

## INNOVATIVE CONCEPT OF HYDRODYNAMIC MODELING IN A ROLLER BIOREACTOR WITH SURFACE CULTIVATION OF CELL CULTURES

A. Kopylenko

*National University of Food Technologies*

S. Semeniuk, V. Shybetskiy, S. Kostyk

*National Technical University of Ukraine "Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute"*

---

**Key words:**

*Biotechnology  
Cell culture  
Hydrodynamics  
Roller  
Shear stress*

---

**Article history:**

Received 16.01.2017

Received in revised form

18.02.2017

Accepted 01.03.2017

---

**Corresponding author:**

A. Kopylenko

**E-mail:**

[npuht@ukr.net](mailto:npuht@ukr.net)

---

**ABSTRACT**

The article describes the modern constructions of bioreactors for cultivating cell cultures. The ways of using the analysis for technologies of deep and surface cultivation are described. A mathematical model was constructed in ANSYS environment for the simulation of mixing process flowing in a roller apparatus. The initial and boundary conditions have been chosen for the modeling task. Vector magnitudes and directions of the speed of liquid movement during the mixing have been established. The maximum peak of shear stress and the scope of its values were defined in the area of cells immobilization.

## СУЧАСНА КОНЦЕПЦІЯ МОДЕЛЮВАННЯ ГІДРОДИНАМІКИ В РОЛЕРНОМУ БІОРЕАКТОРІ З ПОВЕРХНЕВИМ КУЛЬТИВУВАННЯМ КЛІТИННИХ КУЛЬТУР

A.B. Копиленко

*Національний університет харчових технологій*

S.M. Семенюк, В.Ю. Шибецький, С.І. Костик

*Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»*

*У статті розглянуто сучасні конструкції біореакторів для культивування клітинних культур. Проаналізовано способи реалізації технологій глибинного і поверхневого культивування. Побудовано математичну модель у середовищі ANSYS для моделювання процесу перемішування, що відбувається в ролерному апараті. Підбрано початкові та граничні умови задачі моделювання. Встановлено величини і напрями векторів швидкості руху рідини під час перемішування. Визначено максимальні значення напружень зсуву в зоні іммобілізації клітин та їх розвиток у часі.*

**Ключові слова:** біотехнологія, клітинні культури, гідродинаміка, ролер, напруження зсуву.

**Постановка проблеми.** Суттєвою відмінністю сучасної біотехнології є експлуатація клітинних культур — CHO, Vero, HeLa, ВНК тощо як біологічних агентів (БА), біосинтез яких спрямований на виробництво рекомбінантних білків, моноклональних антитіл і вакцин. Промислова фармацевтична біотехнологія при отриманні біологічно активних речовин (БАР), що слугують активними фармацевтичними інгредієнтами (АФІ), потребує забезпеченості біореакторами (ферментерами) з високофункціональними властивостями. Ця вимога сформульована в настанові СТ-Н МОЗУ 42-4.0:2016 «Лікарські засоби. Належна виробнича практика» і слугує запорукою отримання якісних безпечних і ефективних лікарських засобів (ЛЗ).

Суттєвою проблемою під час розробки систем культивування культур клітин є той факт, що більшість БА, що використовуються у виробництві АФІ та вакцин, дуже вимогливі до асептичності середовища, високовразливі до надлишкових напружень зсуву, вражаються бульбашками повітря та відносяться до поверхневозалежних, тобто таких, проліферація яких, як правило, можлива лише за умов прикріплення до біоафінної поверхні росту [2; 3]. Зазначені особливості клітинних культур суттєво обмежують використання традиційних конструкцій ферментерів, призначених для культивування суспензійних культур мікроорганізмів у традиційних біотехнологіях [4].

**Метою статті** є формування принципів інжинірингу при розробці конструкції промислового ролерного біореактора для вирощування клітинних культур на основі проведення модельних досліджень з використанням біологічних агентів в апаратах різних розмірів, а також розробка концепції конструювання біореакторів на основі математичного моделювання на платформі ANSYS.

**Виклад основних результатів дослідження.** З точки зору технологічного оформлення стадії культивування можна виділити два основних види культивування культур клітин (рис. 1).

1. Непроточна культура (періодичне культивування) — клітини знаходяться у фіксованому об'ємі поживного середовища (ПС), що в кінцевому результаті призводить до інгібування БА дефіцитом субстрату, взаємовпливом клітин і продуктами метаболізму. Такий спосіб культивування характерний для лабораторних маніпуляцій у пробірках, чашках Петрі, чашках Колле, що характеризується малим об'ємом і мінливістю зовнішніх умов (рис. 2).

2. Проточна культура — клітини культивуються у ПС що постійно змінюється, алгоритм відповідає завданням культивування і хемостатним, турбідостатним або іншим умовам регулювання проточної культури.

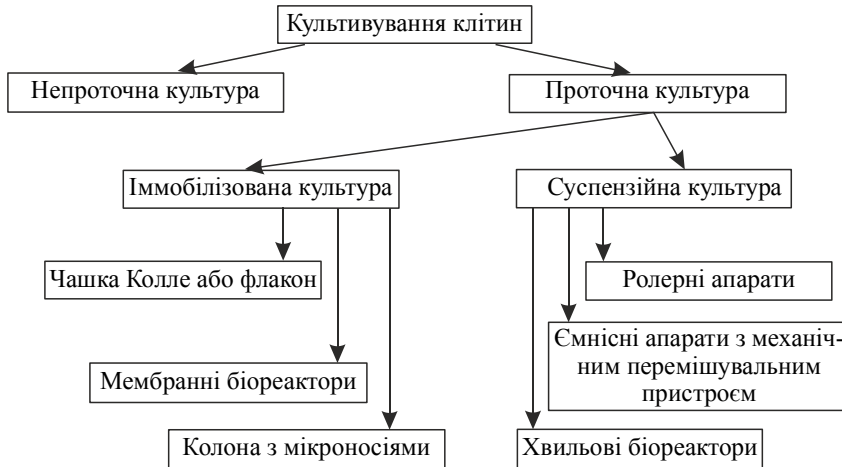
Введення енергії для гомогенізації вмісту біореактора здійснюється механічними пристроями, рідинною фазою тощо.

Системи культивування культур клітин залежно від типу розташування клітин можна умовно розділити на дві групи:

1. Клітини в адгезивному стані, що формують моношарові стаціонарні культури, в яких клітини розвиваються на поверхні скла і пластику чи

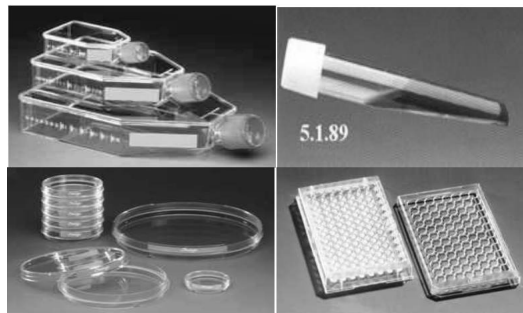
поверхні спеціальних носіїв (мікроносіїв), занурених у ПС. Даний тип культивування найбільш оптимальний з точки зору морфологічної будови клітин тварин і людини.

2. Суспензійні культури — клітини (після адаптації до суспензійного культивування) ростуть вільно в ПС (подібно до мікроорганізмів). Не всі культури клітин належним чином адаптуються до такого виду культивування.



**Рис. 1. Приклади систем для культивування клітин**

Для моношарових культур кількість клітин пропорційна площі поверхні ПС. Для малих обсягів і при вирощуванні культури для паралельних досліджень (дослідів) найкращим чином підходять багатолункові планшети, які можуть мати велику кількість маленьких лунок (рис. 2).



**Рис. 2. Системи культивування клітинних культур у типових ємностях для культивування клітин у вигляді моношару стаціонарної культури: 1 — флакони; 2 — пробірка зі скошеним дном; 3 — чашка Петрі; 4 — планшет культуральний**

У фармацевтичній біотехнології визнаний перспективним спосіб культивування культур клітин із застосуванням мікроносіїв. Інкапсулювання клітин у полімерні середовища дає змогу знизити негативний вплив зрізових зусиль, що виникають при гомогенізації середовища культивування. Спосіб інкапсулювання використовується для культивування гібридом з метою отримання

моноклональних антитіл. При культивуванні інкапсульованих гібридом продукція моноклональних антитіл зростає в тисячі разів порівняно із традиційним способом культивування. Такі системи культивування використовуються для лабораторних досліджень, тому що дають змогу проводити відповідні маніпуляції з клітинними культурами в малих об'ємах, значно заощаджуючи на поживних середовищах, обладнанні та витратних матеріалах.

*Біореактори для промислового культивування клітинних культур.* Для промислового культивування клітинних культур у суспензійному вигляді застосовується ємкісний апарат з турбінними та гвинтовими перемішувальними пристроями на магнітному приводі BIRE Bioreactor SYSTEM (ZETA Holding GmbH, Німеччина), робочий об'єм 40 л [7]. Усі частини апарата виготовлені з нержавіючої сталі. Система повністю автоматизована, існує можливість регулювання режиму роботи мішалки, здійснюється підготовка аераційного повітря, наявна система (Cleaning in Place and Sterilizing in Place — CIP/SIP), контроль CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> і тиску, а також контрольоване таймером введення поживних речовин, забезпечується цикл нагрівання й охолодження.

Вищеописана система підходить тільки для генетично трансформованих клітин, адаптованих до суспензійного способу культивування.



**Рис. 3. Установа BIRE Bioreactor SYSTEM (ZETA Holding GmbH для культивування клітинних культур [7]**

До інноваційного напрямку можна віднести біореактори одноразового використання (single-use), які не потребують виконання CIP/SIP процедур, що визначає їх високу рентабельність.

Компанією GE Healthcare Life Sciences (США) пропонується система культивування клітинних культур у суспензійному вигляді в гнучкій пластиковій місткості об'ємом до 500 л, що знаходиться на рухомій платформі (рис. 4). Платформа здійснює коливальні рухи в горизонтальній площині, забезпечуючи умови суспензійного культивування [8].

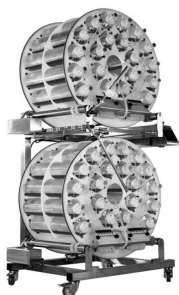
Закрита система не потребує кімнати біологічної безпеки. Wave — технології, що представлені хвильовими біореакторами, широко використовуються для

отримання моноклональних антитіл. Діапазон об'ємів культивування 100 мл—580 л дає змогу отримувати концентрацію клітин до  $10 \cdot 10^6$  кл/мл. Концентрація розчиненого кисню залишається на рівні, вищому за 50% насичення без використання бульбашкової аерації. Хвильові біореактори можуть бути використані як для суспензійних культур, так і для культивування з використанням мікроносіїв.



**Рис. 4. Установа Wave Bioreactor для культивування клітинних культур [8]**

Серед біореакторів для культивування культур клітин в адгезивному стані найбільш популярні ролерні системи. Ролерні ферментери являють собою набір циліндричних місткостей різного об'єму, що поміщені в термостатуючі камери та обертаються навколо своєї осі (рис. 5).



**Рис. 5. Ролерна установка для культивування клітинних культур [9]**

Ролерні культури прості, надійні, економічні. При вирощуванні клітин центральною проблемою залишається підвищення ефективності використання компонентів середовища, продуктивності клітин, збільшення доступної для росту клітин поверхні в розрахунку на одиницю об'єму поживного середовища.

Принцип роботи ролера полягає в тому, що при обертанні місткості навколо власної довгої осі на ролерному штативі середовище з клітинами переміщується по внутрішній частині місткості. Якщо клітини не прикріплюються, то відбувається їх збовтування під впливом кочення, однак вони залишатимуться в середовищі. Якщо клітини здатні прикріплюватися до субстрату, вони поступово адгезують до внутрішньої поверхні біореактора і почнуть рости з формуванням моношару.

Ролерний біореактор має три головні пріоритети порівняно зі статичною моношаровою системою:

- збільшення використовуваної поверхневої ділянки для посудини даного розміру;
- постійне, але «м'яке» перемішування середовища;
- збільшене відношення площі поверхні середовища до її обсягу, що дає змогу забезпечити підвищений газообмін через тонку плівку середовища над клітинами, які ненадовго занурюються в середовище.

Технологія ролерного культивування адгезованих клітинних культур має низку переваг, які є передумовами їх широкого використання:

- досягнення високої щільності клітин з використанням перфузійної техніки;
- виділення метаболітів багатьма клітинами здійснюється більш ефективно в разі їх прикріплення до субстрату;
- існує можливість швидкої заміни поживного середовища і регулювання його складу відповідно до фаз росту клітинної культури;

При використанні моношарових адгезованих клітинних культур існують недоліки:

- складність масштабування процесу;
- відсутність інформативності візуального аналізу;
- труднощі з визначенням і підтримкою таких параметрів, як кислотність і вміст  $O_2$  та забезпеченням гомогенності культури клітин;
- необхідність значних поверхонь для росту клітинної культури.

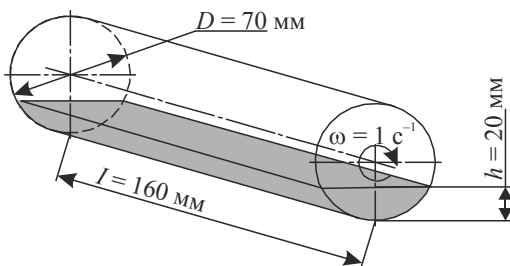
*Моделювання гідродинаміки промислового ролерного апарата.* Оскільки дані напруження, досягаючи певних значень, можуть викликати пошкодження клітини, то необхідно визначити величини та розподіл напружень зсуву вздовж поверхні ролера внаслідок його обертального руху.

З точки зору фізичної картини процесу ролерного культивування при обертанні ролера відбувається захоплення культуральної рідини стінками, внаслідок чого спостерігається ковзання одного шару рідини відносно іншого. На межі цих шарів відбувається виникнення швидкостей зсуву потоку рідини, які, у свою чергу, залежно від в'язкості, викликають дотичні (тангенційні) напруження, що змінюються по радіусу і довжині ролера. В літературних джерелах наводяться критичні значення напружень зсуву для клітинних культур еукаріотів, що починаються вже з 10 Па [9].

Для встановлення оптимальних гідродинамічних параметрів процесу культивування клітинних культур моделюється реальний фізичний процес, що триває в елементі ролерної установки.

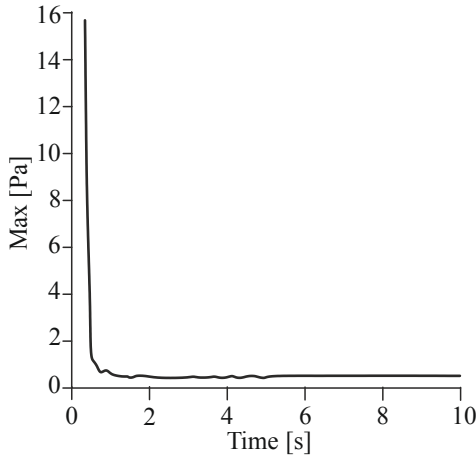
Геометрія моделі середовища, створена в програмі SolidWorks, являє собою циліндр з радіусом 70 мм і довжиною 160 мм (тобто порожнину флакона ролера). Для опису часткового заповнення порожнини ролера рідиною (рис. 6) були прописані команди в CFX Expression Language.

За допомогою програмного пакета ANSYS і, зокрема, вбудованого модуля FluidFlow (CFX) були задані фізичні параметри системи і граничні умови. Внутрішній об'єм розглядається як нерухомий, причому стінка обертається з частотою 60 об./хв навколо поздовжньої осі циліндра. Моделювання проводилося для часу 10 с, а результати записувалися з інтервалом в 0,2 с.

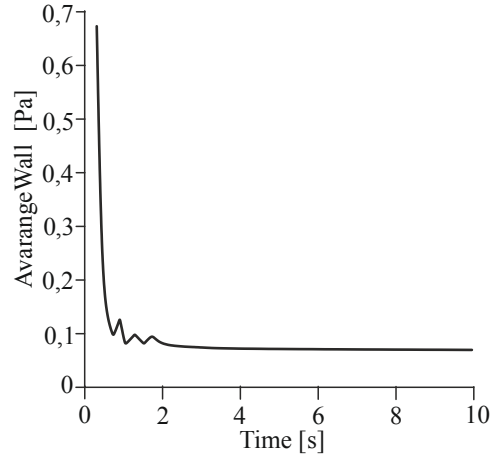


**Рис. 6.** Схема об'єму ролера: тонований — рідина, прозорий — повітря

Найбільшого «стресу» клітини зазнають у момент пуску ролера, при цьому максимальне значення напруження зсуву сягає майже 16 Па (рис. 7), а середнє значення дорівнює 0,7 Па (рис. 8). Далі максимальне і середнє значення суттєво зменшуються і знаходяться нижче за межу в 10 Па.

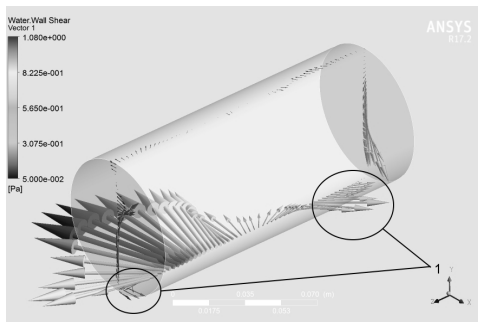


**Рис. 7.** Залежність максимального значення напружень зсуву від часу

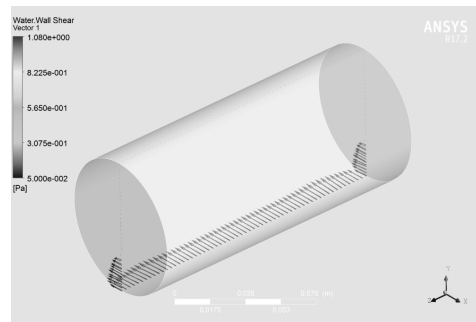


**Рис. 8.** Залежність середнього значення напружень зсуву від часу

У початковий момент моделювання процесу перемішування частина рідини захоплюється торцевими стінками ролера, що зумовлює формування напрямку вектора напружень зсуву (рис. 9, зони 1), протилежного до руху рідини (рис. 9). Після початкового «ривка» рідина починає стікати по стінці рівномірно і напрям векторів напружень зсуву вирівнюється по довжині (рис. 10).



**Рис. 9.** Напрямок вектора напружень зсуву в початковий момент часу моделювання



**Рис. 10.** Напрямок вектора напружень зсуву в установленому режимі

Розподіл швидкостей руху рідини залежить від положення перерізу, в якому розглядається процес. Так, для рідини біля торцевих стінок ролера максимальна швидкість становить 0,22 м/с, а поле швидкостей розподіляється відповідно до рис. 11. В будь-якому іншому перерізі рідина в середині об'єму майже не перемішується (рис. 12), що може призвести до виникнення зон застою.

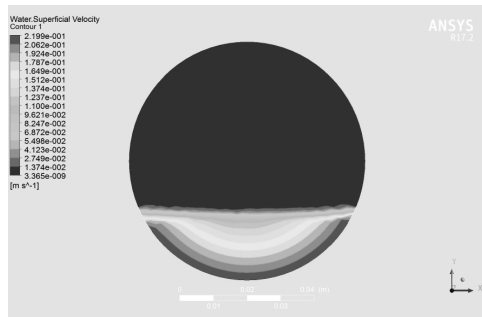


Рис. 11. Контур градієнта швидкості рідини в торцях ролера

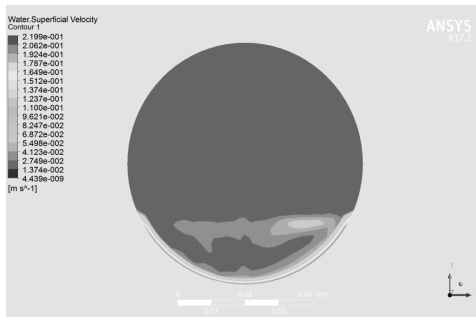


Рис. 12 Контур градієнта швидкості рідини в об'ємі порожнини ролера

## Висновки

Наведений аналіз конструктивних реалізацій ферментаційного обладнання дає змогу ознайомитися з новачіями апаратурного оформлення для культивування клітинних культур і виявити лімітуючі фактори проведення процесу.

Проведене моделювання гідродинаміки ролерного біореактора дає змогу оцінити фізичну картину процесів і встановити:

- максимальні значення напружень зсуву, що становлять 16 Па;
- напрямок векторів напружень зсуву в різні моменти часу;
- поля швидкостей рідини по об'єму ролера;

Виходячи з отриманих результатів, можна стверджувати, що напруження, які виникають у ролерному апараті під час культивування, знаходяться в межах допустимих значень, що доводить доцільність його використання в промисловості. Хоча при аналізі полів швидкостей варто відмітити неефективність взаємного перемішування шарів рідини, що може призвести до виникнення зон застою.

Дані дослідження можуть бути використані при проектуванні ферментаційного обладнання для культивування клітинних культур з різними типорозмірами та продуктивністю.

## Література

1. Mintz C. Single Use, Disposable Products: A «State Of The Industry» Update // Life Sci. Leader. — 2009. — #7 [Електронний ресурс]. — Режим доступу: [http://www.lifescienceleader.com/index.php?option=com\\_jambozine&layout=article&view=page&aid=3856&Itemid=56](http://www.lifescienceleader.com/index.php?option=com_jambozine&layout=article&view=page&aid=3856&Itemid=56).
2. Ultee M.E. SingleUse Components in Biopharmaceutical Manufacturing: Opportunities Outweigh Objections // PharmPro. — 2009. — # 2 [Електронний ресурс]. — Режим доступу: <http://www.pharmpro.com/Articles/2009/03/ObjectionsOverruled!>.
3. Ружинська Л.І. Моделювання гідродинаміки ролерного ферментера у біотехнології вакцин / Л.І. Ружинська, В.М. Поводзинський, В.Ю. Шибедький // Науковий вісник ЛНУВМБТ ім. С.З. Гжицького. — Львів : ЛНУВМБТ ім. С.З. Гжицького. — 2010. — Т. 12, №2 (44). — С. 76—82.
4. Закоморний Д.М. Гідродинаміка ферментера з багатоваловою мішалкою / Д.М. Закоморний, М.Г. Кутовий, С.І. Костик, В.М. Поводзинський, В.Ю. Шибедький // Scientific Journal «ScienceRise». — 2016. — № 5 / 2 (22). — С. 65—70.



5. Костик С.І. Математичне моделювання гідродинаміки перемішуючого пристрою з магнітним приводом / С.І. Костик, Л.І. Ружинська, В.Ю. Шибецький, О.О. Ревтов // Scientific Journal «ScienceRise». — 2016. — № 4 / 2 (21). — С. 27—31.

6. Сидоров Ю.І. Одноразова ферментаційна апаратура / Ю.І. Сидоров // Біотехнологія. — 2010. — № 6/ 3. — С. 9—21.

7. Bioreaktoren und Fermentationssysteme [Електронний ресурс]. — Режим доступу: URL: [http://www.zeta.com/bioreaktoren\\_161.htm](http://www.zeta.com/bioreaktoren_161.htm).

8. WAVE Bioreactors — GE Healthcare Life Sciences [Електронний ресурс]. — Режим доступу: URL: <http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/catalog/en/GELifeSciences-us/brands/wave/>.

9. Фрешии Р.Я. Культура животных клеток: практическое руководство / Р.Я. Фрешии; пер. 5-го англ. изд. — Москва : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2010. — 691 с.

## **СОВРЕМЕННАЯ КОНЦЕПЦИЯ МОДЕЛИРОВАНИЯ ГИДРОДИНАМИКИ В РОЛЛЕРНОМ БИОРЕАКТОРЕ С ПОВЕРХНОСТНЫМ КУЛЬТИВИРОВАНИЕМ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР**

**А.В. Копыленко**

*Национальный университет пищевых технологий*

**С.Н. Семенюк, В.Ю. Шибецкий, С.И. Костик**

*Национальный технический университет Украины «Киевский политехнический институт имени Игоря Сикорского»*

*В статье рассмотрены современные конструкции биореакторов для культивирования клеточных культур. Проанализированы способы реализации технологий глубинного и поверхностного культивирования. Построена математическая модель в среде ANSYS для моделирования процесса перемешивания, протекающего в роллерном аппарате. Подобраны начальные и граничные условия задачи моделирования. Установлены величины и направления векторов скорости движения жидкости во время перемешивания. Определены максимальные значения напряжения сдвига в зоне иммобилизации клеток и их развитие во времени.*

**Ключевые слова:** биотехнология, клеточные культуры, гидродинамика, роллер, напряжение сдвига.