УДК 532+536

## НЕСТАЦИОНАРНЫЙ МАССОПЕРЕНОС ПИТАТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ В ГЕЛЯХ С КАНАЛАМИ РАЗЛИЧНОЙ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ

© 2020 г. Б. Г. Покусаев<sup>а, \*</sup>, А. В. Вязьмин<sup>b, \*\*</sup>, Н. С. Захаров<sup>а</sup>, Д. П. Храмцов<sup>b</sup>, Д. А. Некрасов<sup>b</sup>

<sup>а</sup> Московский политехнический университет, Москва, Россия <sup>b</sup> МИРЭА — Российский технологический университет, Москва, Россия \*e-mail: pokusaev2005@yandex.ru \*\*e-mail: av1958@list.ru Поступила в редакцию 15.10.2019 г. После доработки 18.10.2019 г. Принята к публикации 21.10.2019 г.

Рассмотрена динамика развития иммобилизованных клеток в геле в условиях ограниченности массопереноса питательных веществ через межфазную границу. Целью работы является поиск путей эффективного культивирования живых микроорганизмов в объеме геля за счет правильного выбора структуры внутренних каналов, когда доставка питательных веществ в объем геля осуществляется по конвективно-диффузионному механизму. Методом спектроскопии определено временное изменение относительной интенсивности проходящего света по высоте образца агарозного геля с живыми клетками дрожжей при диффузии с поверхности в объем питательного раствора. Оценена глубина гелевого слоя, на которой обеспечивается жизнедеятельность микроорганизмов. Экспериментально установлена возможность формирования устойчивых во времени линейных и ветвящихся каналов в объеме геля. Проверена возможность их стабильного использования для конвективной подачи питательного вещества в объем. Установлены закономерности диффузии питательных веществ из каналов в объем геля с иммобилизованными клетками, обсуждены вопросы объемной структуры каналов, обеспечивающей повышение эффективности питания клеток в объеме геля.

*Ключевые слова:* массоперенос, диффузионно-конвективный механизм, гель, иммобилизованные клетки, метод спектроскопии, глубина проникновения, объемная структура гелевых каналов **DOI:** 10.31857/S0040357120020153

#### **ВВЕДЕНИЕ**

Повсеместно внедрение в практику методов аддитивных (послойных) технологий, основанных на 3D-печати, принято относить к четвертой промышленной революции [1]. В настоящее время с использованием этих технологий могут создаваться не только сложные технические устройства и приспособления [2], а также протезы медицинского назначения [3], но и живые биотехнологические объекты [4]. Сейчас происходит формирование такого нового научного направления, как биопринтинг [5]. Идея 3D-печати человеческих органов из стволовых клеток уже не кажется несбыточной [6] и можно говорить о первых успехах в этом направлении [7–9]. Даже ее частичная реализация обеспечит прорыв в развитии регенеративной медицины [10].

Процесс биопечати по своей идее почти не отличается от технологии 3D-печати неживых объектов. Он реализуется с помощью специально созданных биопринтеров, "картриджи" которых заправлены сфероидами, представляющими собой гидрогель, заполненный живыми клетками, которые наносят в определенном порядке на своеобразный каркас (скаффолд) и тем самым формируют живой орган [11—14]. Сфероиды склеиваются на каркасе в горизонтальном и вертикальном направлении. Гидрогель деградирует [15], и остается трехмерная структура, которая уплотняется и не обнаруживает клеточной миграции (перемещения клеток). Хотя это еще не совсем орган, а, скорее, инженерная конструкция в виде органа. Органом ее можно будет назвать, когда стволовые клетки начнут расти, делиться и дифференцироваться.

Перспективными материалами для использования в биопечати являются гидрогели [16, 17]. Это дисперсные системы, имеющие жидкую дисперсионную и микроструктурированную за счет сил межмолекулярного взаимодействия дисперсную фазу [18]. Наиболее важными функциональными свойствами гелей являются: упругость, пластичность, текучесть; тиксотропия — восстановление формы после деформации; синерезис — самопроизвольное выделение жидкой фазы [19-21]. Капиллярная сеть способна подводить к живым клеткам питательные вещества и кислорол, а также удалять продукты метаболизма. Данное свойство зависит от размера капилляров и коэффициента диффузии, которые при увеличении концентрации в геле дисперсной фазы уменьшаются [22–24]. При этом скорость диффузионного массопереноса не будет превышать максимально возможную для чистой дисперсионной фазы [25]. Есть определенная аналогия между массопереносом в геле и процессом фильтрования [26]. Достаточно очевидно, что перенос питательных веществ через внешнюю границу сформированного органа в силу его больших размеров только за счет диффузии не сможет обеспечить живые клетки необходимым количеством питательных веществ и кислорода. Природа решила эту проблему за счет создания сосудов кровеносных и лимфатических систем.

Казалось бы, что рассматриваемая проблема во многом подобна задачам, возникающим при обеспечении метаболизма микроорганизмов в биореакторах. В биотехнологии и микробиологии наработан огромный опыт выращивания и получения продуктов с помощью микроорганизмов в промышленных масштабах, а также использования для культивирования микроорганизмов гидрогелей, в частности, на основе агарозы [27].

Практически все промышленные процессы культивирования микроорганизмов проводят глубинным способом в жидкой фазе. Это связано с тем, что при ее перемешивании легче снять диффузионные ограничения массопереносу и обеспечить доступ каждой клетки микроорганизмов к питательным веществам и кислороду (при аэробном культивировании). Вывод метаболитов и двуокиси углерода также легче проводить из жидкости. Преимущественно, продукты микробиологического синтеза также выделяются клетками в окружающую жидкость. Так получают большинство лекарственных препаратов, аминокислот, ветеринарные и кормовые продукты, живые культуры микроорганизмов (используемые как закваски и пробиотики) [28].

Поверхностное твердофазное культивирование применяется значительно реже и только в тех случаях, когда выход продукта на порядок выше, чем при жидкостном культивировании. Выделение продуктов биосинтеза при этом все равно осуществляется в жидкой фазе путем измельчения и смешения твердофазного носителя, содержащего микроорганизмы с соответствующим растворителем. Так получают ряд антибиотиков и ферментов [29]. Используется также способ фиксации клеток в гелях или специальных носителях для проведения некоторых специфических реакций микробными ферментами, чтобы они не теряли ферментативную активность. Так проводят изомеризацию глюкозы, гидролиз крахмала и белка, реакции полимеризации. В таких условиях клетки микроорганизмов не размножаются, а только поддерживают жизнеспособность в течение некоторого времени [30]. При этом питательная среда и кислород вносятся на этапе смешения с клетками. Сохранение в жизнеспособном состоянии клеток в гелях в основном практикуется для проведения некоторых исследовательских работ и хранения культур микроорганизмов.

Таким образом, проблема выращивания микроорганизмов в объеме геля не является предметом изучения в биотехнологии. Однако при выращивании тканей из стволовых клеток в геле обеспечение их питательными веществами и кислородом приобретает принципиальное значение. Это обусловливает недавний рост интереса к исследованиям по созданию методами биопечати (и не только) кровеносных систем, обеспечивающих решение проблемы массообмена живых клеток с окружающей средой (см., например, [31–34]).

Целью настоящей работы является сравнительный анализ возможности обеспечения питанием и кислородом иммобилизованных в геле живых клеток либо непосредственно за счет массопереноса через капиллярную сеть гелей от внешней поверхности, контактирующей с питательной средой, либо за счет внутренних сетей микроканалов разной конфигурации. Также будут приведены экспериментальные результаты по созданию в геле искусственных стабильных во времени микроканалов и данные по моделированию доставки через них питательной среды к живым клеткам непосредственно в объем геля.

### МАТЕРИАЛЫ, МЕТОДЫ, ПОДХОДЫ

Проведение прямых экспериментальных исследований непосредственно со стволовыми клетками представляет непростую задачу [35], требующую выполнение условий стерильности и создания для роста клеток многофакторных комфортных условий. Подбор соответствующих гелей – сложная материаловедческая проблема (см., например, [36]). С другой стороны, для целей первичных исследований многие качества, проявляемые различными живыми клетками, и свойства различных гелей имеют схожие черты. Поэтому на первом этапе исследований представляется возможным провести экспериментальные исследования на более простых и удобных системах, чтобы получить принципиальные результаты, позволяющие уточнить направления исследований. Дальнейшее развитие этого научного направления потребует учета и реализации конкретных условий, связанных со спецификой выбранных биологических объектов и их носителей. Безусловно, такие исследования окажутся более сложными и трудоемкими, чем на начальном этапе.

В экспериментах использовали как чистые гели на основе агарозы Chemapol, так и гели с добавлением дрожжевой культуры в питательном растворе. Гели получали смешиванием агарозы с дистиллированной водой с последующим нагреванием до 90°С и медленным охлаждением в термостате до температуры эксперимента 23–25°С. Дрожжевая культура, предварительно растворенная в питательной среде до необходимой концентрации, добавлялась в гелеобразующий раствор на стадии охлаждения при температуре 40°С и тщательно перемешивалась. Содержание агарозы в гелях варьировалось в интервале 0.6–1.5 мас. %. При таких концентрациях агарозные гели являются оптически прозрачными, что позволяет проводить исследования роста дрожжевой культуры бесконтактно оптическими методами, не нарушая условий ее метаболизма [37].

Для проведения экспериментов с живыми клетками в качестве модельной выбрана культура Pichia polymorpha Y-314, поскольку близка к соматическим клеткам человека по размерам клеток (20-25 мкм размер клеток дрожжей [38] и 25 мкм – размер гепатоцитов паренхимы печени человека [39]) и по условиям жизнедеятельности. При росте на агаризованной среде, в состав которой входят глюкоза и минеральные соли, культура образует колонии белые, гладкие с ровным краем, с возрастом колонии приобретают бугристую поверхность и бежевый оттенок. Культура способна к сбраживанию глюкозы в качестве единственного источника углерода и хорошо растет при температуре от 30 до 42°С [40]. В образцы геля высевали 0.5 мл дрожжевой суспензии. Концентрация дрожжей в суспензии составляла 0.034 мг/см<sup>3</sup>. Ее контролировали путем измерения оптической проницаемости при длине волны 540 нм.

Для визуализации процессов массопереноса и измерения скорости диффузии из каналов в объем агарозных гелей в экспериментах использовался 1.0% водный раствор фуксина, который иногда добавляют в питательные среды. Фуксин (солянокислый розанилин)  $C_{20}H_{20}N_3Cl$  — вещество с высокой молекулярной массой, водные растворы которого имеют пурпурно-красный цвет и на фоне геля имеют высокую контрастность.

Для изучения кинетики роста дрожжей в объеме геля при диффузионном массопереносе питательной среды с поверхности экспериментальной кюветы был использован метод спектроскопического зондирования оптической проницаемости по глубине слоя. Он позволяет получать косвенную информацию (без какого-либо контакта) о динамике изменения концентрации посеянной дрожжевой культуры в реальном времени. Схема экспериментальной установки и ее подробное описание приведены в [24, 41].

Для проведения исследований массопереноса в гелях с искусственными каналами использовалась экспериментальная установка, схематично показанная на рис. 1. Кювета с гелем 3 необходимой концентрации, имеющим канал заданного диаметра, помещается в рабочий участок, подсоединяется к линии, по которой окрашенная жидкость из емкости 1 попадет в канал. Расход окрашенной жидкости регулируется вентилем 2. Окрашенная жидкость после прохождения через канал попадает в мерную емкость 4 с градуированной шкалой. С помощью секундомера и емкости контролируется средний расход жидкости, прошедшей через канал. Фоторегистрирующим устройством 5 фиксируется распространение диффузионного фронта, затем фотографии проходят обработку через программу на компьютере 6 для последующего вычисления значения коэффициента диффузии в геле при вынужденной конвекции жидкости в канале. В качестве окрашенной жидкости используется раствор фуксина. Обработка изображений проводится по методике, использованной ранее в [24] для определения коэффициента диффузии фуксина в воде.

При проведении экспериментов с микробиологическими объектами, анализе их результатов и создании математических моделей массопереноса необходимо учитывать, что скорость потребления дрожжами различных компонентов питательной среды разная (это весьма сложная композиция), однако скорости потребления каждого из компонентов пропорциональны концентрации клеток. Скорость роста клеток (изменение их концентрации в единицу времени) — показатель, величина которого изменяется в широком диапазоне от 0.5 до 0.01 г/(л ч) в зависимости от видовой принадлежности клеток [42].

Накопление биомассы микроорганизмов в периодическом процессе роста без внесения дополнительных компонентов питательной среды описывают кривой роста (см. рис. 2) [43]. Она представляет собой зависимость концентрации клеток микроорганизмов  $Y(\Gamma/\pi)$  от времени t (ч) и имеет несколько стадий: 1 – лаг-фаза, период адаптации клеток к среде без увеличения их численности: 2 – экспоненциальная фаза, характеризующаяся максимальной скоростью роста количества клеток; 3стационарная фаза, при которой скорость роста и гибели равны; 4 - стадия отмирания (при исчерпании питательной среды). Длительность фаз и уровень накопления биомассы для каждого штамма микроорганизмов определяются экспериментально и зависят от начального количества посеянных клеток, количества питательной среды и температуры.

Для используемой культуры *Pichia polymorpha Y-314* при оптимальной температуре культивирования длительность лаг-фазы при малой началь-



**Рис. 1.** Схема экспериментальной установки: *1* – емкость с окрашенной жидкостью; *2* – регулятор расхода; *3* – кювета с гелем и сформированным каналом; *4* – мерная емкость; *5* – фоторегистрирующее устройство; *6* – компьютер.



**Рис. 2.** Кривая роста микроорганизмов: *1* – лаг-фаза; *2* – экспоненциальная фаза; *3* – стационарная фаза; *4* – стадия отмирания.

ной концентрации клеток составляет 2–6 ч, фазы экспоненциального роста – 4–8 ч, стационарной фазы – 2–4 ч, далее при исчерпании питательной среды стадия отмирания длится 2–4 ч. При более низких температурах эксперимента продолжительность каждой из фаз увеличивается.

Максимальная скорость потребления питательной среды у источника углерода, поскольку это основной структурный компонент, используемый для внутриклеточного синтеза всех биополимеров. Эта скорость потребления (в нашем конкретном случае глюкозы) всегда больше скорости потребления других компонентов питательной среды. Сама скорость потребления источника углерода — генетически заложенная для разных культур величина, зависящая в достаточно широком диапазоне от вида источника углерода и вида клетки. Скорость потребления углерода прямо пропорциональна концентрации клеток и характеризуется коэффициентом конверсии углерода в биомассу. В случае дрожжевых клеток и глюкозы коэффициент конверсии, как правило, не превышает 50% (т.е. для получения 1 г биомассы требуется 2 г глюкозы) [44].

Для математического описания кривой роста микроорганизмов используют разные модели, связанные с разными условиями жизнедеятель-

ности микроорганизмов [45]. Однако, следуя вышесказанному, для описания временной и пространственной динамики концентрационных полей для питательного вещества и количества живых клеток дрожжей в геле следует пользоваться моделями типа динамики популяций с запаздыванием. Некоторые из таких моделей описаны и проанализированы в [46]. Они включают минимум два уравнения. Первое – нестационарное уравнение диффузии описывает материальный баланс по питательному веществу (в рассматриваемом выше случае, по глюкозе) с учетом его поглощения клетками. Скорость поглощения пропорциональна как текущей концентрации питательного вещества, так и текущей концентрации клеток дрожжей. Количество таких уравнений возрастает пропорционально количеству учитываемых при моделировании компонентов питательной среды. Второе уравнение – обыкновенное дифференциальное уравнение с запаздыванием, описывающее изменение концентрации дрожжей во времени с учетом их размножения путем деления клеток. Поскольку клетки в геле неподвижны и их пространственное распространение происходит только за счет деления, то диффузионный эффект крайне незначителен. Скорость роста клеток пропорциональна текущей концентрации питательного вещества. Запаздывание связано с наличием лагфазы, из-за которой скорость роста микроорганизмов в текущий момент времени будет определяться их концентрацией на более ранних временах по сравнению с текущим на величину продолжительности лаг-фазы.

При анализе указанной системы обычно рассматривают случаи, когда увеличение концентрации микроорганизмов за счет деления ограничивается только недостатком питания и гибелью клеток. На самом деле, в геле ситуация сложнее. Рост количества клеток еще ограничен механическим сопротивлением со стороны дисперсной фазы геля. Кроме того, клетки в процессе жизнедеятельности вырабатывают продукты метаболизма, которые могут быть удалены только диффузией и ингибируют рост и размножение клеток. Учет реальных факторов, влияющих на рост концентрации клеток, делает такие модели чрезвычайно сложными, а полученные на их основе результаты можно рассматривать только как качественные, некоторые из них приведены в [47].

### КИНЕТИКА МАССОПЕРЕНОСА ПИТАТЕЛЬНОГО ВЕЩЕСТВА К КЛЕТКАМ В ОБЪЕМЕ ГЕЛЯ

На этом этапе исследования было определено влияние диффузионного ограничения массопереноса на кинетику размножения живых клеток, находящихся в объеме геля. В спектрометрической кювету размером  $10 \times 10 \times 35$  мм до высоты

15 мм помещали агарозный гелеобразующий раствор заданной концентрации с равномерно распределенными в нем клетками дрожжей и при непрерывном перемешивании ее охлаждали до температуры начала гелеобразования. После этого гель стабилизировали до температуры эксперимента и на его верхнюю поверхность заливали питательную среду в объеме 1.0 мл. Оптически с использованием спектрометра Ocean Optics USB2000+ с шагом 0.2 мм по высоте кюветы *х* определяли относительную (по сравнению с дистиллированной водой) интенсивность света, проходящего через нее, *I*. Результаты обрабатывались для длины волны 540 нм.

Поглощение проходящего через кювету света связано с наличием геля и посеянных в нем первоначально клеток, диффундирующей от поверхности в объем геля питательной средой и появлением дополнительных клеток, образовавшихся путем деления. Определение оптической проницаемости образца осуществлялось через 15 мин после готовности геля и заливки на его поверхность питательной среды, а также через 24 ч. Уровень и концентрация питательной среды в кювете поддерживались постоянными. Результаты исследования для геля с клетками дрожжей при массовой концентрации агарозы 1.0% приведены на рис. 3. Нулевой точке по высоте кюветы соответствует середина краевого мениска смачивания на поверхности раздела геля и питательной среды (толщина мениска оценивается нами в 2.0 мм: 0  $\pm$  $\pm$  1.0 мм). Положительные значения координаты отсчитываются вглубь жидкой фазы (питательной среды), а отрицательные – вглубь геля с клетками.

Как следует из рис. 3, в жидкой фазе (при x > 0) в силу условий постановки эксперимента относительная интенсивность проходящего света с течением времени не меняется. Поскольку питательная среда представляет собой многокомпонентный раствор, содержащий высокомолекулярные соединения, интенсивность проходящего света снижается примерно на 20% по отношению к дистиллированной воде.

В области краевого мениска смачивания наблюдается минимум относительной интенсивности проходящего света на обоих рассматриваемых временах. Исходя из того, что он зафиксирован и в начале процесса (кривая *1* на рис. 3), когда количество питательного вещества, поступившее в объем геля за счет диффузии, незначительно, причиной возникновения минимума является повышенное рассеяние света на краевом мениске. Через 24 ч эксперимента минимум существенно углубляется и расширяется в обе стороны от краевого мениска. Это происходит за счет заполнения приповерхностной области питательной средой и деления посеянных клеток дрожже.



**Рис. 3.** Зависимость относительной (по сравнению с дистиллированной водой) интенсивности пропускания света через 1.0 мас. % агарозный гель с посеянными дрожжевыми клетками от расстояния до границы при различных временах культивирования: *1* – через 15 мин после подачи питательной среды; *2* – через 24 ч культивирования. Визуально наблюдаемой границе раздела соответствует значение 0, с минусом – слой геля с клетками, с плюсом – питательная среда.

вых клеток из геля в жидкую фазу в результате их деления.

В объеме геля (при x < 0) первоначально (кривая 1 на рис. 3) имеет место снижение относительной интенсивности проходящего света за счет поглощения геля и посеянных в нем клеток примерно на 20% по отношению к жидкой фазе. Через 24 ч относительное прохождение света в этой области заметно уменьшается (кривая 2 на рис. 3), при этом с увеличением глубины слоя геля разница между кривыми 1 и 2 также уменьшается. Причиной является увеличение поглощения света за счет массопереноса в объем геля питательной среды и деления дрожжевых клеток. Поскольку деление клеток при массопереносе питательного вещества из-за наличия лаг-фазы начинается с запаздыванием, то снижение относительной интенсивности в глубине гелевого слоя будет определяться только его проникновением с учетом поглощения живыми клетками (плато на кривой 2 рис. 3 на глубине -8.0 < x < -3.5 мм). Влияние увеличения числа клеток в этой области на поглощение малозначимо. Более глубоких слоев геля питательное вещество не достигает, и кривые, соответствующие обоим временам измерения, фактически сливаются.

Приближенно считаем, что за счет проникновения питательной среды с учетом ее поглощения клетками в гель, относительная интенсивность проходящего света снижается примерно на 10% по отношению к уровню кривой *1* (плато на кривой *2* рис. 3). Таким образом, можно предположить, что снижение относительной интенсивности проходящего света вблизи мениска на кривой 2 ниже 50% обусловлено только увеличением числа дрожжевых клеток за счет деления. Указанные рассуждения позволяют уверенно оценить глубину локализации зоны роста клеток вблизи границы, через которую подается питательное вещество, примерно в 3.0–4.0 мм.

Следует заметить, что результаты экспериментов, проведенных на геле с концентрацией агарозы 0.6 мас. %, практически не отличаются от показанных на рис. 3, тогда как для геля с концентрацией 1.5 мас. % локализация зоны деления клеток сужается до 2.0–3.0 мм.

Физически механизм преобладающего роста клеток в геле вблизи поверхности, через которую поступает питательное вещество, заключается в следующем. В случае, когда начальная концентрация клеток невелика и скорость диффузионного подвода питательной среды в объем превышает скорость поглощения клетками, находящимися в состоянии лаг-фазы, первоначально, в приповерхностных слоях геля начинает накапливаться питательное вещество. В этой области на временах, превышающих продолжительность лаг-фазы (запаздывания), начинается увеличение концентрации клеток за счет их деления. Соответственно, пропорционально увеличивается поглощение питательных веществ. При экспоненциальном увеличении числа клеток диффузионная подача питательного вещества внутрь геля через межфазную границу не компенсирует всего поглощения питательного вещества клетками в объеме геля. Причем чем дальше находятся клетки от поверхности, тем меньше им достается питательного вещества за счет его интенсивного поглощения в приповерхностных слоях. Чем ближе к границе, тем больше клеток и тем выше поглощение питательной среды. В результате клетки в глубине геля остаются без питательного вещества, прекращают деление, и большинство из них погибает. Такой механизм массопереноса приводит к тому, что клетки локализуются только вблизи поверхности, через которую питательное вещество поступает в гель.

# МАССОПЕРЕНОС В ОБЪЕМ ГЕЛЯ ЧЕРЕЗ ИСКУСТВЕННЫЕ КАНАЛЫ

Как самый простой вариант, для обеспечения роста клеток во всей гелевой матрице необходимо вносить питательные вещества непосредственно в объем геля с помощью специальных микроканалов. В этом случае диффузия питательного вещества через стенки каналов в объем обеспечит питание клеток внутри геля. Чтобы избежать внутреннего диффузионного сопротивления внутри канала, питательное вещество в них должно находиться в движении. Таким образом, в определенной степени, система искусственных микроканалов внутри геля должна выполнять функции кровеносных сосудов в органах.

Ранее было показано, что внутри геля при некоторых условиях возможно образование устойчивых капиллярных структур, способных транспортировать жидкость и даже пузырьки газа [48]. В настоящее время возникает необходимость создавать такие каналы искусственно.

Методика их формирования проста. Основа из металлической проволоки требуемого диаметра и формы помещается в экспериментальную кювету, которая заполняется гелеобразующим раствором при температуре не ниже 40°С с необходимой массовой концентрацией агарозы. После снижения температуры до 25°С (ниже температуры гелеобразования) и стабилизации геля в течение часа, проволока аккуратно извлекается и на ее месте остается стабильный во времени канал требуемого диаметра и формы. Экспериментально проверено, что такие каналы остаются устойчивыми при боковой деформации столбика геля до 60° от первоначального направления оси канала. Формировать каналы в готовом геле методом прокола нецелесообразно, поскольку стенки полученных каналов приобретают неровную и рваную форму.

Указанным методом экспериментально были сформированы прямые проточные и ветвящиеся каналы толщиной от 1.5 до 0.3 мм в агарозном геле с различной концентрацией агарозы. После извлечения каналообразующей проволоки они в течение нескольких минут (время увеличивалось с ростом концентрации агарозы в геле) заполня-



**Рис. 4.** Вертикальный (в центре) и наклонные каналы сразу после формирования в образце агарозного геля, для визуализации заполнены раствором фуксина.

ются дисперсионной влагой. Дисперсионная влага в них легко заменяется жидкой питательной средой, в качестве которой в эксперименте для визуализации использовался водный раствор фуксина. Фотоизображение ветвящегося канала в агарозном геле приведено на рис. 4. На описанной выше экспериментальной установке через прямые каналы осуществлялся проток водного раствора фуксина с расходом около  $2 \times 10^{-10}$  м<sup>3</sup>/с при перепаде давления 1.0 м вод. ст. без деформации формы канала.

При протоке раствора фуксина с указанным выше расходом через прямолинейный канал имеет место его поперечная диффузия в объем геля. В качестве примера на рис. 5 приведены фотографии, визуализирующие этот процесс, для канала диаметром 0.35 мм в агарозном геле с массовой концентрацией агарозы 1.0%. Внешне процесс диффузии наблюдается как уширение канала. Для различных концентраций геля и диаметров созданных каналов по фотографиям, сделанным в привязке к определенным моментам времени *t* от начала эксперимента, с помощью программы Autocad определялось расстояние z, характеризующее распространение диффузионного фронта от канала в объем. Исходя из экспериментальных зависимостей z = z(t), по формуле  $D = z^2/(4t)$  методом наименьших квадратов рассчитывался коэффициент диффузии D.

В результате экспериментов установлено, что коэффициент диффузии зависит от концентрации агарозы в геле и диаметра каналов. Так, при диаметре каналов 1.0 мм и более оцененные по экспериментальным данным по массопереносу



**Рис. 5.** Фотографии, визуализирующие процесс поперечной диффузии фуксина из проточного канала диаметром 0.35 мм в объем агарозного геля массовой концентрацией агарозы 1.0% в различные моменты времени от начала эксперимента, мин: 1 - 0, 2 - 15, 3 - 30, 4 - 45, 5 - 60.

из каналов значения коэффициентов диффузии в зависимости от концентрации агарозы в геле согласуются с полученными ранее в [47] результатами для плоской поверхности. Иначе обстоит дело в узких каналах. На рис. 6 приведены сравнительные данные для зависимостей глубины проникновения z от времени t при диффузии фуксина в гель с массовой концентрацией агарозы 0.6% из проточных прямолинейных вертикальных каналов диаметрами 1.0 и 0.5 мм. Из него следует, что глубина проникновения из тонкого капилляра меньше, чем из более толстого канала, соответственно для одного и того же геля, меньше и коэффициент диффузии. Физическое объяснение этому явлению на настоящий момент не предложено.

### ЧИСЛЕННОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ МАССОПЕРЕНОСА В ОБЪЕМ ГЕЛЯ ИЗ МИКРОКАНАЛОВ

В связи с неоднородностью структуры геля при наличии в нем микроканалов задача моделирования массопереноса является непростой и неоднозначной. Пока остается открытым вопрос об оптимальной структуре каналов внутри геля, которая обеспечивает необходимый подвод питательных веществ к иммобилизованным в геле клеткам. Для поиска такой структуры необходима разработка методов моделирования массопереноса из каналов сложной формы (в том числе разветвленных) и переменного сечения, а также проведение численных экспериментов с различными конфигурациями каналов для определения их оптимального расположения и количества, необходимого для обеспечения клеток питательными веществами.

Первоначально рассматривались две формы каналов – линейные и перекрестные. Сеть каналов показана в реальном масштабе, в соответствии с которым проводился расчет. Линейная модель соответствует системе капилляров, пронизывающих гель по вертикали (рис. 7а). Преимуществом такой структуры является техническая простота ее формирования. Перекрестная модель соответствует системе вертикальных и горизонтальных капилляров, имеющих взаимные пересечения (рис. 7б). Такая конфигурация сложнее в реализации, но наличие пересечений между каналами позволяет интенсифицировать процесс массообмена и перераспределить нагрузку по течению жидкости в случае засорения одного из каналов на другие. Выбор той или иной структуры обусловлен необходимостью и технической возможностью их реализации в гелевом образце.



**Рис. 6.** Зависимость глубины проникновения от времени при диффузии фуксина в гель с массовой концентрацией агарозы 0.6% из проточного прямолинейного вертикального канала разного диаметра: *1* – 1.0 мм; *2* – 0.5 мм.



**Рис. 7.** Характерные модели капиллярной структуры в гелях: (а) – линейная, (б) – перекрестная. Вертикальные и горизонтальные линии – каналы, закрашенный прямоугольник – область, в которую обеспечивается массоперенос диффундирующего вещества.

Для выделенной расчетной зоны на рис. 7 массоперенос питательного вещества через ее границы отсутствует в силу равномерности распределения вещества по всему объему геля. Массоперенос происходит только диффузионным путем через поверхность каналов. шаг расположения которых h. Полагаем, что диффузионное сопротивление внутри каналов за счет течения жидкости отсутствует и полностью сосредоточено вблизи поверхности раздела со стороны геля. Тогда массовый поток в пробный объем геля кубической формы с ребром h в предположении, что подводящие питательное вещество каналы расположены для линейной конфигурации по боковым ребрам, а для перекрестной – по всем ребрам пробного куба, составит  $\alpha S_{va}(1-C)$ . Здесь  $\alpha$  – коэффициент массоотдачи от поверхности канала в гель;  $S_{\rm vg}$  — удельная поверхность каналов, C — отношение средней концентрации переносимого вещества в выделенном объеме к его концентрации в каналах.

Поскольку гель является неподвижной средой, для коэффициента массоотдачи справедлива следующая оценка:  $\alpha \approx D/h$ , где D – коэффициент диффузии питательной среды в геле, зависящий от массовой концентрации агарозы. В расчетах воспользуемся для оценки величины D значениями, приведенными в [47] по коэффициентам диффузии фуксина в агарозных гелях различной плотности. Удельную поверхность для линейной конфигурации каналов определим как отношение боковой поверхности цилиндрического канала к пробному объему геля  $S_{yg} = \pi d/h^2$ , поскольку в силу малости диаметра каналов d их объемом можно пренебречь по сравнению с объемом, занимаемым гелем. Очевидно, что удельная поверхность для перекрестной конфигурации каналов в три раза больше, чем для линейной.

Наличие клеток, поглощающих питательную среду, приводит к снижению ее концентрации в пробном объеме. Как указано ранее, поглощение питательного вещества пропорционально концентрации клеток Y и питательной среды C. Отнесенная к единице объема интенсивность поглощения питательного вещества клетками выражается соотношением kYC. Концентрация клеток в период лаг-фазы в расчетах принималась постоянной и равной  $Y_0 = 0.2$  г/л, коэффициент k был подобран опытным путем и для него принято значение k = 3.2.

Таким образом, баланс по питательному веществу для выбранного пробного объема выражается уравнением

$$\frac{dC}{dt} = \alpha S_{y\pi}(1-C) - kYC. \tag{1}$$

Оно дополняется начальным условием, выражающим отсутствие питательного вещества в рассматриваемом объеме в начальный момент времени:

$$t = 0: C = 0.$$

Решение этого уравнения получается аналитически и хорошо известно. При малых временах имеет место линейный рост концентрации питательного вещества, который при больших временах переходит в асимптотическое приближение к предельному значению.

Тангенс угла наклона линейного участка зависимости, характеризующий скорость нарастания концентрации в объеме, определяется комплексом  $\alpha S_{ya}$ , а значит, возрастает при переходе от линейной структуры каналов к перекрестной за счет увеличения удельной поверхности. Однако, поскольку коэффициент массоотдачи определяется коэффициентом диффузии, а он, в свою очередь, сильно зависит от массовой концентрации агарозы, возможны ситуации, что для малоконцентрированных гелей (0.6 мас. % агарозы) при линейной системе каналов имеет место более быстрое нарастание концентрации, чем для перекрестной системе каналов в сильноконцентрированных гелях (например, при 1.2 мас. % агарозы).



**Рис. 8.** Временная динамика заполнения геля диффундирующим веществом с учетом его поглощения клетками, когда их количество возрастает в результате деления (*C* – отношение средней концентрации переносимого вещества в выделенном объеме к его концентрации в каналах): *1* – вертикальные каналы в геле концентрацией 0.6 мас. % агарозы; *2* – перекрестные каналы в том же геле; *3* – вертикальные каналы в геле концентрацией 1.2 мас. % агарозы; *4* – перекрестные каналы в том же геле.

С увеличением первоначальной концентрации посеянных клеток *Y* поглощение питательного вещества клетками возрастает. Это замедляет ее рост на начальной стадии. Предельная концентрация питательной среды достигается при больших временах и определяется из условия равенства нулю правой части (1). Анализ показывает, что с увеличением начальной концентрации посеянных клеток уровень, на котором стабилизируется концентрация питательного вещества, снижается.

Описанные выше результаты относятся к состоянию лаг-фазы, когда количество клеток остается практически постоянным. Далее начинается стадия деления клеток и их концентрация Y начинает возрастать во времени. Тогда продолжительность лаг-фазы  $\tau$  следует рассматривать как время запаздывания. Каждая вновь образовавшаяся клетка сначала в течение времени  $\tau$  адаптируется к окружающей среде, а лишь затем делится. Таким образом, изменение числа клеток в выбранном пробном объеме на стадии роста концентрации клеток описывается следующим уравнением:

$$\frac{dY}{dt} = kCW - \frac{bYY_{\infty}}{Y_{\infty} - Y}$$
(2)

со специфическим начальным условием для уравнения с запаздыванием

$$t < \tau$$
:  $Y = Y_0$ .

Здесь  $W = Y(t - \tau)$  – концентрация клеток микроорганизмов во время  $\tau$ , b – коэффициент сопротивления делению клеток,  $Y_0$  и  $Y_{\infty}$  – начальная и максимальная концентрация клеток соответственно. Первое слагаемое в правой части (2) определяет скорость увеличения числа клеток с учетом запаздывания, а второе – сопротивление окружающей среды нарастанию их числа за счет взаимодействия с гелем. С учетом деления клеток, в результате чего происходит рост их концентрации, условия поглощения питательного вещества в пробном объеме изменяются, поскольку в последнем слагаемом (1) величина *Y* становится зависящей от времени *t*. Таким образом, концентрация питательного вещества и концентрация клеток дрожжей в пробном объеме определяются исходя из решения системы двух уравнений (1) и (2) с соответствующими начальными условиями. Важно, что одно из них обыкновенное дифференциальное уравнение, а второе — уравнение с запаздыванием. Эта система уравнений решалась численно. Полученные результаты по динамике изменения концентрации питательного вещества приведены на рис. 8.

Анализ характерного вида кривых на рис. 8 показывает, что первоначально при малых временах, когда клетки находятся в состоянии лагфазы, идет относительно быстрое насыщение пробного объема питательным веществом. При длительной продолжительности лаг-фазы концентрация питательного вещества асимптотически приближается к значениям, определяемым начальной концентрацией посеянных клеток и параметрами, характеризующими его перенос в пробный объем. С началом стадии деления клеток кинетические кривые концентрации питательного вещества переходят через максимум и начинают снижаться вследствие увеличения поглощения за счет изменения числа потребляющих питание клеток. Когда количество клеток после сталии роста приближается к максимальному значению, определяемому условиями их существования в геле, концентрация питательного вещества асимптотически выходит на новые стационарные значения, существенно меньшие, чем для первоначально посеянных клеток. Все описанные выше закономерности, связанные с влиянием структуры каналов, их диаметра и концентрации геля, характеризующие насыщение пробного объема питательной средой, здесь также имеют место. Важно отметить, что новые значения стационарной концентрации питательного вещества в пробном объеме будут определять концентрацию клеток дрожжей, которую можно достичь за счет подачи питательного вещества через каналы и далее поддерживать в иммобилизованном состоянии.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При моделировании роста микроорганизмов в объеме геля при подаче питания через межфазную границу наиболее физически обоснованной является кинетическая модель на основе обыкновенного дифференциального уравнения с запазлыванием. При этом запазлывание имеет ясный и четкий физический смысл. как продолжительность лаг-фазы, т.е. временного интервала адаптации микроорганизмов к окружающей среде до начала деления. Среди факторов, препятствующих росту числа клеток, необходимо учитывать следующие: недостаток питательной среды (кислорода) при ее доставке к клеткам диффузионным путем, механическое сопротивление геля увеличению объема, занимаемого микроорганизмами, выделение клетками продуктов метаболизма, ингибирующих их рост.

Вследствие малой диффузионной массопроводности геля рост микроорганизмов в его объеме локализуется вблизи поверхности, через которую поступают питательные вещества. Полученные экспериментальные оценки для клеток дрожжей показывают, что ширина зоны такой локализации составляет от 2.0 до 4.0 мм и зависит от массовой концентрации агарозы в геле. С ростом концентрации зона локализации сужается.

Показано, что в геле может быть создана система искусственных микроканалов для массопереноса питательных веществ в его объем по конвективно-диффузионному механизму. Установлено, что микроканалы, несмотря на явление синерезиса присущее гелям, остаются стабильными во времени. Практически подтверждено, что через них можно пропускать жидкий поток питательного вещества с объемным расходом несколько микролитров в секунду и это не влияет на состояние каналов. Отмечено, что для микроканалов, созданных механическим методом, наблюдается неоднородность массопереноса через межфазную границу.

Методом математического моделирования установлено, что основное влияние на время насыщения среды питательным веществом в отсутствие деления клеток оказывает структура и диаметр каналов, объемная скорость поглощения ими питательного вещества, а также концентрация геля, в котором клетки иммобилизованы. На стадии деления клеток их число возрастает, и даже при наличии каналов количество питания в объеме геля будет снижаться. Скорость подачи в гель питания через каналы будет определять концентрацию клеток (по отношению к максимально возможному значению), которую можно достичь при выбранной конфигурации и размере каналов в геле с заданной массовой концентрацией агарозы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 15-19-00177). Авторы выражают глубокую признательность Л.С. Герман за помощь в постановке микробиологической части экспериментов и незаменимые консультации по этим вопросам.

### ОБОЗНАЧЕНИЯ

b	коэффициент сопротивления делению клеток, 1/с
С	отношение средней концентрации пере- носимого вещества в выделенном объеме к его концентрации в канадах мас л
D	$k$ or $\delta$ hold $k$ is the set of k is the set of $k$ is the set of k is the set of $k$ is the set of $k$ is the set of k is the set of $k$ is the set of k is the set of $k$ is the set of k is the set of $k$ is the set of k is th
d	коэффициент диффузии, м /с
a k	диаметр канала, м
n	шаг расположения каналов, м
Ι	относительная (по отношению к дистил- лированной воде) интенсивность прохо- дящего через гель с клетками света, %
k	коэффициент объемного поглощения
	питательного вещества клетками, 1/с
$S_{ m yg}$	удельная поверхность каналов
t	время, с или ч (для микробиологического эксперимента)
$W=Y(t-\tau)$	концентрация клеток микроорганизмов во время т, г/л
x	вертикальная координата, м
Y	концентрация клеток микроорганизмов, г/л
<i>Y</i> <sub>0</sub>	концентрация клеток в состоянии лаг- фазы, г/л
$Y_{\infty}$	максимальная концентрация клеток, г/л
Ζ	расстояние распространения диффузи- онного фронта, м
α	коэффициент массоотдачи, м/с
τ	продолжительность лаг-фазы (время
	запаздывания), с

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Schwab K., Davis N.* Shaping the Fourth Industrial Revolution. Cologny: World Economic Forum, 2018.

- 2. *Badiru A.B., Valencia V.V., Liu D.* Additive Manufacturing Handbook: Product Development for the Defense Industry. Boca Raton: CRC, 2017.
- 3. *Rodríguez-Salvador M., Garcia-Garcia L.A.* Additive manufacturing in healthcare // Foresight STI Governance. 2018. V. 12. № 1. P. 47.
- 4. *Wang M.Y., He J.K., Liu Y.X., Li M., Li D., Jin Zh.* The trend towards in vivo bioprinting // Int. J. Bioprint. 2015. V. 1. P. 15.
- 5. *Murphy S.V., Atala A.* 3D bioprinting of tissues and organs // Nat. Biotechnol. 2014. V. 32. № 8. P. 773.
- Placzek M.R., Chung I.M., Macedo H.M., Ismail S., Blanco M.T., Lim M., et al. Stem cell bioprocessing: fundamentals and principles // J. R. Soc., Interface. 2009. V. 6. P. 209.
- Chimene D., Lennox K.K., Kaunas R.R., Gaharwar A.K. Advanced bioinks for 3D printing: A materials science perspective // Ann. Biomed. Eng. 2016. V. 44. № 6. P. 2090.
- Jakab K., Norotte C., Marga F., Murphy K., Vunjak-Novakovic G., Forgacs G. Tissue engineering by self-assembly and bio-printing of living cells // Biofabrication. 2010. V. 2. P. 20.
- Melchels F.P.W., Domingos M.A.N., Klein T.J., Malda J., Bartolo P.J., Hutmacher D.W. Additive manufacturing of tissues and organs // Prog. Polym. Sci. 2012. V. 37. № 8. P. 1079.
- Bioprinting in Regenerative Medicine (Series in Stem Cell Biology and Regenerative Medicine) / Ed. Turksen K. N.Y.: Springer, 2015.
- 11. Chua Ch.K., Yeong W.Y. Bioprinting. Principles and Applications. Singapore: World Scientific, 2015.
- 12. *Khang G., Kim M.S., Lee H.B.* A Manual for Biomaterials / Scanffold Fabrication Technology. Singapore: World Scientific, 2007.
- Handbook of Tissue Engineering Scaffolds: Volume One (Woodhead Publishing Series in Biomaterials) / Eds. Mozafari M., Sefat F., Atala A. Cambridge: Woodhead, 2019.
- Ferris C.J., Gilmore K.G., Wallace G.G., Panhuis M. Biofabrication: an overview of the approaches used for printing of living cells // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2013. V. 97. № 10. P. 4243.
- 15. *Patel H., Bonde M., Srinivasan G.* Biodegradable polymer scaffold for tissue engineering // Trends Biomater. Artif. Organs. 2011. V. 25. № 1. P. 20.
- 16. Jang T.-S., Jung H.-D., Pan H.M., Tun H., Chen Sh., Song J. 3D printing of hydrogel composite systems: Recent advances in technology for tissue engineering // Int. J. Bioprint. 2018. V. 4. P. 126. https://doi.org/10.18063/IJB.v4i1.126
- 17. Wang S., Lee J.M., Yeong W.Y. Smart hydrogels for 3D bioprinting // Int. J. Bioprint. 2015. V. 1. № 1. P. 3.
- Фролов Ю.Г. Курс коллоидной химии. Поверхностные явления и дисперсные системы. М.: Химия, 1988.
- Gels: Structures, Properties, and Functions: Fundamentals and Applications (Progress in Colloid and Polymer Science. V. 136) / Eds. Tokita M., Nishinari K. Berlin: Springer-Verlag, 2009.

- 20. *Scherer G.W.* Structure and properties of gels // Cem. Concr. Res. 1999. V. 29. № 8. P. 1149.
- Gels Handbook / Eds. Kajiwara K., Osada Yo. Amsterdam: Elsevier, 2000. V. 1–4.
- Amsden B. Solute diffusion within hydrogels. Mechanisms and models // Macromolecules. 1998. V. 31. № 23. P. 8382.
- Pokusaev B.G., Karlov S.P., Vyazmin A.V., Nekrasov D.A. Diffusion phenomena in gels // Chem. Eng. Trans. 2015. V. 43. P. 1681.
- 24. Покусаев Б.Г., Карлов С.П., Вязьмин А.В., Некрасов Д.А. Закономерности формирования и диффузионные свойства силикатных и агарозных гелей // Теор. осн. хим. технол. 2018. Т. 52. № 2. С. 200.
- Pokusaev B.G., Vyazmin A.V., Karlov S.P., Nekrasov D.A., Zakharov N.S., Khramtsov D.P. The diffusion properties of the hydrogels // Proc. 2018 IEEE Northwest Russia Conference "Mathematical Methods in Engineering and Technology" (MMET NW). St. Petersburg, Russia: Saint Petersburg Electrotechnical University "LETI", 2018. P. 523.
- 26. *Таран Ю.А., Козлов А.В., Таран А.Л.* Влияние образования отложений в порах фильтровальной перегородки на процесс фильтрации // Тонкие хим. технол. 2019. Т. 14. № 2. С. 15.
- Hitchens A.P., Leikind M.C. The introduction of agar-agar into bacteriology // J. Bacteriol. 1939. V. 37. P. 485.
- 28. Промышленная микробиология / Под ред. Егорова Н.С. М.: Высшая школа, 1989.
- 29. Перт С.Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. М.: Мир, 1978.
- Синицин А.П., Райнина Е.И., Лозинский В.И., Спасов С.Д. Иммобилизованные клетки микроорганизмов. М.: МГУ, 1994.
- Sasmal P, Datta P, Wu Y, Ozbolat I.T. 3D bioprinting for modelling vasculature // Microphysiol. Syst. 2018. V. 2. P. 9.
- Bertassoni L.E., Cecconi M., Manoharan V., Nikkhah M., Hjortnaes J., Cristino A.L., Barabaschi G., Demarchi D., Dokmeci M.R., Yang Y., Khademhosseini A. Hydrogel bioprinted microchannel networks for vascularization of tissue engineering constructs // Lab Chip. 2014. V. 14. № 13. P. 2202.
- Norotte C., Marga F.S., Niklason L.E., Forgacs G. Scaffoldfree vascular tissue engineering using bioprinting // Biomaterials. 2009. V. 30. № 30. P. 5910.
- 34. Richards D., Jia J., Yost M., Markwald R., Mei Y. 3D bioprinting for vascularised tissue fabrication // Ann. Biomed. Eng. 2017. V. 45. № 1. P. 132.
- 35. Rodrigues C.A.V., Fernandes T.G., Diogo M.M., da Silva C.L., Cabral J.M.S. Stem cell cultivation in bioreactors // Biotechnol. Adv. 2011. V. 29. № 6. P. 815.
- Lin S., Sangaj N., Razafiarison T., Zhang Ch., Varghese Sh. Influence of physical properties of biomaterials on cellular behavior // Pharm. Res. 2011. V. 28. № 6. P. 1422.
- 37. Pokusaev B., Vyazmin A., Zakharov N., Karlov S., Nekrasov D., Reznik V., Khramtsov D. The effect of bioresorbable additives and micro-bioobjects on gel formation, stabilization and thermophysical properties // Therm. Sci. 2019. V. 23. № 2b. P. 1297.

- Меледина Т.В., Давыденко С.Г. Дрожжи Saccharoтусеs serevisiae. Морфология, химический состав, метаболизм. СПб.: Университет ИТМО, 2015.
- Радченко В.Г., Шабров А.В., Зиновьева Е.Н., Ситкин С.И. Заболевания печени и желчевыводящих путей. СПб.: СпецЛит, 2011.
- 40. The Yeasts: A Taxonomic Study / Eds. Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T. Amsterdam: Elsevier, 2011.
- 41. Pokusaev B., Vyazmin A., Zakharov N., Karlov S., Nekrasov D., Reznik V., Khramtsov D. Non-stationary heat transfer in gels applied to biotechnology // Therm. Sci. 2017. V. 21. № 5. P. 2237.
- 42. Бирюков В.В. Основы промышленной биотехнологии. М.: КолосС, 2004.
- Минкевич И.Г. Материально-энергетический баланс и кинетика роста микроорганизмов. М.: РХД, 2005.

- 44. Грачева И.М., Иванова Л.А. Биотехнология биологически активных веществ. М.: Элевар, 2006.
- 45. Дворецкий Д.С., Дворецкий С.И., Муратова Е.И., Ермаков А.А. Компьютерное моделирование биотехнологических процессов и систем. Тамбов: Тамб. гос. ун-т, 2005.
- 46. Полянин А.Д., Сорокин В.Г., Вязьмин А.В. Реакционно-диффузионные модели с запаздыванием: некоторые свойства, уравнения, задачи и решения // Теор. осн. хим. технол. 2018. Т. 52. № 3. С. 278.
- 47. Pokusaev B.G., Nekrasov D.A., Zakharov N.S., Khramtsov D.P., Karlov S.P., Vyazmin A.V. Unsteady Heat and Mass Transfer in Structured Media and Gel // Theor. Found. Chem. Eng. 2020 (in press).
- Khramtsov D.P., Vyazmin A.V., Pokusaev B.G., Karlov S.P., Nekrasov D.A. Numerical simulation of slug flow mass transfer in the pipe with granular layer // Chem. Eng. Trans. 2016. V. 52. P. 1033.