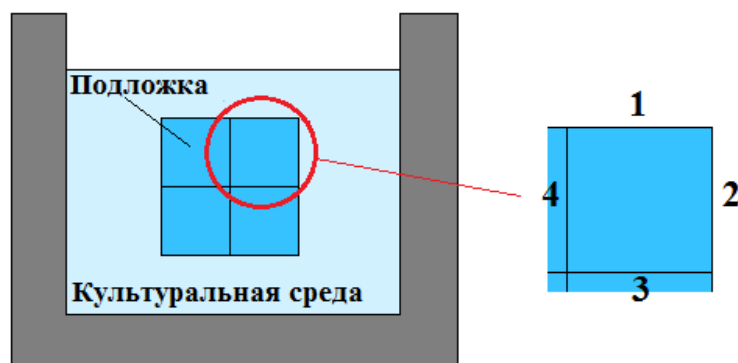


Рисунок 1.14 - Схематичное изображение культуральной системы и рассматриваемой подсистемы моделирования (в правом верхнем углу)

В процессе культивирования клеток млекопитающих поток субстрата диффундировал в поры подложки и далее поглощался клетками, как описано:

$$\frac{\partial c}{\partial t} + \nabla J = -\varepsilon(x) \cdot Q_{max} \cdot \frac{c}{c + K_c} \quad (1.46)$$

где ε – функция пространственного положения, которая принимает значения $\varepsilon = 1$, если в окрестности ячейки присутствует заполненная клетка, и $\varepsilon = 0$ если ее нет; Q_{max} – предельное значение потока питательных веществ (кг/(м³·ч)); c – концентрация субстрата; J – поток питательной среды (кг/(м²·ч)), который описывается следующим уравнением:

$$J = -D_{эфф} \nabla C \quad (1.47)$$

где $D_{эфф}$ – коэффициент эффективной диффузии ($\text{м}^2/\text{ч}$), отражающий перенос вещества через поры подложки.

При решении уравнения распределения концентрации субстрата могут быть получены значения его концентраций на каждом этапе по времени, которые затем учитываются при описании процесса деления клеток в клеточном автомате.

Рассмотренная гибридная математическая модель на основе клеточного автомата позволяет определить динамику роста клеточных культур во времени с учетом индивидуального поведения клеток: их миграции и пролиферации, с явлениями клеточного столкновения и контактного ингибирования. Помимо этого, в ней учитывается изменение концентраций питательных веществ с учетом их диффузии через поры подложки. С помощью данной модели процесс культивирования может быть оптимизирован путем изменения техники посева клеточных культур, и может быть определена эффективность роста клеточных культур на подложках определенного состава и геометрии.

1.2.5 Некоторые аспекты моделирования гидродинамики и тепломассообмена в биореакторах для культивирования клеток млекопитающих

Как уже было упомянуто, моделирование процессов, протекающих в биореакторах, отличается высокой сложностью. Учет гидродинамической составляющей математической модели биореактора представляет собой основу в структуре математического описания процесса в целом [1, 2]. Большое значение имеет здесь определение структуры потоков, свойственной тому или иному типу биореактора, что позволяет затем обосновано проводить перенос результатов лабораторных экспериментов на промышленные аппараты, т.е. осуществлять масштабирование процесса.

Среди используемых гидродинамических моделей основными являются модель идеального смешения, идеального вытеснения, диффузионная, ячеечная, комбинированная. Однако для процессов, протекающих с участием клеток млекопитающих, стоит отметить некоторые аспекты, которые накладывают дополнительные проблемы в связи с их особой чувствительностью к различным

стрессовым воздействиям, в первую очередь, воздействию гидродинамической обстановки в реакторе. Например, моделирование гидродинамической обстановки в биореакторах с мешалками (смешения или со взвешенным слоем микроносителей) обычно проводится на основе модели идеального смешения. Ячеечная модель может быть использована в случае каскада биореакторов, каждый из которых представляет собой реактор идеального смешения. Для биореактора со слоем насадки можно применять диффузионную модель ил ячейную модель с обратными потоками при секционировании слоев насадки.

Следующим важным аспектом, который необходимо учитывать при рассмотрении гидродинамической обстановки в биореакторе, является показатель уровня смешения или степень сегрегации I [1, 2]. Это касается в первую очередь биореакторов с неадгезионным типом клеток (смешения, эрлифтных, волновых). В перемешиваемом биореакторе возможны два крайних состояния смешения: перемешивание жидкости на уровне «жидких частиц» - состояние сегрегации ($I=1$) и второй вариант смешения на молекулярном уровне (при этом $I=\min$). Промежуточные состояния также возможны. Другими словами, в биореакторе могут присутствовать клеточные агломераты, глобулы дисперсной фазы, что может привести к недостаточному снабжению клеток элементами питательной среды. Разрушение агломератов может произойти только при создании определенной турбулентности в реакторе, когда характеристический размер турбулентных пульсаций η будет сравним с размером клеточного агрегата:

$$\eta = \left(\frac{\nu^3}{\varepsilon} \right)^{1/4} \leq d_{\text{агр}} \quad (1.48),$$

где ν – кинематическая вязкость, ε - скорость диссипации энергии.

Что касается биореакторов с адгезивным типом клеток, необходимо учитывать сдвиговое напряжение в зависимости от режима подачи питательной среды, при котором не произойдет отрыва клетки от поверхности носителя, что может привести к ее гибели.

Протекание тепломассообменных процессов в биохимических реакторах связано с транспортом питательных веществ и продуктов метаболизма, а также переносом энергии (поглощение и выделение тепла при биохимических превращениях). Скорость потребления питательных веществ клеткой связано не только со скоростью биохимических реакций, но и со скоростью их доставки к клеткам.

В общем, можно записать балансовое уравнение для транспорта и расхода веществ в объеме V для i -ого компонента [2]:

$$\frac{dC_i}{dt} = vC_0 - R(C)V - vC \quad (1.49),$$

где C_i, C_0 – текущая и начальная концентрации компонента, соответственно.

Особенностью всех процессов с участием клеток млекопитающих является их проведение при обязательном присутствии кислорода. Поскольку кислород плохо растворим в жидкости, лимитирующей стадией транспорта кислорода будет стадия перехода «газ - жидкость» или «жидкость – клеточный агломерат» для сегрегированной системы. В практических расчетах скорости массопередачи кислорода из газовой фазы в жидкую пользуются понятием объемного коэффициента массопередачи $K_L a$ или поверхностного коэффициента $K_L d$. Обычно используют полуэмпирические формулы, например:

- для аэрируемого реактора с мешалкой

$$K_L a = C(N/V)^m W_r^n \quad (1.50),$$

где N/V – удельная мощность, W_r – линейная скорость газа, $m = 0.95$, $n = 0.67$;

- для реактора с лопастной мешалкой

$$K_L a = C(N/V)^m \varphi^n \quad (1.51),$$

где φ – газосодержание.

Кроме того, достаточно часто используется балансовая зависимость по кислороду, учитывающая ферментационный процесс:

$$\frac{dC_i}{dt} = K_L a (C_L^* - C_L) - q_{O_2} \quad (1.52),$$

где $q_{O_2} = \alpha^{O_2} \mu X$ – удельная скорость потребления кислорода, α^{O_2} – расходный коэффициент по кислороду, C_L^* и C_L – равновесная и текущая концентрация растворенного кислорода.

Для аэробных процессов с участием клеток млекопитающих концентрация растворенного кислорода в реакторе должна превышать критическое значение, определяемое в каждом конкретном случае, чтобы избежать лимитирования по кислороду.

В качестве примера рассмотрим математическую модель биореактора для условий идеального смешения при избытке кислорода, реализуемую, главным образом, в реакторах небольшого объема с интенсивным механическим перемешиванием среды, исключающим образование застойных зон или байпасных потоков [1]. В качестве кинетической зависимости было использовано уравнение Моно.

Закон сохранения массы для реактора идеального смешения записывается в виде:

$$\begin{cases} v \cdot X_0 + \mu(S, X, \dots) \cdot X \cdot V = v \cdot X + V \frac{dX}{dt} \\ vS_0 - \alpha^S \mu(S, X, \dots) \cdot X \cdot V = v \cdot S + V \frac{dS}{dt} \end{cases} \quad (1.52),$$

где V – объем среды в аппарате; v – проток через аппарат; X, S – концентрации клеток и субстрата в среде (индекс 0 относится к исходным концентрациям); $\mu(S, X, \dots)$ – общий вид удельной скорости роста клеток; α^S – расходный коэффициент по субстрату.

Заменяя $v/V=D$, где D – скорость протока или скорость разбавления, $ч^{-1}$), систему уравнений примет вид:

$$\begin{cases} \frac{dX}{dt} = D(X_0 - X) + \mu X \\ \frac{dS}{dt} = D(S_0 - S) - \alpha^S \mu X \end{cases} \quad (1.53)$$

При условии установившегося непрерывного процесса в биореакторе и использовании уравнения Моно уравнения примут вид:

- для нестационарного режима:

$$\begin{cases} \frac{dX}{dt} = D(X_0 - X) + \frac{\mu_m \cdot S}{K_S + S} X \\ \frac{dS}{dt} = D(S_0 - S) - \alpha^S \frac{\mu_m \cdot S}{K_S + S} X \end{cases} \quad (1.54)$$

- для стационарного режима:

$$\begin{cases} D(X_0 - X) + \frac{\mu_m \cdot S}{K_S + S} X = 0 \\ D(S_0 - S) - \alpha^S \frac{\mu_m \cdot S}{K_S + S} X = 0 \end{cases} \quad (1.55)$$

Для конкретного микробиологического процесса вид кинетических закономерностей и значения кинетических констант находятся, как правило, эмпирическим путем. Если для процесса не является применимым ни одно из общих, наиболее часто используемых уравнений, то необходимо разрабатывать свои кинетические уравнения, исходя из того, какие факторы наиболее существенно влияют на проведение процесса.

Таким образом, систематизированы кинетические модели и выведены соотношения, позволяющие объединять кинетические модели с моделями гидродинамики. Данные выводы и результаты могут служить основой для автоматизированного синтеза необходимой математической модели процесса.

1.3 Использование вычислительной гидродинамики (CFD) для моделирования биотехнологических процессов

В настоящее время для моделирования многочисленных биотехнологических процессов широко используются методы вычислительной гидродинамики, в частности, программные пакеты CFD (Computational fluid dynamics) [114 - 118]. CFD продукт содержит в себе комплекс программ, подходящих для проектирования, расчетов и решения проблем, связанных с описанием потоков жидкости.

Поскольку базовые операции, которые обычно используются в биотехнологических процессах, такие как: ферментация, центрифугирование, хроматография, ультрафильтрация, микрофильтрация, сублимационная сушка - зачастую носят комплексный характер, возникает необходимость более глубокого

понимания поведения исследуемой системы в различных технологических условиях. Для изучения таких процессов необходимо проведение большого количества экспериментов, чего можно избежать благодаря моделированию процессов с помощью пакетов CFD. Изучение процесса с помощью вычислительной гидродинамики может быть использовано для проведения наиболее эффективного и действенного эксперимента.

Процесс ферментации и/или культивирования клеток включает в себя помещение клеток в биореактор с последующим добавлением различных компонентов среды. Как правило, процесс смешивания является определяющим, и он необходим для увеличения массопереноса, который в свою очередь часто значительно влияет как на выход, так и на качество получаемого продукта. Смешивание по своей сути является еще и процессом, приводящим к повреждениям клеток, которые возникают из-за механических воздействий в процессе перемешивания. Так с одной стороны повышения скорости массопереноса в биореакторе можно достигнуть за счет увеличения скоростей вращения мешалки и/или подачи газа для аэрации. С другой стороны, все это приводит к возрастанию турбулентности, неблагоприятным образом влияющей на клетки за счет усиления механических воздействий (состояние механического и/или гидродинамического стресса). В связи с этим основной задачей моделирования таких процессов в пакетах CFD является достижения оптимального баланса этих двух явлений. Стоит отметить, что оптимальные условия зависят и от природы клеток, продукта, представляющего интерес, и других рабочих условий. Клетки растений и микроорганизмов являются более устойчивыми к перемешиванию, чем клетки млекопитающих, которые получают повреждения под воздействием механического стресса из-за отсутствия в своей структуре толстого целлюлозного слоя, поэтому моделирование в данном случае имеет большое значение [115].

Кроме того, использование вычислительной гидродинамики позволяет оценить влияние механической нагрузки и напряжения сдвига как на слой клеток, так и на используемую подложку. Так результаты моделирования могут послужить основой к конструированию подложек для клеток определенного типа.

CFD-пакеты широко используются для оптимизации конструкционных параметров биореактора, что может привести к экономии ресурсов и времени. Например, на основании результатов экспериментов и CFD моделирования были изучены характеристики потока во вращающейся колбе с хрящевой тканью [116]. В [119, 120] были рассчитаны процессы роста кости для перфузионном биореакторе и в титановом скаффолде, предназначенном для имплантации, соответственно.

Основной механизм первичного очищения сырья в большинстве случаев – это фильтрация, часто протекающая при использовании полупроницаемой мембраны с различной конфигурацией мембранного модуля: трубчатого, рулонного, половолоконного. Основной проблемой, стоящей перед биотехнологической промышленностью, является накопление осадка и забивка пор мембраны. В большей степени этому подвержены ультрафильтрационные мембраны, имеющие достаточно узкое распределение пор по размерам. CFD широко используется для расчета различных мембранных процессов, например, концентрирования белков на половолоконных мембранах [121], с учетом явления концентрационной поляризации [122].

При изучении баромембранных процессов CFD-моделирование часто используют как для прогнозирования движения потоков сквозь мембрану и распределения давления, так и для того чтобы обеспечить более точное описание процесса для скоростных изменений входного и выходного потоков, чем рассчитанных по закону Дарси. Кроме того, при помощи пакетов CFD можно посчитать крутящие моменты, силу механического сдвига и влияние вязкости жидкости на гидродинамику потоков через мембрану. Например, в работе [123] с помощью программного пакета CFD изучен эффект влияния геометрической формы микропор на микропотоки культуральной жидкости. Анализ гидродинамики выявил эллиптическую форму микроподложки как наиболее оптимальную, в отличие от подложки цилиндрической формы. В работе [124]

исследуют области мембраны, которые имеют более высокую тенденцию к накоплению осадка, чтобы с помощью регулирования рабочих условий снизить фактор загрязнения. В другом исследовании на основании экспериментальных данных и результатов CFD-моделирования было спрогнозировано влияние оседания частиц на поверхность микрофльтрационной мембраны [125].

Таким образом, данный вид моделирования является одним из инструментов оптимизации процессов, протекающих с участием жидких и газовых потоков в химическом и биотехнологическом производствах. Но следует отметить, что при математическом описании данный программный комплекс основывается на реальных моделях, заложенных в код системы. В связи с этим предпочтительно проводить экспериментальную проверку результатов моделирования для более точной оценки адекватности модели и возможности скорректировать полученные результаты.

На основании проведенного литературного обзора можно сделать следующие выводы:

1. В настоящее время культивирование клеток млекопитающих является актуальной задачей. Полученные клетки могут быть использованы для различных целей: либо для получения различных биофармацевтических продуктов, например, терапевтических белков, вакцин, вирусов и т.д., либо для выращивания клеточной массы в целях регенеративной медицины.
2. В зависимости от вида клеток (суспензионный или адгезивный тип) должны подбираться тип подложки и вид биореактора.
3. Для прогнозирования и оптимизации процессов клеточного роста широко применяется математическое моделирование. Наиболее перспективным является использование готовых программных пакетов, например CFD, с учетом описания особенностей кинетики роста клеток уравнениями различной сложности.

Целью диссертационной работы является математическое моделирование половолоконного мембранного биореактора для культивирования клеток млекопитающих.

Для достижения заданной цели поставлены следующие научно-технические задачи:

1. Проведение экспериментальных исследований культивирования клеток млекопитающих на примере культуры клеток Chinese Hamster Ovary (CHO) в половолоконном биореакторе и моделирование кинетических зависимостей.
2. Анализ возможности использования вычислительной гидродинамики (CFD) для расчета гидродинамики потоков в мембранных биореакторах. Выбор геометрии сетки для оптимизации времени расчетов и точности решения.
3. Математическое моделирование гидродинамики потоков в половолоконном мембранном биореакторе при помощи CFD (20 волокон).
4. Проведение вычислительного эксперимента по модели с целью определения оптимального способа подачи питательной среды во внутриволоконное пространство (ВП) и его выбор на основе оценки энергоэффективности процесса.
5. Анализ возможности противоточного и прямоточного режимов подачи питательной среды в межволоконное пространство (МП).
6. Создание технологической схемы процесса культивирования клеток в мембранном биореакторе.
7. Проведение масштабирования процесса в большем по размеру половолоконном биореакторе (60 волокон).

Для реализации поставленных задач была разработана стратегия исследования и моделирования гидродинамики и массообмена в половолоконном мембранном биореакторе (на примере культивирования клеток млекопитающих), представленная на рисунке 1.15.

Стратегия исследования и моделирования половолоконного биореактора



4

Рисунок 1.15 – Стратегия исследования и моделирования гидродинамики и массообмена в полволоконном мембранном биореакторе

Реализация всех этапов стратегии исследования и моделирования гидродинамики и массообмена в полволоконном мембранном биореакторе представлена в последующих главах диссертации.

2. Экспериментальные и аналитические исследования

2.1 Особенности роста культуры клеток Chinese Hamster Ovary в половолоконном биореакторе

В качестве объекта исследования были использовали клетки постоянной клеточной линии, полученной на материале клеток СНО, как одной из наиболее распространенных в исследовательских работах. Данный вид клеточной культуры является одним из наиболее устойчивых к различным изменениям условий культивирования, в связи с чем их часто называют млекопитающим аналогом бактерии *Escherichia Coli*. Клетки этой линии способны расти как на поверхности подложки, так и в биореакторах суспензионного типа. Однако при определенных условиях в стационарной фазе роста данные клетки способны образовывать монослой. Они не склонны к миграции, поскольку относятся к эпителиоподобному клеточному типу.

Характер роста клеточной культуры в значительной степени зависит от двух факторов: контактного ингибирования движения и контактного ингибирования роста. Контактное ингибирование роста способствует формированию монослоя и препятствует образованию многослойных клеточных структур. Тем не менее многие клетки постоянных линий, являясь трансформированными, не склонны к образованию многослойных структур и растут преимущественно в виде монослоя.

Рост клеток в половолоконном мембранном биореакторе

Половолоконный мембранный биореактор состоит из цилиндрического корпуса, в котором расположены полые мембранные волокна. Корпуса аппаратов изготавливают из таких материалов как органическое стекло, полистирол или поликарбонат. В качестве материала для мембранных волокон в биореакторах, применяемых для выращивания клеток, используют пористые полимерные материалы, например, полисульфон, полиметилметакрилат. Каждое мембранное волокно является подложкой для клеток. Благодаря компактному расположению

полых волокон значительно возрастает площадь мембранной поверхности по сравнению с мембранными биореакторами других типов, что позволяет обеспечить высокую плотность клеток (таблица 1.3). Многие производители проводят дополнительную химическую обработку поверхности волокон для увеличения адгезивных свойств материала с целью создания более комфортных условий для роста клеток на подложке.

При изучении движения потоков питательной среды в подобных аппаратах в научной литературе пространство внутри реактора разделяют на две части: межволоконное пространство (МП) или ECS («extracapillary space») и внутриволоконное пространство (ВП) или ICS («intracapillary space» или «lumen») (рисунок 2.1).

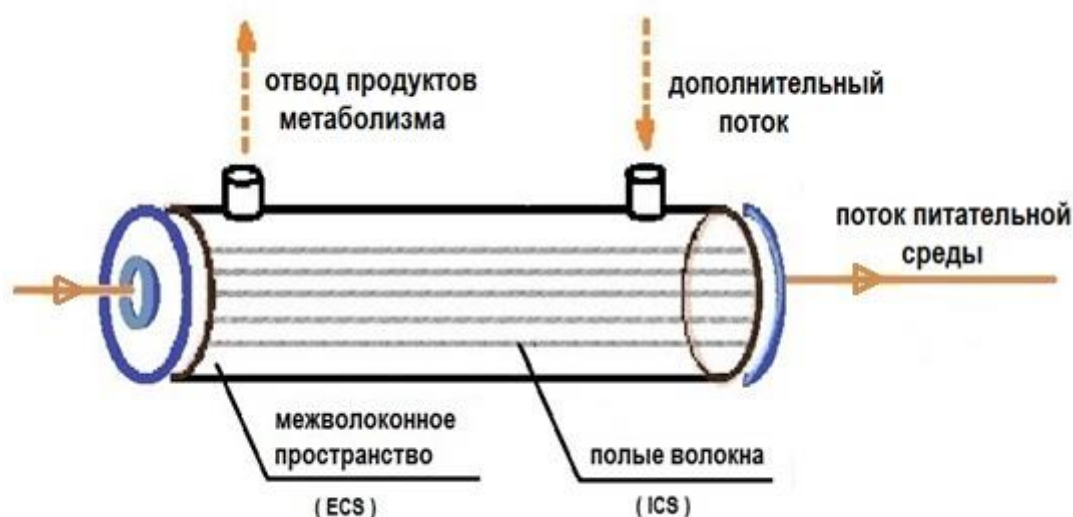


Рисунок 2.1 – Схематичное изображение полуволоконного мембранного биореактора

Для культивирования клеток млекопитающих используется следующий принцип действия: верхние отверстия в корпусе биореактора служат для размещения клеток в межволоконном пространстве и для отвода метаболитов, а также при необходимости для подачи дополнительного потока питательной среды. Во фронтальные патрубки биореактора поступает основной поток питательной

среды во внутриволоконное пространство биореактора. Часть питательной среды проходит сквозь поры в волокне (пермеат) и попадает непосредственно к клеткам для обеспечения их необходимыми веществами для роста и жизнедеятельности (рисунки 2.2 и 2.3). Непрошедший поток питательной среды выходит из биореактора (ретентат).

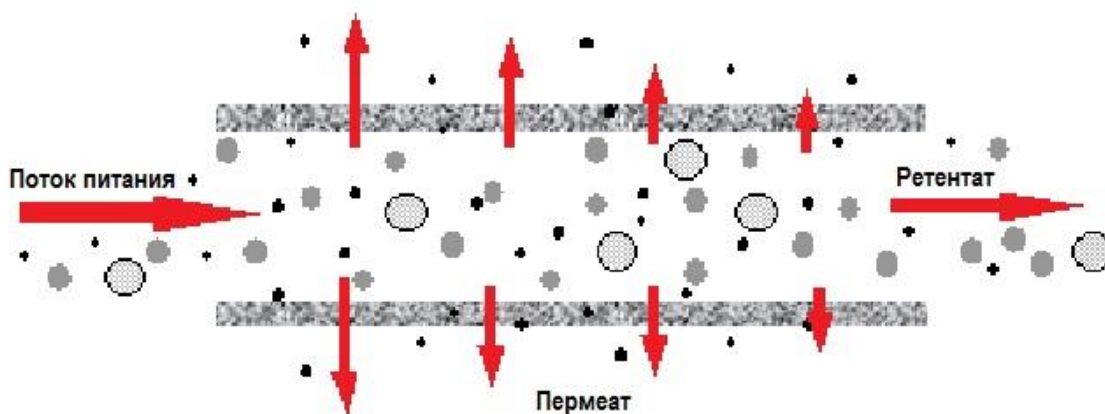


Рисунок 2.2 – Схематичное изображение движения потока питательной среды и пермеата во внутриволоконном пространстве

Рисунок 2.3 – Основные компоненты процесса, протекающего в половолоконном мембранном биореакторе

Клетки могут расти как на внешней, так и на внутренней поверхности волокна. В большинстве случаев клетки млекопитающих располагают на внешней поверхности волокна для их более удобного извлечения из объема аппарата. В зависимости от конструкционных особенностей биореактора и вида клеточной культуры возможен как монослойный, так и многослойный рост клеток. Так, слой клеточной культуры СНО в половолоконном мембранном биореакторе может быть толщиной в одну клетку, а клетки эмбриональных тканей – в несколько клеток.

На рисунке 2.4 приведена схема подключения лабораторного половолоконного мембранного биореактора, который чаще всего используется в научно-исследовательских центрах для изучения процессов роста и размножения клеток адгезивного типа.

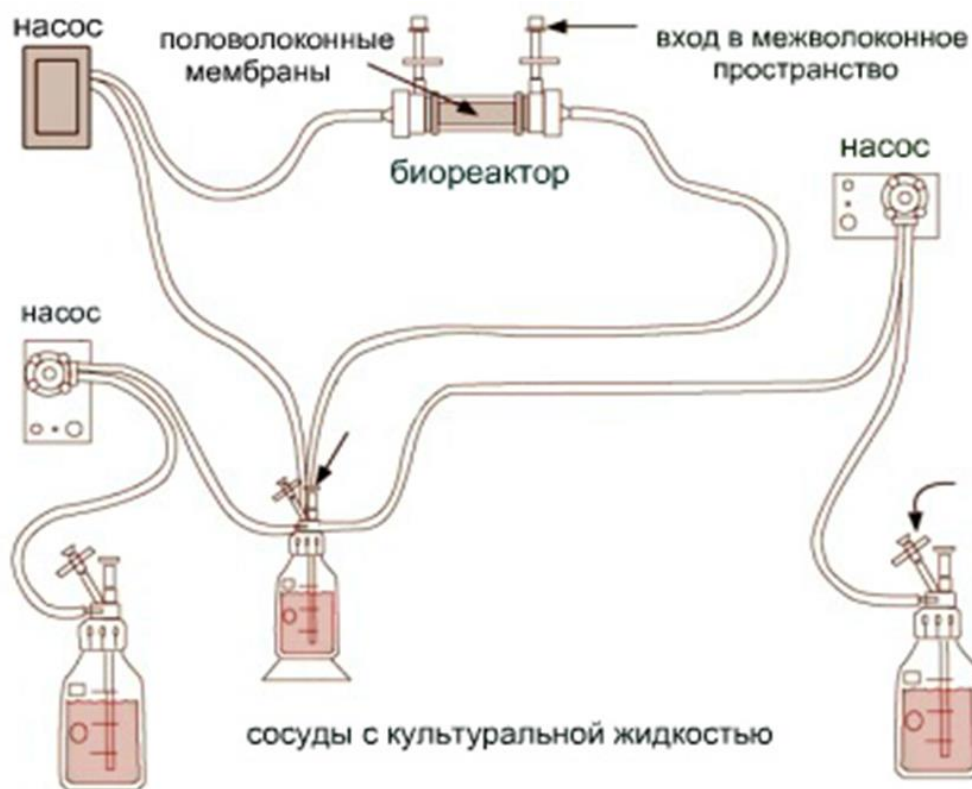


Рисунок 2.4 – Схема подключения полволоконного мембранного биореактора в фармацевтических и фармакокинетических исследованиях

В результате проведения сравнительного анализа данных о существующих конструкциях биореакторов, используемых для культивирования клеток млекопитающих и представленных в разработанной базе данных [126], был сделан вывод, что полволоконный мембранный биореактор (особенно одноразовый) является одним из наиболее востребованных аппаратов, особенно для целей персонифицированной медицины, например, для выращивания стволовых клеток, и в тоже время дорогостоящим биофармацевтическим оборудованием. Таким образом, проведение математического моделирования процессов гидродинамики и массообмена в биореакторах такого типа будет являться очень важным этапом подготовки, планирования эксперимента и дальнейшего использования.

2.2 Исследование пористости полуволоконной мембраны

Для моделирования полуволоконного мембранного биореактора необходимо определить основные параметры мембраны. Одними из основных характеристик мембран являются пористость и проницаемость. Для исследования структуры и поверхности изучаемой полуволоконной мембраны был использован метод сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Данный метод исследования имеет широкое применение для решения конкретных научных и технологических задач вследствие высокой информативности и достоверности получаемых результатов исследования.

Экспериментальные исследования полуволоконной мембраны были проведены на сканирующем электронном микроскопе в Центре коллективного пользования РХТУ им. Д.И. Менделеева. Образцы для исследования были подготовлены с наличием срезов различного типа: ровный срез скальпелем вдоль и поперек волокон, разрыв волокна. В результате были получены увеличенные изображения пористой структуры волокна (рисунок 2.5) и его поверхности (рисунок 2.6).

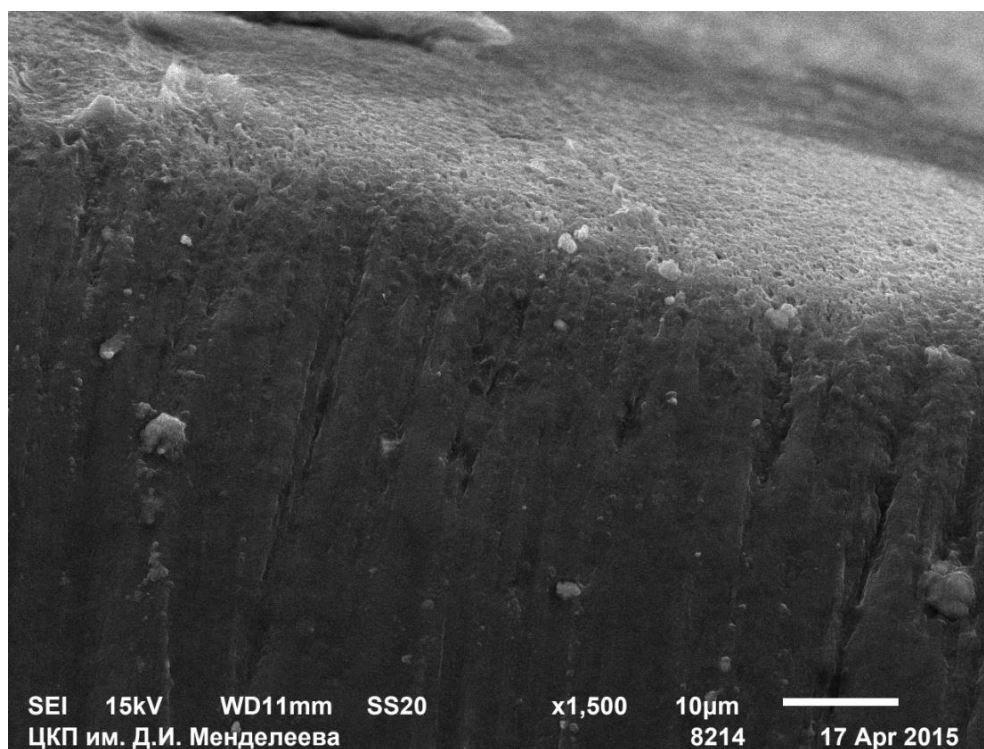


Рисунок 2.5 – Фотография поперечного сечения половолоконной мембраны, полученная с помощью СЭМ

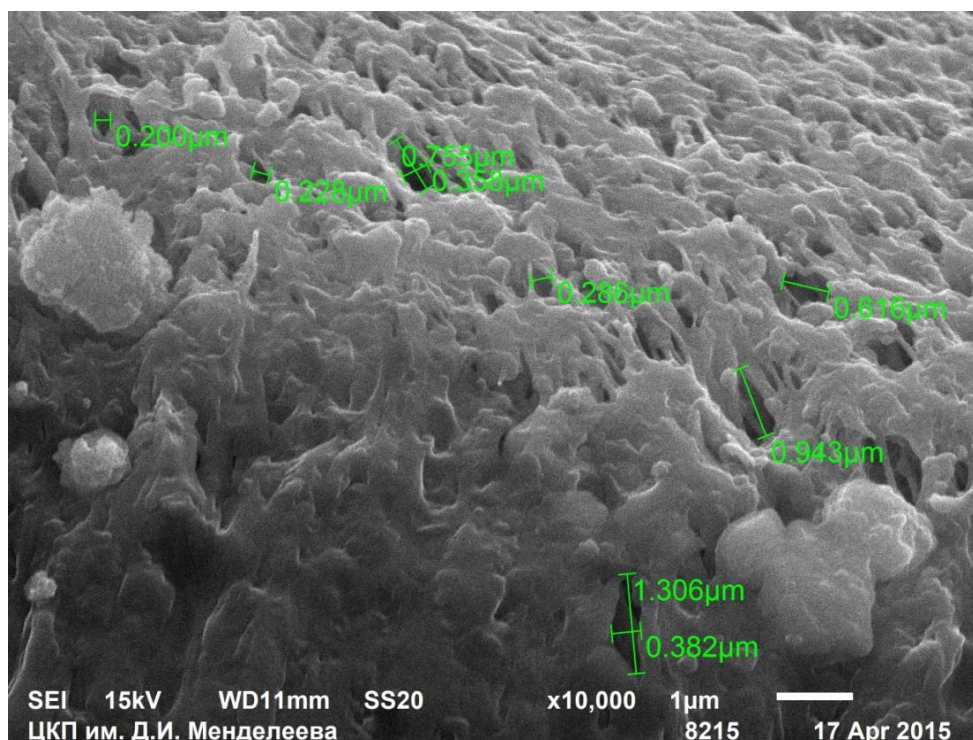


Рисунок 2.6 – Фотография поверхности половолоконной мембраны, полученная при помощи СЭМ

В результате экспериментальных исследований была подтверждена пористая структура полого волокна (рисунок 2.5). Были получены значения размеров пор мембраны, лежащие в пределах от 0,15 до 1,35 мкм. Полученные поры соответствуют процессу микрофльтрации. В последующих расчетах было принято среднее значение размера пор половолоконной мембраны, равное 0,7 мкм. Количество пор на единицу поверхности мембраны составило $2.5 \cdot 10^6$ шт/см².

2.3 Экспериментальные исследования по изучению кинетики роста клеток СНО

Изучение кинетики роста клеток СНО было сделано путем проведения 3-х серий экспериментов по культивированию клеток в чашках Петри. Данный способ достаточно удобен для периодического измерения количества клеток в

исследуемом объеме, что позволяет построить кинетическую кривую роста клеток и рассчитать основные характеристики процесса.

Используемые в эксперименте материалы:

Стерильные:

- клетки культуры CHO;
- ростовая питательная среда DMEM/F-12 без антибиотиков;
- трипсин, 0,25% в D-PBSA, 10 мл;
- D-PBSA с 1 mM EDTA, 20 мл;
- пипетки, градуированные и заткнутые пробками;
- пипетки без пробок для удаления среды, перистальтический насос или вакуумная линия;
- универсальные контейнеры или 50-мл центрифужные пробирки;
- чашки Петри, 25 см².

Нестерильные:

- пипетирующее устройство;
- шланг трубки на приемник, связанный с вакуумной линией или перистальтическим насосом;
- этанол 70% в бутылке с пульверизатором;
- безворсовые салфетки или тампоны для протирки;
- адсорбирующие бумажные полотенца;
- цилиндр для пипеток, содержащий воду и дезинфектант;
- ручка-маркер с этанол-нерастворимыми чернилами;
- записная книжка, ручка, протоколы и т. д.;
- автоматизированный счетчик клеток компании Invitrogen (IVGN).

Длительность эксперимента составила 6 суток. Одинаковое количество клеток культуры CHO ($2 \cdot 10^5$ шт.) были помещены в 6 чашек с 7 мл ростовой питательной среды DMEM/F-12 каждая. Каждые сутки из одной из культуральных чашек проводили отбор проб для исследования количества клеток и концентрации глюкозы в питательной среде.

В качестве питательной среды была использована стандартная среда DMEM/F-12, используемая для культивирования клеток и тканей млекопитающих. Она представляет собой смесь 1:1 питательной среды DMEM и F-12. pH была 7.0-7.4, осмолярность составила 260-320 мосмоль/кг. Стандартная питательная среда содержит солевой состав, наиболее приближенный к составу естественной среды ткани при соответствующем pH, включая аминокислоты, витамины, производные нуклеиновых кислот, углеводы, жиры и их производные. Основным компонентом питательной среды, по которому в дальнейшем проводились расчеты, являлась глюкоза. Компоненты питательной среды свободно проходят через поры микрофльтрационной мембраны.

Основные характеристики питательной среды при 37°C представлены в таблице 2.1.

Таблица 2.1 – Основные характеристики питательной среды, используемой для культивирования клеток СНО, при температуре 37 °C

Параметр	Значение
Плотность, кг/м ³	993
Динамическая вязкость, мПа*с	0,7

2.3.1 Методика культивирования клеток в чашках Петри

1. Подготовить ламинарный шкаф, реактивы и материалы, необходимые для выполнения процедуры.
2. Тщательно проверить культуры на признаки ухудшения или заражения.
3. Провести субкультивирование клеток.
4. Перенести чашки с культурой в стерильную рабочую зону, удалить и вылить среду.
5. Добавить D-PBSA/EDTA для предварительной промывки (0,2 мл/см²), направляя струю на сторону, противоположную прикрепленным клеткам так, чтобы избежать смещения клеток. Затем произвести осторожное полоскание клеток, удалить раствор. Этот шаг предназначен для удаления следов сыворотки, которая

ингибирует действие трипсина и истощает двухвалентные катионы, необходимые для прикрепления клеток.

6. Добавить трипсин ($0,1 \text{ мл/см}^2$), направляя струю к стороне чашки, противоположной расположению клеток. Повернуть чашки, положить их так, чтобы монослой был полностью закрыт раствором трипсина. Оставить чашки в таком положении на 15-30 секунд.

7. Поднять чашки так, чтобы удалить трипсин с монослоя, быстро проверить, не отделяется ли монослой от подложки. Использование трипсина при 4°C помогает предотвратить преждевременное отделение.

8. Удалить раствор, оставив несколько капель трипсина.

9. Инкубировать чашки в таком положении, чтобы клетки находились горизонтально до тех пор, пока клетки не примут форму сферы. Затем при наклоне чашки монослой должен скользить вниз по поверхности (это обычно происходит после 5-15 мин. инкубирования). Не следует оставлять чашки с добавленным трипсином дольше, чем необходимо, но, с другой стороны, не следует механическим путем способствовать откреплению клеток. Необходимо также следить, чтобы не образовывались комки.

10. Добавить среду ($0,1\text{-}0,2 \text{ мл/см}^2$) и смыть клетки повторным пипетированием по поверхности монослоя.

11. Пипетировать клеточную суспензию вверх и вниз несколько раз с таким положением наконечника, при котором не создается пена. Обычно несколько движений вверх-вниз достаточно для образования суспензии единичных клеток. Однородность и гомогенность суспензии отдельных клеток существенны, если проводится количественная оценка клеточного деления или эффективность посева.

12. Подсчитать клетки при помощи автоматизированного счетчика клеток, записать полученные данные.

На рисунке 2.7 показаны стадии субкультивирования и цикла роста монослоя клеток после трипсинизации.

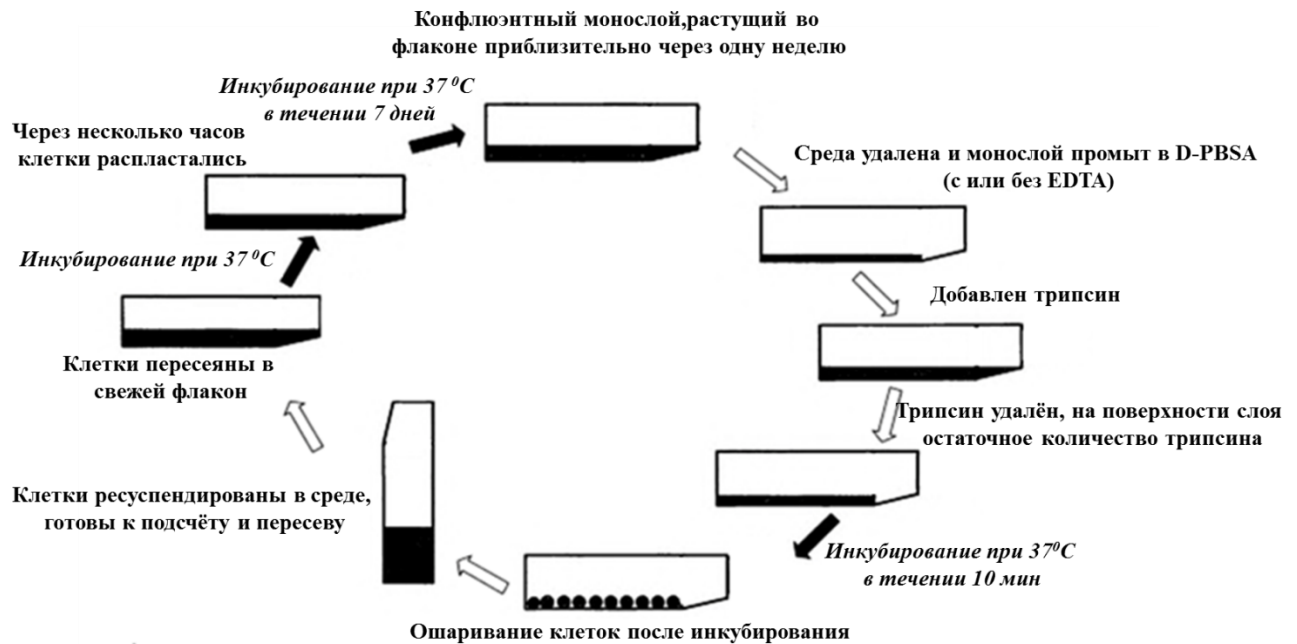


Рисунок 2.10 – Стадии субкультивирования монослоя и цикл роста клеток в монослое после трипсинизации

Автоматический счетчик клеток Countess компании Invitrogen (IVGN) был использован в качестве анализатора количества, размера и жизнеспособности клеток в образце. Счётчик позволяет определить плотность культуры клеток, средний размер, концентрации живых и мертвых клеток, долю живых клеток. Основными характеристиками автоматического счетчика являются:

- расход образца: 5 – 10 мкл;
- скорость анализа: 30 секунд на обработку одного образца;
- точность: исключение ошибок ручного подсчета, обусловленных человеческим фактором;
- воспроизводимость результатов;
- использование одноразовых слайдов для анализа;
- отсутствие необходимости калибровки прибора;
- возможность импорта данных
- цветной сенсорный экран: четкое отображение результатов.

Технические характеристики счетчика:

- метод детекции: колориметрия;
- объем слайда: 10 мкл;
- рекомендуемый размер клеток (в диаметре): 5 – 60 мкл;
- плотность культуры клеток: $10^4 - 10^7$ клеток/мл.

Для подсчета клеток 5 мкл суспензии клеток смешиваются с раствором трипанового синего, который полностью прокрашивает только мёртвые клетки. Полученный образец заливается в камеру рабочего слайда (толщина 100 мкм). Слайд вставляется в гнездо прибора. Прибор выводит увеличенное изображение образца на экран, обрабатывает его и отображает на экране результаты.

Для обработки результатов двух подсчетов и определения концентрации исследуемого образца была использована формула:

$$W = \frac{N}{V} \quad (2.1)$$

где W – концентрация клеток, штук/мл; N – количество подсчитанных клеток, штук; V – подсчитанный объем, мл.

Подсчет клеток при помощи автоматизированного счетчика клеток дает возможность в минимальный промежуток времени получить достоверную информацию о количестве клеток в пробе.

2.3.2 Методика определения концентрации глюкозы в питательной среде

Поскольку глюкоза является одним из основных компонентов питательной среды для клеток, определение ее концентрации является ключевой задачей при исследовании процесса культивирования. Концентрация глюкозы устанавливалась с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Диапазон определения массовой концентрации глюкозы — от 1,0 до 650,0 г/дм³ включительно. Диапазон определения массовой доли — от 0,3‰ до 60,0 ‰ включительно.

Метод основан на применении ион-эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с лигандно-обменным механизмом. Массовую

концентрацию глюкозы определяют рефрактометрическим детектором.

Используемые материалы:

1. Хроматограф для ВЭЖХ с рефрактометрическим детектором и термостатируемой хроматографической колонкой и программно-аппаратным комплексом сбора и обработки данных типа "Millenium 2000".
2. Колонка аналитическая длиной 300 мм и внутренним диаметром 6.5 мм, заполненная сульфированным сополимером полистирола и дивинилбензола в кальциевой ионной форме размером частиц 30 мкм.
3. Бумага фильтровальная лабораторная.
4. Микрошприцы для ВЭЖХ вместимостью 10, 100 и 250 мкл.
5. Весы лабораторные с пределом допускаемой абсолютной погрешности однократного взвешивания ± 0.1 мг.
6. Мини-насос лабораторный (к установке для дегазации элюента).
7. Центрифуга лабораторная с величиной фактора разделения (д-фактор) 800-1000.
8. Аппарат для встряхивания проб типа АВУ-6С.
9. Фильтры мембранные с диаметром пор 0,20 или 0,45 мкм для фильтрования подвижной фазы и проб.
10. Фильтры обеззоленные.
11. Пипетки градуированные 1-2-2-25 2-го класса или дозаторы пипеточные с аналогичным или изменяемым объемами доз с относительной погрешностью дозирования 1%.
12. Колбы мерные с притертой пробкой вместимостью 100, 1000 см³ с одной меткой.
13. Шприц медицинский вместимостью 5 см³.
14. Емкости для жидких проб (виалы) вместимостью 2-6 см³.
15. Установка для дегазации элюента.
16. Посуда лабораторная стеклянная:
 - колбы круглодонные вместимостью 1000 см³;

- воронки лабораторные;
- стаканы вместимостью 50, 100 и 1000 см³.

17. Вода дистиллированная.

18. Вода для лабораторного анализа первой степени чистоты.

19. Кальциевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (Са-ЭДТА), раствор массовой концентрации 10-20 мг/дм³.

20. Глюкоза с массовой долей основного вещества не менее 99.0 %.

Допускается применение других средств измерений, вспомогательного оборудования, не уступающих вышеуказанным по метрологическим и техническим характеристикам и обеспечивающим необходимую точность измерения, а также реактивов и материалов по качеству не хуже вышеуказанных.

Для определения массовой концентрации глюкозы пробу питательной среды разбавляют дистиллированной водой в соотношении 1:20. Для этого пипеткой отбирают 5 см³ пробы, помещают в мерную колбу вместимостью 100 см³, доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают.

Затем 1-2 см³ пробы отбирают в медицинский шприц через иглу. После этого заменяют иглу на фильтр с диаметром пор 0,20 или 0,45 мкм и отфильтровывают в виалу.

Молярную концентрацию или молярную долю глюкозы в пробе продукта рассчитывают по градуировочным зависимостям с учетом степени разведения. Данный способ широко распространен для исследования кинетики роста клеток. Вычисления проводят до третьего десятичного знака.

Обработку хроматограмм и расчет количественных характеристик проводят с помощью программно-аппаратного комплекса сбора и обработки данных, с использованием градуировочной зависимости:

$$c(x) = \frac{S_x \cdot V_2}{k \cdot V_1} \quad (2.2)$$

$$c(x) = \frac{S_x \cdot m_{\text{общ}}}{k \cdot m(x)} \quad (2.3)$$

или по формулам с использованием стандартных градуировочных растворов:

$$c(x) = \frac{c_{cm} \cdot S_x \cdot V_2}{S_{cm} \cdot V_1} \quad (2.4)$$

$$c(x) = \frac{c_{cm} \cdot S_x \cdot m_{общ}}{S_{cm} \cdot m(x)} \quad (2.5)$$

где $c(x)$ — молярная концентрация глюкозы в анализируемой пробе, ммоль/л; S_x — площадь пика анализируемого вещества; V_2 — вместимость мерной колбы, взятой для разбавления, л; k — градуировочный коэффициент, л/ммоль; V_1 — объем пробы, отобранной для измерения, л; $m_{общ}$ — масса пробы после разбавления, г; $m(x)$ — масса пробы до разбавления, г; c_{cm} — молярная концентрация глюкозы в стандартном растворе, ммоль/л; S_{cm} — площадь пика глюкозы в стандартном растворе.

2.3.3 Результаты экспериментов культивирования клеток СНО в чашках Петри

Результаты 3-х экспериментов по культивированию клеток СНО в чашках Петри приведены в таблицах 2.2 и 2.3, соответственно. Эксперименты были сделаны в ФГБУН Институте биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН.

Таблица 2.2 – Экспериментальные значения количества клеток в чашках Петри

Время, сутки	Количество клеток, шт			
	Эксперимент №1	Эксперимент №2	Эксперимент №3	Среднее значение
0	$1,50 \cdot 10^5$	$2,30 \cdot 10^5$	$2,20 \cdot 10^5$	$2,00 \cdot 10^5$
1	$2,31 \cdot 10^5$	$2,96 \cdot 10^5$	$2,92 \cdot 10^5$	$2,73 \cdot 10^5$
2	$5,57 \cdot 10^5$	$6,37 \cdot 10^5$	$8,31 \cdot 10^5$	$6,75 \cdot 10^5$
3	$1,40 \cdot 10^6$	$1,63 \cdot 10^6$	$1,47 \cdot 10^6$	$1,50 \cdot 10^6$
4	$2,72 \cdot 10^6$	$2,84 \cdot 10^6$	$3,17 \cdot 10^6$	$2,91 \cdot 10^6$
5	$5,03 \cdot 10^6$	$5,15 \cdot 10^6$	$5,81 \cdot 10^6$	$5,33 \cdot 10^6$
6	$6,16 \cdot 10^6$	$6,35 \cdot 10^6$	$6,99 \cdot 10^6$	$6,50 \cdot 10^6$

Таблица 2.3 – Экспериментальные значения концентрации глюкозы в чашках Петри

Время, сутки	Концентрация глюкозы, ммоль/л			
	Эксперимент №1	Эксперимент №2	Эксперимент №3	Среднее значение
0	29,5	29,8	30,1	29,7
1	28,9	29,0	29,3	29,0
2	28,3	28,2	28,4	28,2
3	26,5	26,1	26,3	26,2
4	25,7	25,3	25,4	25,4
5	21,74	21,23	20,82	21,16
6	15,09	14,39	13,21	14,13

Для последующих расчетов были взяты средние значения по количеству клеток и концентрации глюкозы.

Использование проверенных методик исследования требуемых величин и автоматического оборудования для подсчета клеток и высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения концентрации глюкозы дает достоверные результаты и способствует более полному пониманию изучаемого процесса и разработке адекватной модели.

2.4 Технологическая схема для культивирования клеток СНО в половолоконном мембранном биореакторе

Для дальнейшей постановки эксперимента по культивированию клеток СНО необходимо было разработать технологическую схему процесса, центральным элементом которой является волоконный мембранный биореактор, в качестве которого был выбран биореактор модели C2025 компании FiberCell Systems Inc. (рисунок 2.11). Параметры используемого волоконного мембранного биореактора, указанные производителем в паспорте оборудования, сведены в таблицу 2.4.

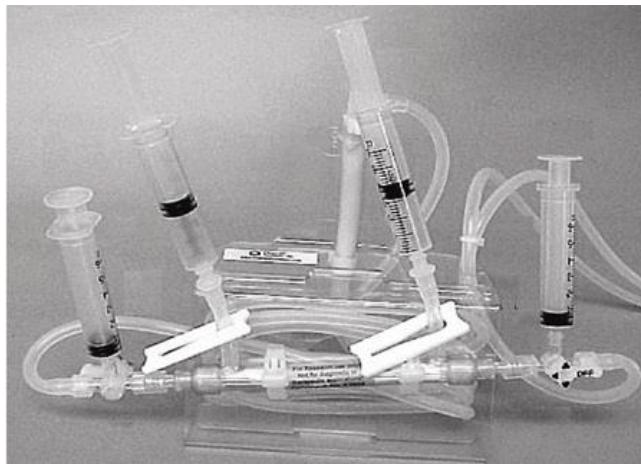


Рисунок 2.11 – Волоконный мембранный биореактор для культивирования
клеток млекопитающих C2025 компании FiberCell Systems Inc.

Разработанная технологическая схема процесса культивирования клеток СНО включает в себя приведённый выше волоконный мембранный биореактор, две питательные емкости со средами культивирования, а также необходимое вспомогательное оборудование. Принципиальная схема технологической схемы показана на рисунке 2.12. Список использованных на схеме обозначений приведен в таблице 2.5.

Таблица 2.4 – Параметры половолоконного мембранного биореактора
C2025 FiberCell System

Параметр	Значение
Количество волокон, шт	20
Внутренний диаметр мембраны (внутриволоконное пространство), мкм	700
Внешний диаметр мембраны, мкм	1300
Толщина мембраны, мкм	300
Длина мембранного волокна, см	11
Диаметр корпуса, мм	13
Длина корпуса, см	13

На рисунке 2.13 показана фотография экспериментальной установки, собранной на основе технологической схемы с указанием её основных частей в ФГБУН Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН.

Половолоконный мембранный биореактор (ПБ5) установлен внутри суховоздушного термостата – термошкафа (ТШ6). Термошкаф оснащён датчиком температуры и системой автоматического поддержания температуры и служит для обеспечения необходимых температурных условий процесса (37°C). С помощью силиконовых шлангов половолоконный биореактор соединён с насосным блоком (БН8), автоклавируемым сосудом (АС1) и рабочей камерой (РК4).

Подача питательной среды во внутриволоконное и межволоконное пространства половолоконного мембранного биореактора (ПБ5) осуществляется с использованием насосного блока (БН8). Насосный блок (БН8) оснащён двумя управляемыми перистальтическими насосами. Управление расходами подаваемых сред осуществляется путём изменения скорости вращения перистальтических насосов. Скорость вращения каждого из насосов задаётся отдельно. Установка скорости вращения может быть получена как от контроллера биопроцессов (КБ5) в автоматическом режиме, так и задана вручную с использованием потенциометров, установленных на панели управления насосного блока (БН8). При необходимости направление вращения каждого из перистальтических насосов может быть изменено путем переключения селекторов направления в соответствующее

положение. Все оборудование насосного блока (БН8) установлено в корпусе из нержавеющей стали. К входам насосного блока (БН8) с помощью силиконовых шлангов подсоединены автоклавируемый сосуд (АС1) и рабочая камера (РК4).

Автоклавируемый сосуд (АС1) представляет собой емкость объемом 5 литров, оснащённую перемешивающим устройством и служащую для асептического хранения питательной среды при температуре культивирования культур клеток ($37 \pm 1^\circ\text{C}$). Обечайка автоклавируемого сосуда (АС1) имеет цилиндрическую форму и выполнена из боросиликатного стекла PYREX производства фирмы SIMAX® (Чехия). Крышка и днище автоклавируемого сосуда (АС1) выполнены из нержавеющей стали. Крышка автоклавируемого сосуда (АС1) оснащена штуцерами, используемыми для подключения технологических шлангов и трубопроводов и для установки контроль-измерительных приборов. Неиспользуемые соединительные штуцеры могут быть герметично закрыты. Для проведения экспериментальных исследований на автоклавируемый сосуд (АС1) были установлены следующие дополнительные элементы:

- силиконовые шланги для возврата отработанной питательной среды из половолоконного реактора (ПБ5);
- датчик температуры Pt100;
- электрический нагреватель.

Электрический нагреватель размещен в металлической гильзе и служит для поддержания температуры в диапазоне от 24 до 42 °C с точностью $\pm 1^\circ\text{C}$.

Для вращения перемешивающего устройства на крышке реактора установлен электродвигатель. Передача крутящего момента от электродвигателя перемешивающему устройству осуществляется с использованием магнитной муфты.

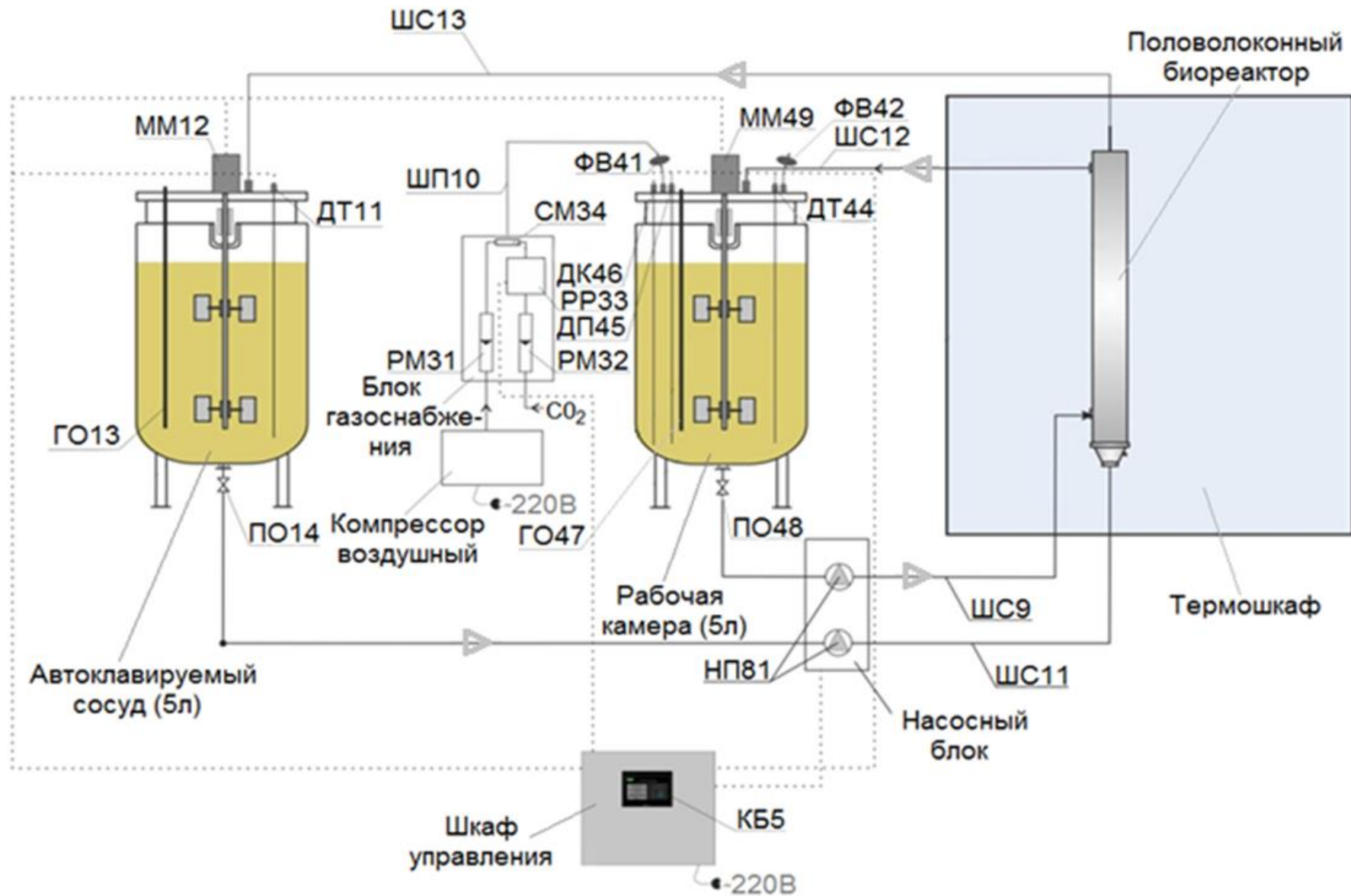


Рисунок 2.12 – Принципиальная схема экспериментальной установки с половолоконным мембранным биореактором

Таблица 2.5 – Список обозначений, используемых на принципиальной схеме экспериментальной установки

№ п/п	Условное обозначение	Наименование
1	АС1	Автоклавируемый сосуд объемом 5 л
2	ДТ11	Датчик температуры автоклавируемого сосуда
3	ММ12	Перемешивающее устройство автоклавируемого сосуда
4	ГО13	Погружной нагреватель автоклавируемого сосуда
5	ПО14	Вентиль выгрузки автоклавируемого сосуда
6	КВ2	Компрессор воздушный
7	БГ3	Блок газоснабжения
8	РМ31	Ротаметр расхода воздуха
9	РМ32	Ротаметр расхода CO ₂
10	РР33	Регулятор расхода CO ₂
11	СМ34	Смеситель воздуха и CO ₂
12	РК4	Рабочая камера объемом 5 л
13	ФВ41	Фильтр мембранный 0,2 мкм входящей газовой смеси
14	ФВ42	Фильтр мембранный 0,2 мкм выходящей газовой смеси
15	ДТ44	Датчик температуры рабочей камеры
16	ДП45	Датчик pH
17	ДК46	Датчик растворенного кислорода pO ₂
18	ГО47	Погружной нагреватель рабочей камеры
19	ПО48	Вентиль выгрузки рабочей камеры
20	ММ49	Перемешивающее устройство рабочей камеры
21	ПБ5	Половолоконный мембранный биореактор
22	ТШ6	Термошкаф (суховоздушный термостат)
23	ШУ7	Шкаф управления

№ п/п	Условное обозначение	Наименование
24	КБ5	Контроллер биопроцессов с цветным сенсорным дисплеем
25	БН8	Насосный блок
26	НП81	Насос перистальтический блока насосов (2шт.)
27	ШС9	Силиконовый шланг подачи питательной среды в межволоконное пространство биореактора
28	ШП10	Шланг PVC подачи газовой смеси в рабочую камеру
29	ШС11	Силиконовый шланг подачи буферного раствора во внутриволоконное пространство биореактора
30	ШС12	Силиконовый шланг возврата питательной среды в рабочую камеру
31	ШС13	Силиконовый шланг возврата буферного раствора в автоклавируемый сосуд

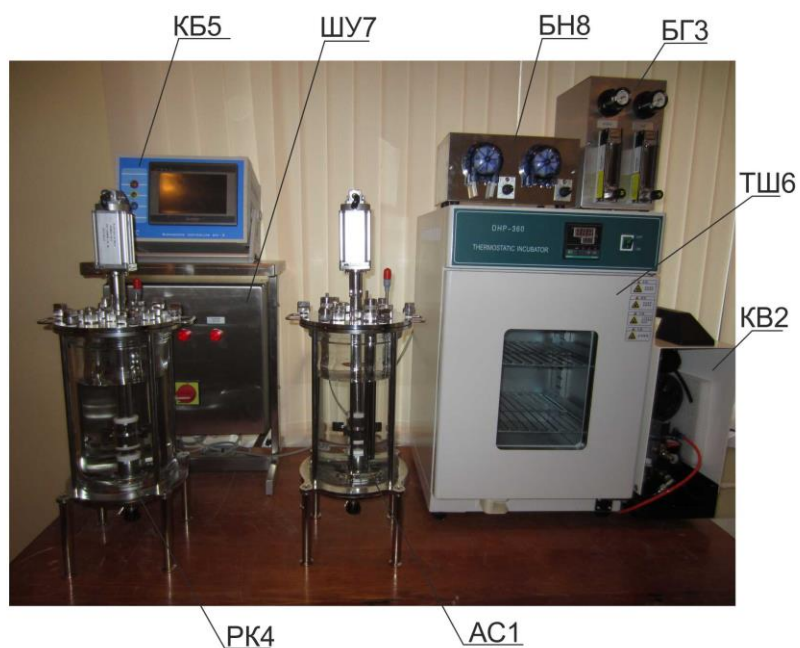


Рисунок 2.13 – Фотография экспериментальной установки в собранном виде с обозначением основных элементов

В днище автоклавируемого сосуда (АС1) установлен штуцер с вентилем выгрузки, через который осуществляется подача питательной среды в полволоконный реактор (ПБ5).

Конструкция используемой рабочей камеры (РК4) во многом аналогична конструкции автоклавируемого сосуда (АС1). Объем рабочей камеры (РК4) составляет 5 л (рабочий объем составляет 3,5 л). Основными элементами рабочей камеры являются: обечайка из боросиликатного стекла PYREX, крышка из нержавеющей стали с подсоединительными штуцерами для установки дополнительных компонентов и днище из нержавеющей стали со штуцером и вентилем выгрузки. Основной задачей рабочей камеры (РК4) является обеспечение асептического хранения питательной среды, непосредственно омывающей культуру клеток.

На рабочей камере дополнительно установлены следующие элементы:

- иглы - для подвода компонентов питательной среды;
- манометр (используется только для проверки герметичности);
- выходная игла для подключения выходного фильтра;
- датчик температуры;
- датчик pH (Mettler-Toledo, диаметр 12 мм, длина – 320 мм);
- датчик pO₂ (Mettler-Toledo InPro 6800, диаметр 12 мм, длина – 320 мм);
- гильза для расположения погружного нагревателя;
- барботёр.

Для перемешивания питательной среды в рабочей камере (РК4) предусмотрено перемешивающее устройство с электроприводом. Передача крутящего момента от электропривода осуществляется с использованием магнитной муфты.

Через один из штуцеров, установленных на крышке рабочей камеры (РК4), осуществляется возврат отработанной питательной среды от полволоконного реактора (ПБ5).

Для необходимого pH и концентрации кислорода в питательной среде к

рабочей камере (РК4) подводится газовая смесь из CO_2 и O_2 . Газовая смесь подводится через иглу с установленным стерильным фильтром с диаметром пор 0,2 мкм.

Подача газовой смеси к рабочей камере (РК4) осуществляется от блока газоснабжения (БГЗ). Подача воздуха к блоку газоснабжения (БГЗ) осуществляется с помощью малошумного лабораторного безмасляного компрессора (КВ2), оснащенного ресивером и редуктором давления. Блок газоснабжения (БГЗ) оснащен камерой смешения (СМ34), в которую, помимо воздуха, подаётся CO_2 . Подача CO_2 осуществляется от баллона высокого давления, оснащенного редуктором. Концентрация CO_2 контролируется в пределах 0,5-10% в воздухе, подаваемом в рабочую камеру (РК4). Блок газоснабжения (БГЗ) выполнен в корпусе из нержавеющей стали и включает в себя два ротаметра для измерения расхода сжатого воздуха и CO_2 . Ротаметры оснащены винтами для тонкой регулировки расхода. Блок газоснабжения (БГЗ) имеет также два редуктора, оснащенных манометрами для измерения давления редуцированных газов. Подача газовой смеси в рабочую камеру (РК4) осуществляется через установленный на ней барботер.

Управление технологическими процессами осуществляется с помощью контроллера биопроцессов (КБ5), установленного в шкафу управления (ШУ7).

Шкаф управления (ШУ7) выполнен в корпусе из нержавеющей стали и содержит источники электрического питания элементов экспериментальной установки, частотные преобразователи электродвигателей перемешивающих устройств автоклавируемого сосуда (АС1) и рабочей камеры (РК4), источник бесперебойного питания, выключатель экспериментальной установки и другие электроустановочные изделия, необходимые для электроснабжения экспериментальной установки.

Контроллер биопроцессов (КБ5) служит для автоматического поддержания основных параметров питательных сред в автоклавируемом сосуда (АС1) и в рабочей камере (РК4). Контроллер биопроцессов оснащен цветным русифицированным дисплеем с функцией touch-screen с диагональю 5,7". Все

технологические параметры отображаются на дисплее. В контроллере с помощью программы формируются сигналы управления, которые выдаются на выходах контроллера. Посредством исполнительных механизмов эти сигналы управляют процессом терморегулирования, скоростями вращения перемешивающих устройств, включением/выключением перистальтических насосов. В контроллере можно выбрать как ручной, так и автоматический режимы управления для процессов термостатирования и контроля pH.

Контроллер биопроцессов (КБ5) обеспечивает контроль и управление следующими процессами:

1. температурой питательной среды в автоклавируемом сосуде (АС1);
2. температурой питательной среды в рабочей камере (РК4);
3. регулированием pH путем подачи CO₂;
4. скоростью вращения перемешивающих устройств.

Для управления контроллер биопроцессов (КБ5) собирает данные со следующих датчиков:

- датчик температуры рабочей камеры;
- датчик температуры автоклавируемого сосуда;
- датчик pH рабочей камеры;
- датчик pO₂ рабочей камеры;
- анализатор CO₂ рабочей камеры.

Таким образом, в данной главе были проведены экспериментальные исследования по культивированию клеток СНО в чашках Петри в течение 6-ти суток. Были получены экспериментальные данные по количеству выросших клеток за каждые сутки и соответствующие им значения концентрации глюкозы, необходимой для питания клеток. Были проведены исследования используемой полуволоконной мембраны, и определены ее пористость и размер пор. Кроме того, была разработана технологическая схема культивирования клеток СНО в полуволоконном мембранном биореакторе и собрана экспериментальная установка

на ее основе. Поскольку основной элемент схемы, полуволоконный мембранный биореактор, является одноразовым и достаточно дорогим, целесообразно первоначально провести математическое моделирование процесса и определение его основных параметров, а затем непосредственно поставить эксперимент на разработанной экспериментальной установке для проверки адекватности модели.

3 Математическая модель для расчета гидродинамики полуволоконного биореактора

3.1 Этапы моделирования в рамках вычислительной гидродинамики

Вычислительная гидродинамика - это раздел механики сплошных сред, включающий в себя, помимо прочего, численные методы решения уравнений, описывающих гидродинамические, тепло- и массообменные процессы. В ходе развития вычислительной гидродинамики был разработан большой массив численных методов решения уравнений, основным из которых на текущий момент является метод конечных объёмов, реализованный в подавляющем большинстве профильных коммерческих и свободно распространяемых программных пакетов.

Решение поставленной задачи в рамках вычислительной гидродинамики с использованием современных программных пакетов можно разделить на 6 последовательных этапов, представленных на рисунке 3.1.

В ходе первого этапа «Определение целей моделирования», с учетом особенностей используемого программного пакета, на основе выбранного модельного представления и принятых допущений был сформирован список целей и задач моделирования в рамках вычислительной гидродинамики. На основании собственного опыта решения схожих задач и литературных данных была разработана основная концепция создания модели в используемом программном пакете, проработана стратегия решения системы уравнений модели с целью повышения стабильности используемых численных методов, выбраны способ и параметры оценки сходимости решения системы уравнений, подобраны методы графического и числового анализа получаемых результатов решения системы уравнений.

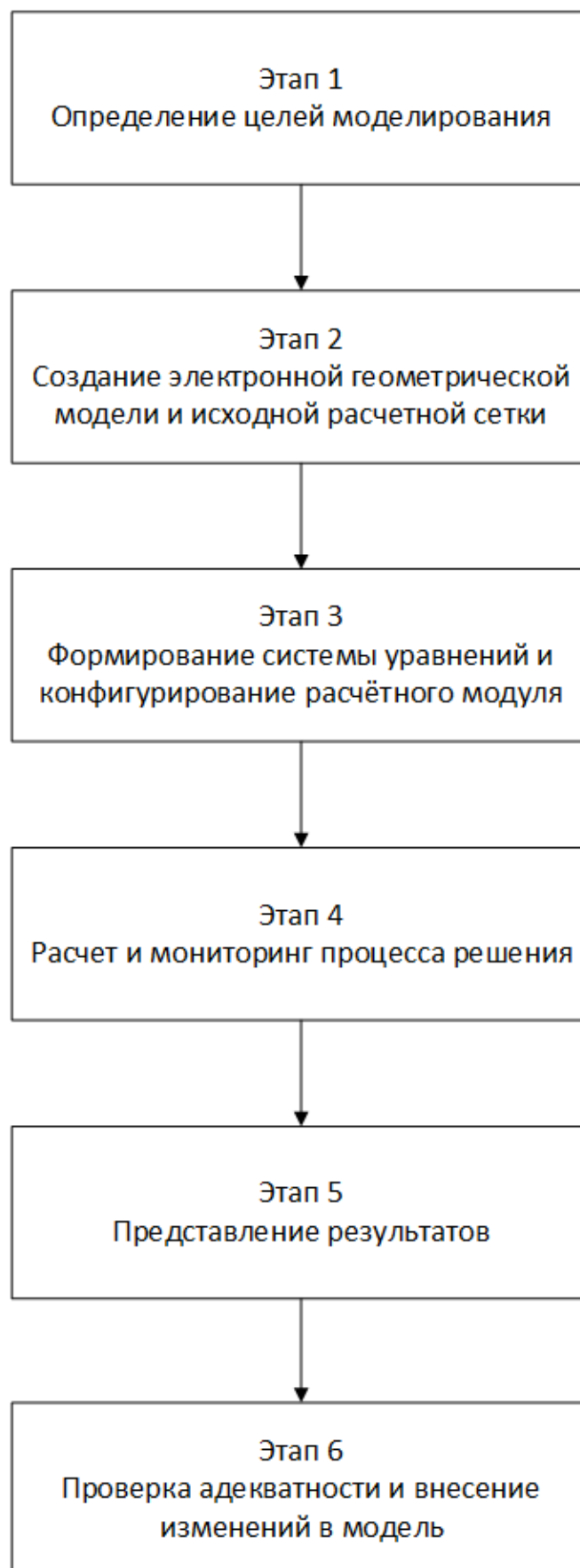


Рисунок 3.1 – Этапы решения задачи в рамках вычислительной гидродинамики

В процессе выполнения этапа «Создание электронной геометрической модели и исходной расчётной сетки» с использованием инструментов систем автоматизированного проектирования были созданы электронные геометрические модели исследуемых половолоконного мембранного биореактора и отдельно взятой половолоконной мембраны. Под электронной геометрической моделью понимается электронная модель изделия, описывающая геометрическую форму, размеры и иные свойства изделия, зависящие от его формы и размеров. На основании созданных электронных геометрических моделей была сгенерирована исходная расчётная сетка, необходимая для использования метода конечных объёмов. Кроме того, была проведена первичная оценка качества сгенерированной исходной расчётной сетки на основании анализа геометрических характеристик элементов сетки наиболее высокой пространственной размерности. В данной работе использовались трёхмерные расчётные сетки, соответственно, и для первичной оценки качества сетки проводился анализ трёхмерных ячеек.

На третьем этапе «Формирование системы уравнений и конфигурирование расчётного модуля» в используемом программном пакете были заданы основные уравнения системы уравнений модели и вспомогательные соотношения, разработаны и интегрированы (с использованием внешних и встроенных инструментов программного комплекса) программные модули, необходимые для реализации созданного математического описания процесса, заданы значения всех констант и параметров математического описания, заданы физико-химические свойства сред, сформированы начальные и граничные условия, проведено конфигурирование расчётного модуля. Расчётный модуль представляет собой программную реализацию совокупности всех модификаций присутствующих в программном пакете численных методов решения системы уравнений, блоков оценки сходимости решения, инструментов графического отображения процесса решения. Под конфигурированием расчётного модуля понимается выбор конкретных модификаций численных методов, используемых для решения поставленной задачи, задание параметров, контролирующих сходимость, точность

решения и влияющих на его устойчивость, вывод и задание параметров графических инструментов для отслеживания процесса решения, инициализация матриц переменных.

Большая часть четвертого этапа «Расчёт и мониторинг процесса решения» проводилась в автоматическом режиме. В процессе решения отслеживались графические данные по невязкам переменных и дисбалансу массы всей системы для выявления случаев возникновения неустойчивости решения. На основании этого при необходимости вносились изменения в конфигурацию расчётного модуля, после чего процесс решения либо продолжался, либо осуществлялся его перезапуск путём инициализации матриц переменных (при инициализации матриц переменных всем переменным присваиваются начальные значения).

Пятый этап «Представление результатов» посвящен графическому и числовому представлению полученных результатов расчётов. Целью данного этапа являлось получение необходимых для проверки адекватности модели графических и числовых данных. Также был сформирован пул данных, достаточный для анализа течения процессов в полуволоконном биореакторе в случае успешной проверки адекватности модели. Для этих целей был использован встроенный инструментарий программного пакета, позволяющий получать различные графические представления рассчитанных полей векторных и скалярных величин, графики изменения значений переменных по координатам для различных областей полуволоконного мембранного биореактора, значения градиентов, объёмных и поверхностных интегралов.

На шестом этапе «Проверка адекватности модели и внесение изменений в модель» была проведена проверка адекватности модели путём сравнения расчётных данных с экспериментальными и в тех случаях, когда результаты расчётов являлись неадекватными, были определены необходимые изменения в содержании и параметрах модели, а также в конфигурации расчётного модуля. После внесения изменений решение системы уравнений проводилось заново.

3.2 Математическая модель гидродинамики потоков и массообмена в половолоконном мембранном биореакторе

С целью определения характеристик сред внутри полволоконного мембранного биореактора, влияющих на рост и жизнедеятельность биологических клеток, была предпринята попытка создания математической модели гидродинамических процессов с использованием подходов и методов вычислительной гидродинамики. Основные уравнения модели базируются на фундаментальных физических закономерностях, что позволяет говорить о возможности применения разработанной модели для исследования систем различного масштаба. Программная реализация разработанной модели и численное решение системы уравнений модели проводилось с использованием программного пакета ANSYS Fluent, базирующегося на теоретической основе вычислительной гидродинамики.

Внутреннее пространство полволоконного мембранного биореактора было условно разделено на две области: внутриволоконное пространство и межволоконное пространство. Между данными областями происходит переток вещества, обусловленный гидродинамическими процессами.

При разработке модели были приняты следующие допущения:

1. Жидкость, текущая внутри полволоконного мембранного биореактора является вязкой и несжимаемой.
2. Вязкость жидкости постоянна и не зависит от температуры и давления.
3. Поры мембраны расположены перпендикулярно поверхности волокна, имеют цилиндрическую форму, размеры пор одинаковы.
4. Поры распределены равномерно по поверхности волокна.
5. Проницаемость мембраны зависит только от количества пор, свободных от биомассы.
6. Клетки заполняют поверхность мембраны равномерно.

7. Поток питательной среды обеспечивает клетки питательными веществами с избытком.
8. Отсутствует концентрационная поляризация.
9. Волокна параллельны друг другу.
10. Клетки имеют форму полусферы.
11. Линейные размеры всех клеток одинаковы.

Уравнения для расчёта гидродинамики во внутриволоконном пространстве биореактора

Двумя основными уравнениями, которые используются для описания потоков, являются уравнение сохранения массы и уравнения сохранения импульса, которые в декартовых координатах для нестационарной задачи записываются следующим образом:

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \rho \frac{\partial v_x}{\partial x} + \rho \frac{\partial v_y}{\partial y} + \rho \frac{\partial v_z}{\partial z} = -J \quad (3.1)$$

$$\frac{\partial \rho v_x}{\partial t} + v_x \rho \frac{\partial v_x}{\partial x} + v_y \rho \frac{\partial v_x}{\partial y} + v_z \rho \frac{\partial v_x}{\partial z} = -\frac{\partial P}{\partial x} + \mu \left(\frac{\partial^2 v_x}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 v_x}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 v_x}{\partial z^2} \right) + \rho g \quad (3.2)$$

$$\frac{\partial \rho v_y}{\partial t} + v_x \rho \frac{\partial v_y}{\partial x} + v_y \rho \frac{\partial v_y}{\partial y} + v_z \rho \frac{\partial v_y}{\partial z} = -\frac{\partial P}{\partial y} + \mu \left(\frac{\partial^2 v_y}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 v_y}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 v_y}{\partial z^2} \right) \quad (3.3)$$

$$\frac{\partial \rho v_z}{\partial t} + v_x \rho \frac{\partial v_z}{\partial x} + v_y \rho \frac{\partial v_z}{\partial y} + v_z \rho \frac{\partial v_z}{\partial z} = -\frac{\partial P}{\partial z} + \mu \left(\frac{\partial^2 v_z}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 v_z}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 v_z}{\partial z^2} \right) \quad (3.4),$$

где ρ – плотность среды, кг/м³; v_x , v_y , v_z – скорость среды вдоль осей ОХ, ОУ и ОZ, соответственно, м/с; g – ускорение свободного падения м/с²; J – поток массы, переходящей переходящий из внутриволоконного пространства в межволоконное через мембрану, кг/м·с²; P – давление, Па; μ – динамическая вязкость, Па·с; t – время, с; x , y , z – координаты, м.

В правой части уравнений 3.2-3.4 стоят члены, описывающие изменение импульса за счёт градиента давления и за счёт сил вязкостного трения. Третий член в уравнении 3.2 описывает изменение импульса за счёт силы гравитации.

Поток массы, переходящей из внутриволоконного пространства в межволоконное пространство через мембрану, описывается уравнением Хагена-Пуазейля, которое записано для области пространства возле мембраны:

$$J = \begin{cases} \frac{\varepsilon r_n^2 S \rho \Delta P}{8 \mu \delta T} \\ 0, \text{ при } x \neq x_{m1}, y \neq y_{m1}, z \neq z_{m1} \end{cases}; \quad (3.5),$$

где ε – количество пор на единицу поверхности мембраны, $1/\text{м}^2$; r_n – средний радиус пор, м; S – площадь поверхности мембраны, м^2 ; δ – показатель кривизны пор; T – толщина мембраны, м.

Для системы уравнений внутриволоконного пространства также были записаны необходимые начальные и граничные условия:

$$\vec{v}(x_{\text{CT}}, y_{\text{CT}}, z_{\text{CT}}) = 0 \quad (3.6)$$

$$\vec{v}(x_{\text{BX}}, y_{\text{BX}}, z_{\text{BX}}) = \vec{v}_{\text{BX}} \quad (3.7)$$

$$P(x_{\text{BX}}, y_{\text{BX}}, z_{\text{BX}}) = P_{\text{BX}} \quad (3.8)$$

$$\vec{v}(t = 0) = \vec{v}_{0\ 1} \quad (3.9)$$

$$\rho(t = 0) = \rho_{0\ 1} \quad (3.10)$$

Граничное условие (3.6) определяет условие прилипания среды к непроницаемым стенкам биореактора, а условие (3.7) определяет скорость среды на входе во внутриволоконное пространство половолоконной мембраны. Выражение (3.8) задает давление среды на входе в половолоконную мембрану, которое для исследуемой системы составляет 131325 Па.

Уравнения для расчета гидродинамики в межволоконном пространстве половолоконного мембранного биореактора

Для межволоконной области основными уравнениями также являются уравнение сохранения массы и уравнения сохранения импульса:

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \rho \frac{\partial v_x}{\partial x} + \rho \frac{\partial v_y}{\partial y} + \rho \frac{\partial v_z}{\partial z} = I + J \quad (3.11)$$

$$\frac{\partial \rho v_x}{\partial t} + v_x \rho \frac{\partial v_x}{\partial x} + v_y \rho \frac{\partial v_y}{\partial x} + v_z \rho \frac{\partial v_z}{\partial x} = -\frac{\partial P}{\partial x} + \mu \left(\frac{\partial^2 v_x}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 v_y}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 v_z}{\partial z^2} \right) + \rho g \quad (3.12)$$

$$\frac{\partial \rho v_y}{\partial t} + v_x \rho \frac{\partial v_x}{\partial x} + v_y \rho \frac{\partial v_y}{\partial x} + v_z \rho \frac{\partial v_z}{\partial x} = -\frac{\partial P}{\partial y} + \mu \left(\frac{\partial^2 v_x}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 v_y}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 v_z}{\partial z^2} \right) \quad (3.13)$$

$$\frac{\partial \rho v_z}{\partial t} + v_x \rho \frac{\partial v_x}{\partial x} + v_y \rho \frac{\partial v_y}{\partial x} + v_z \rho \frac{\partial v_z}{\partial x} = -\frac{\partial P}{\partial y} + \mu \left(\frac{\partial^2 v_x}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 v_y}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 v_z}{\partial z^2} \right) \quad (3.14)$$

В правой части уравнения (3.11) стоят члены, описывающие приток массы за счёт потока массы, перетекающего из внутриволоконного пространства в межволоконное, и убыль массы за счёт поглощения клетками питательных веществ, необходимых для их жизнедеятельности. Приток массы, перетекающей из внутриволоконного в межволоконное пространство, описывается выражением (3.5).

Количество массы, потребляемое клетками, рассчитывается по следующему уравнению:

$$I = \int_1^N q^c(t) dt \quad (3.15),$$

где N – число клеток; q^c – скорость потребления питательной среды одной клеткой.

Набор начальных и граничных условий для системы уравнений межволоконного пространства имеет следующий вид:

$$\vec{v}(x_{ст}, y_{ст}, z_{ст}) = 0 \quad (3.16)$$

$$\vec{v}(x_{вх\ 2}, y_{вх\ 2}, z_{вх\ 2}) = \vec{v}_{вх} \quad (3.17)$$

$$P(x_{вх}, y_{вх}, z_{вх}) = P_a \quad (3.18)$$

$$\vec{v}(t = 0) = \vec{v}_{0\ 2} \quad (3.19)$$

$$\rho(t = 0) = \vec{\rho}_{0\ 2} \quad (3.20)$$

Граничное условие (3.16) определяет условие прилипания среды к непроницаемым стенкам биореактора, а условие (3.17) определяет скорость среды на входе в межволоконное пространство биореактора. Выражение (3.18) задает давление среды на выходе из межволоконного пространства биореактора, которое для исследуемой системы составляет 101325 Па.

3.3 Построение электронной геометрической модели половолоконного мембранного биореактора

Построение электронной геометрической модели половолоконного мембранного биореактора осуществлялось с использованием системы автоматизированного проектирования (САПР) DesignModeler, производства компании ANSYS. Данная САПРС интегрирована в рабочую среду ANSYS Workbrench вместе с программным комплексом ANSYS Fluent, что облегчает передачу данных из одной программы в другую и позволяет использовать одну и ту же электронную геометрическую модель одновременно в нескольких расчётах с разными параметрами.

Построение электронной геометрической модели половолоконной мембраны

Геометрические параметры волокна, использовавшиеся при создании электронной геометрической модели половолоконной мембраны, представлены в таблице 3.1.

Таблица 3.1 - Геометрические параметры одной половолоконной мембраны биореактора

Параметр	Значение
Внешний диаметр	1300 мкм
Толщина	30 мкм
Длина	11 см

Как было написано выше, внутренняя область биореактора была разделена на внутриволоконное и межволоконное пространства (рисунок 3.2 а, б).

Внутриволоконное пространство отдельно взятого волокна представляет собой цилиндр. Мембрана имеет кольцевое сечение и по длине равна внутриволоконному пространству. Всё внутриволоконное пространство биореактора представляет собой совокупность внутриволоконных пространств всех волокон, равномерно распределённых в объёме биореактора

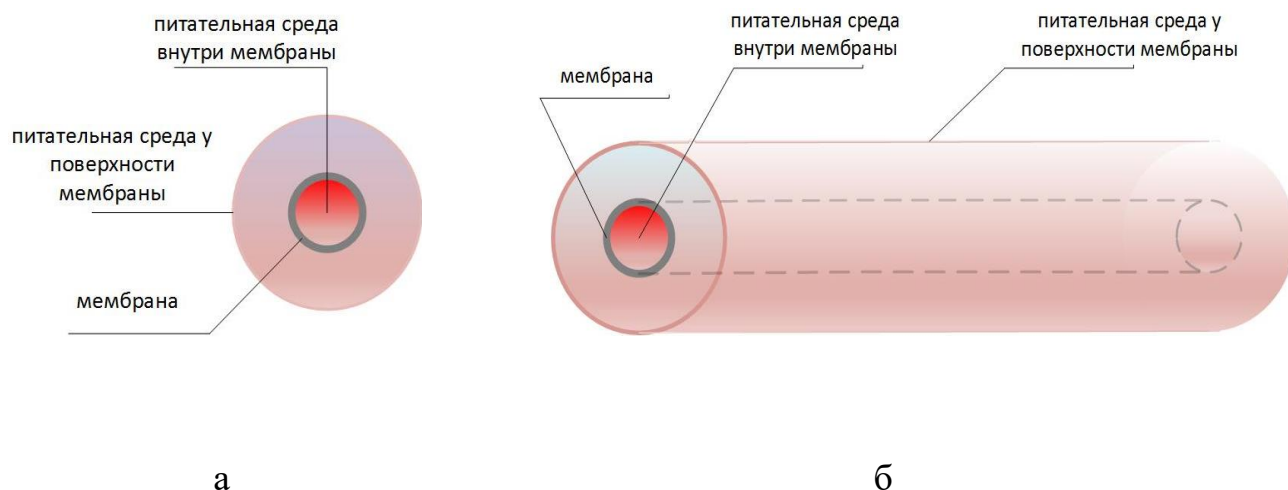


Рисунок 3.2 – Создание электронной геометрической модели полуволоконной мембраны: а – вид сбоку; б – фронтальный вид

Построение электронной геометрической модели межволоконного пространства

Электронная геометрическая модель межволоконного пространства полуволоконного мембранного биореактора представлена на рисунках 3.3 – 3.6. В электронной геометрической модели предусмотрены два патрубка цилиндрического сечения, расположенных перпендикулярно главной оси биореактора и служащих для подачи и отвода среды в межволоконное пространство.

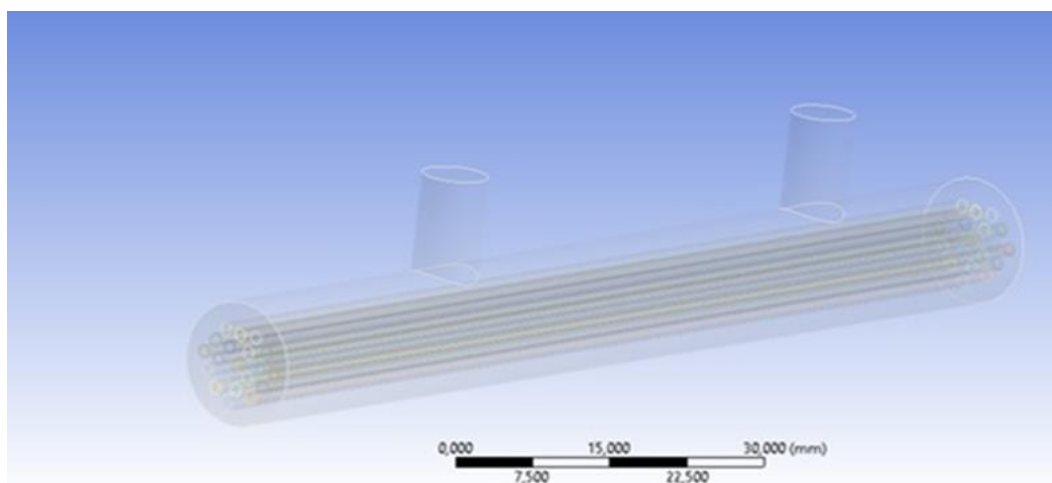


Рисунок 3.3 – Электронная геометрическая модель полуволоконного мембранного биореактора

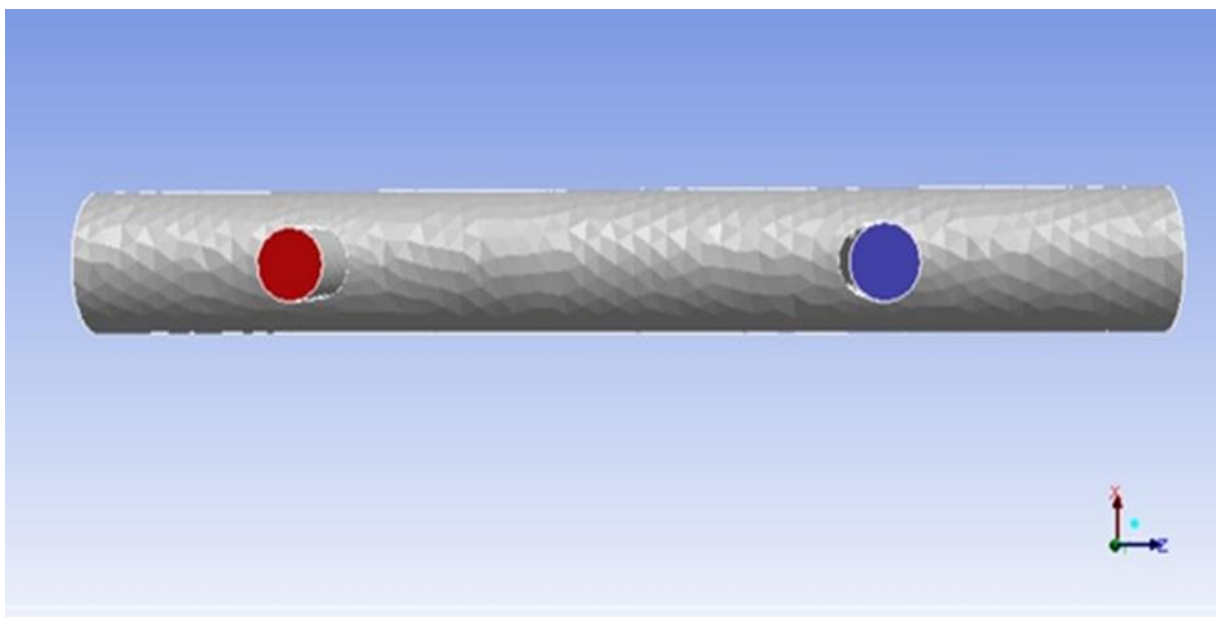


Рисунок 3.4 – Электронная геометрическая модель полуволоконного мембранного биореактора, главный вид

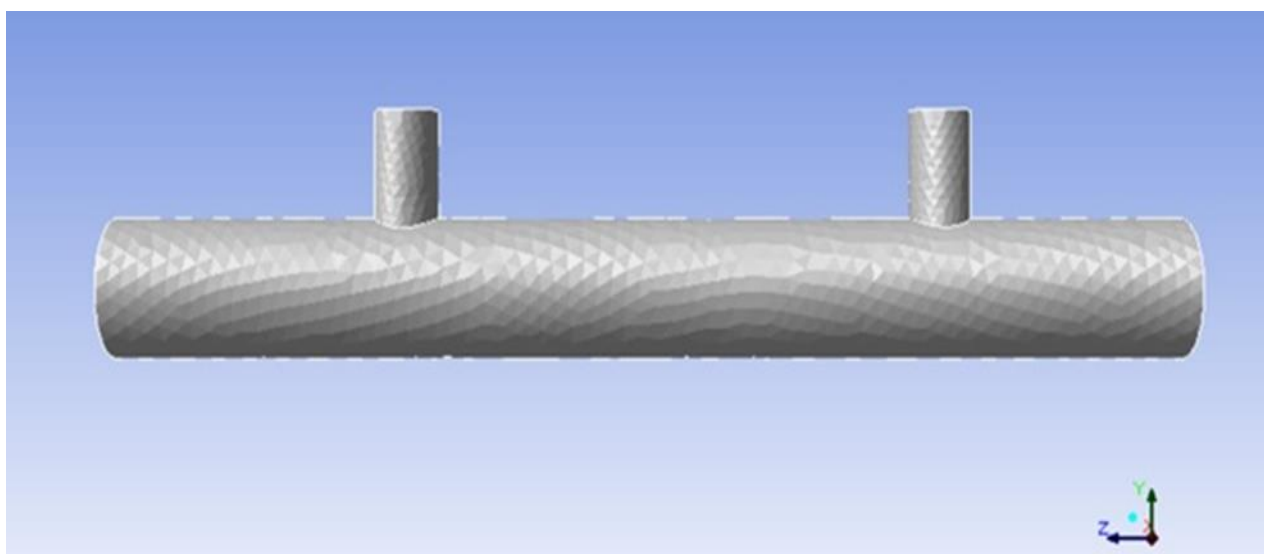
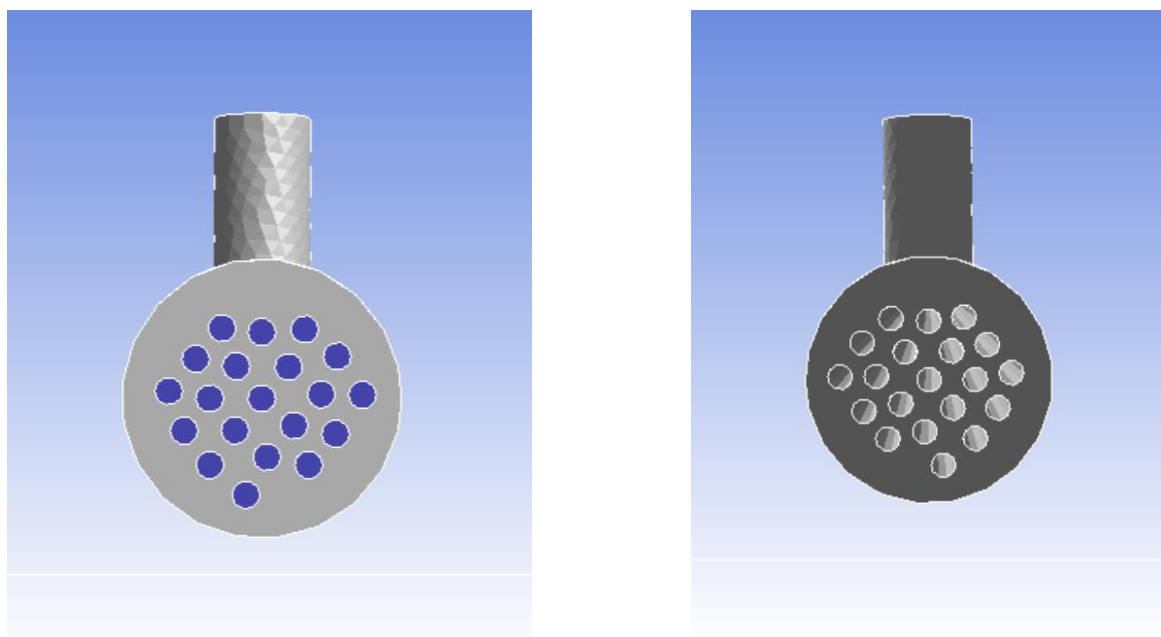


Рисунок 3.5 – Электронная геометрическая модель полуволоконного мембранного биореактора, вид сверху



а

б

Рисунок 3.6 – Электронная геометрическая модель полуволоконного мембранного биореактора, созданная в ANSYS DesignModeler:

а – вид сбоку (вход), входные отверстия для питательной среды во внутриволоконное пространство биореактора отмечены синим цветом, межволоконное пространство отмечено серым; б – вид сбоку (выход), отражены выходные отверстия полуволоконных мембран

3.4 Построение расчётной сетки

Процесс построения расчётной сетки состоял из двух этапов: этап создания первичной расчётной сетки (выполнялся однократно) и этап адаптации расчётной сетки (выполнялся в несколько итераций).

Для создания первичной расчётной сетки использовался программный продукт ANSYS Mesh, интегрированный в рабочую среду ANSYS Workbench.

Главной характеристикой расчётной сетки является её плотность, которая представляет собой количество ячеек, приходящихся на единицу объема. С увеличением плотности сетки увеличивается точность решения. Однако в этом случае также увеличивается и время, необходимое для сходимости решения, или

количество вычислительных ресурсов, которое требуется для получения решения за аналогичное время, причем зависимость требуемого времени от плотности сетки имеет нелинейный характер. Таким образом, при создании расчетной сетки необходимо достичь оптимума между точностью получаемого решения и временем расчета. В связи с этим на практике применяются два способа: построение расчетных сеток с переменной плотностью и адаптация расчётных сеток, - благодаря которым в наиболее важных областях исследуемого пространства при сохранении времени сходимости решения удастся увеличить точность получаемого решения. Оба этих способа направлены на получение расчётных сеток с контролируемой переменной плотностью. Построение расчётных сеток с переменной плотностью осуществляется с использованием инструментов специализированных программных продуктов, к которым относится ANSYS Mesh, используемых для построения расчётных сеток, и проводится на основании опыта специалиста, осуществляющего моделирование. Под адаптацией расчётных сеток понимается процесс увеличения плотности расчётных сеток в заданных областях на основании результатов промежуточного решения. Таким образом, оба упомянутых метода могут быть применены к одной и той же задаче.

Наиболее важными считаются те области пространства, где изменение характеристик течения происходит наиболее быстро. Данные области характеризуются большими значениями градиентов характеристик потока. Совершенно очевидно, что при этом из-за более низкой плотности сетки падает точность решения в «периферийных» зонах, где изменение характеристик не столь велико. Часто плотность сетки уменьшают в тех местах, где нет необходимости получать решение высокой точности. Для поставленной задачи областями с низкой плотностью расчётной сетки являются пристеночные области биореактора.

На рисунках 3.7 – 3.9 показаны расчётные сетки всего биореактора и отдельного волокна.

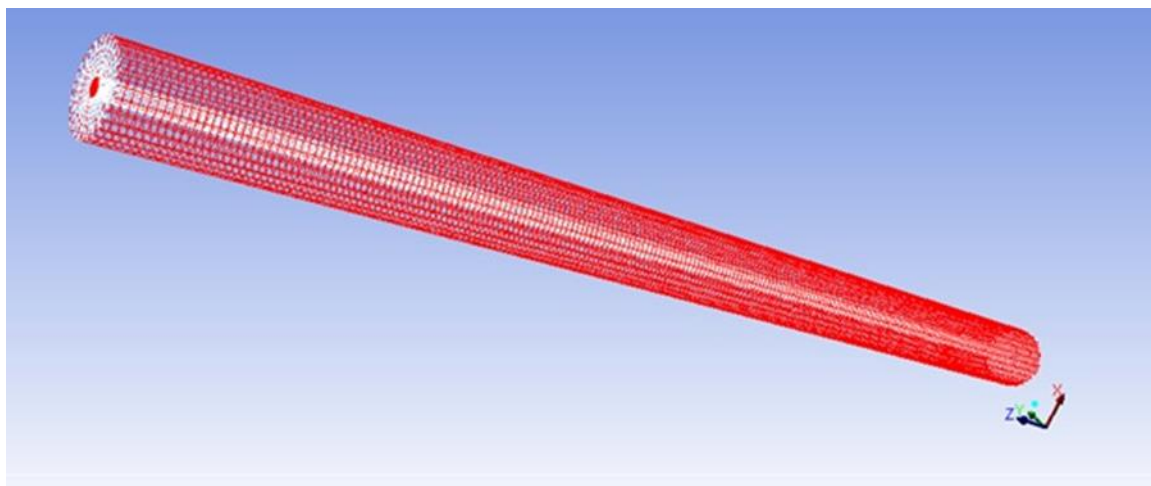


Рисунок 3.7 – Расчетная сетка полуволоконной мембраны

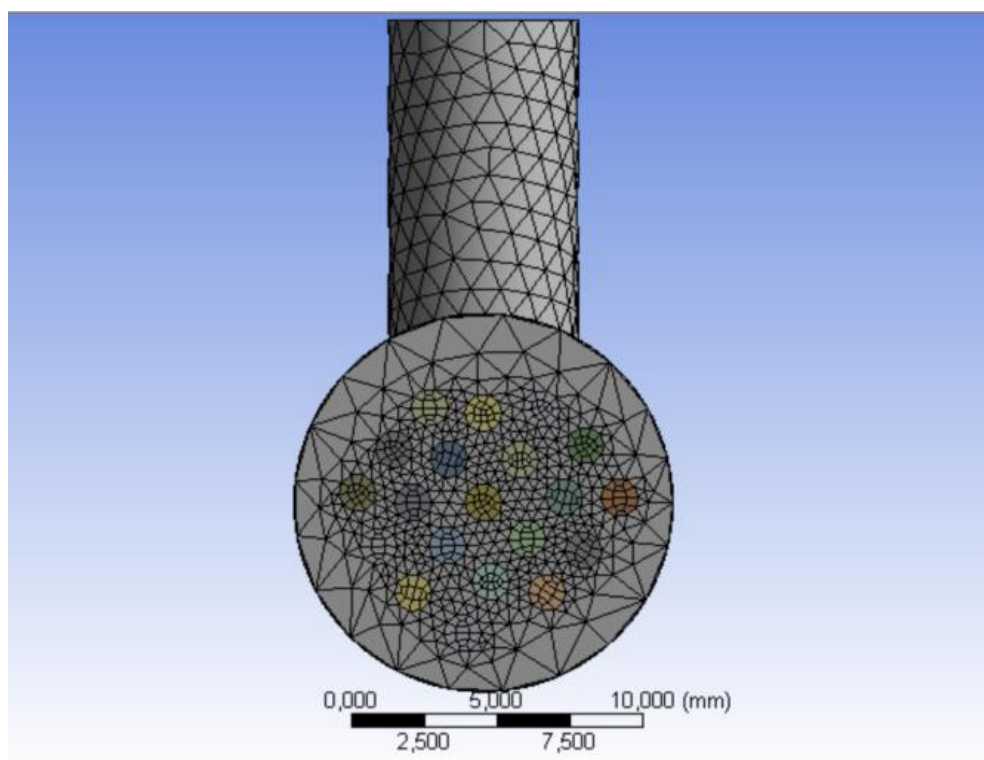


Рисунок 3.8 – Расчётная сетка полуволоконного мембранного биореактора (вид сбоку)

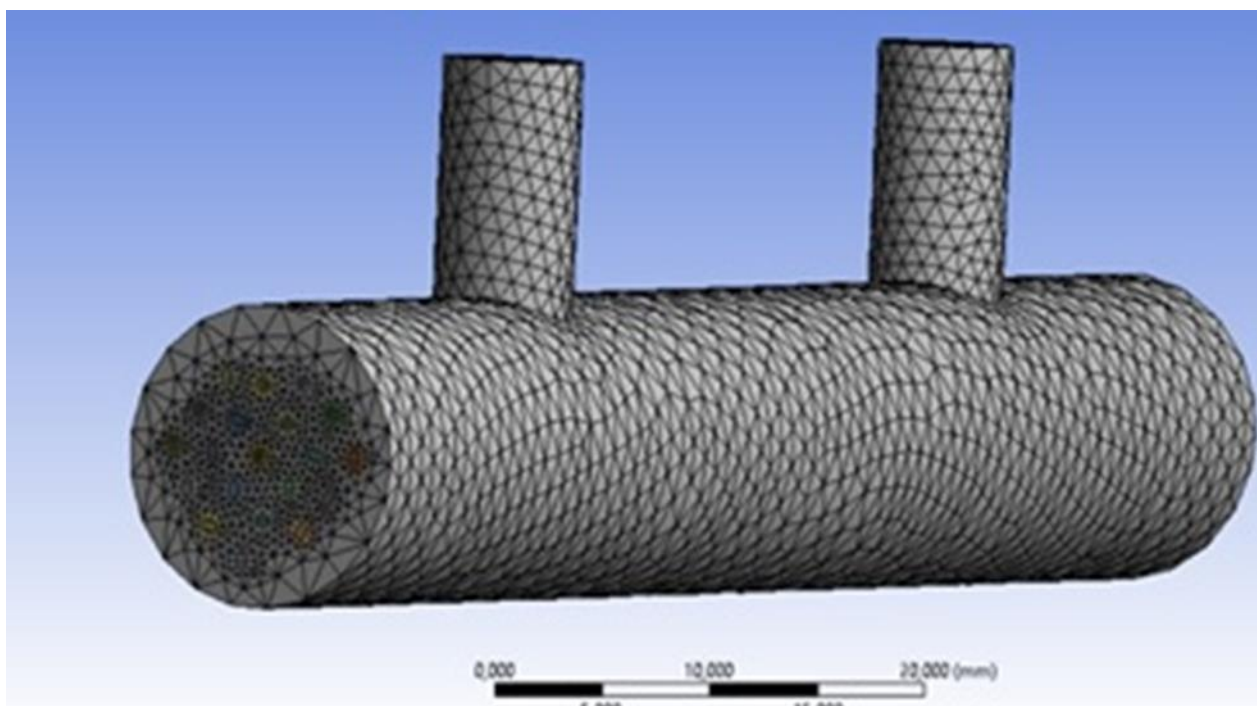


Рисунок 3.9 – Расчетная сетка полуволоконного мембранного биореактора
(общий вид)

На рисунках 3.8, 3.9 представлена расчетная сетка биореактора с уменьшением шага разбиения вблизи полуволоконных мембран, а также расчетная сетка всего биореактора, отражающая разграничение на расчетные ячейки всего объема аппарата.

В работе использовалась трёхмерная расчетная сетка, состоящая из тетраэдрических элементов. Построение сетки начиналось с разбиения всех поверхностей с некоторым заданным шагом. Поверхности, прилегающие к зонам с повышенной плотностью сетки, разбивались на треугольные элементы с шагом 0,4 мм. Поверхности, прилегающие к зонам с пониженной плотностью, разбивались также на треугольные элементы с шагом 0,8 мм. Таким образом, была создана первичная расчётная сетка. Общее количество тетраэдрических элементов первичной сетки модели полуволоконного мембранного биореактора составило 837422.

В процессе создания первичной расчётной сетки проводилась грубая оценка её качества на основе анализа геометрических характеристик ячеек сетки. Данная

оценка необходима по причине того, что генерация сетки ведётся по определённому алгоритму в автоматическом режиме (с учётом предварительно заданных параметров сетки и правил её построения), в результате чего могут быть построены ячейки с очень острыми углами «вытянутые» в пространстве. Такие ячейки отрицательным образом влияют на точность получаемого решения, так как значения переменных хранятся в центрах масс ячеек, а расчёт градиентов переменных, используемых в процессе решения, проводится с использованием расстояний между центрами масс и вершинами ячеек, из-за чего при большой «вытянутости» ячеек рассчитанные градиенты могут сильно отличаться от истинных, что и снижает точность решения.

Однако при решении поставленной задачи не представлялось возможным сразу создать расчётную сетку, которая бы обеспечивала необходимую точность решения, поскольку поток питательной среды в биореактора с несколькими входами и сравнительно большим количеством волокон достаточно сложен и неравномерен, в результате чего отсутствовала возможность достаточно точно оценить вероятное поведение потока во всех областях. Именно поэтому было необходимым проведение этапа адаптации первичной расчётной сетки.

Адаптация расчётной сетки выполнялась итеративно. Алгоритм процесса адаптации представлен рисунке 3.10. На каждой итерации на первом шаге проводилось решение системы уравнений модели. На втором шаге на основе полученного решения рассчитывались градиенты скорости потока, давления. Третьим шагом являлось разбиение ячеек расчётной сетки, где модули рассчитанных градиентов превышали пороговое значение в 10% от максимального значения. Таким образом, удавалось получить более высокую плотность расчётной сетки в тех местах, где происходит наиболее быстрое изменение характеристик потока, и где, соответственно, наиболее важно получить более точное решение. После разбиения вновь проводилось решение системы уравнений, и получались новые профили искомых характеристик потока. Цикл адаптации прерывается,

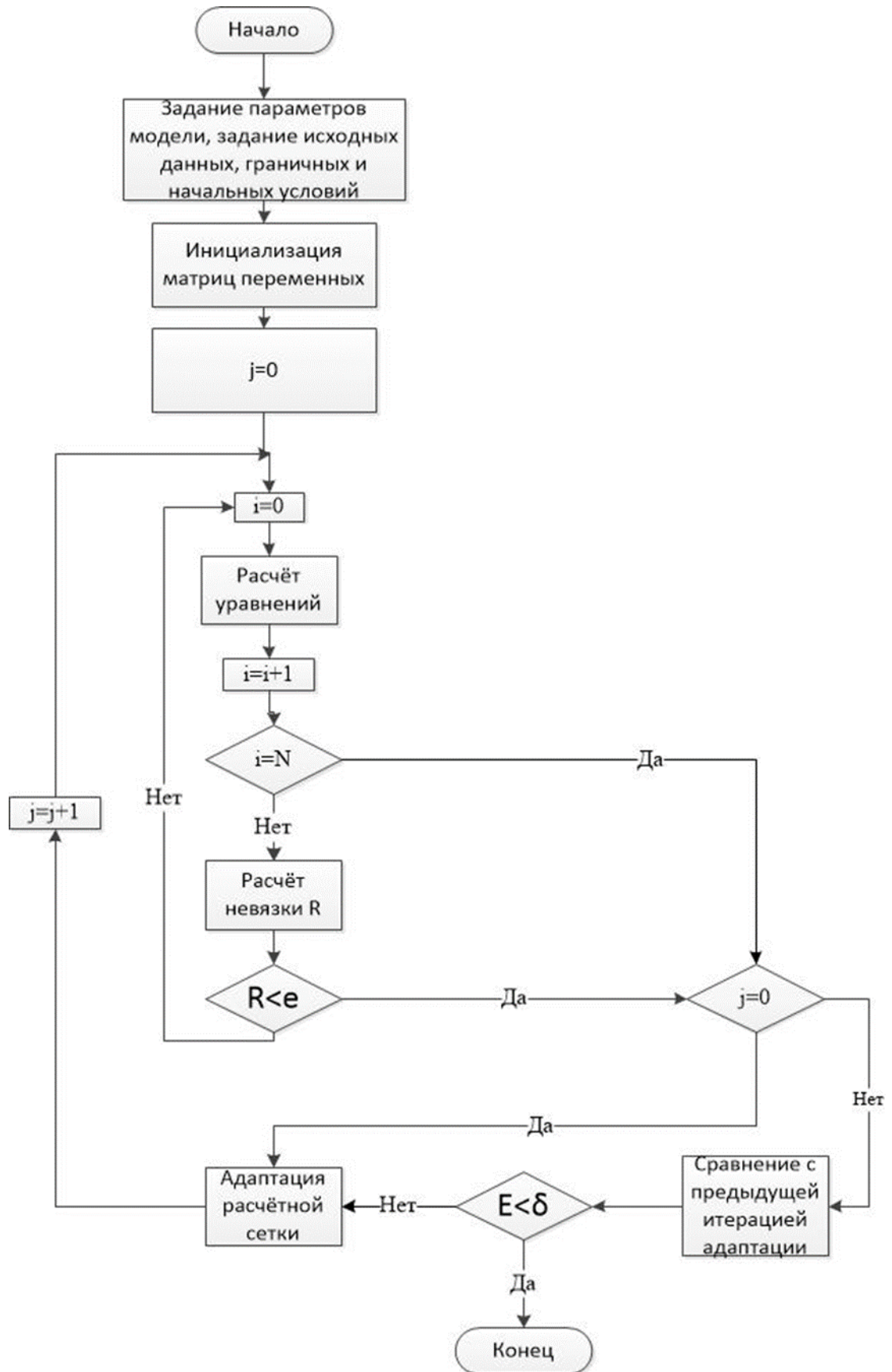


Рисунок 3.10 – Алгоритм адаптации расчётной сетки

когда относительное отклонение (E) одного профиля от другого составляет менее 1%.

Благодаря данной процедуре, удалось получить решение, которое не зависело от структуры расчетной сетки и обладало максимально возможной для разработанной модели точностью. Сокращение общего времени расчёта происходило также благодаря тому, что на каждой итерации расчет начинался не с исходной точки (точки, откуда «стартовал» первый расчет с использованием первичной сетки), а с уже полученного решения, что значительно сокращает время сходимости нового решения для каждой итерации.

3.5 Численные методы решения дифференциальных уравнений

Как уже говорилось выше, численное решение системы уравнений модели проводилось с использованием метода конечных объёмов, реализованного в программном комплексе ANSYS Fluent. Общая концепция данного метода кратко может быть описана следующим образом. Для каждой ячейки расчётной сетки проводится интегрирование по объёму данной ячейки каждого уравнения модели. Далее с помощью теоремы Остроградского-Гаусса происходит преобразование интегралов по объёму, содержащих дивергенцию, к интегралам по поверхности. На следующем шаге проводится пространственная дискретизация уравнений. В результате дискретизации исходная система дифференциальных уравнений в частных производных в случае нестационарной задачи переходит к системе обыкновенных дифференциальных уравнений, записанных для каждой ячейки расчётной сетки.

В методе конечных объёмов значения характеристик потока по умолчанию «хранятся» в центрах масс ячеек. Для членов уравнений, описывающих поток той или иной величины через поверхность ячейки (проекция двух расчётных ячеек приведена на рисунке 3.11), необходимо знать значение данной переменной на этой поверхности, поэтому при расчете было применено следующее выражения для нахождения этих величин:

$$\varphi_f = \varphi_{C0} + \nabla \varphi \cdot \vec{r}_0 \quad (3.21)$$

где φ_f – характеристики потока непрерывной фазы на общей грани двух расчётных ячеек; φ_{C0} – характеристики потока непрерывной фазы в центре масс ячейки, расположенной вверх по течению; r_0 – радиус-вектор; $\nabla \varphi$ – изменение характеристик потока непрерывной фазы между двумя расчетными ячейками.

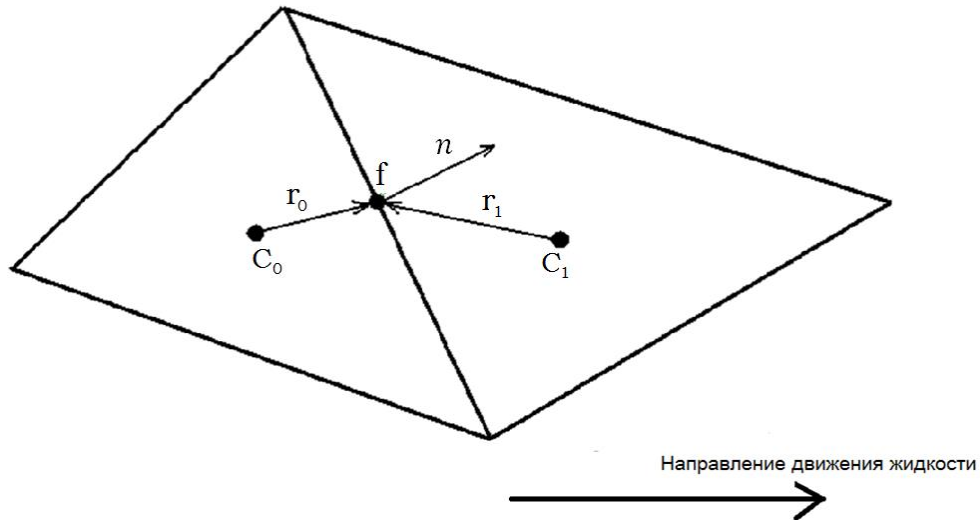


Рисунок 3.11 – Ячейки расчётной сетки

Для расчёта градиента параметра потока непрерывной фазы φ было использовано следующее выражение:

$$\nabla \varphi_f = \frac{1}{V_y} \sum \left(\bar{S}_{cp} \frac{1}{N_{yz}} \sum \varphi_{yz} \right) \quad (3.22),$$

где V_y – объём расчётной ячейки; S_{cp} – площадь грани расчётной ячейки; N_{yz} – количество узлов грани расчётной ячейки; φ_{yz} – значение характеристики потока в узле расчётной ячейки.

В данной работе для расчёта системы уравнений модели использовался отдельный алгоритм с коррекцией давления (рисунок 3.12). Данный алгоритм носит итеративный характер и подразумевает отдельное вычисление каждой компоненты скорости среды путём решения уравнения сохранения импульса.

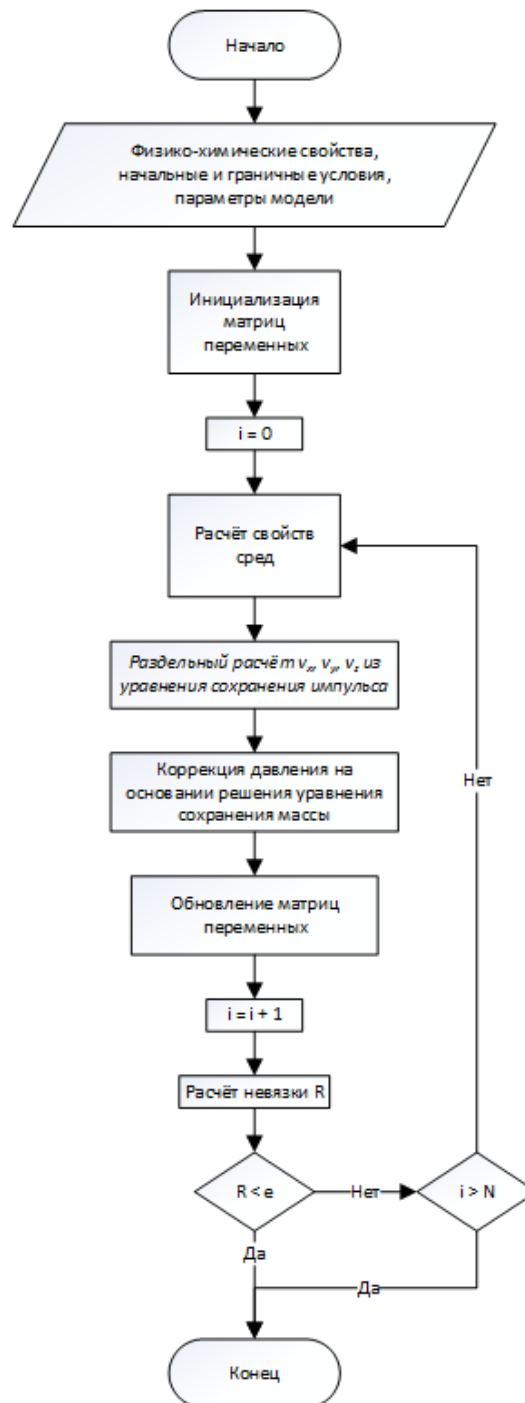


Рисунок 3.12 – Алгоритм расчёта системы уравнений модели

После нахождения всех компонент скорости среды для каждой ячейки проводится коррекция давления на основе решения уравнения сохранения массы с целью устранения дисбаланса по массе между ячейками, который возникает вследствие раздельного нахождения компонент скорости и ошибки численного метода. Далее рассчитывается невязка, которая сравнивается со значением,

заданным на этапе конфигурации расчётного модуля. Описанный цикл повторяется до тех пор, пока значение невязки для всех переменных не становится ниже заданной ошибки (в данной работе значение ошибки ϵ равно 10^{-6}).

Таким образом, в данной главе разработано математическое описание, отражающее гидродинамику потоков питательной среды и массообмен в межволоконном и внутриволоконном пространствах полволоконного биореактора. Рассмотрены особенности построения расчётной сетки полволоконного мембранного биореактора и её адаптации, разработан алгоритм адаптации расчётной сетки с целью достижения максимально возможной точности получаемого решения и независимости решения от топологии расчётной сетки, проанализированы численные методы решения системы уравнений, реализованные в программном пакете ANSYS Fluent, и составлен алгоритм расчёта.

4 Моделирование гидродинамики и массообмена в полуволоконном мембранном биореакторе (20 волокон)

4.1 Обработка экспериментальных данных по кинетике роста клеток СНО в чашках Петри

4.1.1 Моделирование кинетики роста клеток СНО

При моделировании полуволоконного мембранного биореактора для культивирования клеток СНО в первую очередь необходимо описать кинетику роста клеток (таблица 2.2, рисунок 2.11), графическая зависимость которой для средних значений представлена на рисунке 4.1.

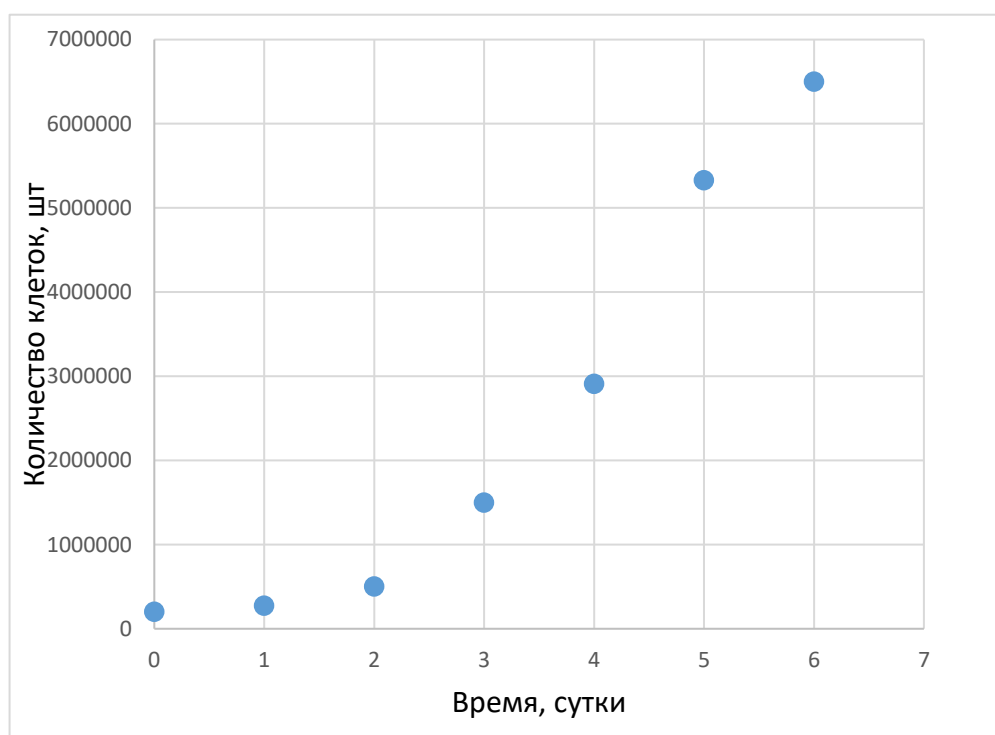


Рисунок 4.1 - Зависимость количества клеток от времени культивирования

Выбор кинетической зависимости достаточно часто определяется на основе визуальной схожести экспериментальных данных и расчетной кривой. Подбор начинают обычно с более простых уравнений, переходя затем к более сложным.

В данном случае для описания кинетики роста клеток СНО первоначально была рассмотрена экспоненциальная зависимость вида:

$$N = N_0 e^{\mu t} \quad (4.1)$$

где N - количество клеток в момент времени t , штук; N_0 - начальное количество клеток, штук; t - время культивирования, сутки; μ - удельная скорость роста клеток, сутки⁻¹.

Для определения скорости роста клеток была построена зависимость логарифма количества клеток от времени культивирования. Расчетные данные приведены в таблице 4.1, полученная зависимость отражена на рисунке 4.2.

Таблица 4.1 – Расчетные данные для определения параметров экспоненциальной модели

Время, сутки	Количество клеток, штук	Логарифм количества клеток
0	200000	12,206
1	273000	12,517
2	500000	13,122
3	1500000	14,220
4	2910000	14,883
5	5330000	15,488
6	6500000	15,687

Из рисунка 4.2 видно, что полученная зависимость описывается линейным уравнением вида $f(x) = kx + b$, коэффициенты которого найдены с помощью программного пакета Microsoft Excel 2007 и равны $k = 0,8$, $b = 11,5$.

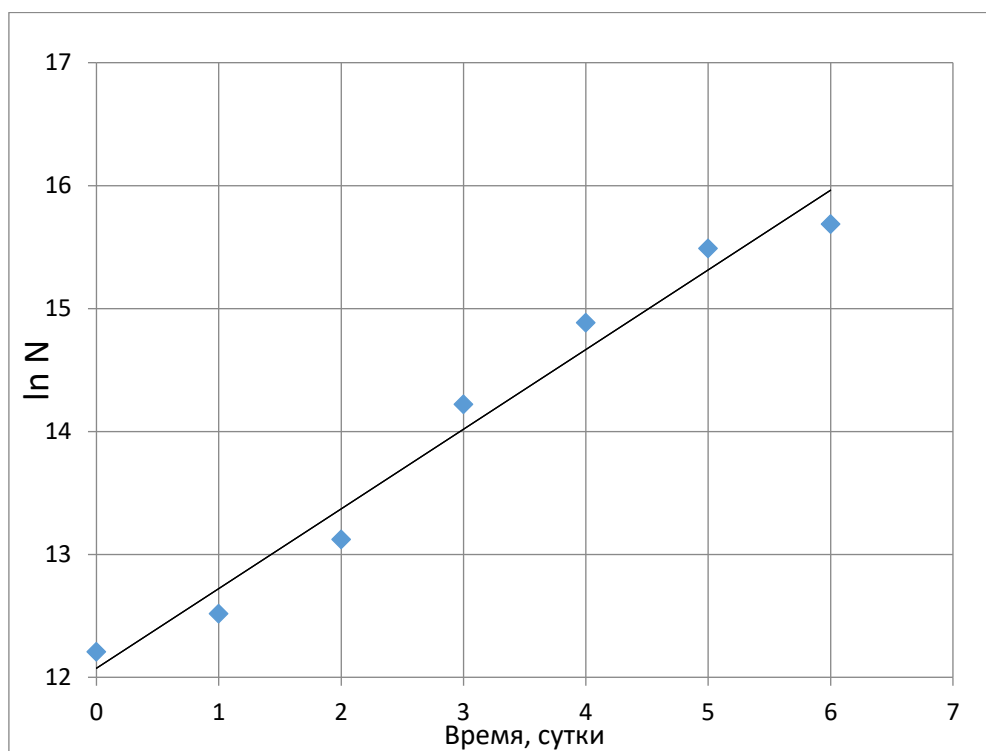


Рисунок 4.2 - Зависимость логарифма количества клеток от времени

Коэффициент k является тангенсом угла наклона логарифмической прямой, величина которого характеризует удельную скорость роста клеток. Таким образом, было найдено значение удельной скорости роста культуры клеток $\mu = 0,8 \text{ сутки}^{-1}$. Кинетическая модель зависимости количества клеток от времени и начального количества клеток будет иметь вид:

$$N = N_0 e^{0.8t} \quad (4.2)$$

Сравнение экспериментальных данных и рассчитанных по модели (4.2) представлено на рисунке 4.3.

Относительная ошибка отклонения рассчитанных данных по экспоненциальной модели от экспериментальных данных составила 18%.

Экспоненциальная модель является относительно простым видом зависимости роста клеток от времени, однако в данном случае величина относительной ошибки достаточно велика, поэтому был рассмотрен вариант применимости логистического уравнения Ферхюльста, учитывающего ограниченный рост популяции.

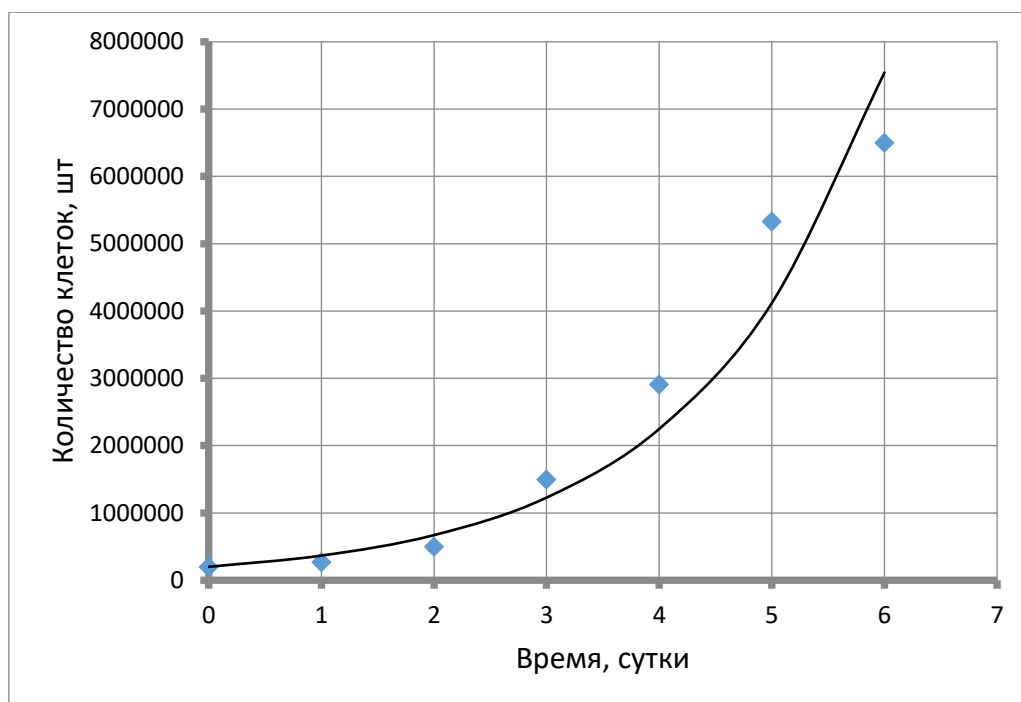


Рисунок 4.3 – Сравнение экспериментальных данных и рассчитанных по экспоненциальной модели

Дифференциальное уравнение Ферхюльста имеет вид:

$$\frac{dN}{dt} = \mu N \left(1 - \frac{N}{K}\right) \quad (4.3)$$

где μ - удельная скорость роста клеток, сутки⁻¹, K – емкость популяции (параметр, характеризующий предельную численность популяции).

Для нахождения удельной скорости роста клеток была использована аналогичная методика графической обработки эксперимента, в результате чего была определена удельная скорость роста клеток μ , равная 0,89 сутки⁻¹. Коэффициент K равен $1,8 \cdot 10^7$.

Таким образом, уравнение для роста клеток, основанное на модели Ферхюльста имеет вид:

$$\frac{dN}{dt} = 0,89 N \left(1 - \frac{N}{1,8 \cdot 10^7}\right) \quad (4.4)$$

На рисунке 4.4 приведено сравнение экспериментальных и расчетных данных, полученных по экспоненциальной модели и уравнению Ферхюльста, причем величина относительной ошибки для последнего составила 9,8 %, что является допустимым для биотехнологических процессов. Таким образом, уравнение Ферхюльста было выбрано для описания кинетики роста клеток СНО.

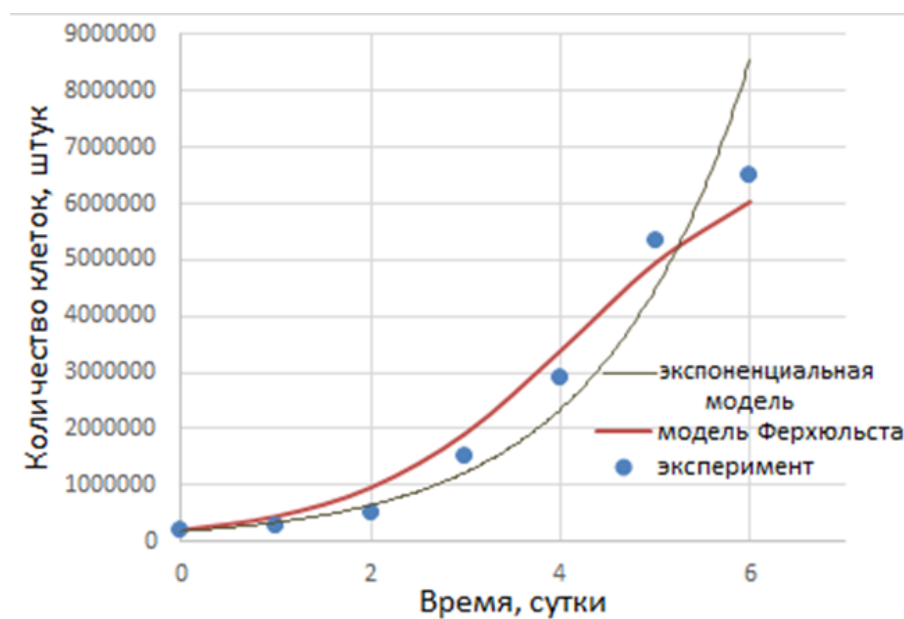


Рисунок 4.4 – Сравнение экспериментальных данных и результатов расчета по экспоненциальной зависимости и уравнению Ферхюльста

Подобранная кинетическая зависимость роста клеток в чашках Петри на основе уравнения Ферхюльста будет использована в дальнейших расчетах полуволоконного мембранного биореактора. Целесообразность ее применения основана на допущении, что рассматриваемые объекты имеют аналогичные условия роста клеток, а именно:

1. процесс культивирования идет до полного заполнения клетками поверхности чашек Петри/ полуволоконных мембран;
2. отсутствие факторов, лимитирующих рост клеток (высоких концентраций продуктов метаболизма, низких концентраций питательных веществ и т.д.),

кроме контактного ингибирования (полного заполнения клетками поверхности половолоконных мембран).

4.1.2 Расчет скоростей потребления глюкозы и выделения метаболитов

Данные проведенного эксперимента позволяют вычислить концентрацию глюкозы, потребляемую клетками. Для определения этого значения на основании таблицы 2.3 была построена графическая зависимость, демонстрирующая изменение концентрации глюкозы с течением времени культивирования (рисунок 4.5).

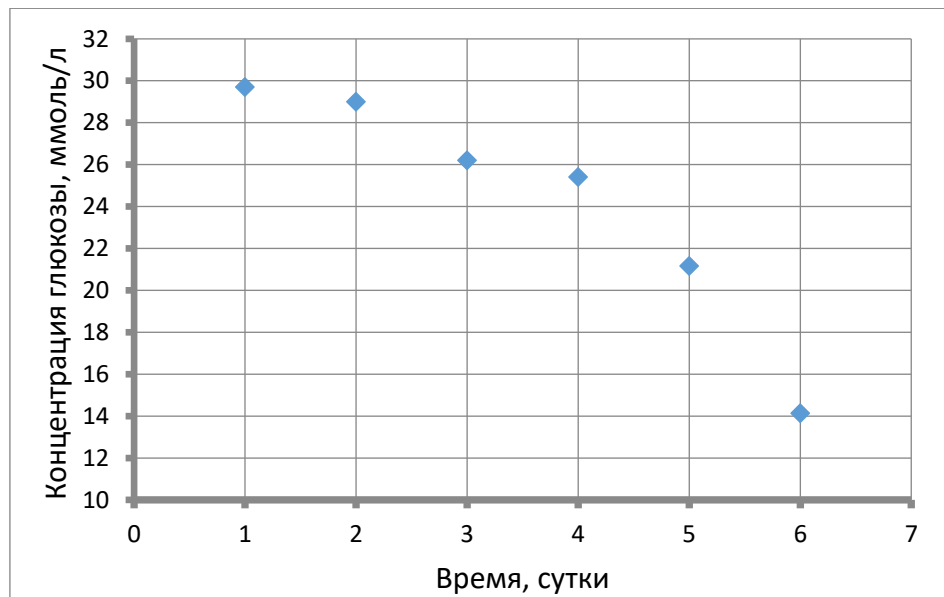


Рисунок 4.5 - Зависимость концентрации глюкозы от времени

Для последующих расчетов расходов питательной среды необходимо определить количество молей глюкозы, потребляемой одной клеткой, количество метаболитов, выделяемых одной клеткой, и поток пермеата, позволяющий обеспечить необходимый поток питательной среды к клеткам.

Для оценки количества глюкозы, потребляемой одной клеткой, было вычислено количество молей глюкозы, содержащиеся в каждый момент времени в чашке Петри. На основе расчета изменения количества глюкозы, отнесенные к

количеству клеток в текущий момент времени, было определено количество глюкозы, потребляемое одной клеткой (таблица 4.2).

Таблица 4.2 – Данные для определения количества глюкозы, потребляемое одной клеткой

Время, сутки	Количество клеток, штук	Количество глюкозы v , ммоль	Δv , ммоль	Количество глюкозы, потребляемое одной клеткой $\Delta v/N$, ммоль/сутки
0	200000	0,208	0,005	$2,11 \cdot 10^{-8}$
1	273000	0,203	0,020	$5,17 \cdot 10^{-8}$
2	500000	0,183	0,005	$5,00 \cdot 10^{-9}$
3	1500000	0,178	0,015	$6,80 \cdot 10^{-9}$
4	2910000	0,163	0,015	$3,64 \cdot 10^{-9}$
5	5330000	0,148	0,049	$8,28 \cdot 10^{-9}$
6	6500000	0,099	-	-

Среднее количество глюкозы, потребляемое одной клеткой за сутки, согласно таблице 4.2, составило $v = 2,02 \cdot 10^{-8}$ ммоль/сутки.

Согласно экспериментальным данным исходная концентрация глюкозы составляет 29,7 ммоль/л, тогда массовая концентрация глюкозы в питательной среде равна $C_0 = 5,4$ г/л .

Используя среднее количество глюкозы, потребляемое одной клеткой за сутки, исходную концентрацию глюкозы в питательной среде и молекулярную массу глюкозы получили значение расхода питательной среды, необходимое для обеспечения питания одной клетки. Этот поток для данной конструкции биореактора является потоком, проходящим через полуволоконную мембрану, т.е. потоком пермеата.

$$q^C = \frac{v \cdot M^Г}{C_0} \quad (4.5),$$

$M^Г = 180$ г/моль - молярная масса глюкозы, г/моль.

$$q^П = 1,58 \cdot 10^{-15} \text{ м}^3/\text{с}$$

Для сохранения жизнеспособности клеткам необходимо находиться в избытке питательной среды. Как правило, для обеспечения благоприятных условий роста необходимо подавать поток питательной среды примерно в 4-6 раза больше потока, потребляемого одной клеткой [5]. Таким образом, поток пермеата для одной клетки $q_П$ составит:

$$q^П = 7,9 \cdot 10^{-15} \text{ м}^3/\text{с}$$

Доля глюкозы, затрачиваемой на деление клеток, составляет 72 % [5], и, соответственно, доля для поддержания жизнедеятельности клеток будет 28%. Тогда объемный расход продуктов метаболизма для одной клетки $q^М$ можно вычислить по следующему уравнению:

$$q^М = 0,72 \cdot q^П \quad (4.6)$$

$$q^М = 5,69 \cdot 10^{-15} \text{ м}^3/\text{с}$$

С точки зрения геометрии полуволоконная мембрана представляет собой цилиндр, у которого высота много больше диаметра, поэтому площадь поверхности всех полуволоконных мембран, на которой могут вырасти клетки, рассчитывалась по уравнению:

$$S_m = m \cdot \pi \cdot d_2 \cdot L \quad (4.7)$$

где m – количество полых мембранных волокон в биореакторе, d_2 – внешний диаметр мембранного волокна, L - рабочая длина волокна. Учитывая данные для рассматриваемого биореактора из таблицы 2.4, получили:

$$S_m = 8,98 \cdot 10^{-4} \text{ м}^2 \quad (4.8)$$

Расчет кинетики роста клеток в моделируемом полуволоконном мембранном биореакторе проводился исходя из плотности их высевания $\rho_{\text{выс}} = 5000$ штук/см². Учитывая площадь поверхности всех полуволоконных мембран, вычислили количество клеток в начальный момент времени N_0 по следующей формуле:

$$N_0 = \rho_{\text{вкл}} \cdot S_m \quad (4.9)$$

$$N_0 = 450000 \text{ штук} \quad (4.10)$$

Таким образом, на основе рассчитанного значения (4.10), можно определить количество клеток в любой момент времени культивирования t по уравнению (4.4).

С учетом площади поверхности половолоконной мембраны, на которой могут вырасти клетки, и площади, занимаемой одной клеткой, вычислено максимальное количество клеток, которые смогут вырасти на имеющейся поверхности.

Поскольку площадь поверхности половолоконной мембраны s , занимаемая одной клеткой, представляет собой окружность с диаметром, равным диаметру клетки, то она вычисляется по формуле:

$$s = \pi \cdot \frac{d^2}{4} \quad (4.11)$$

где d - диаметр клетки, м.

Таким образом, для рассматриваемых клеток площадь одной клетки будет равна:

$$s = 1,13 \cdot 10^{-10} \text{ м}^2$$

Для того чтобы рассчитать максимально возможную площадь всех клеток, было принято, что клетка на поверхности половолоконной мембраны вписана в правильный шестиугольник, так как именно этой геометрической фигурой можно заполнить плоскость без пробелов и наложений. Количество шестиугольников, требуемое для полного заполнения ими поверхности половолоконных мембран, было рассчитано с учетом того, что площадь каждого шестиугольника должна быть оптимальной, чтобы на ней полностью умещалась клетка, а свободная от клетки площадь была минимальна (рисунок 4.6).

Площадь такого правильного шестиугольника s_{opt} была рассчитана по формуле:

$$s_{\text{opt}} = 2 \cdot \sqrt{3} \cdot \left(\frac{d}{2}\right)^2 \quad (4.12)$$

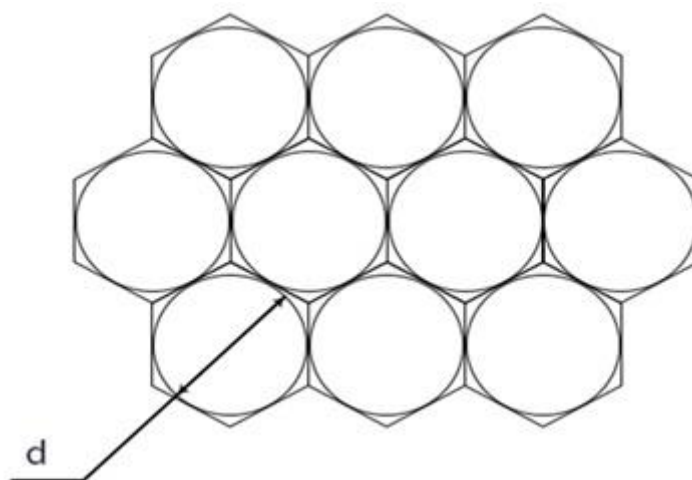


Рисунок 4.6 – Заполнение поверхности половолоконной мембраны правильными шестиугольниками (d – диаметр клетки)

Тогда для данного типа клеток:

$$s_{opt} = 1,24 \cdot 10^{-10} \text{ м}^2. \quad (4.13)$$

Таким образом, максимальное количество клеток, которое можно вырастить в исследуемом мембранном модуле, можно посчитать как:

$$N_{max} = \frac{S_m}{s_{opt}} \quad (4.14),$$

что составило $N_{max} = 7,2 \cdot 10^7$ штук.

Согласно уравнению Ферхюльста, описывающем рост клеточной популяции, можно посчитать время, за которое это максимальное количество клеток вырастет. Параметрами уравнения будут являться удельная скорость роста $\mu = 0,89 \text{ сутки}^{-1}$ и емкость популяции – коэффициент K , в данном случае вычисленный исходя из геометрических ограничений согласно конструкции биореактора, и равный максимальному количеству клеток.

Расчет проводился в среде MathLab 8.3. Результаты вычисления в графическом виде представлены на рисунке 4.7.

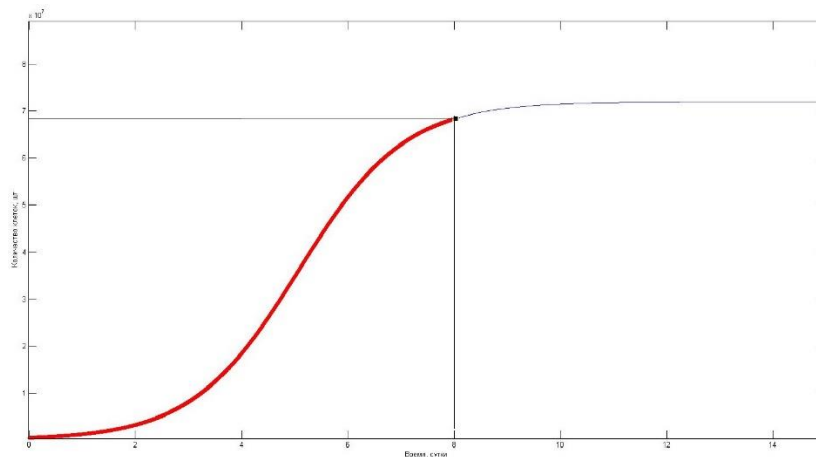


Рисунок 4.7 – Рассчитанная кинетика роста клеток в полволоконном биореакторе

Анализ рисунка 4.7 позволяет сделать вывод о том, что 95% клеток вырастают за 8 часов. Оставшиеся 5% растут в течение 2х суток, уже испытывая контактное ингибирование. Время окончания процесса в полволоконном биореакторе было принято считать:

$$t = 8 \text{ суток} \quad (4.15)$$

С учетом максимального количества клеток можно вычислить процент заполненной клетками поверхности полволоконных мембран в любой момент времени как:

$$S_m^{\%} = \frac{N}{N_{max}} 100\%. \quad (4.16)$$

Полученные результаты по росту клеток на волокнах мембраны были в дальнейшем использованы для моделирования гидродинамики и массообмена в полволоконном мембранном биореакторе.

4.2 Моделирование внутриволоконного пространства биореактора

4.2.1 Расчет коэффициента проницаемости мембранного волокна

Для случая установившегося течения вязкой несжимаемой жидкости в круглых цилиндрических порах одинакового размера справедливо уравнение Хагена – Пуазейля [127], которое в данном случае имеет вид:

$$Q_{\Pi} = \frac{n_{\Pi} \pi r_{\Pi}^4 \Delta P}{8 \cdot \mu \cdot \delta \cdot T} \quad (4.17)$$

где Q_{Π} – объемный поток пермеата, м³/с; n_{Π} – число пор, штук; r_{Π} – радиус поры, м; ΔP – перепад давления на мембране, Па; μ – динамическая вязкость жидкости, Па·с; T – толщина мембраны (длина поры), м; δ – извилистость пор.

Закон Дарси, учитывающий толщину мембраны, имеет вид:

$$Q_{\Pi} = \frac{\alpha}{\mu} \frac{\Delta P}{T} \tilde{S}_2, \quad (4.18)$$

где Q_{Π} – объемный поток пермеата, м³/с; α – проницаемость полотоволоконной мембраны, м²; μ – динамическая вязкость жидкости, Па·с; ΔP – перепад давления на мембране, Па; T – толщина мембраны (длина поры), м; S_m – площадь поверхности одной полотоволоконной мембраны, равная $S_m = \frac{S_m}{m}$, м².

При сравнении уравнений (4.17) и (4.18) проницаемость представили в виде зависимости от радиуса пор r_{Π} , количества пор n_{Π} , их извилистости δ (в данном случае $\delta = 1$) и площади поверхности одной полотоволоконной мембраны:

$$\alpha = \frac{\pi r_{\Pi}^4 n_{\Pi}}{8 \delta S_m}. \quad (4.19)$$

В процессе культивирования клетки постепенно заполняют поверхность волокна, что оказывает дополнительное сопротивление потоку питательной среды, понижающему сквозь мембрану. Проницаемость, рассчитанная в отсутствии сопротивления клеточного слоя, в начальный момент времени является максимальным значением для полотоволоконной мембраны:

$$\alpha_{max} = 4,8 \cdot 10^{-15} \text{ м}^2. \quad (4.20)$$

По результатам исследований [49, 128, 129] слой клеток снижает проницаемость полотоволоконной мембраны линейно с ростом их численности, следовательно, проницаемость мембраны, полностью заполненной клетками ($N = N_{max}$), равна:

$$\alpha_{min} = 8,3 \cdot 10^{-17} \text{ м}^2. \quad (4.21)$$

На основе зависимости количества клеток от времени можно рассчитать

зависимость проницаемости мембраны от времени для исследуемого процесса:

$$\alpha = \alpha_{min} + \frac{(\alpha_{max} - \alpha_{min})}{N_{max}} \cdot N \quad (4.22)$$

4.2.2 Расчет объемного расхода питательной среды, потребляемого клетками

Расчеты проводились в пакете CFD-пакете ANSYS Fluent. Для определения оптимальных расходов питательных веществ на входе в полволоконный мембранный биореактор (внутриволоконное пространство) для каждого момента времени культивирования необходимо определить количество питательных веществ, достаточных для обеспечения процессов жизнедеятельности клеток.

На основе расчета кинетики роста клеток в рассматриваемом полволоконном биореакторе, выполненном в пакете MathLab 8.3, было проведено определение количества клеток в каждые сутки культивирования.

По модели кинетики роста клеток (4.4), учитывая начальное ($N_0 = 4,5 \cdot 10^5$ штук) и максимально возможное ($N_{max} = 7,2 \cdot 10^7$ штук) количества клеток в изучаемом биореакторе при плотности высевания 5000 штук/см², было рассчитано количество клеток на волокнах в каждый момент времени. Результат расчета представлен в виде графической зависимости.

Согласно зависимости (4.22), было рассчитано изменение коэффициента проницаемости мембраны от количества клеток. Результаты расчетов представлены в таблице 4.3.

Таблица 4.3 – Результаты расчета количества клеток и коэффициента проницаемости в каждый момент времени

Время, сутки	Количество клеток, штук	Коэффициент проницаемости, м ²
0	450000	$4,8 \cdot 10^{-15}$
1	1021165	$2,5 \cdot 10^{-15}$
2	2307265	$1,2 \cdot 10^{-15}$
3	5136867	$5,0 \cdot 10^{-16}$

Продолжение таблицы 4.3

Время, сутки	Количество клеток, штук	Коэффициент проницаемости, м ²
4	11072204	$2,6 \cdot 10^{-16}$
5	22303858	$2,0 \cdot 10^{-16}$
6	39595843	$1,5 \cdot 10^{-16}$
7	58345336	$1,0 \cdot 10^{-16}$
8	72070260	$8,3 \cdot 10^{-17}$

На основе значения потока питания, необходимого для обеспечения жизнедеятельности одной клетки, для каждого момента времени можно рассчитать объемный поток пермеата, достаточный для питания текущего количества клеток. Результаты расчета потока пермеата для одного волокна представлены в таблице 4.4.

Таблица 4.4 – Результат расчета необходимого объемного потока на 20
половолоконных мембранах

Время, сутки	Необходимый объемный поток пермеата, м ³ /с	Необходимый объемный поток пермеата, л/ч
0	$3,60 \cdot 10^{-9}$	0,013
1	$8,10 \cdot 10^{-9}$	0,029
2	$1,82 \cdot 10^{-8}$	0,066
3	$4,10 \cdot 10^{-8}$	0,148
4	$8,70 \cdot 10^{-8}$	0,313
5	$1,76 \cdot 10^{-7}$	0,634
6	$3,13 \cdot 10^{-7}$	1,127
7	$4,60 \cdot 10^{-7}$	1,656
8	$5,69 \cdot 10^{-7}$	2,048

Для анализа поведения потоков пермеата в разработанной модели полволоконного биореактора (глава 3) была выбрана мембрана (рисунок 4.8, 4.9), расположенная таким образом, чтобы на гидродинамическую обстановку около нее влияло близкое расположение к остальным полволоконным мембранам, а также к боковым патрубкам, которые используются для вывода среды из межволоконного пространства. Визуализация результатов моделирования гидродинамики представлена на рисунках 4.10.

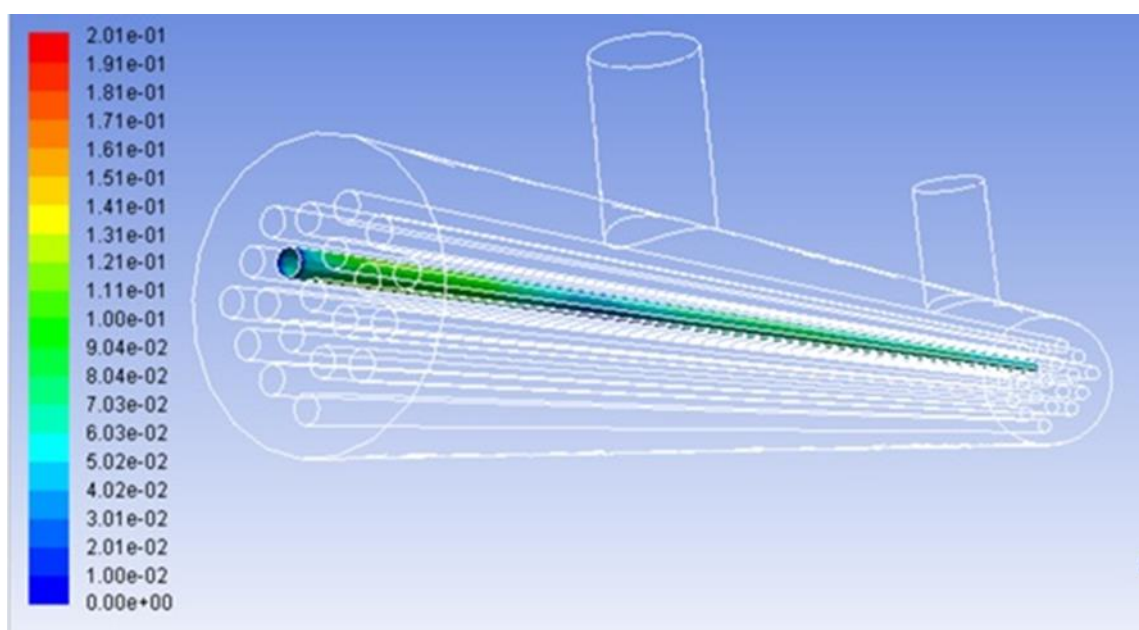


Рисунок 4.8 – Моделирование гидродинамики в одной полволоконной мембране (распределение скоростей по длине мембраны)

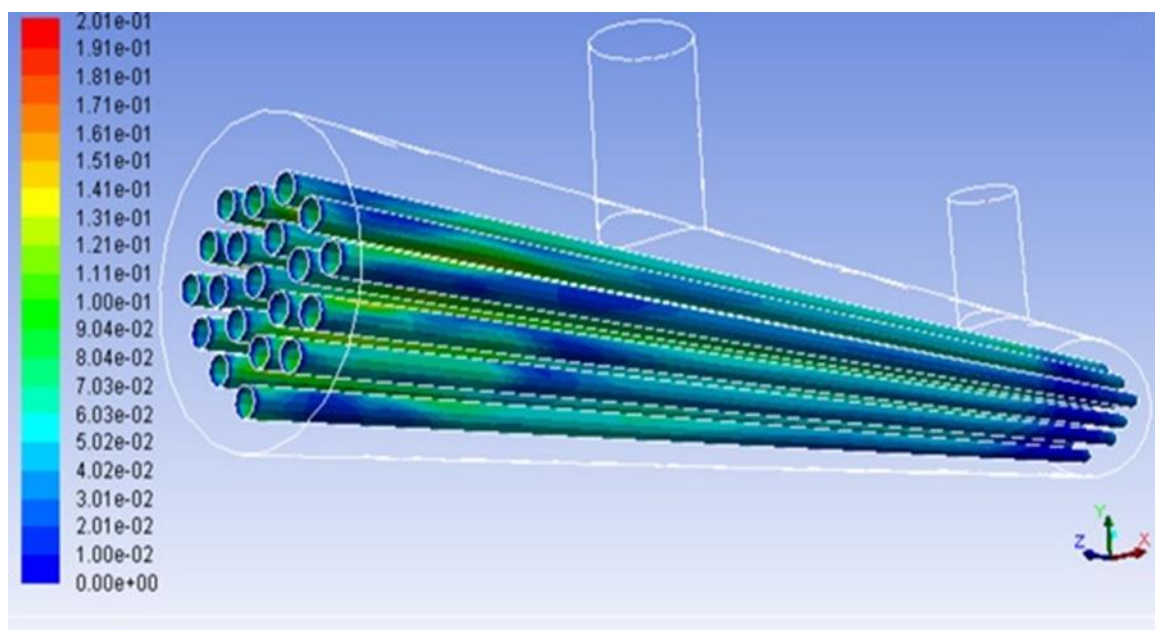


Рисунок 4.9 – Моделирование гидродинамики в 20-ти полуволоконных мембранах (распределение скоростей по длине мембраны)

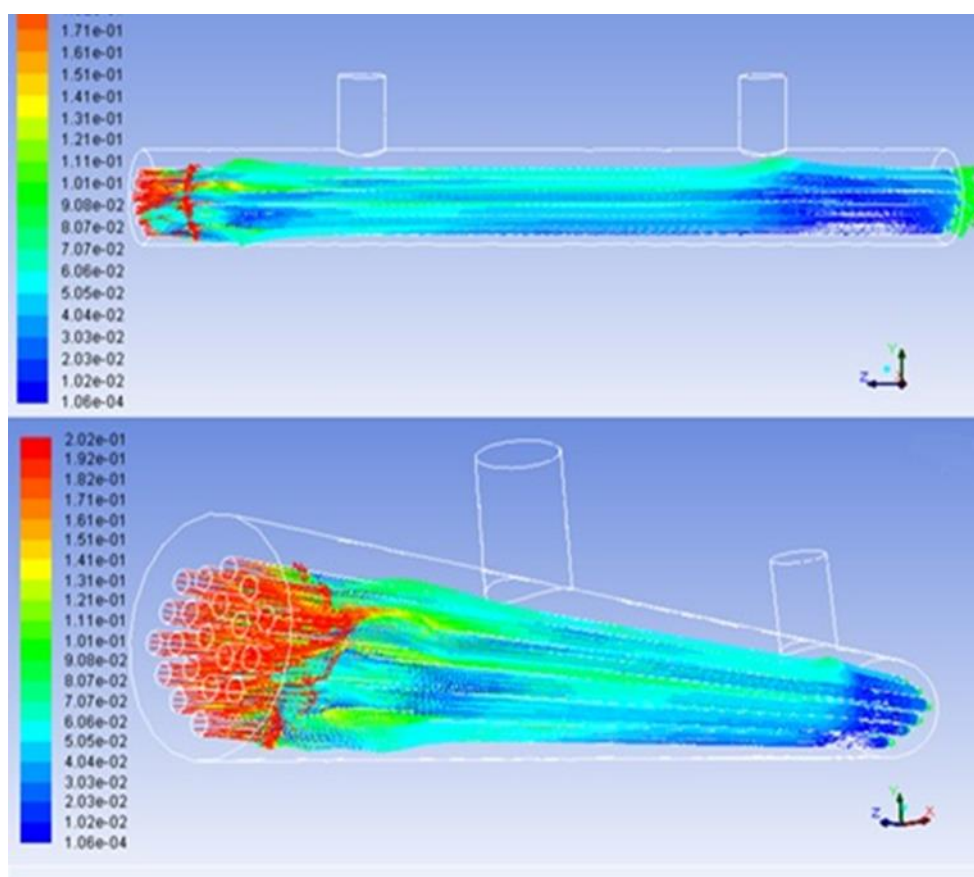


Рисунок 4.10 – Визуализация моделирования гидродинамики для всего полуволоконного биореактора

Были получены графики изменения давления и скорости внутри полуволоконной мембраны по длине волокна. На рисунках 4.11, 4.12 представлены результаты для 12 л/ч на вход во внутриволоконное пространство.

Из рисунка 4.11 видно, что со временем происходит уменьшение значения скорости на выходе из внутриволоконного пространства во длине мембранного элемента. Это можно объяснить уменьшением количества потока пермеата, проходящего сквозь мембрану вследствие накопления клеток на мембранной поверхности, которые создают сопротивление потоку. Давление, в свою очередь, возрастает по длине мембраны со временем культивирования (рисунок 4.12).

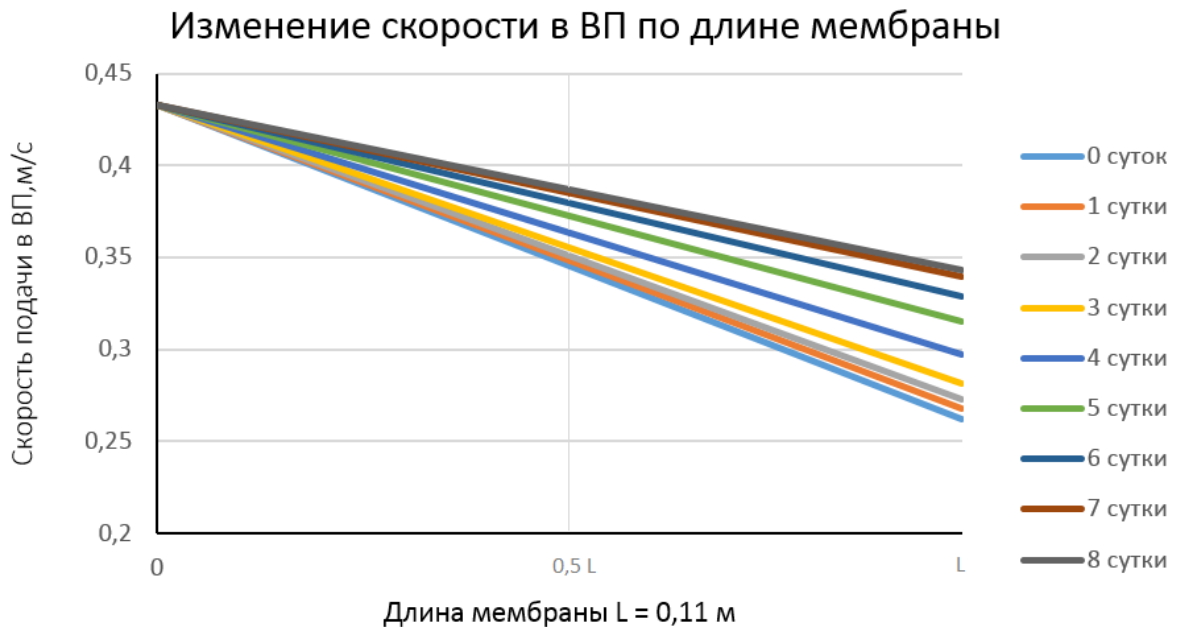


Рис. 4.11 – Изменение скорости по длине полуволоконной мембраны для расхода питательной среды на вход во внутриволоконное пространство 12л/ч

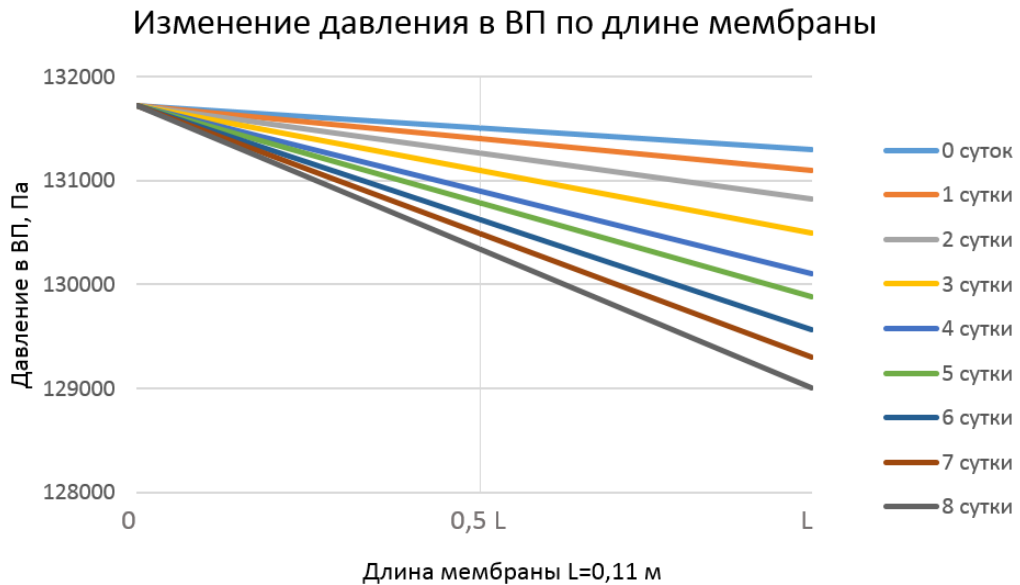


Рис. 4.12 – Изменение давления по длине полуволоконной мембраны для расхода питательной среды на вход во внутриволоконное пространство 12л/ч

Для данной микрофльтрационной полуволоконной мембраны с размером пор 0,7 мкм перепад давления через мембрану составил максимально 0,3 атм, что коррелируется с рекомендуемыми предельными нагрузками на микрофльтрационное волокно [127] и рекомендациями производителя по использованию FiberCell [129].

С целью исследования гидродинамики потоков во внутриволоконном пространстве были рассмотрены варианты подачи питательной среды на 1-ые и 8-ые сутки процесса культивирования, что соответствует максимальному и минимальному значению коэффициента проницаемости (рисунки 4.13 – 4.15). Для 1-х суток распределение векторов скоростей потока вдоль осевого сечения полуволоконной мембраны показано на рисунке 4.13. С увеличением численности клеток увеличивается их потребность в питании, поэтому растет значение объемного расхода пермеата, необходимого для обеспечения жизнедеятельности клеток. Следовательно, растет сопротивление, оказываемое клеточным слоем на поток через мембрану. В связи с чем необходимо увеличивать расход питательной среды, подаваемый на вход в биореактор.

При анализе скоростного распределения потока необходимо отметить изменение скорости по длине волокна (рисунки 4.13 – 4.15). Изменение наблюдается вследствие высокой проницаемости волокна в начальный момент времени.

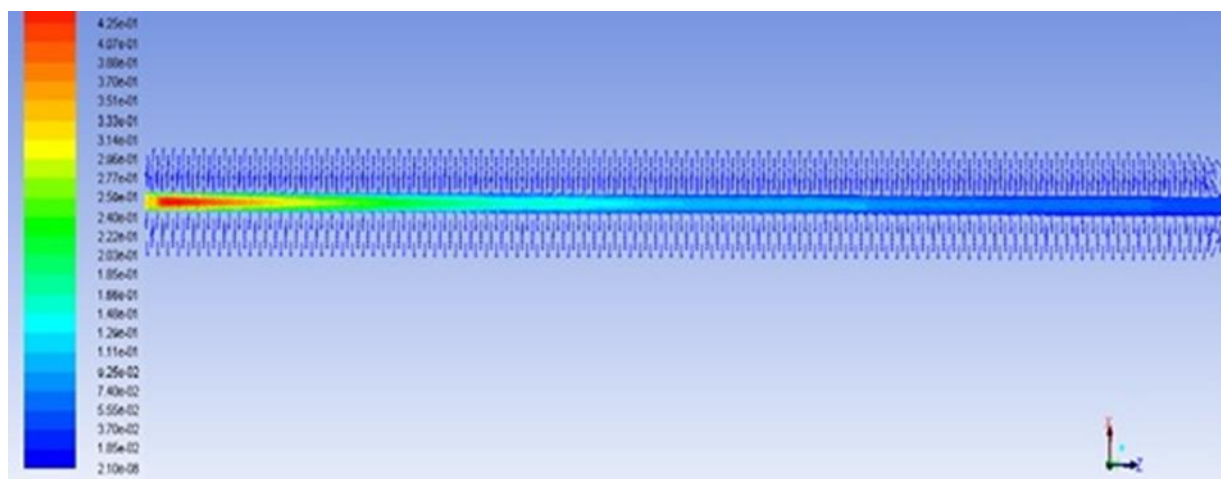


Рисунок 4.13 – Распределение скорости потока питательной среды по длине мембранного волокна на 1-е сутки культивирования (течение среды слева направо)

Питательная среда свободно проникает через основное количество пор, поскольку на 1-е сутки культивирования количество клеток на поверхности волокна минимально, клетки не закрывают поры, и, следовательно, слой клеток не оказывает сопротивление потоку среды через поры. В связи с этим большое количество потока питательной среды проникает сквозь поры, не достигая середины длины волокна, что показывает изменение цвета от красного к голубому.

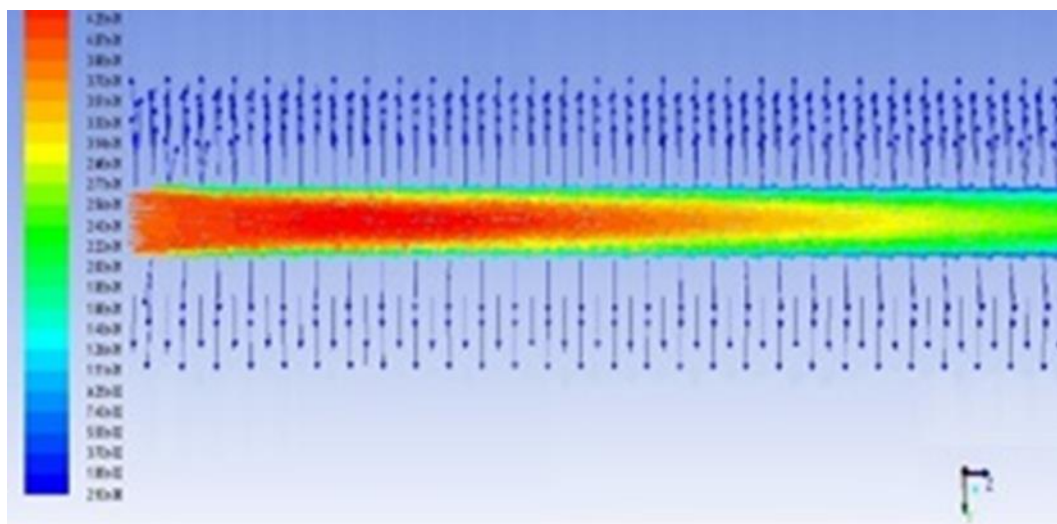


Рисунок 4.14 – Распределение скоростей потока питательной среды на входе в мембранное волокно на 1-ые сутки культивирования (увеличенный масштаб, течение среды слева направо)

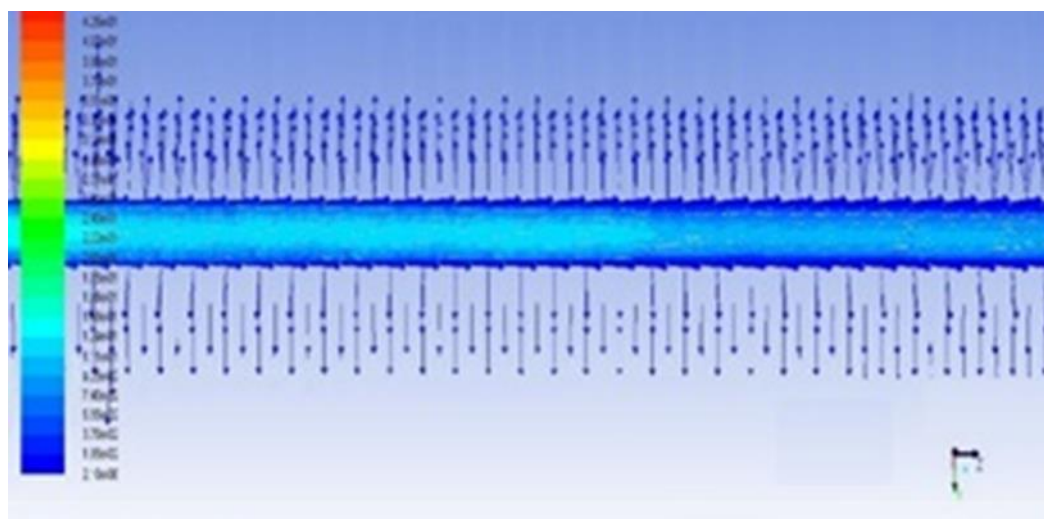


Рисунок 4.15 – Распределение скоростей потока питательной среды на выходе из мембранного волокна на 1-ые сутки культивирования (увеличенный масштаб, течение среды слева направо)

Распределение скоростей вдоль одной половолоконной мембраны на 8-е сутки культивирования (минимальное значение коэффициента проницаемости) показано на рисунках 4.16 – 4.18.

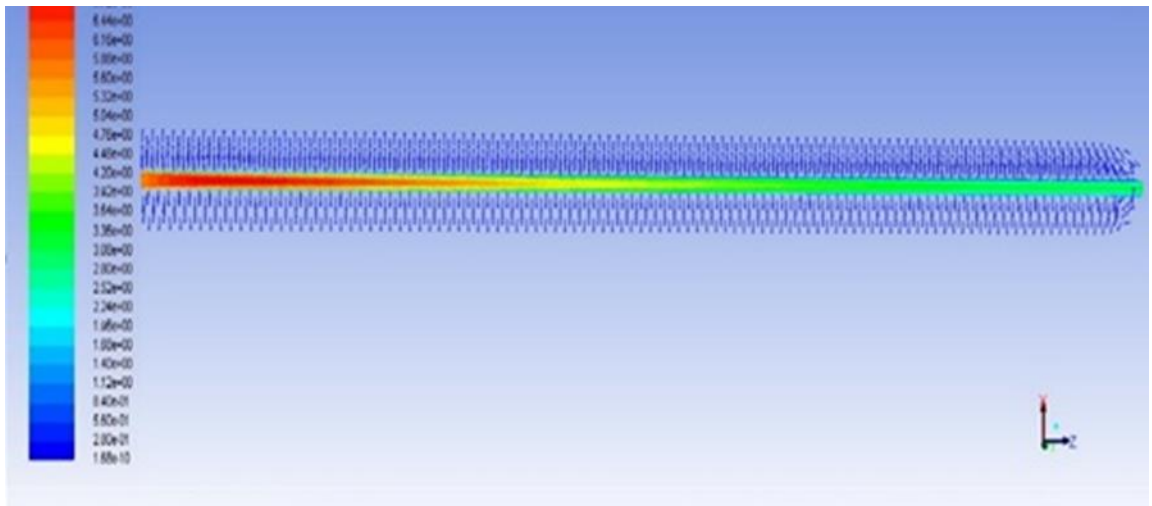


Рисунок 4.16 – Распределение скоростей потока питательной среды по длине мембранного волокна на 8 сутки культивирования (течение среды слева направо)

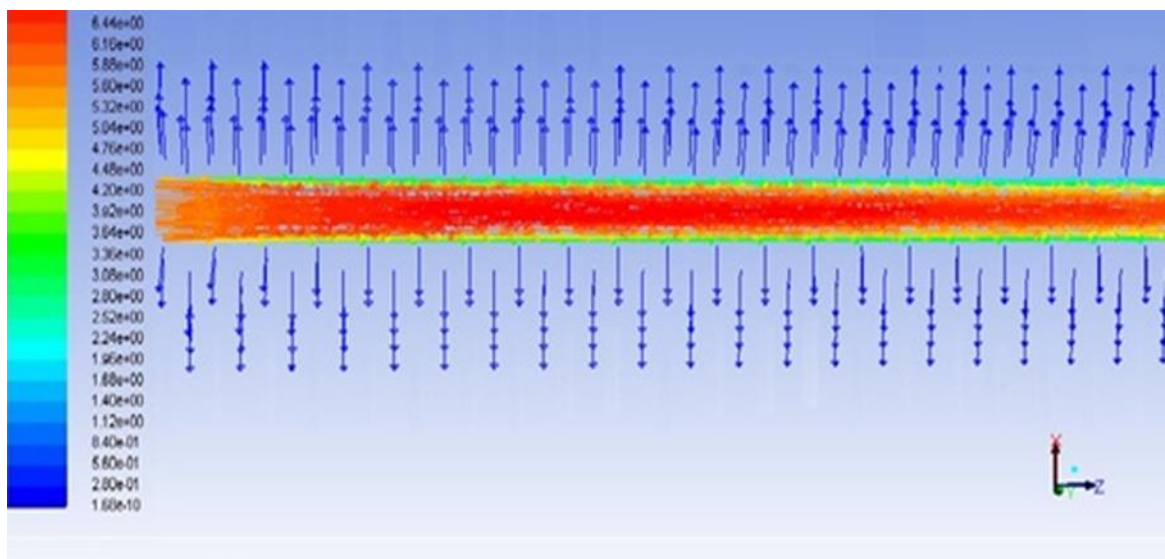


Рисунок 4.17 – Распределение скоростей потока питательной среды на входе в мембранное волокно на 8 сутки культивирования (увеличенный масштаб, течение среды слева направо)

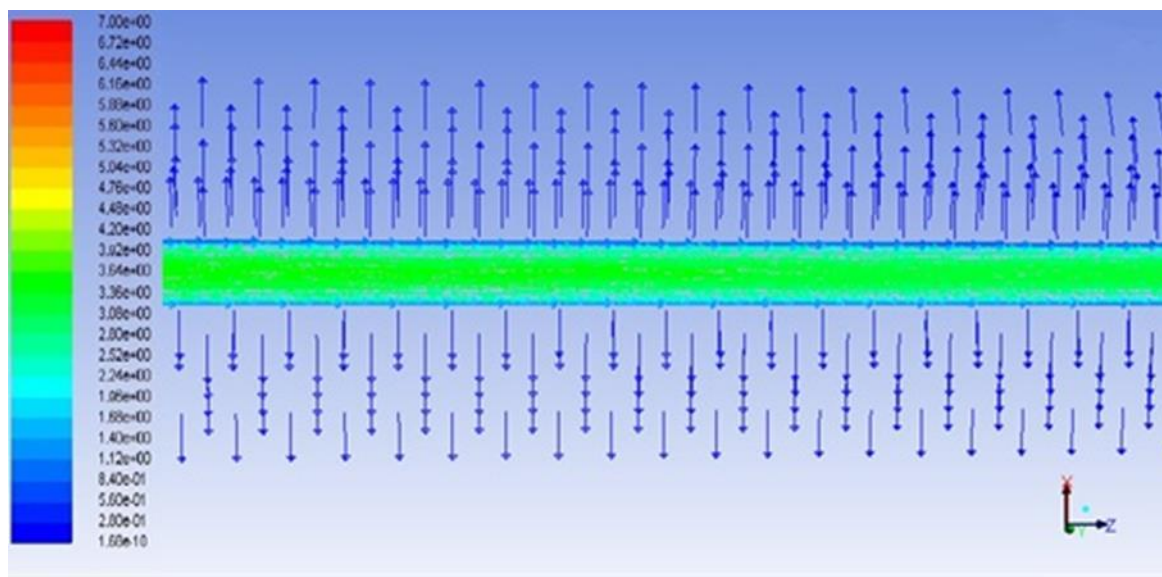


Рисунок 4.18 – Распределение скоростей потока питательной среды на выходе из мембранного волокна на 8 сутки культивирования (увеличенный масштаб, течение среды слева направо)

В результате анализа распределения скоростей было установлено, что на 1-ые и 8-ые сутки культивирования при минимальном и максимальном расходе по длине полуволоконной мембраны (что соответствует максимальному и минимальному коэффициенту проницаемости) обеспечивается поток пермеата, необходимый для обеспечения жизнедеятельности клеток.

4.2.3 Выбор режима подачи питательной среды во внутриволоконное пространство

Для определения значения расхода питательной среды на вход во внутриволоконное пространство биореактора было рассмотрено несколько технологических режимов:

1. поддерживать на протяжении всего времени культивирования максимально возможный расход, согласно рекомендациям производителя;
2. поддерживать ступенчатую подачу потока, то есть вычислить определенные промежутки времени, по истечении которых необходимо менять расход для

обеспечения необходимого количества питательной среды для жизнедеятельности клеток;

3. поддерживать плавное изменение расхода, рассчитав необходимые значения расходов питательной среды для каждых суток культивирования.

Режим 1. Расчет максимально возможного расхода на вход во внутриволоконное пространство

Исходя из рекомендаций производителя биореактора [130] максимальный расход питательной среды на входе во внутриволоконное пространство составляет 12 л/ч. Данное значение было выбрано для стационарной подачи потока питательной среды во внутриволоконное пространство биореактора. На основе разработанной модели в программном пакете ANSYS Fluent (глава 3) был рассчитан поток пермеата с учетом изменения проницаемости полуволоконной мембраны (таблица 4.5, рисунки 4.19, 4.20).

Таблица 4.5– Результаты расчета подачи питательной среды для режима 1

Время, сутки	Количество клеток, штук	Объемный расход на входе во ВП, л/ч	Объемный расход через мембрану (пермеат), л/ч
0	450000	12	4,5
1	1021165		4,35
2	2307265		4,2
3	5136867		3,95
4	11072204		3,5
5	22303858		3,0
6	39595843		2,6
7	58345336		2,3
8	72070260		2,2

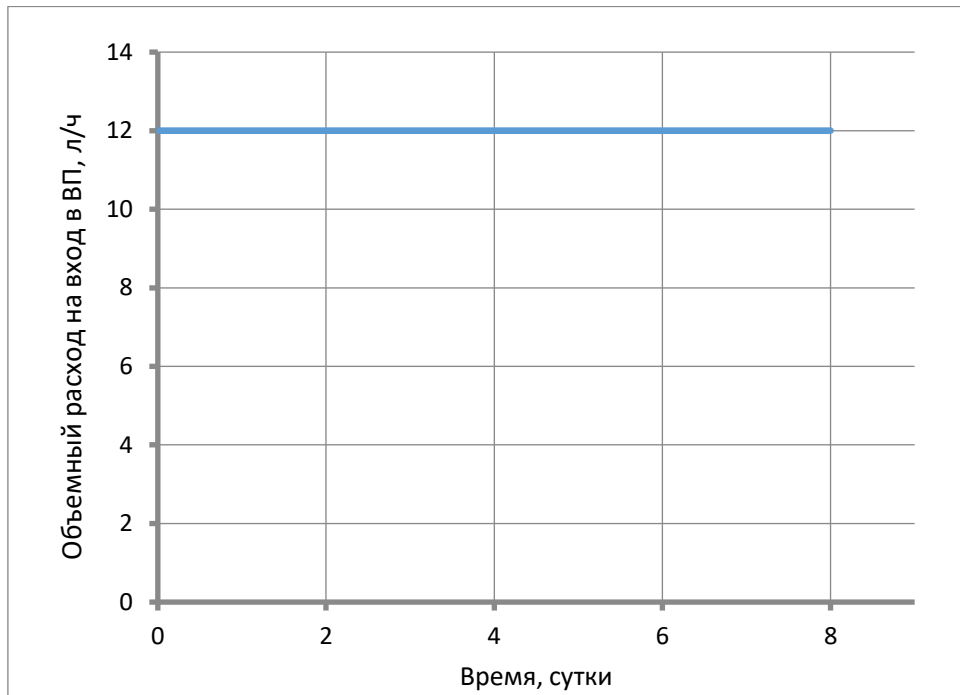


Рисунок 4.19 – Режим 1: Зависимость объемного расхода на входе во внутриволоконное пространство от времени

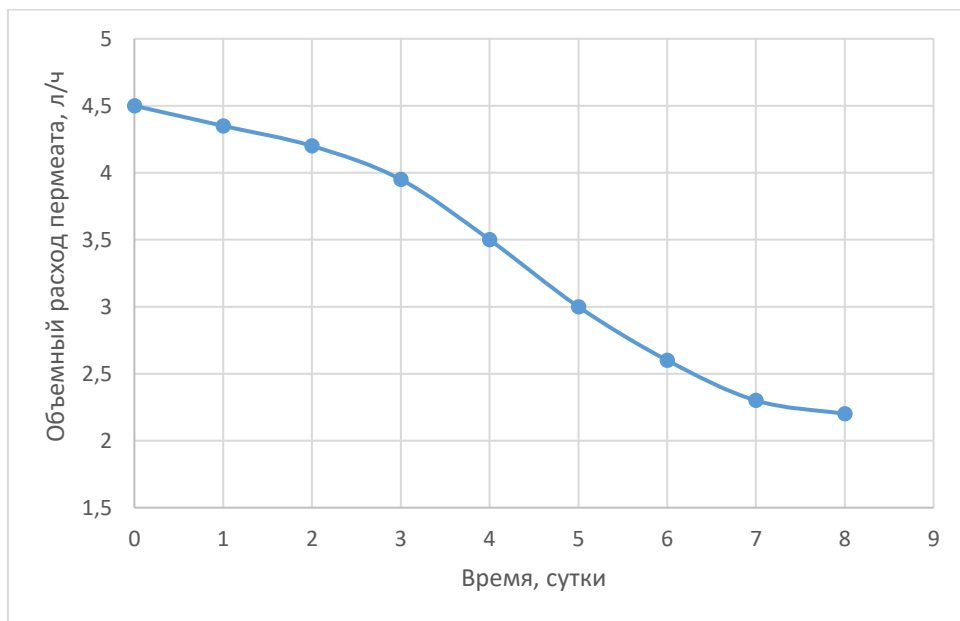


Рисунок 4.20 - Режим 1: Зависимость объемного расхода пермеата от времени

При сравнении зависимости объемного расхода пермеата от времени (рисунок 4.20) и требуемых расходов пермеата (таблица 4.4) можно сделать вывод,

что на протяжении 8 дней культивирования через мембрану проходит поток пермеата, достаточный для питания клеток.

Режим 2. Расчет расхода на вход во внутриволоконное пространство при условии ступенчатой подачи потока

Расчет был проведен при трех разных расходах питательной среды на вход во внутриволоконное пространство, находящихся в пределах, указанных производителем биореактора в спецификации – 4 л/ч, 8 л/ч, 12 л/ч. [129] По результатам расчетов составлена зависимость объемного расхода пермеата от времени с учетом изменения коэффициента проницаемости полуволоконной мембраны при каждом из трех значений.

Расход питательной среды 4 л/ч

На рисунке 4.21 отражены данные по результатам расчетов зависимости среднего объемного расхода пермеата от времени при различном коэффициенте проницаемости мембраны при расходе питательной среды во внутриволоконном пространстве 4 л/ч.

Изменение объемного расхода пермеата с течением времени хорошо описывается полиномиальной зависимостью второй степени

$$Q_{\Pi} = 4,0 \cdot 10^{-5} t^2 - 0,013 t + 1,23 \text{ (л/ч)}.$$

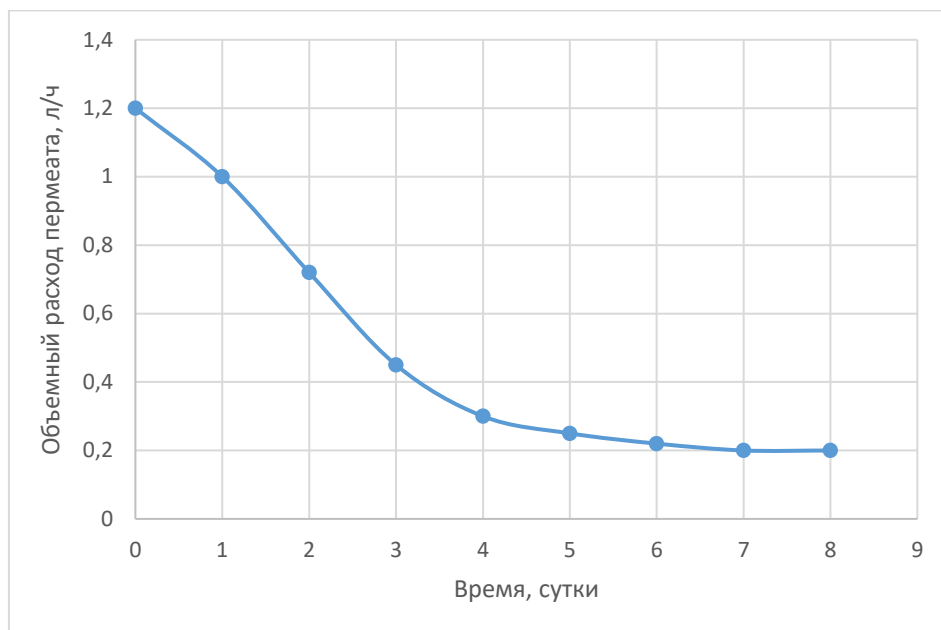


Рисунок 4.21 – Режим 2: изменение объемного расхода пермеата во времени при расходе 4 л/ч на вход во внутриволоконное пространство

Расход питательной среды 8 л/ч

На рисунке 4.22 отражены данные по результатам расчетов зависимости среднего объемного потока пермеата от времени с учетом различного коэффициента проницаемости мембраны при расходе питательной среды во внутриволоконном пространстве 8 л/ч.

Изменение объемного потока пермеата с течением времени хорошо описывается полиномиальной зависимостью третьей степени. Таким образом, зависимость объемного потока пермеата Q_{Π} от времени t можно представить уравнением:

$$Q_{\Pi} = 8,0 \cdot 10^{-7}t^3 - 2,0 \cdot 10^{-4}t^2 + 0,004t + 2,97 \quad (\text{л/ч})$$

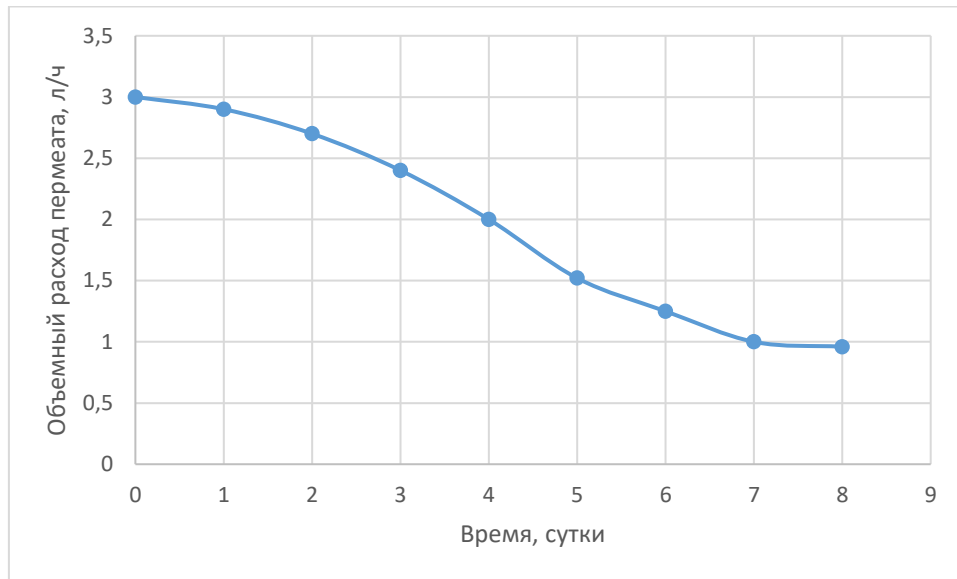


Рисунок 4.22 – Режим 2: изменение объемного расхода пермеата во времени при расходе 8 л/ч на вход во внутриволоконное пространство

Расход питательной среды 12 л/ч

Результаты расчета были получены для режима 1 (таблица 4.5 и рисунок 4.20). Изменение объемного потока пермеата с течением времени хорошо описывается полиномиальной зависимостью третьей степени. Таким образом, зависимость объемного потока пермеата Q_{Π} от времени t можно представить уравнением:

$$Q_{\Pi} = 7,0 \cdot 10^{-7}t^3 - 2,0 \cdot 10^{-4}t^2 + 0,004t + 4,45 \quad (\text{л/ч})$$

Рисунок 4.23 отражает три зависимости объемного расхода от времени 4, 8, 12 л/ч, сведенных на один график.

Объемный расход пермеата должен быть не меньше количества питательной среды, потребляемой клетками, в противном случае клетки окажутся в условиях недостатка питательных веществ для обеспечения процесса их жизнедеятельности.

Для определения зависимости изменения оптимального расхода питательной среды через внутриволоконное пространство в данном способе, необходимо вычислить, в течение какого времени каждый из потоков с расходами 4, 8, 12 л/ч сможет поддерживать подачу питательных веществ через мембрану, достаточную для обеспечения потребностей клеток.

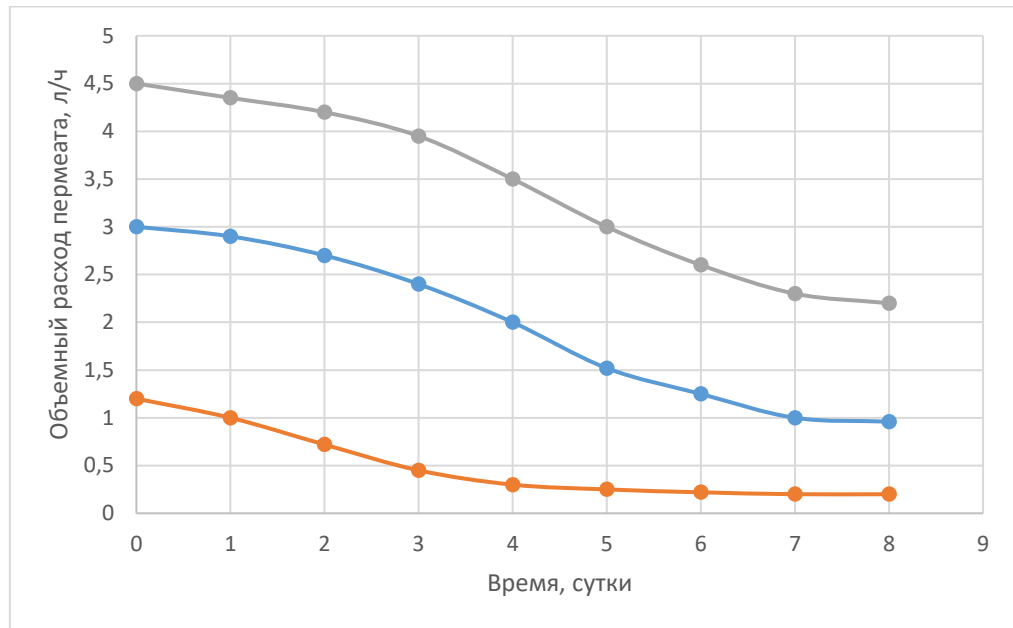


Рисунок 4.23 – Режим 2: зависимости объемных расходов пермеата при различных расходах питательной среды на вход во внутриволоконное пространство

На основе рассчитанных объемных расходов пермеата для каждого из трех потоков на вход в биореактор были найдены три значения времени, за которые поток пермеата достигнет минимально допустимого значения, необходимого для жизнедеятельности клеток.

Результаты расчета:

Для расхода 4 л/ч:

$t \leq 4$ суток.

Согласно уравнению (4.16) при времени $t = 4$ суток клетки заполнили поверхность волокон на 13,8%.

Для расхода 8 л/ч:

$t \leq 6$ суток.

При времени $t = 6$ суток поверхность волокон заполнена на 87 %.

Для расхода 12 л/ч:

$t \leq 8$ суток.

По окончании данного периода поверхность волокон заполнена клетками на 100%.

Зависимость объемного расхода пермеата от времени в зависимости от различных потоков на вход во внутриволоконное пространство в данном случае имеет ступенчатый вид (рисунок 4.24).

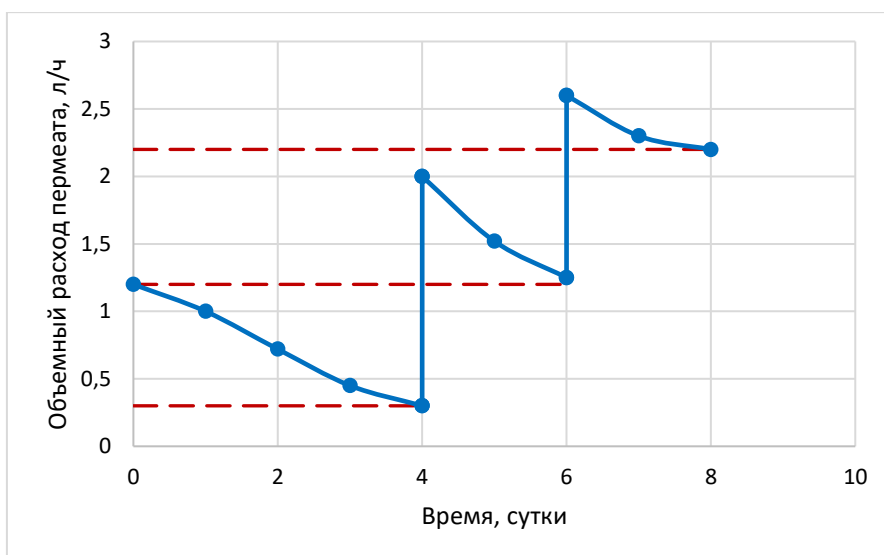


Рисунок 4.24 – Режим 2: изменение объемного расхода пермеата во времени (пунктирная линия указывает минимально допустимые значения расхода пермеата)

Зависимость изменения объемного расхода на входе во внутриволоконное пространство будет иметь ступенчатый вид (рисунок 4.25).

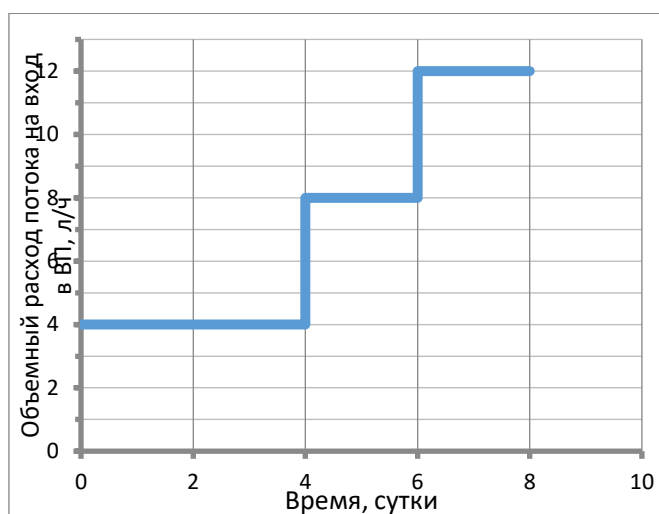


Рисунок 4.25 – Режим 2: Ступенчатое изменение объемного расхода на вход во внутриволоконное пространство от времени

Режим 3. Расчет объемного расхода на вход во внутриволоконное пространство для каждой суток культивирования

Для первых суток культивирования был рассчитан объемный расход питательной среды на вход во внутриволоконное пространство, который составил 1 л/ч. Аналогичным образом, был проведен расчет для каждой суток культивирования. Результаты расчета представлены в таблице 4.6.

Для конечного этапа культивирования поток пермеата необходимо поддерживать на значении не менее 2,1 л/ч. Рассчитанный объемный расход, подаваемый на вход биореактора для последних суток культивирования, составляет 11,6 л/ч.

Таблица 4.6 – Результаты расчета величины оптимального расхода, подаваемого на вход во внутриволоконное пространство

Время, сутки	Количество клеток, штук	Объемный расход на вход во внутриволоконное пространство, л/ч
0	450000	1
1	1021165	1,5
2	2307265	2,1
3	5136867	3,0
4	11072204	4,0
5	22303858	4,9
6	39595843	6,2
7	58345336	8,3
8	72070260	11,6

Из зависимости расхода питательной среды на вход в биореактор от времени культивирования (рисунок 4.26) хорошо видно, что данные можно описать

экспоненциальной зависимостью вида $f(x) = A \cdot e^{bx}$, где коэффициенты A и b , соответственно, равны 1,12 и 0,012.

Таким образом, эмпирическая зависимость, по которой можно определить расход питательной среды на вход в биореактор, будет иметь вид (л/ч):

$$Q_1 = 1,12 \cdot e^{0,012t} \quad (4.23)$$

где t – время культивирования, ч.

Таким образом, при данном режиме подачи питательной среды объемный расход пермеата для каждого суток культивирования (рисунок 4.27) соответствует рассчитанным требуемым значениям (таблица 4.4).

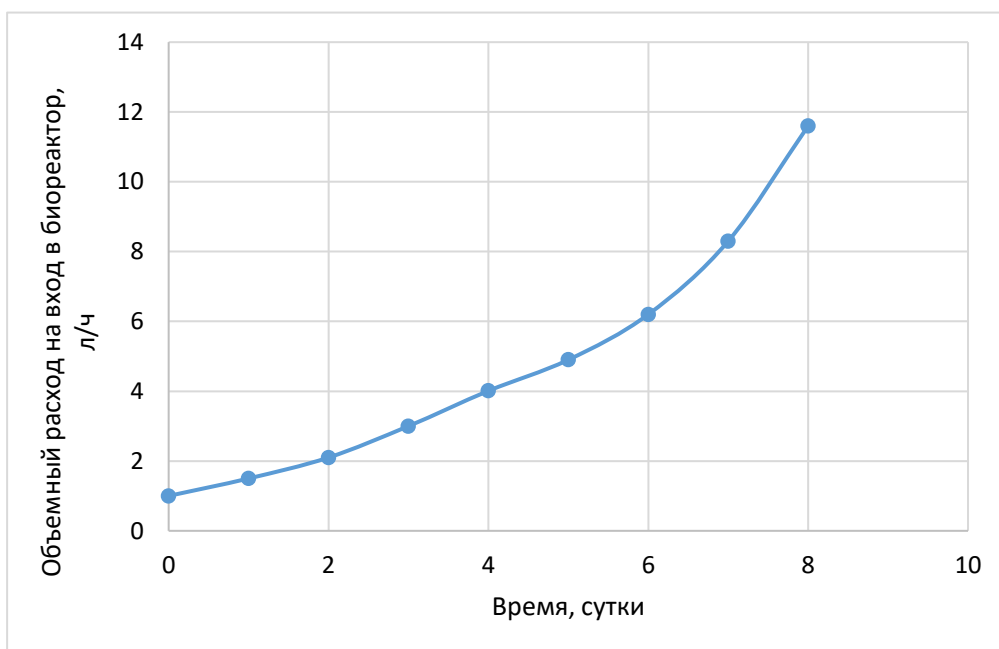


Рисунок 4.26 – Режим 3: зависимость объемного расхода потока на вход во внутриволоконное пространство биореактора от времени

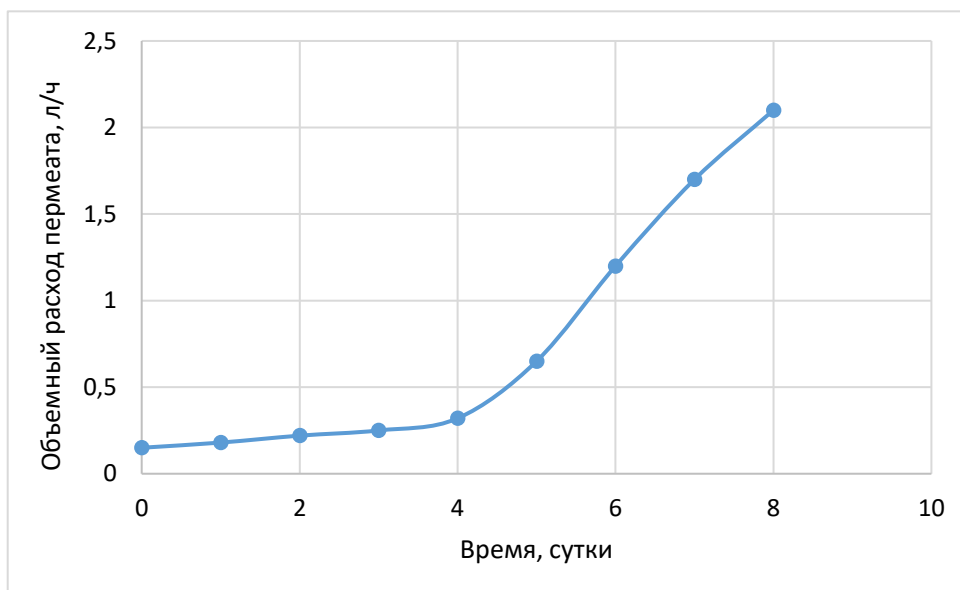


Рисунок 4.27 – Режим 3: изменение объемного расхода пермеата от времени

Таким образом, были рассчитаны численные значения расхода жидкости на вход во внутриволоконное пространство биореактора, и определена зависимость, по которой необходимо изменять скорость подачи данного потока.

4.2.4 Сравнение энергоэффективности предложенных режимов подачи питательной среды

Для выбора одного из рассчитанных режимов подачи питательной среды во внутриволоконное пространство сравнивались энергетические нагрузки для каждого из них. Основными элементами экспериментальной установки (глава 2), потребляющими электроэнергию, являются: рабочая камера РК4, автоклавируемый сосуд АС1, перистальтические насосы БН8 и воздушный компрессор КВ2 (рисунок 2.12).

Автоклавируемый сосуд АС1 оснащен датчиками температуры, pH и другими дополнительными приборами. Согласно техническим характеристикам [130] мощность прибора, потребляемая на перемешивание с помощью лопастной мешалки, составляет 150 Вт. Мощность, потребляемая на нагрев жидкости до необходимой температуры, составляет 264 Вт. Затраты на остальные функции и датчики автоклавируемого сосуда являются незначительными.

Блок перистальтических насосов БН8 состоит из двух роликовых головок, основной характеристикой которых является количество оборотов в минуту. Максимальная потребляемая мощность составляет 24 Вт.

Воздушный компрессор KB2 работает непрерывно в течение всего времени культивирования. Основной характеристикой является расход воздуха. Максимальная потребляемая мощность – 110 Вт.

Сведения о потреблении электроэнергии данными приборами описаны в таблице 4.7.

Согласно существующим тарифам на электроэнергию для предприятий Москвы, действующим с 1 января 2015 года, стоимость 1 кВт·ч составляет 2,62 руб. для ценовой категории до 150 кВт и 2,60 руб. для ценовой категории от 150 кВт до 670 кВт.

Таблица 4.7 – Сведения о потреблении энергии для расчета энергоэффективности установки

Элемент установки	Изменяемый параметр, единицы измерения	Значение изменяемого параметра	Потребляемая мощность, кВт·ч
АС1, РК4	Скорость мешалки, об/мин	1400	0,15
		800	0,09
	Температура, °С	60	0,26
		40	0,18
БН8	Обороты, об/мин	220	0,024
KB2	Расход воздуха, м3/мин	0,065	1,1
		0,115	1,1

Режим 1

Для поддержания постоянного максимально возможного расхода питательной среды на входе в ВП биореактора на протяжении всего времени культивирования на основании данных руководств по эксплуатации приборов и

установок [20, 130, 131] были рассчитаны затрачиваемые мощности элементов установки (таблица 4.8).

Стоимость процесса D , затраченная на работу установки, определяется по формуле:

$$D = C \cdot P_{\text{общ}} \cdot \tau_i \quad (4.24)$$

где C - стоимость одного кВт·ч, руб; $P_{\text{общ}}$ - затрачиваемая мощность элементов установки, кВт; τ_i - время работы установки, ч.

$$P_{\text{общ}} = P_{\text{меш}} + P_{\text{комп}} + P_{\text{нагр}} + P_{\text{нас}}$$

$$P_{\text{меш}}, P_{\text{комп}}, P_{\text{нас}} = f(Q_1)$$

$$P_{\text{нагр}} = \text{const}$$

Таблица 4.8 – Характеристики элементов экспериментальной установки для расчета энергоэффективности (режим 1)

Наименование потребителя	Изменяемый параметр, единицы измерения	Значение изменяемого параметра	Потребляемая мощность, кВт·ч	Время работы элемента, ч
АС1	Скорость мешалки, об/мин	800	0,09	192
	Температура, °С	40	0,18	192
РК4	Скорость мешалки, об/мин	500	0,05	192
	Температура, °С	40	0,18	192
БН8	Расход жидкости, об/мин	251	0,027	192
КВ2	Расход воздуха, м3/мин	0,115	1,1	192

Суммарная потребляемая мощность установки при данном способе работы составляет 312,4 кВт·ч. Стоимость работы рассматриваемых потребителей энергии за все время процесса составляет 812 руб.

Режим 2

Для ступенчатого режима подачи потока на вход во внутриволоконное пространство биореактора, согласно зависимости на рисунке 4.25, были рассчитаны затрачиваемые мощности элементов установки (таблица 4.9). Данные таблицы 4.9 получены на основании данных руководств по эксплуатации приборов и установок [20, 130, 131].

Таблица 4.9 – Характеристики элементов экспериментальной установки для расчета энергоэффективности (режим 2)

Элемент установки	Изменяемый параметр, единицы измерения	Значение изменяемого параметра	Потребляемая мощность, кВт·ч	Время работы элемента, ч
АС1	Скорость мешалки, об/мин	800	0,09	55,2
		500	0,05	33,6
		100	0,01	103,2
	Температура, °С	40	0,18	192
РК4	Скорость мешалки, об/мин	500	0,05	192
	Температура, °С	40	0,18	
БН8	Расход жидкости, об/мин	295	0,032	55,2
		195	0,021	33,6
		98	0,01	103,2
КВ2	Расход воздуха, м3/мин	0,65	1,1	55,2
		0,43		33,6
		0,115		103,2

Суммарная потребляемая мощность установки при данном способе работы составляет 301,1 кВт·ч. Стоимость работы рассматриваемых потребителей энергии за все время процесса составляет 782,8 руб.

Режим 3

При изменении требуемого расхода на входе в ВП биореактора по закону (4.23) элементы экспериментальной установки потребляют энергию, параметры которой отражены в таблице 4.10. Информация таблицы 4.10 рассчитана на основании данных руководств по эксплуатации приборов и установок [20, 130-132].

Таблица 4.10 – Характеристики элементов экспериментальной установки для расчета энергоэффективности (метод 3)

Наименование потребителя	Изменяемый параметр, единицы измерения	Значение изменяемого параметра	Потребляемая мощность, кВт·ч	Время работы элемента, ч
АС1	Скорость мешалки, об/мин	800	0,09	55,2
		500	0,05	33,6
		100	0,01	103,2
	Температура, °С	40	0,18	192
РК4	Скорость мешалки, об/мин	500	0,05	192
	Температура, °С	40	0,18	192
БН8	Расход жидкости, об/мин	295	0,032	55,2
		195	0,021	33,6
		98	0,01	103,2
КВ2	Расход воздуха, м ³ /мин	0,65	1,1	55,2
		0,43	1,1	33,6
		0,115	1,1	103,2

Суммарная потребляемая мощность установки при данном режиме работы составляет 223,7 кВт·ч. Стоимость работы рассматриваемых потребителей энергии за все время процесса составляет 581,62 руб.

Таким образом, среди предложенных режимов подачи питательной среды во внутриволоконное пространство способ 3 является наиболее энергоэффективным, поскольку регулирование расхода происходит по

экспоненциальной зависимости, значения которой рассчитаны для каждых суток культивирования. Стоимость процесса в данном случае снижается на 30%.

4.3 Моделирование межволоконного пространства биореактора

Задачей моделирования межволоконного пространства (МП) является расчет численного значения дополнительного потока питательной среды, подаваемого на вход в межволоконное пространство половолоконного мембранного биореактора для отвода метаболитов, и исследование биореактора на наличие застойных зон.

4.3.1 Расчет необходимой скорости потока

Согласно принятому допущению, в процессе культивирования (до наступления контактного ингибирования) рост клетки начинает ингибироваться, когда объем продуктов метаболизма, находящийся около клетки, равен её объему.

Поскольку клетка имеет форму полусферы, то её объем можно вычислить по формуле:

$$v = \left(\frac{1}{6} \pi \cdot d^3 \right) / 2$$

Соответственно, при среднем диаметре клетки 12 мкм объем клетки равен:

$$v = 4,52 \cdot 10^{-16} \text{ м}^3.$$

Используя рассчитанный из уравнения (4.6) объем продуктов метаболизма, выделяемый одной клеткой в единицу времени, вычислили время t_u , через которое этот объем продуктов метаболизма, выделенный клеткой, станет равен объему клетки:

$$t_u = \frac{v}{q^M} \tag{4.25}$$

$$t_u = 73 \text{ с}$$

При полном заполнении мембранного волокна клетками, через 73 с будет выделено продуктов метаболизма V^M :

$$V^M = q^M \cdot N_{max} \cdot t_u \tag{4.26}$$

$$V^M = 3,26 \cdot 10^{-8} \text{ м}^3$$

Следовательно, за время $t_u = 73$ с из межволоконного пространства необходимо отвести объем жидкости, равный $3,26 \cdot 10^{-8} \text{ м}^3$. А значит, для того чтобы отводить продукты метаболизма от клеток, расход жидкости, проникающей через волокно в межволоконное пространство в последние сутки культивирования, должно быть не менее:

$$Q_2 = \frac{V^M}{t_u} \quad (4.27)$$

$$Q_2 = 0,0016 \text{ л/ч}$$

Поскольку значение потока Q_2 достаточно мало, его величина остается постоянной на всем протяжении процесса культивирования.

Площадь поперечного сечения межволоконного пространства половолоконного мембранного модуля вычислена по уравнению:

$$S_2 = \frac{\pi D^2}{4} - m \frac{\pi d_2^2}{4} \quad (4.28),$$

где D – диаметр корпуса биореактора, м, d_2 – внешний диаметр мембранного волокна, м.

$$S_2 = 0,00011 \text{ м}^2$$

Учитывая объемный расход жидкости в межволоконном пространстве биореактора и площадь поперечного сечения межволоконного пространства мембранного модуля, вычислили минимальную линейную скорость потока питательной среды, при достижении которой продукты метаболизма будут своевременно отведены от клеток:

$$v_2 = \frac{Q_2}{S_2} \quad (4.29)$$

$$v_2 = 4,09 \cdot 10^{-6} \frac{\text{м}}{\text{с}}$$

4.3.2 Оценка гидродинамического режима течения среды

Для исследуемого биореактора, трехмерная модель которого отражена на рисунке 4.28, расчет критерия Рейнольдса был проведен аналогично варианту для потока, который обтекает параллельный пучок труб. Расположение мембран отражено на рисунке 4.29.

В этом случае Re был вычислен по формуле:

$$Re = \frac{\rho \cdot D_2 \cdot v_2}{\mu}$$

где D_2 – расстояние между волокнами в межволоконной части, за исключением пучка самих полуволоконных мембран.

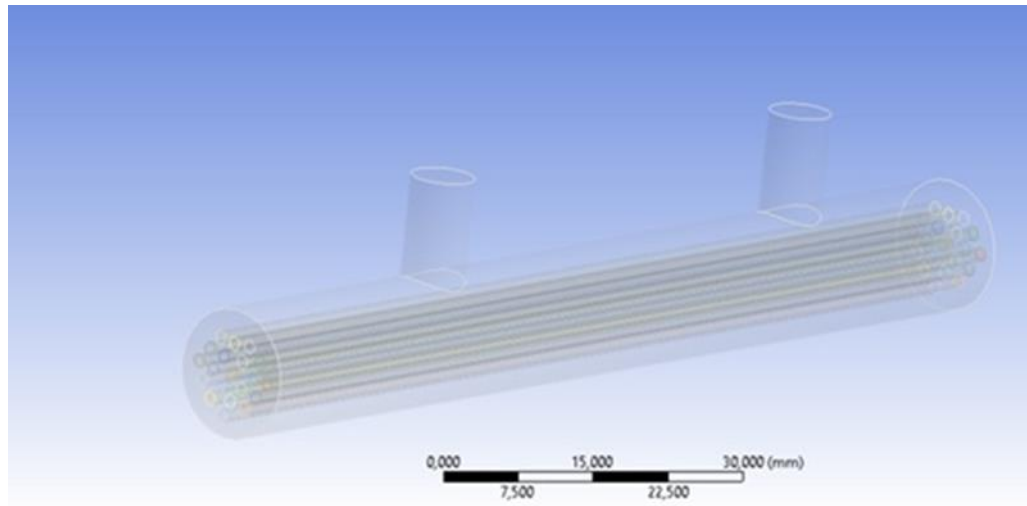


Рисунок 4.28 - Проектирование геометрии потоков полуволоконного мембранного биореактора в ANSYS Fluent

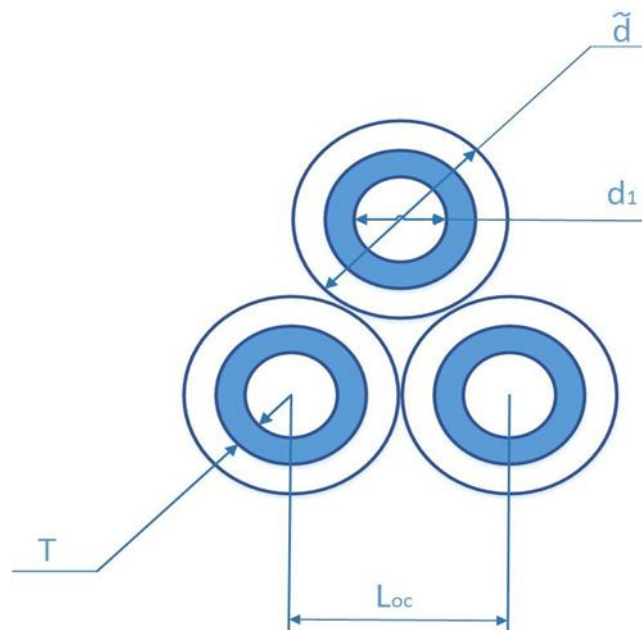


Рисунок 4.29 – Характеристические размеры волокон: T - толщина, L_{oc} – расстояние между осями волокон, d_1 – внутренний диаметр волокна

Для определения расстояния между волокнами D_2 необходимо узнать, какого диаметра должны были бы быть волокна, чтобы, касаясь друг друга, площадь их поперечного сечения была равна площади поперечного сечения корпуса реактора:

$$\frac{\pi \cdot D^2}{4} = m \cdot \frac{\pi \cdot \tilde{d}_2^2}{4} \quad (4.30)$$

где $\tilde{d}$ – диаметр волокон, удовлетворяющий описанному выше условию.

Тогда из выражения (4.30) получаем:

$$\tilde{d} = \sqrt{\frac{D^2}{m}} \quad (4.31)$$

Поскольку волокна, находящиеся в биореакторе, распределены равномерно, расстояние между осями этих волокон L_{oc} составляет $L_{oc} = \frac{2 \cdot \tilde{d}}{2} = \tilde{d}$, а расстояние между волокнами D_{MB} вычисляется как:

$$D_2 = L_{oc} - (d_1 + 2T)$$

Диаметр волокон, площадь поперечного сечения которых заполнила бы площадь поперечного сечения биореактора, составляет:

$$\tilde{d} = 2,5 \cdot 10^{-3} \text{ м}$$

Расстояние между осями волокон, находящимися в биореакторе, составляет:

$$L_{oc} = \tilde{d} = 2,5 \cdot 10^{-3} \text{ м}.$$

Расстояние между волокнами:

$$D_2 = 6 \cdot 10^{-4} \text{ м}$$

Число Рейнольдса при рассчитанных параметрах биореактора и линейной скорости потока во внутриволоконном пространстве составляет $Re = 0,00035$, следовательно, внутри биореактора поддерживается ламинарный режим течения среды, позволяющий обеспечить необходимые условия культивирования клеток.

4.3.4 Расчет распределения потоков в межтрубном пространстве биореакторе

С использованием рассчитанного необходимого расхода жидкости в межволоконном пространстве для отвода продуктов метаболизма от клеток был проведен численный расчет в CFD-пакете ANSYS Fluent. В связи с конструктивными особенностями проектируемого полуволоконного биореактора возможны два способа подачи питательной среды в межволоконное пространство относительно основного потока внутри волокон: прямоточный и противоточный. Расчет скоростного распределения питательной среды был проведен для обоих способов организации процесса.

В случае противоточного движения потоков входными являются патрубки, отмеченные на рисунке 4.30 цифрами 1 и 3, патрубки выхода жидкости из биореактора отмечены цифрами 2 и 4. Красным цветом обозначено движение потока во внутриволоконном пространстве, синим цветом – в межволоконном пространстве.

В результате расчета данного способа подачи питательной среды получено скоростное распределение движения потоков в межволоконном пространстве (рисунки 4.31). Из рисунка 4.31 видно, что большая часть потока питательной среды выходит из межволоконного пространства через патрубок 2 и не достигает середины биореактора, поэтому можно сделать вывод о нецелесообразности ведения процесса данным способом с точки зрения отвода продуктов метаболизма. Кроме того, неравномерное скоростное распределение по длине биореактора ведет к возможным образованиям стрессовых условий для культивируемых клеток, что неблагоприятно влияет уже на саму клеточную культуру и может привести к отрыву клеток от мембранной подложки.

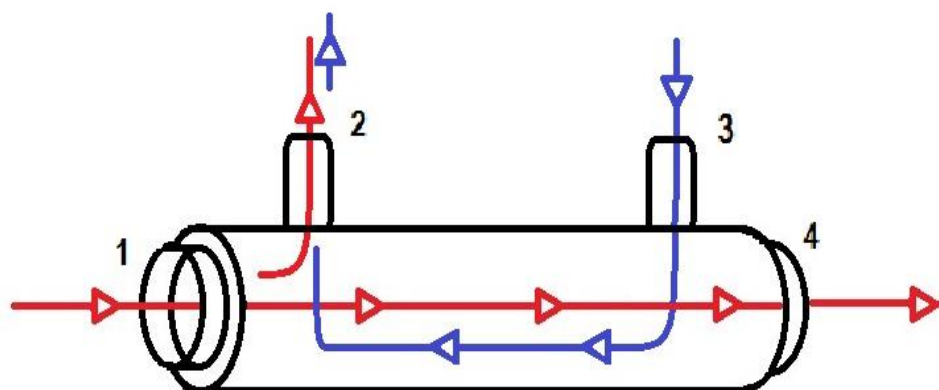


Рисунок 4.30 - Схема движения потоков в поволоконном биореакторе в случае противотока: красный – движение среды во внутриволоконном пространстве, синий – движение среды в межволоконном пространстве

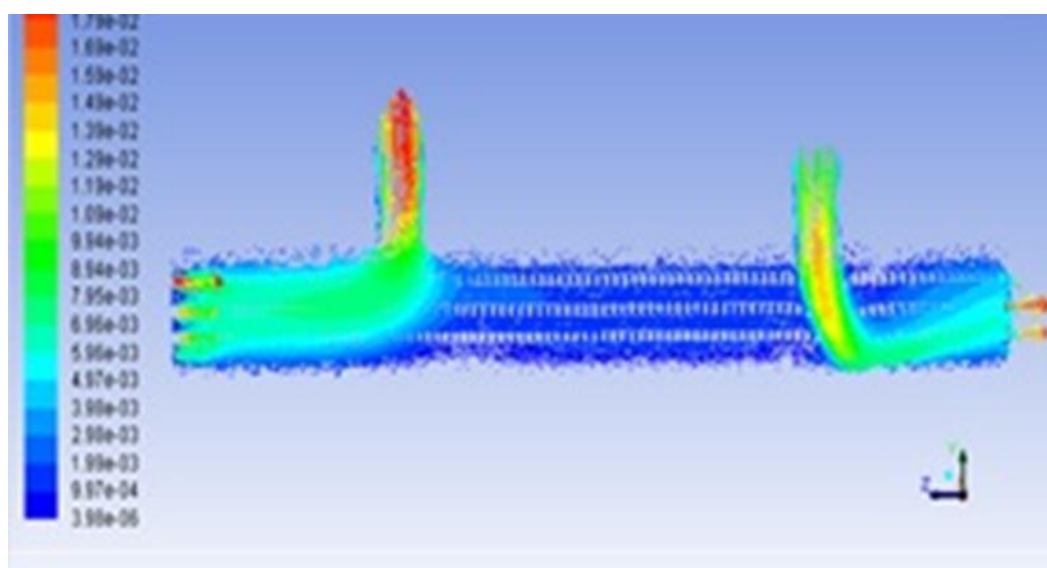


Рисунок 4.31 - Распределение скоростей потоков в межволоконном пространстве биореактора в конце культивирования при противоточном движении потоков

В случае проточного движения потоков входными являются соседние патрубки, обозначенные на рисунке 4.32 цифрами 1 и 2. Распределение скоростей потока показано на рисунке 4.33. Расчетная сетка не подвергается изменениям, количество ячеек также остается прежним.

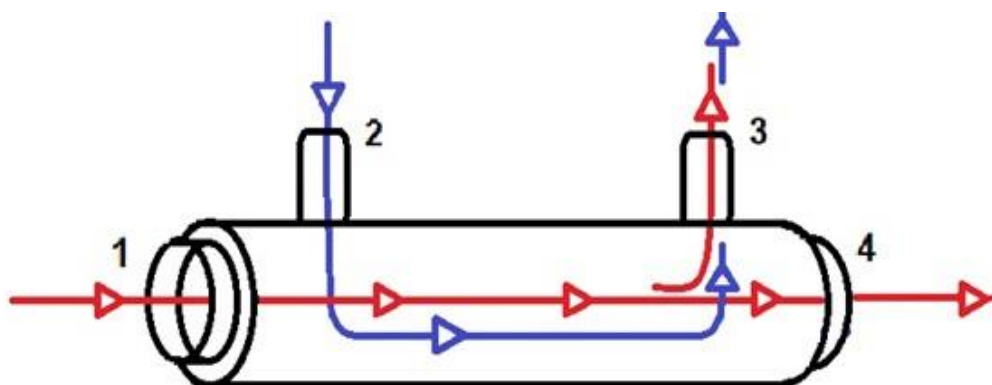


Рисунок 4.32 - Схема движения потоков в волоконном биореакторе в случае прямотока: красный – движение среды во внутриволоконном пространстве, синий – движение среды в межволоконном пространстве

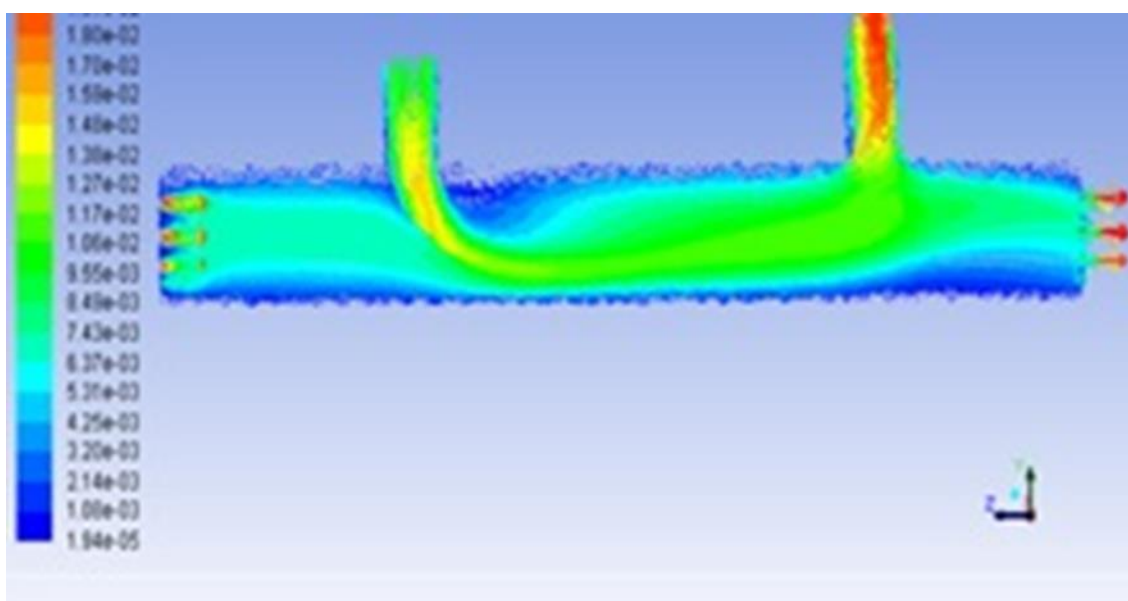


Рисунок 4.33 - Распределение скоростей потоков в биореакторе при прямоточном движении потоков

На основе анализа рассчитанного скоростного распределения для разных входных скоростей (рисунки 4.34, 4.35), можно сделать вывод о более равномерном распределении потока по длине биореактора. При данном способе организации процесса вероятность поддержания оптимальных условий для жизнедеятельности клеток является наиболее высокой, чем в случае противотока. Поток в биореакторе

остается ламинарным, что отражает распределение скорости в поперечном сечении биореактора (рисунок 4.36).

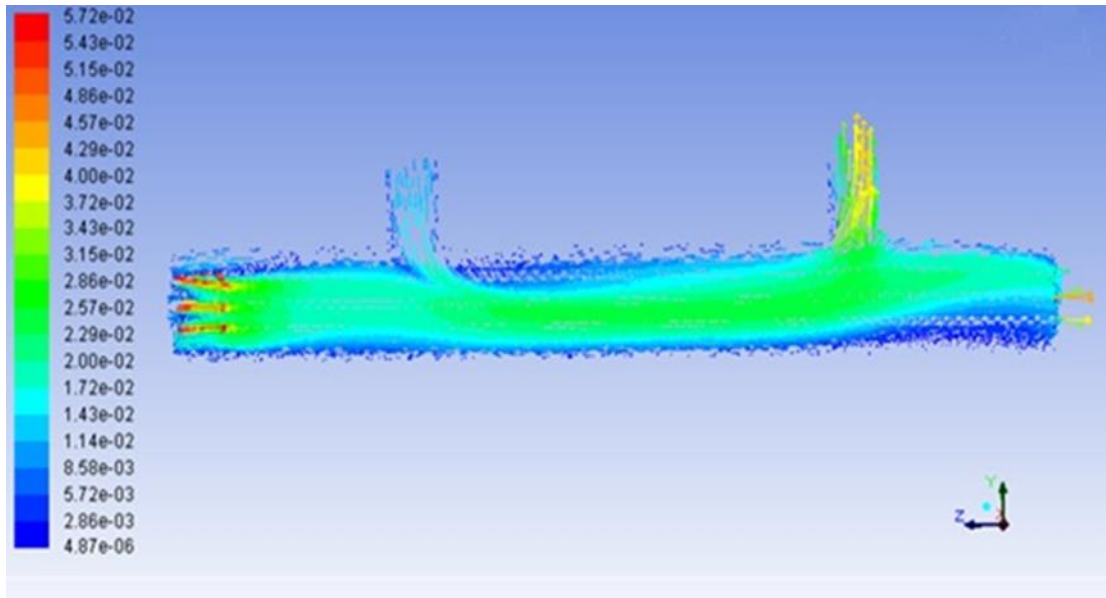


Рисунок 4.34 – Распределение скоростей потоков в биореакторе при прямооточном движении потоков (скорость на входе в ВП 0,05 м/с)

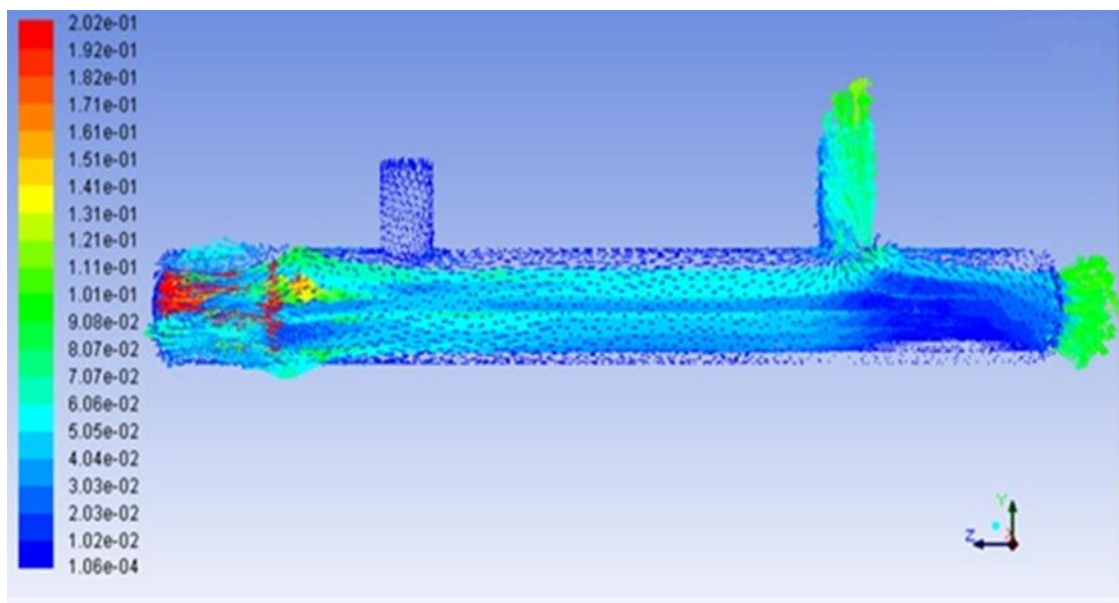


Рисунок 4.35 – Распределение скоростей потоков в биореакторе при прямооточном движении потоков (скорость на входе в ВП 0,2 м/с)

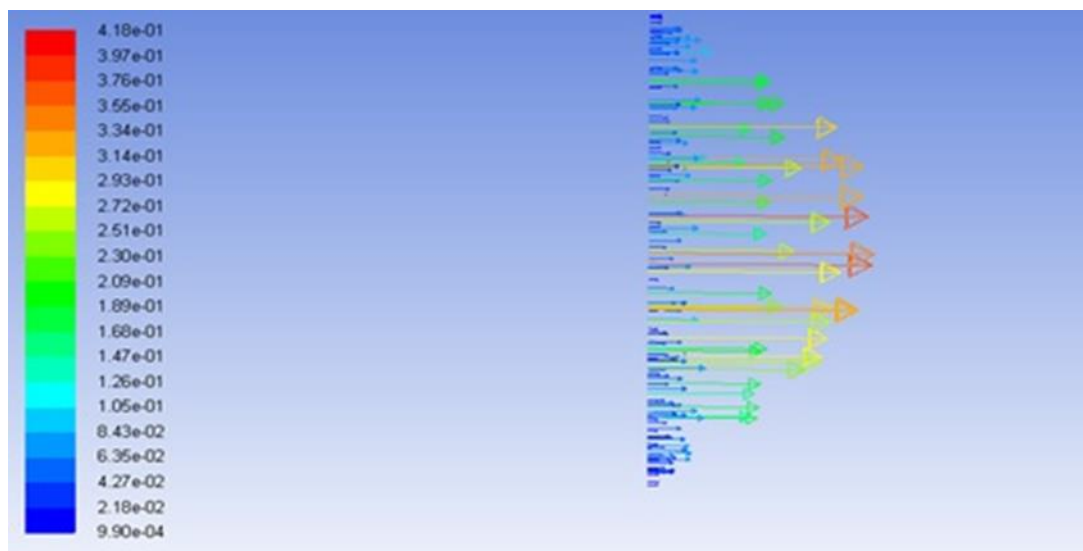


Рисунок 4.36 - Профиль скоростей потока в поперечном сечении биореактора

Ближе к концу биореактора наблюдаются области, в которых расход питательной среды существенно отличается от расхода в остальной части межволоконного пространства. Но скорость в данных областях не является меньше допустимых значений, рассчитанных ранее по уравнению (4.29), что говорит об отсутствии застойных зон на последнем этапе культивирования, что является благоприятным для роста клеточной культуры и отсутствия ингибирования роста клеток.

4.4 Сопоставление расчетных и экспериментальных данных для проверки адекватности разработанной модели для половолоконного мембранного биореактора

Для проверки адекватности разработанной модели экспериментальным данным на экспериментальной установке, представленной в части 2.4, был проведен эксперимент. Клетки СНО культивировали в половолоконном мембранном биореакторе в течение 8 суток. Параметры культивирования указаны в таблице 4.11. Начальное количество клеток – $4,5 \cdot 10^5$ штук.

Таблица 4.11 – Параметры культивирования клеток в половолоконном мембранном биореакторе

Параметр культивирования	Значение
Температура	37 ⁰ С
pH	7.3
pO ₂	30%
Расход CO ₂	0.06 л/час
Расход O ₂	0.06 л/час

На вход во внутриволоконное пространство половолоконного мембранного биореактора подавалась питательная среда с расходом, изменяемым посуточно согласно зависимости 4.26. Расход на вход в межволоконное пространство был равен $Q_2 = 0,0016 \text{ л/ч}$.

В конце 8 суток культивирования клетки были стерильно извлечены из биореактора и отделены с помощью процедуры трипсинизации. С помощью автоматизированного счетчика клеток было рассчитано количество клеток в биореакторе, которое составило $6,5 \cdot 10^7$ штук (90,3% от расчетного значения). Расчетное значение максимально возможного количества клеток в половолоконном мембранном биореакторе было $7,2 \cdot 10^7$ штук.

Сравнение расчетных и экспериментальных данных было проведено по значениям расхода потока, выходящего из внутриволоконного пространства.

На рисунке 4.37 приведена зависимость расхода потока на выходе из внутриволоконного пространства, из которого видно, что кривая расчетных значений практически совпадает с экспериментальными.

Для оценки точности расчета по модели использовалась относительная ошибка, вычисляемая по формуле:

$$\delta = \sum_{i=1}^n \left| \frac{y_i^3 - y_i^p}{y_i^3} \right| 100\% \quad (4.32)$$

Относительная ошибка составила 10,5%, показывающая, что разработанная модель достаточно точно описывает изменение расхода питательной среды во внутриволоконном пространстве.

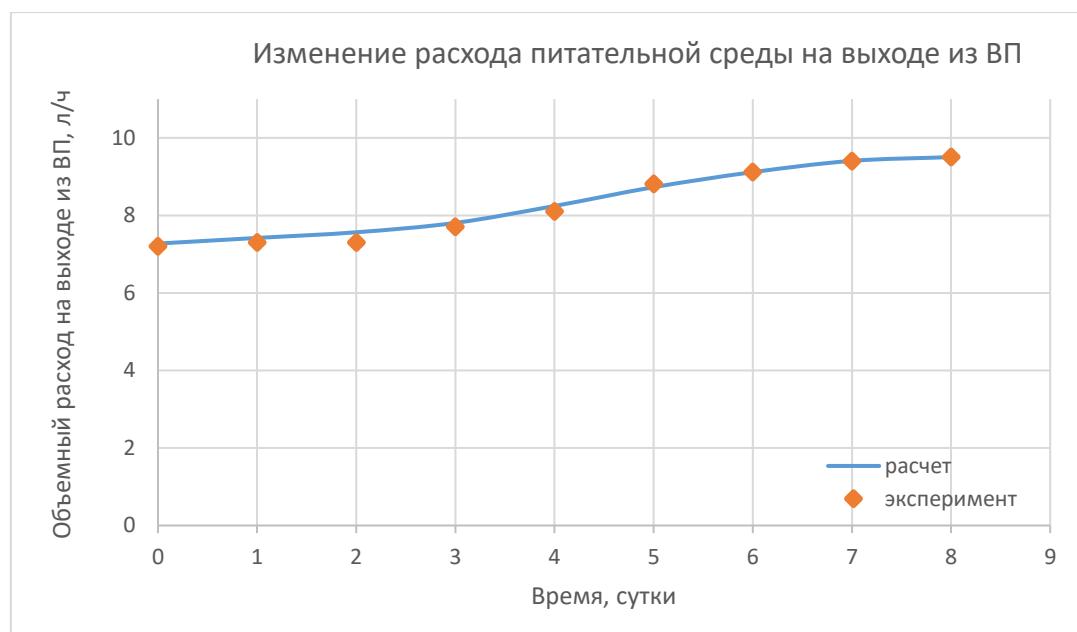


Рисунок 4.37 – Сравнение расчетных и экспериментальных данных для расхода на выходе из внутриволоконного пространства

Таким образом, в данной главе в результате обработки экспериментальных данных были определены кинетические параметры роста клеток, получены зависимости изменения расходов питательной среды на вход во внутриволоконное и межволоконное пространства половолоконного мембранного биореактора (20 волокон), и даны рекомендации по их численным значениям. С использованием пакета FLUENT Ansys исследована гидродинамическая обстановка в половолоконном биореакторе на разных этапах культивирования, проведен анализ гидродинамики на наличие застойных зон в межволоконном пространстве биореактора. Согласно расчетам, застойные зоны на различных этапах культивирования отсутствуют, что говорит о благоприятной обстановке для роста

клеточной культуры и отсутствия гидродинамических факторов, ингибирующих рост клеток.

5 Моделирование гидродинамики и массообмена в половолоконном мембранном биореакторе: масштабирование процесса (60 волокон)

По вышеизложенной схеме (глава 1, рисунок 1.15) проведен расчет для реактора большего объема с 60 половолоконными мембранами C2008 FiberCell System. Технические характеристики биореактора указаны в таблице 5.1.

Таблица 5.1 – Параметры половолоконного мембранного биореактора с 60 волокнами

Параметр	Значение
Количество волокон, шт	60
Диаметр внутриволоконного пространства мембраны, мкм	700
Диаметр мембраны внешний, мкм	1300
Толщина мембраны, мкм	300
Длина мембранного волокна, см	11
Диаметр корпуса, мм	22
Длина корпуса, см	13

Рассматриваемый биореактор C2008 FiberCell System из-за большого количества волокон имеет большую площадь поверхности для роста клеток, а также больший объем корпуса по сравнению с предыдущим биореактором, гидродинамика которого рассчитана в главе 4.

5.1 Результаты расчета количества клеток и времени культивирования

Для расчета максимально возможного числа клеток была вычислена площадь поверхности мембранных волокон S'_m для рассчитываемого биореактора (формула (4.7)) с учетом данных из спецификации биореактора из таблицы 5.1:

$$S'_m = 269,56 \cdot 10^{-4} \text{ м}^2 \quad (5.1)$$

Для данного биореактора с 60-ю волокнами был воспроизведен расчет кинетики роста клеток при плотности их высевания 5000 штук/см². Используя формулу (4.9), начальное количество клеток должно быть равным:

$$N'_0 = 1347800 \text{ штук}$$

Поскольку волокна имеют прежние размеры и свойства, то вычисленные площади по формулам (4.11, 4.12) могут быть использованы и для данного расчета. Максимальное количество клеток N'_{max} , которое можно вырастить в исследуемом мембранном модуле, согласно формуле (4.14), составляет:

$$N'_{max} = 2,17 \cdot 10^8 \text{ штук.}$$

Тогда согласно (4.15) время, через которое в рассматриваемом биореакторе вырастет максимальное количество клеток, составит $t' = 8$ суток. Следовательно, за 8 дней в рассматриваемом биореакторе возможно получить максимально возможное количество клеток, равное $2,17 \cdot 10^8$ штук. Соответственно, $K = 2,17 \cdot 10^8$.

5.2 Результаты расчета гидродинамики и массообмена во внутриволоконном пространстве биореактора

Поскольку размеры и свойства волокон не изменились, то расчет коэффициента проницаемости для половолоконной мембраны на начальном этапе культивирования и в конце процесса, когда, поверхность мембраны заполнена клетками, остается прежним, согласно формулам (4.17 – 4.19):

$$\alpha_{max} = 4,8 \cdot 10^{-15} \text{ м}^2,$$

$$\alpha_{min} = 8,3 \cdot 10^{-17} \text{ м}^2.$$

Для определения оптимальных расходов питательных веществ на входе в биореактор (внутриволоконное пространство) для каждого момента времени культивирования необходимо определить количество питательных веществ, достаточное для обеспечения процессов жизнедеятельности клеток.

По подобранной кинетической модели роста клеток (4.3), учитывая рассчитанные начальное и максимально возможное для плотности высева 5000 штук/см² количество клеток в изучаемом биореакторе, рассчитали количество клеток на мембранах в каждый момент времени. Результат расчета представлен в виде графической зависимости (рисунок 5.1).

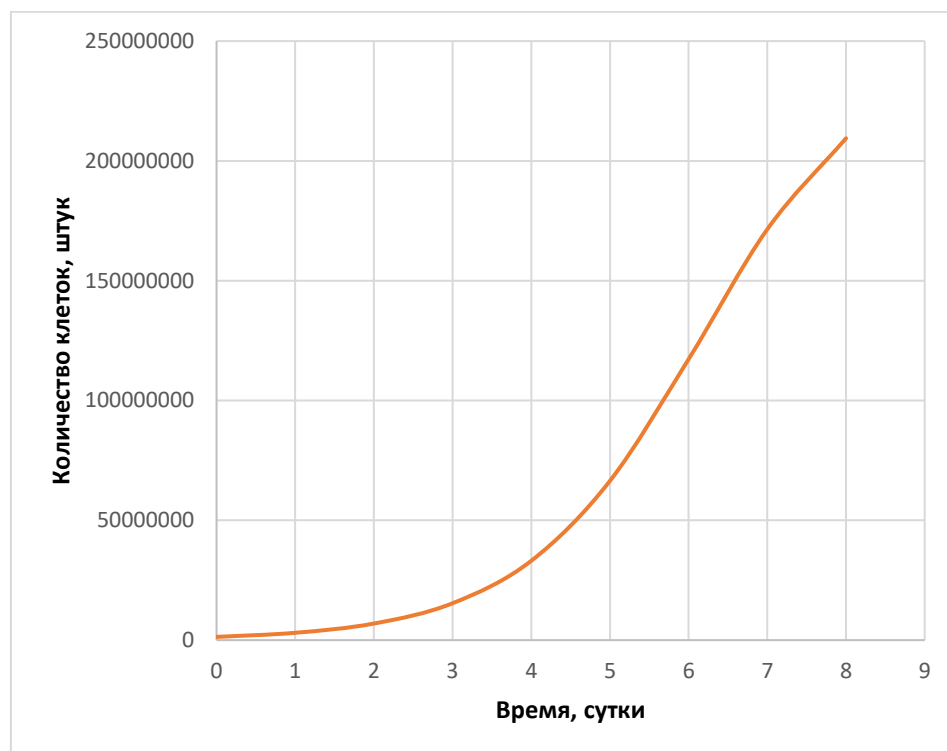


Рисунок 5.1 – Кинетика роста клеток во времени в биореакторе с 60-ю волокнами

Кроме того, согласно зависимости (4.22), было рассчитано изменение коэффициента проницаемости от количества клеток на мембранах. Результаты расчетов представлены в таблице 5.2.

Таблица 5.2 – Результаты расчетов количества клеток и коэффициента проницаемости в каждый момент времени

Время, сутки	Количество клеток, штук	Проницаемость, м ²
0	1347800	$4,8 \cdot 10^{-15}$
1	3064802	$2,5 \cdot 10^{-15}$
2	6922115	$1,2 \cdot 10^{-15}$
3	15398266	$5,0 \cdot 10^{-16}$
4	33129309	$2,6 \cdot 10^{-16}$
5	66490319	$2,0 \cdot 10^{-16}$
6	117296635	$1,5 \cdot 10^{-16}$
7	171497136	$1,0 \cdot 10^{-16}$
8	217447464	$8,3 \cdot 10^{-17}$

Кроме того, для каждого момента времени был рассчитан объемный поток пермеата, достаточный для питания текущего количества клеток. Результаты расчета потока для одного волокна представлены в таблице 5.3.

Объемный расход, который требуется подать на вход во внутриволоконное пространство биореактора, рассчитан с помощью программного комплекса ANSYS Fluent. Для этапа культивирования, при котором количество клеток на мембранах минимально, вычисленный объемный расход составляет 1,0 л/ч.

Аналогично для каждого момента времени культивирования произведен расчет, результат которого представлен в таблице 5.4. С увеличением численности клеток увеличивается поддерживаемое значение необходимого потока на мембране (поток пермеата), достаточного для обеспечения жизнедеятельности клеток, но растет сопротивление, оказываемое клеточным слоем на поток через мембрану. В связи с чем увеличивается поток питательной среды, который требуется подать на вход в биореактор (рисунок 5.2). Необходимый расход пермеата показан на рисунке 5.3.

Таблица 5.3 – Результат расчета необходимого объемного потока пермеата для биореактора с 60-ю волокнами

Время, сутки	Количество клеток на мембранах, штук	Необходимый средний объемный поток пермеата, л/ч
0	1347800	0,04
1	3064802	0,09
2	6922115	0,20
3	15398266	0,40
4	33129309	0,90
5	66490319	1,89
6	117296635	3,30
7	171497136	4,86
8	217447464	6,16

Таблица 5.4 – Результаты расчета величины оптимального расхода, подаваемого на вход биореактора

Время, сутки	Объемный расход на вход в биореактор, л/ч
0	1,0
1	1,5
2	2,3
3	3,1
4	4,5
5	7,6
6	12,7
7	19,4
8	33,3

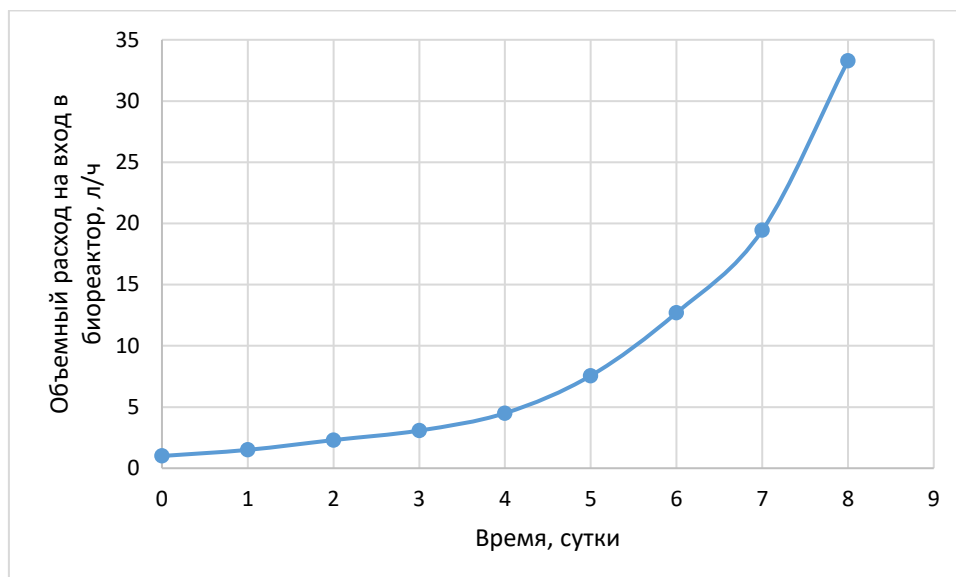


Рисунок 5.2 - Зависимость расхода потока на вход во внутриволоконное пространство биореактора для обеспечения достаточного количества питательных веществ на мембране от времени культивирования

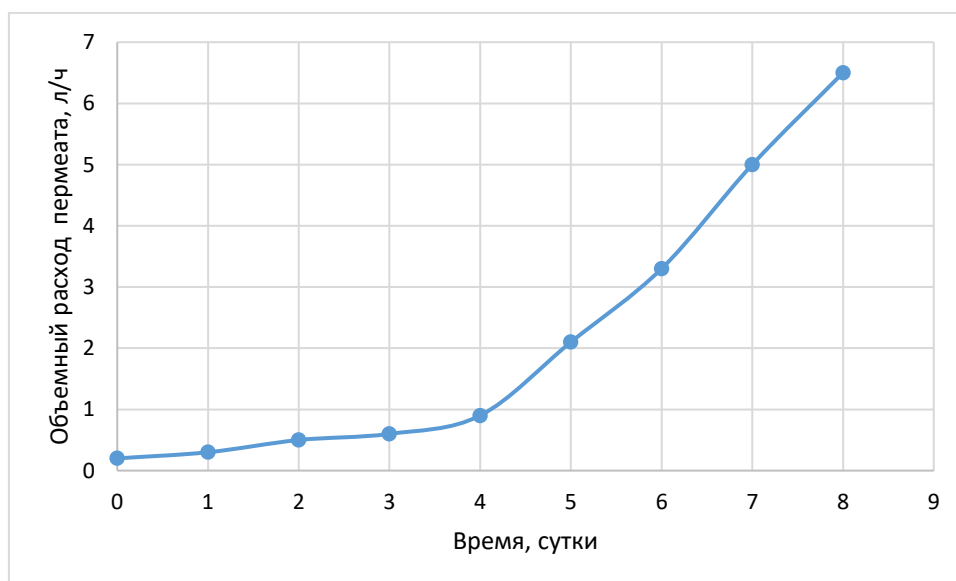


Рисунок 5.3 - Зависимость расхода пермеата для обеспечения достаточного количества питательных веществ на мембране от времени культивирования

Для конечного этапа культивирования, когда проницаемость минимальна, поток на мембране необходимо поддерживать не менее, чем 6,2 л/ч. Объемный расход, подаваемый на вход биореактора для данного этапа культивирования, составляет 33,3 л/ч.

Зависимость расхода питательной среды на вход во внутриволоконное пространство биореактора от времени (рисунок 5.2), в течение которого будет обеспечен необходимый поток питательной среды через мембрану, можно описать экспоненциальной зависимостью вида $f(x) = A \cdot e^{bx}$. Коэффициенты A и b вычислены с помощью программного пакета Microsoft Excel и, соответственно, равны 0,93 и 0,02.

Следовательно, зависимость, по которой можно определить расход питательной среды на вход во внутриволоконное пространство биореактора, имеет вид (л/ч):

$$Q_1' = 0,93 \cdot e^{0,02 t'} \quad (5.2),$$

где t' - время культивирования, сутки.

Таким образом, были рассчитаны численные значения расхода жидкости на вход во внутриволоконное пространство биореактора с 60-ю волокнами и зависимость, по которой необходимо изменять скорость подачи данного потока.

5.3 Результаты расчета гидродинамики и массообмена в межволоконном пространстве биореактора

Поскольку рост клетки начинает ингибироваться, когда объем продуктов метаболизма, находящийся около клетки, равен её объему (глава 4, п. 4.3.1), то используя рассчитанный из уравнения (4.6) объем продуктов метаболизма, выделяемый одной клеткой в единицу времени, и время, через которое объем продуктов метаболизма, выделенный клеткой, станет равен объему клетки по (4.25), рассчитаем объем продуктов метаболизма, выделяемый в культуральную жидкость при полном заполнении мембранного волокна клетками по уравнению (4.26).

Получаем объем продуктов метаболизма:

$$V^m = 9,83 \cdot 10^{-8} \text{ м}^3 \quad (5.3)$$

Таким образом, за время $t_u = 73 \text{ с}$ из межволоконного пространства необходимо отвести объем жидкости, равный $9,83 \cdot 10^{-8} \text{ м}^3$, поэтому для отвода

продуктов метаболизма от клеток минимальный расход жидкости в межволоконном пространстве (МП) по формуле (4.27) составляет:

$$Q'_2 = 0,0049 \frac{\text{л}}{\text{ч}} \quad (5.4)$$

Поскольку поток Q'_2 достаточно мал, то считаем его постоянным для подачи питательной среды в межволоконное пространство.

Площадь поперечного сечения межволоконного пространства половолоконного мембранного модуля, вычисленная по уравнению (4.28):

$$S'_2 = 3,5 \cdot 10^{-4} \text{ м}^2$$

Минимальную линейную скорость потока питательной среды, при достижении которой продукты метаболизма будут своевременно отведены от клеток, можно рассчитать по формуле (4.29):

$$\vartheta'_2 = 3,9 \cdot 10^{-6} \text{ м/с} \quad (5.5)$$

Оценка гидродинамического режима течения среды

С учетом принятых допущений, как было упомянуто в главе 4, п. 4.3.2, был рассчитан критерий Рейнольдса.

Расстояние между волокнами:

$$D'_2 = 0,0015 \text{ м}$$

Число Рейнольдса при рассчитанных параметрах биореактора и линейной скорости потока во внутриволоконном пространстве составляет $Re' = 0,0082$, следовательно, внутри биореактора поддерживается ламинарный режим течения среды, позволяющий обеспечить необходимые условия культивирования клеток.

Было проведено моделирование гидродинамики биореактора в программном пакете ANSYS Fluent для предельного случая — полного заполнения клетками поверхности волокон, с учетом рассчитанной величины коэффициента проницаемости мембраны (таблица 5.2).

На основании предложенного ранее (п. 4.3.4) прямоточного режима подачи питательной среды в межволоконное пространство относительно внутриволоконного, входными являются патрубки, потоки которых обозначенные

на рисунке 5.4 цифрами 1 и 2. Соответственно, выходными патрубками являются патрубки 3 и 4. Красным цветом указан потоки питательной среды во внутриволоконном пространстве, синим цветом – потоки в межволоконном пространстве.

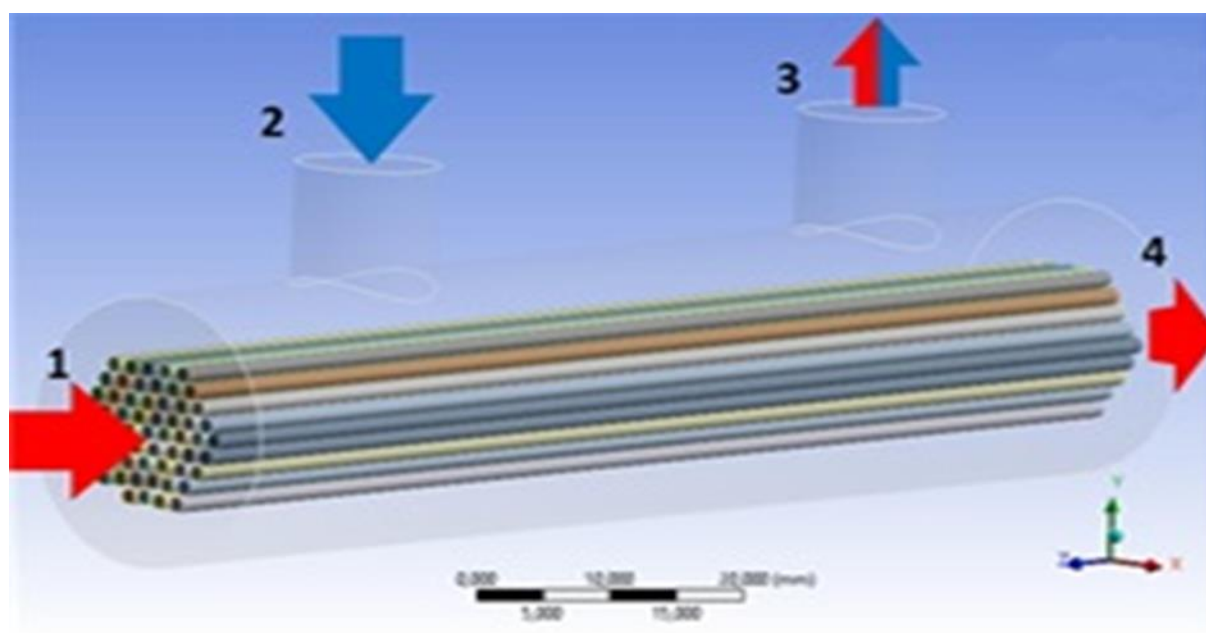


Рисунок 5.4 – Схема движения потоков питательной среды в моделируемом биореакторе (60 волокон)

Расчетная сетка биореактора с 60-ю волокнами содержит 12 млн. ячеек с минимальным размером ячейки в зоне повышенной плотности сетки, равным 0,1 мм (рисунок 5.5).

В результате расчета получено скоростное распределение движения потоков в межволоконном пространстве. Для 2х дней культивирования гидродинамика потоков представлена на рисунке 5.6, анализируя который можно сделать вывод о равномерном распределении потока в большей части биореактора.

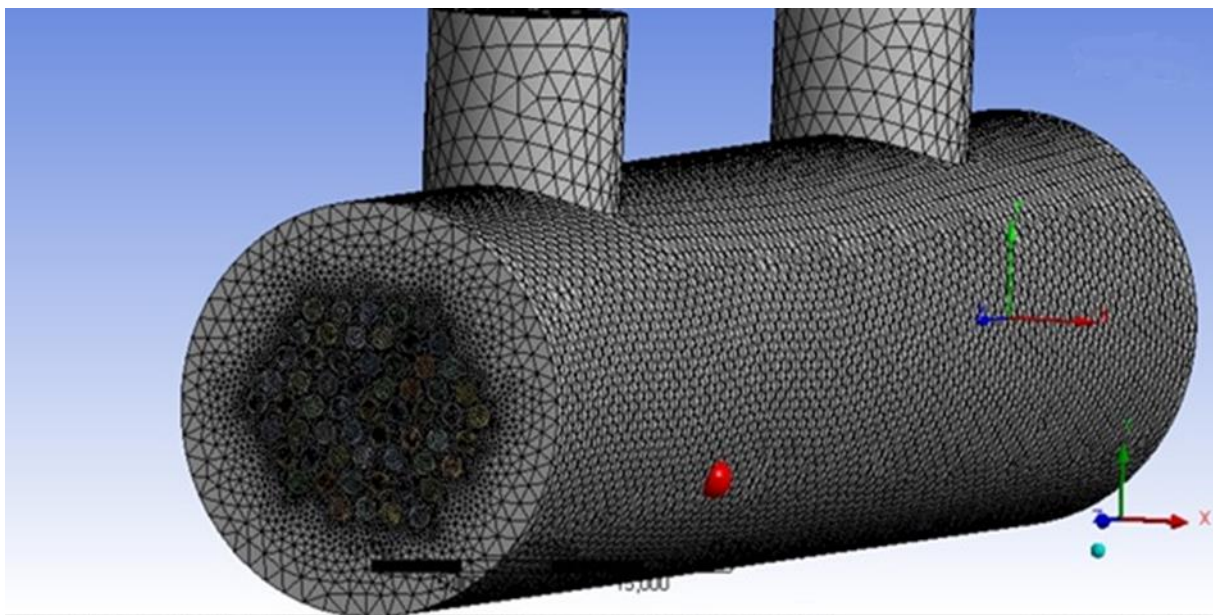


Рисунок 5.5 – Наложение расчетной сетки на половолоконный биореактор (60 волокон)

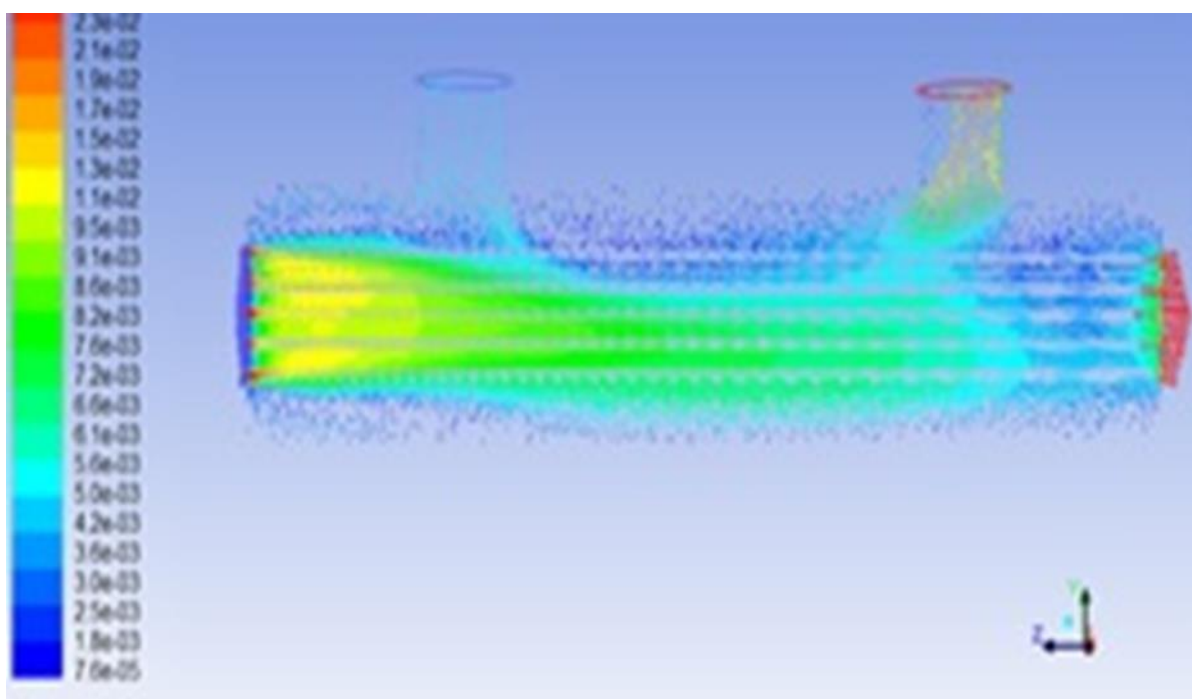


Рисунок 5.6 – Распределение скоростей потоков в межволоконном пространстве биореактора для 2х дней культивирования (течение среды слева направо)

Визуализация гидродинамической обстановки для последнего этапа культивирования отражена на рисунке 5.7. В левой части реактора, а также в центральной области между боковых патрубков наблюдаются области низких скоростей (синий цвет). Однако рассчитанная минимальная скорость потока в межволоконном пространстве меньше скоростей в рассматриваемых областях, поэтому сделан вывод об отсутствии застойных зон на первых этапах культивирования.

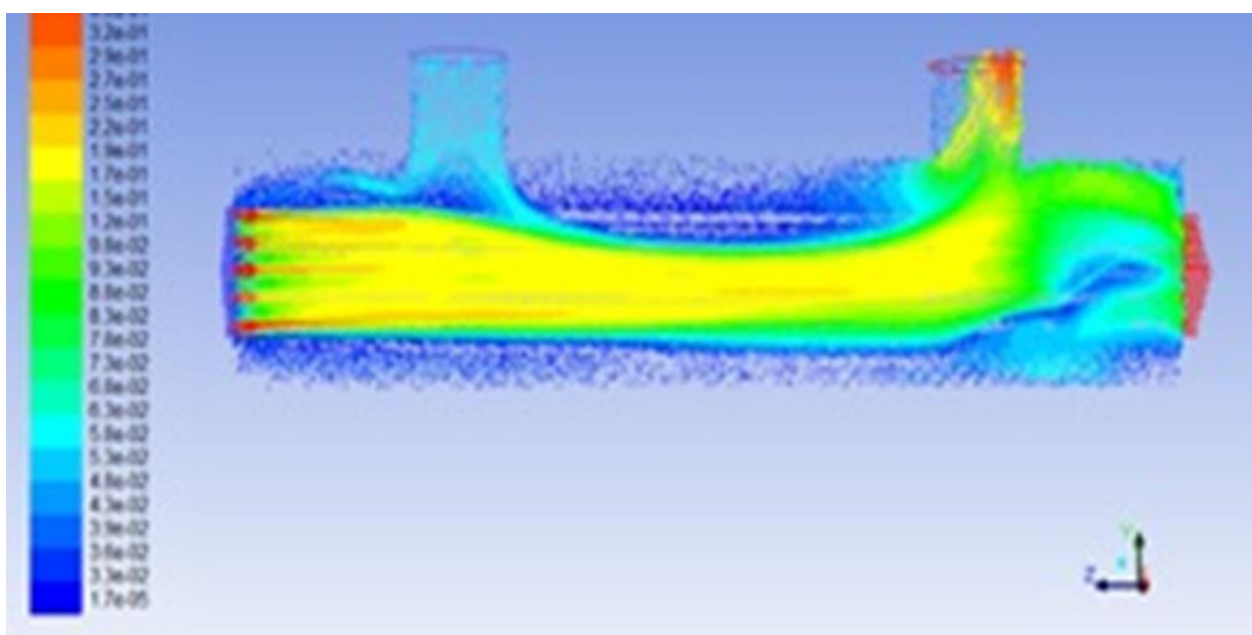


Рисунок 5.7 – Распределение скоростей потоков в межволоконном пространстве биореактора на последнем этапе культивирования (8 дней)

Кроме того, отмечены области, в которых скорость имеет максимальное значение (рисунок 5.7). Данные области относятся к зоне входа питательной среды во внутриволоконное пространство биореактора, а также к зоне выхода питательной среды из межволоконного пространства (патрубок 3, рисунок 5.4). Данные зоны не содержат поверхности с прикрепленными клетками, поэтому рассматриваемые скоростные пики не окажут пагубного влияния на процесс.

Таким образом, по составленному алгоритму и разработанной модели было проведено масштабирование процесса культивирования клеток СНО для полволоконного мембранного биореактора с 60-ю волокнами, а именно рассчитана кинетическая зависимость роста клеток, определены расходы подачи питательной среды во внутриволоконное и межволоконное пространства биореактора, проанализирована гидродинамика аппарата с шестьюдесятью полыми волокнами.

Выводы

1. Были проведены исследования по культивированию клеток CHO в полуволоконном биореакторе и моделирование кинетических зависимостей, на основании которых было рассчитано время проведения процесса культивирования клеток в биореакторе модели C2025 компании FiberCell Systems. Была выбрана модель Ферхюльста для расчета кинетики роста клеток CHO, которая была использована для описания процессов массопереноса в биореакторе.
2. Был проведен анализ возможности использования вычислительной гидродинамики (CFD) для расчета гидродинамики потоков в мембранных биореакторах. В программном пакете ANSYS Fluent была построена электронная геометрическая модель установки. Осуществлен выбор геометрии сетки с различной плотностью для оптимизации времени расчетов и точности решения для конкретного аппарата (общее число ячеек составило 850 тыс.).
3. Разработана математическая модель полуволоконного мембранного биореактора, позволяющая исследовать гидродинамику движения жидкости во внутриволоконном и межволоконном пространствах, процесс микрофльтрации через мембрану с учетом увеличения числа клеток на ее поверхности. Получены эпюры распределения скоростей и давления в каждой точке аппарата.
4. Исследованы разные способы подачи питательной среды во внутриволоконное и межволоконное пространства биореактора. Предложены прямоточный способ подачи питательной среды в межволоконное пространство.
5. На основании вычислительного эксперимента по модели и оценки энергоэффективности процесса была выбрана наиболее оптимальная схема посуточного изменения расходов питательной среды в ВП.
6. Создана электронная модель, в которой возможна визуализация процессов гидродинамики, массопереноса и кинетики роста клеток на мембране в реакторе.
7. Проведено масштабирование процесса в большем по размеру полуволоконном биореакторе (60 волокон).
8. Создана технологическая схема процесса культивирования клеток млекопитающих в полуволоконном мембранном биореакторе и собрана лабораторная установка, позволяющая соблюдать требуемые условия культивирования, с учетом экономии питательной среды.

Список литературы

1. Кафаров, В.В. Моделирование биохимических реакторов: монография / В.В. Кафаров, А.Ю. Винаров, Л.С. Гордеев. - М.: Лесная промышленность, 1979. - 344 с.
2. Кафаров, В.В. Моделирование и системный анализ биохимических производств / В.В. Кафаров, Л.С. Гордеев, А.Ю. Винаров. - М.: Лесная промышленность, 1985. – 280 с. – (в пер.)
3. Бирюков, В.В. Оптимизация периодических процессов микробиологического синтеза / В.В. Бирюков, В.М. Кантере. – М.: «Наука», 1985. – 293 с.
4. Пинаев, Г. П. Клеточная биотехнология: учебное пособие / Г.П. Пинаев, М.И. Блинова, Н.С. Николаенко и др. – Санкт-Петербург : Изд-во Политехн. ун-та, 2011. – 244 с.
5. Cell and Tissue Reaction Engineering: Principles and Practice / D. Eibl, R. Eibl, R. Portner et al. // Springer. – 2009. – P.363
6. Быков, В.А. Расчет процессов микробиологических производств / В.А. Быков, А.Ю. Винаров, В.В. Шерстобитов. – Киев: Техника, 1985. – 58-111 с.
7. Аткинсон, Б. Биохимические реакторы / Б. Аткинсон. – М.: Пищ. Промышленность, 1991. – 238 с.
8. Винаров, А.Ю. Ферментационные аппараты для процессов микробиологического синтеза: учеб. пособие / А.Ю. Винаров, Л.С. Гордеев, А.А. Кухаренко, В.И. Панфилов. – М. : ДеЛи Принт, 2005. – 277 с.
9. Приказ Министерства промышленности и торговли РФ от 14 июня 2013 г. N 916 «Об утверждении Правил организации производства и контроля качества лекарственных средств». Зарегистрировано в Минюсте РФ 10 сентября 2013 г. Регистрационный № 29938 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: www.ffprom22.ru/pic/file/minprom.doc (Дата обращения: 01.12.2014).
10. EudraLex «The Rules Governing Medicinal Products in the European Union». Volume 4 EU guidelines for Good Manufacturing Practice for Medicinal Products for

Human and Veterinary Use. Annex 2 Manufacture of Biological active substances and Medicinal Products for Human Use [Электронный ресурс] / EudraLex // The Rules Governing Medicinal Products in the European Union. – 2012. – Режим доступа: http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-4/vol4-an2__2012-06_en.pdf (Дата обращения 25.02.2016).

11. Дорожная карта развития регенеративной медицины 2.0 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://mipt.ru/education/chairs/theor_cybernetics/government/upload/98c/roadmap-arpgs09k9mm.pdf (Дата обращения 25.02.2016).

12. «Комплексная программа развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года». Утверждено Правительством РФ 24 апреля 2012г. N 1853п-П8 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://economy.gov.ru/wps/wcm/connect/2c9d7d804b0988f09b2a9ba338dd8a95/biotechdevelopcomprog_2020.pdf?MOD=AJPERES&CACHEID=2c9d7d804b0988f09b2a9ba338dd8a95 (Дата обращения 25.02.2016).

13. Bates, M. K. Cell culture contamination: understanding the causes and managing the risks / M. K. Bates, D. Wernerspach // Lab manager magazine. – 2011. – Vol. 6, №4. – P.3-5.

14. Шиморский, А. Инкапсуляция клеток для биотехнологических применений / А. Шиморский // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2015.—№1.— С.220-227.

15. Спiera, Р.Е. Массовое культивирование клеток животных. Биотехнология клеток животных / Р.Е. Спiera, Дж.Б. Гриффитса. – М.: Линткон, 1989. – 356 с.

16. Airan, A.G. First principles, unstructed, dynamic model for egulating CO₂ and pH in bicarbonate buffered perfusion bioreactor / A.G. Airan // Master of Science thesis. University of Rhode Island, Rhode Island. – 2013. – P.128.

17. Korossis, S.A. Bioreactors in Tissue Engineering / S.A. Korossis, F. Bolland, J.N. Kearney // Tissue Engineering. – 2005. – Vol. 2. – P.24.

18. Hambor, J.E. Bioreactor design and bioprocess controls for industrialized cell processing. Bioengineering strategies and platform technologies / J.E. Hambor // BioProcess international. – 2012. – P.22-33.
19. Техническая спецификация: Bioengineering AG [Электронный ресурс]. – Режим доступа: www.bioengineering.ch. (Дата обращения 25.02.2016).
20. Техническая спецификация: Sartorius [Электронный ресурс]. – Режим доступа: www.sartorius.de. (Дата обращения 26.02.2016).
21. Техническая спецификация: Biotechno [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.biotechno.ru>. (Дата обращения 26.02.2016).
22. Техническая спецификация: Gelifesciences [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.gelifesciences.com>. (Дата обращения 29.02.2016).
23. Техническая спецификация: Nestscientificusa [Электронный ресурс]. – Режим доступа: www.nestscientificusa.com. (Дата обращения 29.02.2016).
24. Levine D.W., Thilly W.G., Wang D.I.C., Wong J.S. Cell culture microcarriers/ Levine D.W.// US Patent. – 1979. - № 4293654.
25. Henderson T.M. Glass-surface microcarrier for growth of cell cultures/ Henderson T.M.// US Patent. – 1982. -№ 4448884.
26. Жестерев, В.И. Изыскание отечественных микроносителей для культивирования клеток / В.И. Жестерев, В.А. Сергеев, В.П. Хижинская, Н.В. Грудина, С.Б. Макарова. – Цитология. – 1986, Том XXVIII, №4, - с. 465-469.
27. Van der Velden-de Groot, C.A.M. Microcarrier technology - present status and perspective / C.A.M. Van der Velden-de Groot // Cytotechnology. – 1995. – Vol. 18, (1-2). – P. 51-56.
28. Microcarrier Cell Culture. Principles and Methods / Handbook from GE Healthcare 18-1140-62 AC, cop. 2013. – 170 p.
29. Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy / ed. L. Castilho, A. Moraes, E. Augusto, M. Butler. – Taylor & Frensis Group, cop. 2008. – 506 p.
30. Fundamentals of Cell Immobilisation Biotechnology / ed. V. Nedovic, R. Willaert. – Springer Science & Business Media, cop. 2013. – 555 p.

31. John E. Hambor. Bioreactor Design and Bioprocess Controls for Industrialized Cell Processing / John E. Hambor // BioProcess International [Электронный ресурс]. – Электрон. журн. – 2012. – Режим доступа: <http://www.bioprocessintl.com/upstream-processing/upstream-single-use-technologies/bioreactor-design-and-bioprocess-controls-for-industrialized-cell-processing-331147/#CIT0053>
32. Zhao, F. Perfusion Bioreactor System for Human Mesenchymal Stem Cell Tissue Engineering: Dynamic Cell Seeding and Construct Development / F. Zhao, T. Ma // Biotechnol. Bioeng. – 2005. – Vol. 91. – P. 482-493.
33. Sart, S. Ear Mesenchymal Stem Cells: An Efficient Adult Multipotent Cell Population Fit for Rapid and Scalable Expansion / S. Sart, YJ Schneider, SN. Agathos // J. Biotechnol. – 2009. – Vol. 139. – P. 291-299.
34. Chawla, M. Production of Islet-Like Structures from Neonatal Porcine Pancreatic Tissue in Suspension Bioreactorsm / M. Chawla // Biotechnol. Prog. – 2006. – Vol. 22. – P. 561-567.
35. Akasha, AA. Entrapment of Embryonic Stem Cells-Derived Cardiomyocytes in Macroporous Biodegradable Microspheres: Preparation and Characterization / AA. Akasha // Cell Physiol. Biochem. – 2008. – Vol. 22. – P. 665-672.
36. Fernandes, AM. Mouse Embryonic Stem Cell Expansion in a Microcarrier-Based Stirred Culture System / AM. Fernandes // J. Biotechnol. – 2007. – Vol. 132. – P. 227-236.
37. Eibes, G. Maximizing the Ex Vivo Expansion of Human Mesenchymal Stem Cells Using a Microcarrier-Based Stirred Culture System / G. Eibes // J. Biotechnol. – 2010. – Vol. 146. – P. 194-197.
38. Online-shop.eppendorf [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://online-shop.eppendorf.us/US-en/Bioprocess-44559/Bioprocess-Systems-60767/New-Brunswick-BioFlo-510-PF-12574.html?_ga=1.141954546.1108519621.1455878086 (Дата обращения: 29.02.2016).
39. Morelli, S. Membrane bioreactors for regenerative medicine: an example of the bioartificial liver / S. Morelli, S. Salerno, A. Piscioneri, C. Campana, E. Drioli, L. De

- Bartolo1o // Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering. – 2010. – Vol. 5. – P. 146–159.
40. Adams, T.T. Increasing Efficiency in Protein Supply and Cell Production by Combining Single-use Bioreactor / T.T. Adams, G. Greller, C.T. Fenge // International Biopharm. – 2011. – P. 4-11.
 41. Salerno, S. Membrane bioreactor for expansion and differentiation of embryonic liver cells / S. Salerno, A. Piscioneri, S. Morelli et. al. // Ind. Eng. Chem. Res. – 2013. – Vol. 52 (31). – P. 10387-10395.
 42. Crommelin, D. J. A. Pharmaceutical Biotechnology. Fundamentals and Applications / D. J. A. Crommelin, R. D. Sindelar, B. Meibohm // Springer Science & Business Media. – 2013 . – P. 544.
 43. Jauregui, H. O. In Vivo Evaluation of a Hollow Fiber Liver Assist Device / H. O. Jauregui, C. J-P. Millon, D. Renklers et. al. // Hepatology. – 1995. – Vol. 21. – P. 460–469.
 44. Nyberg, SL. Evaluation of a hepatocyte-entrapment hollow fiber bioreactor: a potential bioartificial liver / SL. Nyberg, RA. Shatford, MV. Peshwa et. al. // Biotechnol Bioeng. – 1993. – Vol. 41. – P. 194–203.
 45. Patzer, JF. Advances in bioartificial liver assist devices / JF. Patzer // Ann NY Acad Sci. – 2001. – Vol. 944. – P. 320-333.
 46. Carcano, S. A model for cell growth in batch bioreactors // PhD dissertation. Polytechnic of Milan, Italy.2010. – 120 P.
 47. Meier, K. In situ product recovery of single-chain antibodies in a membrane bioreactor / K. Meier, F. Carstensen, C. Scheeren et. al. // Biotechnol Bioeng. – 2014. Vol. 111. – P. 1566-1576.
 48. Kargi, F. Membrane Bioreactors for Animal Cell Culture/ F. Kargi // Recent Advances in Biotechnology. – 1992. – Vol. 210. – P. 449-454.
 49. De Napolia, I.E. Mesenchymal stem cell culture in convection-enhanced hollow fibre membrane bioreactors for bone tissue engineering / I. E. De Napolia, S. Scaglioneb, P. Giannonic et. al. // J. of Membrane Science. – 2011. – Vol. 379, Issues 1–2. – P. 341–352.

50. Техническая спецификация: Spectrumlabs [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.spectrumlabs.com/> (Дата обращения: 29.02.2016).
51. Dias-Lopes, C. Generation and molecular characterization of a monoclonal antibody reactive with conserved epitope in sphingomyelinases D from *Loxosceles* spider venoms / C. Dias-Lopes, L. Felicori, L. Rubrecht et. al. // Vaccine. – 2014. – Vol. 32. – P. 2086–2092.
52. Janowitz, T. Biopharmaceuticals and monoclonal antibodies in oncology trials – a cross-sectional analysis / T. Janowitz // Protein Eng., Design and Select. – 2011. – Vol. 24, №1-2. – P. 105-111.
53. Li, F. Monoclonal antibodies for prophylactic and therapeutic use against viral infections / F. Li, N. Vijayasankaran, A.Y. ShenKiss et. al. // Vaccine. – 2013. – Vol. 31. – P. 1553-1559.
54. Selișteanu, D. Mammalian Cell Culture Process for Monoclonal Antibody Production: Nonlinear Modelling and Parameter Estimation / D. Selișteanu, D.V. Georgeanu, M. Roman // BioMed Research International. – 2015. – P. 16.
55. Amer, H.M. Baculovirus expression vector system: An efficient tool for the production of heterologous recombinant proteins / H.M. Amer // African J. of Biotechnol. – 2011. – Vol. 10, №32. – P. 5927-5933.
56. Wurm, F.M. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells / F.M. Wurm // Nat. Biotechn. – 2004. – Vol. 22. – P. 1393 – 1398.
57. Bandaranayakea, A.D. Recent advances in mammalian protein production / A.D. Bandaranayakea, S.S. Almoa // Protein Eng. – 2014. – Vol. 588. – P. 253–260.
58. Butler, M. Recent advances in technology supporting biopharmaceutical production from mammalian cells / M. Butler, A. Meneses-Acosta // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2012. – Vol. 96. – P. 885–894.
59. Богословская, Е.В. Производство вакцин и вирусных векторов для генной терапии / Е.В. Богословская, Д.В. Глазкова, Г.А. Шипулин, В.В. Покровский // Вестник РАМН. – 2012. – №10. – С. 55-61.

60. Pattnaik, P. Expediting Clinical Batch Production of Viral-Vectored Vaccines and Gene Therapy Products / P. Pattnaik, G. Adams // *BioProcessing J.* – 2013. – Vol. 12, №3. – P. 41-45.
61. Mateu, M.G. Virus engineering functionalization and stabilization / M.G. Mateu // *Protein Eng., Design and Select.* – 2011. – Vol. 24, №1-2. – P. 53-63.
62. Salehi-Nik, N. Engineering Parameters in Bioreactor's Design: A Critical Aspect in Tissue Engineering / N. Salehi-Nik, G. Amoabediny, B. Pouran et. al. // *BioMed Res. Intern.* – 2013. – P. 15.
63. Mazzitelli, S. Production and characterization of engineered alginate-based microparticles containing EGM powder for cell/tissue engineering applications / S. Mazzitelli, C. Nastruzzi, G. Luca et. al. // *Acta Biomater.* – 2011. – Vol. 7, №3. – P. 1050-1062.
64. Rodrigues, M.T. Tissue-engineered construct based on SPCL scaffolds cultured with goat marrow cells: functionality in femoral defects / M.T. Rodrigues, M.E. Gomes, C.A. Viegas et. al. // *J.of Tissue Eng. And Regener. Medicine.* – 2011. – Vol. 5, №1. – P. 41-49.
65. Carletti, E. Scaffolds for tissue engineering and 3D cell culture / E. Carletti, A. Motta, C. Migliaresi // *Methods Mol Biol.* – 2011. – Vol. 695. – P. 17-39.
66. Nema, R. An animal cell culture: Advance technology for modern research / R. Nema, S. Khare // *Adv. Biosc. and Biotechn.* – 2012. – Vol. 3. – P. 219-226.
67. Yahia, B.B. Macroscopic modeling of mammalian cell growth and metabolism / B.B. Yahia, L. Malphettes, E. Heinzlecorresponding // *Applied Microbiology and Biotechnology.* – 2015. – Vol. 99(17). – P. 7009–7024.
68. Бейли, Дж. Основы биохимической инженерии: [пер. с англ.] в 2-х частях / Дж. Бейли. – М.: Мир, 1989. Ч. 1. – 692 с.
69. Паников, Н. С. Кинетика роста микроорганизмов. Общие закономерности и экологические приложения / Н.С. Паников. – М.: Наука, 1992.
70. Минкевич, И.Г. Стехиометрия метаболических путей в динамике клеточных популяций. Компьютерные исследования и моделирование, т. 3 / И.Г. Минкевич. – 2011. – 455-475 с.

71. Ризниченко, Г.Ю. Математические модели биологических продукционных процессов: учебное пособие / Г.Ю. Ризниченко, А.Б. Рубин. – М.: Изд-во МГУ, 1993. — 302 с.
72. Egli, T. Physiology / T. Egli // Dubendorf: Elsevier Inc. – 2009. – P. 700.
73. Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-Based Therapies / Ozturk S., Hu WS // Taylor & Francis, New York. – 2006. – P.776.
74. Rehberg M. The regulation of glutaminolysis and citric acid cycle activity during mammalian cell cultivation / Rehberg M. // Comp. Appl. in Biotech. - 2013. - , Vol. 12. – P. 48-53.
75. Sanderson, C.S. A structured, dynamic model for animal cell culture systems / C.S. Sanderson, J.P. Barford, G.W. Barton // Biochemical Engineering Journal. – 1999. – Vol. 3. – P. 203-211.
76. Nasser, A.A. Factors effects the Growth of Chinese Hamster Ovary (CHO) cell on Microcarriers Culture / A.A. Nasser, El-Moghaz // Advances in bioresearch. – 2010. – Vol. 1. – P.182-188.
77. García Münzer, DG. An unstructured model of metabolic and temperature dependent cell cycle arrest in hybridoma batch and fed-batch cultures / DG. García Münzer, M. Ivarsson, C. Usaku et. al. // Biochemical Engineering. – 2015. – Vol. 93. – P. 260-273.
78. Karra, S. Multi-scale modeling of heterogeneities in mammalian cell culture processes / S. Karra, B. Sager, MN. Karim // Industrial & Engineering Chemistry Research. – 2010. – Vol. 49(17). – P. 7990–8006.
79. Meshram, M. Modeling the coupled extracellular and intracellular environments in mammalian cell culture / M. Meshram, S. Naderi, B. McConkey et. al. // Metabolic Engineering. – 2013. – Vol. 19. – P. 57-68.
80. Ashyraliyev, M. Systems biology: parameter estimation for biochemical models / M. Ashyraliyev, Y. Fomekong-Nanfack, JA. Kaandorp et. al. // FEBS J. – 2009. – Vol. 276(4). – P. 886-902.
81. Carcano, S. A. Model for cell growth in batch bioreactors. / Carcano, S. A // PhD thesis. – Polytechnical University of Milan, Italy. - 2010. – 120 P.

82. Royle, KE. Integration of models and experimentation to optimise the production of potential biotherapeutics / KE. Royle, Jimenez del Val I, C. Kontoravdi // *Drug Discovery Today*. – 2013. – Vol. 18(23-24). – P. 1250-1255.
83. Цыренов, В. Ж. Основы биотехнологии: культивирование клеток человека и животных: учебное пособие / В.Ж. Цыренов. – Улан-Уде: ВСГТУ, 2005. – 48с.
84. William, G.W. Fed-batch mammalian cell culture in bioproduction / G.W. William // *BioProcess International*. – 2006. – P. 30-40.
85. Дворецкий, Д.С. Компьютерное моделирование биотехнологических процессов и систем: учебное пособие / Д.С. Дворецкий, С.И. Дворецкий, Е.И. Муратова, А.А. Ермаков. – Т.: Издат-во ТГТУ, 2005. – 80 с.
86. Chen, N. Analysis of Chinese hamster ovary cell metabolism through a combined computational and experimental approach / N. Chen, M. H. Bennet, C. Kontoravdi // *Cytotechnology*. – 2013. – Vol. 3. – P.8-30.
87. Xing, Z. Modeling kinetics of a large-scale fed-batch CHO cell culture by Markov chain Monte Carlo method / Z. Xing, N. Bishop, K. Leister, ZJ. Li // *Biotechnology Progress*. – 2010. – Vol. 26(1). – P. 208-219.
88. Shakibaie, M. Kinetics experimental and simulation studies of Chinese Hamster Ovary cell growth in a packed-bed bioreactor / M. Shakibaie, F. Tabandeh, A. R. Zomorodipour // *World Applied Sciences Journal*. – 2011. – Vol. 11, №15. – P.1568-1575.
89. Airan, A.G. First principles, unstructured, dynamic model for regulating CO₂ and pH in bicarbonate buffered perfusion bioreactor / A.G. Airan // *Master of science thesis*. – University of Rhode Island. – 2013. – P.128.
90. Baughman, AC. On the dynamic modeling of mammalian cell metabolism and mAb production / AC. Baughman, X. Huang, ST. Sharfstein, LL. Martin // *Computer Chemical Engineering*. – 2010. – Vol. 34(2). – P. 210–222.
91. Dorka, P. Metabolic flux-based modeling of mAb production during batch and fed-batch operations / P. Dorka, C. Fischer, H. Budman, JM. Scharer // *Bioprocess and Biosystem Engineering*. – 2009. – Vol. 32(2). – P. 183-196.

92. Borchers, S. Identification of growth phases and influencing factors in cultivations with AGE1.HN cells using set-based methods / S. Borchers, S. Freund, A. Rath et. al. // PLoS One. – 2013. – Vol. 8(8). – P. 68-124.
93. Craig, J. Galban. Analysis of cell growth kinetics and substrate diffusion in a polymer scaffold / Craig J. Galban, Bruce R. Locke // Biotechnology and Bioengineering. – 1999. – Vol. 65(2). – P. 121–132.
94. Иерусалимский, Н.Д. Количественные закономерности между продуктами обмена и скоростью роста микроорганизмов / Н.Д. Иерусалимский, Н.М. Неронова. – Докл. АН СССР. – 1965. – т.161. – №6. – с.1437-1440.
95. Бирюков, В.В. Основы промышленной биотехнологии / В.В. Бирюков. – М.: КолосС. – 2004. – 296 с.
96. Goudar, CT. Analyzing the dynamics of cell growth and protein production in mammalian cell fed-batch systems using logistic equations / CT. Goudar // J. Indian Microbiology and Biotechnology. – 2012. – Vol. 39(7). – P. 1061-1071.
97. Goudar, CT. Robust parameter estimation during logistic modeling of batch and fed-batch culture kinetics / CT. Goudar, KB. Konstantinov, JM. Piret // Biotechnology Progress. – 2009, May-Jun. - Vol. 25(3): 801-6.
98. Munzera, D.G. An unstructured model of metabolic and temperature dependent cell cycle arrest in hybridoma batch and fed-batch cultures / D.G. Munzera, M. Ivarsson, C. Usakua // Biochemical Engineering Journal. – 2014. – Vol. 8, №93. – P. 260-273.
99. Acosta, ML. Analysis of kinetic, stoichiometry and regulation of glucose and glutamine metabolism in hybridoma batch cultures using logistic equations / ML. Acosta, A. Sánchez, F. García et. al. // Cytotechnology. – 2007. – Vol. 54(3). – P. 189-200.
100. Frisch, S.M. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis / S. M. Frisch, H.J. Francis // Cell Biol. – 1994. – Vol. 124(4). – P. 619-626.
101. Mo1hler, L. Segregated Mathematical Model for Growth of Anchorage-Dependent MDCK Cells in Microcarrier Culture / L. Mo1hler, A. Bock, U. Reichl // Biotechnology Progress. – 2008. – Vol. 24. – P. 110-119.

102. Frame, K.K. A model for density-dependent growth of anchorage-dependent mammalian cells / K.K. Frame, W.S. Hu // *Biotechnology & Bioengineering*. – 1988. – Vol. 32. – P. 1061-1066.
103. Lim, J. A stochastic model to simulate the growth of anchorage dependent cells on flat surfaces / J. Lim, G. Davies // *Biotechnology & Bioengineering*. – 1990. – Vol. 36. – P. 547-562.
104. Ruaan, R.C. Monitoring and modeling density dependent growth of anchorage-dependent cells / R.C. Ruaan, G.J. Tsai, G. Tsao // *Biotechnology & Bioengineering*. – 1993. – Vol. 41. – P. 380-389.
105. Hawboldt, K.A. A cellular automaton model for microcarrier cultures / K.A. Hawboldt, N. Kalogerakis, L. A. Behie // *Biotechnol. Bioeng.* – 1994. – Vol. 43. – P. 90-100.
106. Тоффоли, Т. Машины клеточных автоматов / Т. Тоффоли, Н. Марголус. – М.: Мир, 1991. – 280 с.
107. Zygourakis, K. Proliferation of anchorage dependent contact-inhibited cells. I. Development of theoretical models based on cellular automata / K. Zygourakis, R. Bizios, P. Markenscoff // *Biotechnology & Bioengineering*. – 1991a. – Vol. 38. – P. 459-470.
108. Zygourakis, K. Proliferation of anchorage dependent contact-inhibited cells. II. Experimental results and validation of the theoretical models / K. Zygourakis, R. Bizios, P. Markenscoff // *Biotechnology & Bioengineering*. – 1991b. – Vol. 38. – P. 471-480.
109. Forestell, S. A cellular automaton model for the growth of anchorage-dependent mammalian cells used in vaccine production / S. Forestell, B. Milne, N. Kalogeratis, L. Behie // *Chemical Engineering Science*. – 1992. – Vol. 47(9-11). – P. 2381-2386.
110. Garijo, N. Stochastic cellular automata model of cell migration, proliferation and differentiation: validation with in vitro cultures of muscle satellite cells / N. Garijo, R. Manzano, R. Osta, MA. Perez // *J Theor Biol.* – 2012, Dec 7. – Vol. 314. – P. 1-9.
111. Vaca-González, JJ. Cellular automata model for human articular chondrocytes migration, proliferation and cell death: An in vitro validation / JJ. Vaca-González, ML. Gutiérrez, JM. Guevara, DA. Garzón-Alvarado // *In Silico Biol.* – 2016, Jan 7 [Epub ahead of print].

112. Vivas, J. Modeling cell adhesion and proliferation: a cellular-automata based approach / J. Vivas, D. Garzón-Alvarado, M. Cerrolaza // *Advanced Modeling and Simulation in Engineering Sciences*. – 2015. – Vol. 2. – P. 32.
113. Chung, C.A. Hybrid cellular automaton modeling of nutrient modulated cell growth in tissue engineering constructs / C.A. Chung, T.-H. Lin, S.-D. Chen, H.-I. Huang // *Journal of Theoretical Biology*. – 2010. – № 262. – P. 267–278.
114. Brannock, M. Mixing characterization of full-scale membrane bioreactors: CFD modeling with experimental validation / M. Brannock, Y. Wang, G. Leslie // *Water research*. – 2010. – Vol. 3. – P. 181-191.
115. Sharma, C. Review of computational fluid dynamics applications in biotechnology process / C. Sharma, D. Malhotra, A.S. Rathore // *Biotechnology programs*. – 2011. – Vol. 27, №6. – P.1497-1510.
116. Dhanasekharan, K. Design and scale-up of bioreactors using computer simulations / K. Dhanasekharan // *BioProcess international*. – 2006. – P.36-40.
117. Guyot, Y. A three-dimensional computational fluid dynamics model of shear stress distribution during neotissue growth in a perfusion bioreactor / Y. Guyot, F.P. Luyten // *Biotechnology and Bioengineering*. – 2015. – Vol. 112. – P. 2591-2600.
118. Техническая спецификация: Ansys [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.ansys.com/> (Дата обращения: 01.03.2016).
119. Zhang, Z. Modeling of time dependent localized flow shear stress and its impact on cellular growth within additive manufactured titanium implants / Z. Zhang, L. Yuan, P.D. Lee, E. Jones, J.R. Jones // *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. – 2014. – Vol. 102(8). – P. 1689–1699.
120. Marcos, B. CFD modeling of a transient hollow fiber ultrafiltration system for protein concentration / B. Marcos, C. Moresoli, J. Skorepova, B. Vaughan // *J Membr Sci*. – 2009. – Vol. 337. – P. 136–144.
121. Schausberger, P. Simulation of protein ultrafiltration using CFD: comparison of concentration polarisation and fouling effects with filtration and protein adsorption experiments / P. Schausberger, N. Norazman, H. Li et. al. // *J Membr Sci*. – 2009. – Vol. 337. – P. 1–8.

122. Wang, Y. CFD simulation of membrane filtration zone in a submerged hollow fiber membrane bioreactor using a porous media approach / Y. Wang, Brannock Matthew, S. Cox // *Jornal of membrane science*. – 2010. – Vol. 363. – P. 57-66.
123. Madaeni, SS. Investigation of cake deposition on various parts of the surface of microfiltration membrane due to fouling / SS. Madaeni, M. Rahimi, M. Abolhasani // *Korean J Chem Eng*. – 2010. – Vol. 27. – P. 206-213.
124. Lee, K. Simulation of resistance of cross-flow microfiltration and force analysis on membrane surface / K. Lee, R. Wu // *Desalination*. – 2008. – Vol. 233. – P. 239–246.
125. Rahimi, M. CFD and experimental studies of fouling of a microfiltration membrane / M. Rahimi, SS. Madaenia, M. Abolhasania // *Chem Eng Process*. – 2009. – Vol. 48. – P. 1405–1413.
126. Воробьёва, Е.С. База данных по биореакторам / Е.С. Воробьёва, Р.Р. Сафаров, С.И. Иванов, Н.В. Меньшутина // *Программные продукты и системы*. – 2015. – №3. – 210–213 с.
127. Шлейкин, А.Г. Мембранные процессы в биотехнологии: Учебно-методическое пособие / А.Г. Шлейкин, Н.Е. Панова. – СПб.: НИУ ИТМО; ИХиБТ, 2013. – 49 с.
128. Chapman, A.C. Optimising cell aggregate expansion in a perfused hollow fibre bioreactor via mathematical modeling / A.C. Chapman, R.J. Shipley, J.P. Whiteley // *Plos one*. – 2014. – Vol. 9. – P. 14.
129. Техническая спецификация: FiberCell Systems [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.fibercellsystems.com/> (Дата обращения: 01.03.2016).
130. Руководство по эксплуатации оборудования: моноблочные насосы Watson Marlow [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.watson-marlow.com/Documents/knowledge-hub/Manuals/ru%20-%20Russian/Watson%20Marlow%20RU/m-120U-DV-ru-02.pdf> (Дата обращения: 01.03.2016).
131. Руководство по эксплуатации и технический паспорт изделия: воздушные компрессоры Quattro Elementi [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.vseinstrumenti.ru/instructions/716903.pdf> (Дата обращения: 01.03.2016).