

Активация клеток в кавитационном потоке

© Г.А. Баранов, А.А. Беляев, А.В. Земляной, С.Б. Оникиенко, С.А. Смирнов, В.В. Хухарев

Научно-исследовательский институт электрофизической аппаратуры им. Д.В. Ефремова,
196641 Санкт-Петербург, Россия
e-mail: laser@mail.rcom.ru

(Поступило в Редакцию 9 октября 2006 г.)

Рассмотрено численное моделирование кавитационного течения в расширяющемся сопле. Экспериментально исследована кавитационная активация клеток.

PACS: 47.11.-j, 87.90.+y

Введение

При кратковременном высокоинтенсивном физическом воздействии на клетки в условиях обратимого повреждения их метаболическая активность переключается на синтез и секрецию факторов защиты, при этом активность клеток в направлении их деления угнетается. Это реакция гормезиса — клеточного стресса. Продуцируемые при гормезисе вещества достаточно универсальны, поэтому, полученные при активации определенных типов дрожжей, они могут применяться для профилактики и лечения поражений людей, вызванных высокоинтенсивными воздействиями факторов окружающей среды.

Это послужило основой концепции стресс-ксенобиотерапии — использование продуктов гормезиса чужеродных по отношению к человеку организмов для его защиты от повреждений, возникающих при воздействии неблагоприятных факторов окружающей среды.

В настоящей работе экспериментально показана перспективность применения кавитации для активации клеток дрожжевой культуры *Saccharomyces cerevisis* и лактобактерий. Численное моделирование кавитационного течения использовано для анализа пространственной структуры и временных характеристик потока в коническом сопле. Выполнено также моделирование процесса изменения формы модельной клетки в неоднородном поле скорости водной среды.

Трансформация биообъектов — молекул амилопектина — в кавитационном потоке с целью получения низкомолекулярных фракций эффективных в иммунологии ряда заболеваний была рассмотрена нами в [1]. Это было логическим следствием [2–4] по гидродинамической модификации полисахаридов при поглощении водным раствором последних излучения CO_2 -лазера. В качестве параметра, связывающего макро- и микрогидродинамические характеристики, в [1–4] была принята скорость деформации жидкости, при определенном уровне которой макромолекулы начинают изменять форму.

В данной работе изучается активация клеток. Критерий связи макро- и микрогидродинамических параметров не используется, однако численный анализ временных характеристик течения воды позволил дать объ-

яснение прекращению влияния кавитации при высоких перепадах давления в сопле.

Экспериментальная часть

Эксперименты проведены с использованием конических сопел с углом расширения $\alpha = 15^\circ$ и 60° . Параметры сопла с $\alpha = 15^\circ$, реализованные в расчетной геометрии, направления входящего и выходящего потоков показаны на рис. 1. Для обоих сопел длина расширяющегося конуса была равна 13 мм, диаметр и длина горлышка были одинаковы — 1 и 1.25 мм соответственно.

Исследование проводилось по следующей методике. Дрожжи растворяли в воде, содержащей сахарный си-

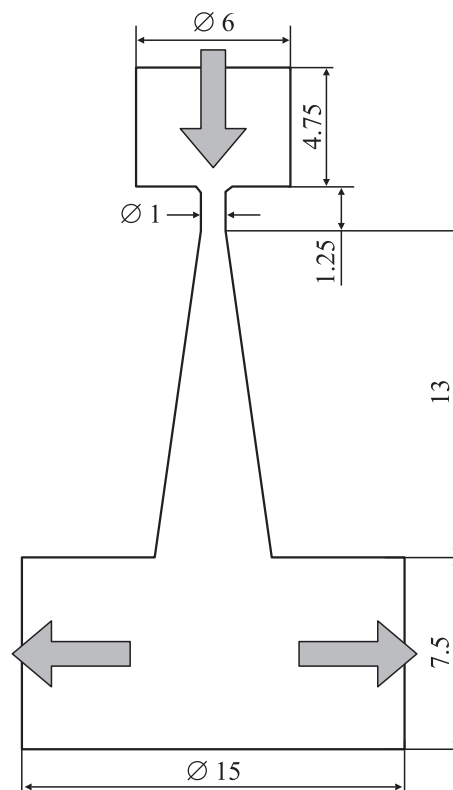


Рис. 1. Геометрия сопла с углом расширения $\alpha = 15^\circ$.

роп. Полученный раствор прогоняли через коническое сопло в режиме развития кавитации на расширяющемся участке. Параметры течения регулировались давлением на входе в сопло $p = 3-11 \text{ atm}$. После прогонки через сопло пробы дрожжей инкубировали в термостате при температуре 25°C в течение 24 h. После термостатирования пробы хранили при температуре 4°C .

Степень активности микроорганизмов определялась по эталону (их естественному метаболиту), а также по увеличению биомассы. Концентрацию этанола определяли на хроматографе „Кристалл 2000“. Рост биомассы определяли микрокапиллярметрийей. Количественные микробиологические высевы проводили на поверхность плотной питательной среды с последующим подсчетом жизнеспособных клеток. Для культивирования дрожжевых грибов использовали среду Сабуро. Высевы дублировали в двух чашках Петри. После посева чашки инкубировали при 37°C в течение 2–3 суток и подсчитывали выросшие колонии.

Теоретический анализ

Модель кавитационного потока включает в себя нестационарные уравнения Навье–Стокса

$$\frac{\partial}{\partial t} (\rho_m u_i) + \frac{\partial}{\partial x_j} (\rho_m u_i u_j) = -\frac{\partial p}{\partial x_j} + \frac{\partial}{\partial x_j} \left[(\mu + \mu_t) \left(\frac{\partial u_i}{\partial x_j} + \frac{\partial u_j}{\partial x_i} \right) \right], \quad (1)$$

уравнение неразрывности

$$\frac{\partial \rho_m}{\partial t} + \frac{\partial (\rho_m u_i)}{\partial x_i} = 0, \quad (2)$$

уравнение переноса объемной доли жидкости

$$\frac{\partial \alpha_1}{\partial t} + \frac{\partial}{\partial x_i} (\alpha_1 u_i) = (m^+ - m^-), \quad (3)$$

$$\rho_m = \rho_1 \alpha_1 + \rho_v (1 - \alpha_1), \quad (4)$$

где t — время; x — координата; u — компонента скорости; p — давление; ρ — эффективная плотность; ρ_1 — плотность жидкости; ρ_v — плотность пара; μ — динамическая вязкость; μ_t — турбулентная вязкость; α_1 — объемная доля жидкой фазы; m^+ — скорость испарения; m^- — скорость конденсации пара [5]. Для расчета турбулентной вязкости была использована модель $k-\omega$ [6]

$$\mu_t = C_\mu \rho_m k / \omega, \quad (5)$$

$$\frac{\partial \rho_m k}{\partial t} + \frac{\partial \rho_m u_i k}{\partial x_i} = P \rho_m - \rho_m k + \nabla \left[\left(\mu + \frac{\mu_t}{\sigma_k} \right) \nabla k \right], \quad (6)$$

$$\frac{\partial \rho_m \omega}{\partial t} + \frac{\partial \rho_m u_i \omega}{\partial x_i} = C_{\omega_1} \frac{\rho_m P \omega}{k} - C_{\omega_2} \rho_m \omega^2 + \nabla \left[\left(\mu + \frac{\mu_t}{\sigma_\omega} \right) \nabla \omega \right], \quad (7)$$

P — источник энергии турбулентности; k — кинетическая энергия турбулентности; ω — удельная скорость диссипации энергии турбулентности; $C_\mu = 0.09$, $C_{\omega_2} = 0.833$, $C_{\omega_1} = 0.555$, $\sigma_k = \sigma_\omega = 2.0$ — константы.

Модель несмешивающихся жидкостей [7] применена для расчета, в упрощенной постановке, процесса изменения формы клетки в неоднородном поле скорости. Предполагалось, что в равновесии клетка имеет сферическую форму, мембрана клетки моделируется поверхностным натяжением внутренней жидкости. Фактически модель включает в себя уравнения Навье–Стокса и уравнения для переноса объемной доли (F) внутренней жидкости.

При полном заполнении расчетной ячейки биообъектом выполняется условие $F = 1$, при отсутствии биообъекта в расчетной ячейке $F = 0$, частичное заполнение соответствует условию $0 < F < 1$.

Уравнение переноса для F записывается в виде

$$\frac{\partial F}{\partial t} + \text{div} (\bar{V} F) = 0, \quad (8)$$

здесь вектор скорости \bar{V} . Удельные физические параметры определяются соотношением

$$\varphi = \varphi_1 F + \varphi_2 (1 - F), \quad (9)$$

φ — эффективный удельный параметр; φ_1, φ_2 — удельные параметры внутри объекта и в окружающей среде.

Интенсивные параметры определяются соотношением

$$\psi = \frac{\psi_1 \rho_1 F + \psi_2 \rho_2 (1 - F)}{\rho_1 + \rho_2}, \quad (10)$$

здесь ψ — эффективный интенсивный параметр; ψ_1, ψ_2 — интенсивные параметры жидкости внутри объекта и в окружающей среде; ρ_1, ρ_2 — плотности объекта и окружающей жидкой среды.

При определении границы раздела биообъекта и окружающей среды учитывалась упругость модельной мембраны.

Результаты и их обсуждение

Результаты расчетов кавитационного течения

На рис. 2–6 представлены мгновенные пространственные распределения параметров нестационарных потоков, отличающихся давлением на входе, $p = 3, 5$ и 7 atm . Угол расширения сопла $\alpha = 15^\circ$.

На рис. 2 показано распределение избыточного давления, т.е. давления, отсчитываемого от уровня 1 atm . Видно, что с увеличением входного давления возрастает размер области отрицательного давления. Одновременно увеличивается размер области с низкой плотностью (рис. 3), изменение которой вызвано появлением паровой фазы при развитии кавитации. С ростом давления возрастает структурная сложность распределения плотности на входе в коническое сопло.

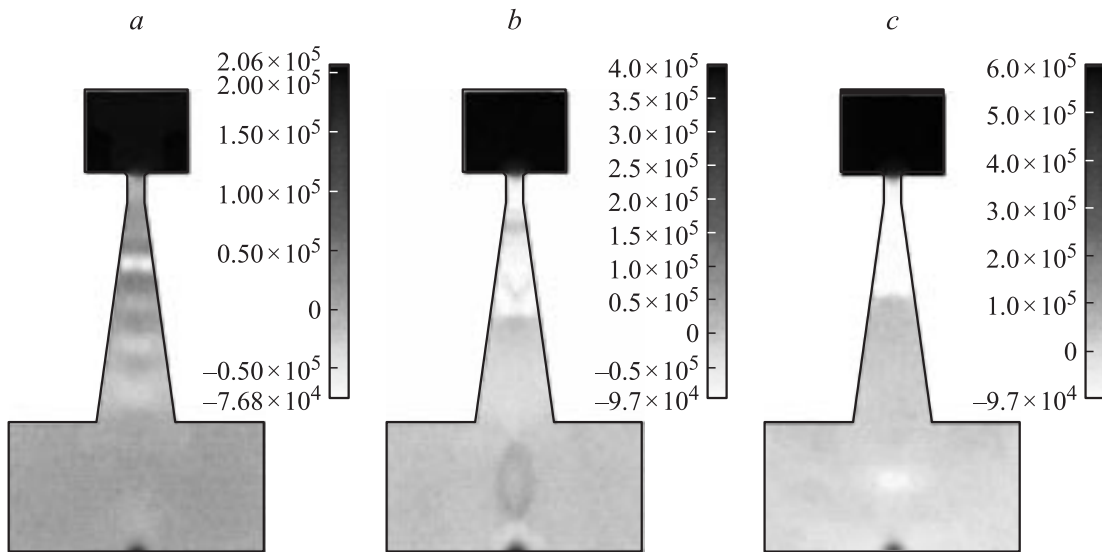


Рис. 2. Распределение избыточного статического давления, Па: $a - p = 3$; $b - 5$; $c - 7$ atm.

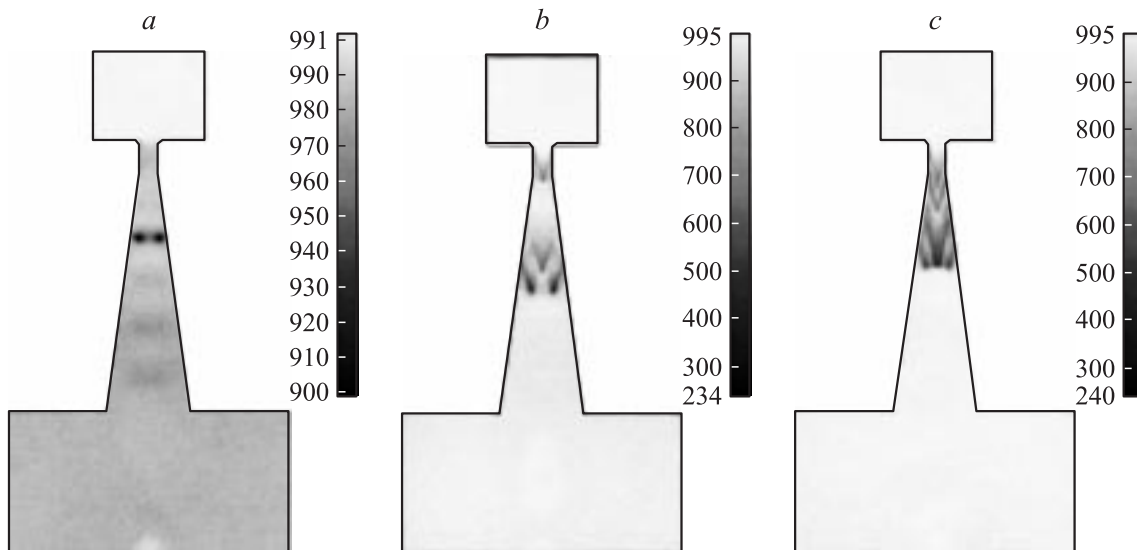


Рис. 3. Распределение плотности, kg/m^3 : $a - p = 3$; $b - 5$; $c - 7$ atm.

На рис. 4 приведено распределение вертикальной скорости. При входном давлении $p = 3$ atm струя практически не расширяется, видно образование локальных максимумов скорости, в чем-то аналогичных бочкам на выходе из сопла недорасширенной струи сжимаемого газа. При увеличении давления до $p = 5$ и 7 atm произошло удлинение начального участка струи с высокой скоростью течения, с резкой границей за зоной отрицательного давления.

На рис. 5 приведены распределения объемной доли газовой фазы, которые хорошо согласуются с распределениями давления и плотности. Абсолютная величина объемной доли газовой фазы возрастает с увеличением давления, причем отличия между значениями для $p = 3$

и 5 atm более сильны, чем между значениями для $p = 5$ и 7 atm.

На рис. 6 приведено распределение скорости деформации жидкости, ограниченной при визуализации по уровню 10^5 1/s. При входном давлении $p = 3$ atm хорошо выражена периодичность этого параметра вдоль струи. При давлении $p = 7$ atm ярко проявляется скачкообразное изменение скорости деформации при выходе из области низкого давления. Максимальные значения скорости деформации для давлений $3, 5$ и 7 atm соответственно равны $5.2 \cdot 10^6, 7.5 \cdot 10^6$ и $9.2 \cdot 10^6$ 1/s, они отслеживают изменение абсолютной скорости струи и сосредоточены около стенки входного участка сопла.

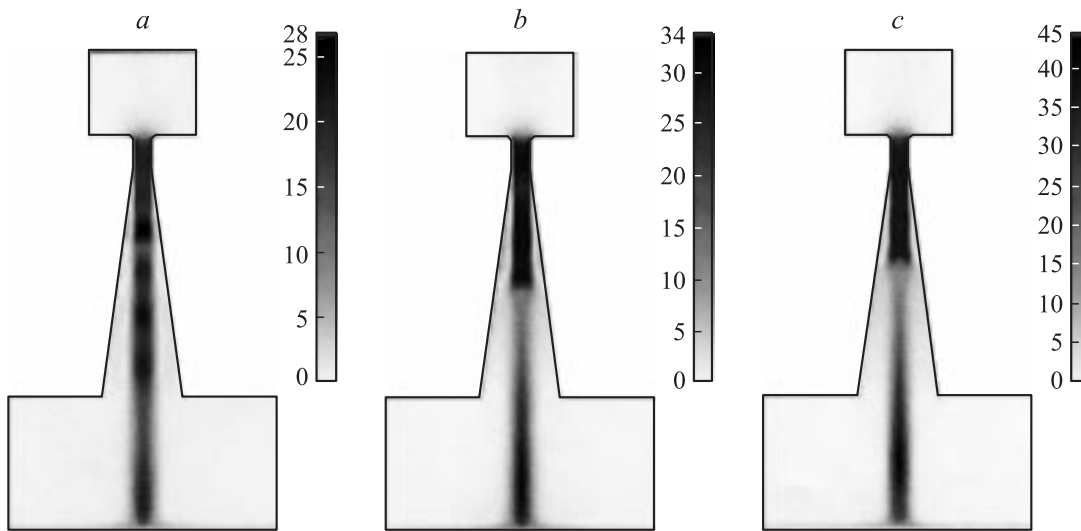


Рис. 4. Распределение вертикальной скорости, м/с: a — $p = 3$; b — 5; c — 7 atm.

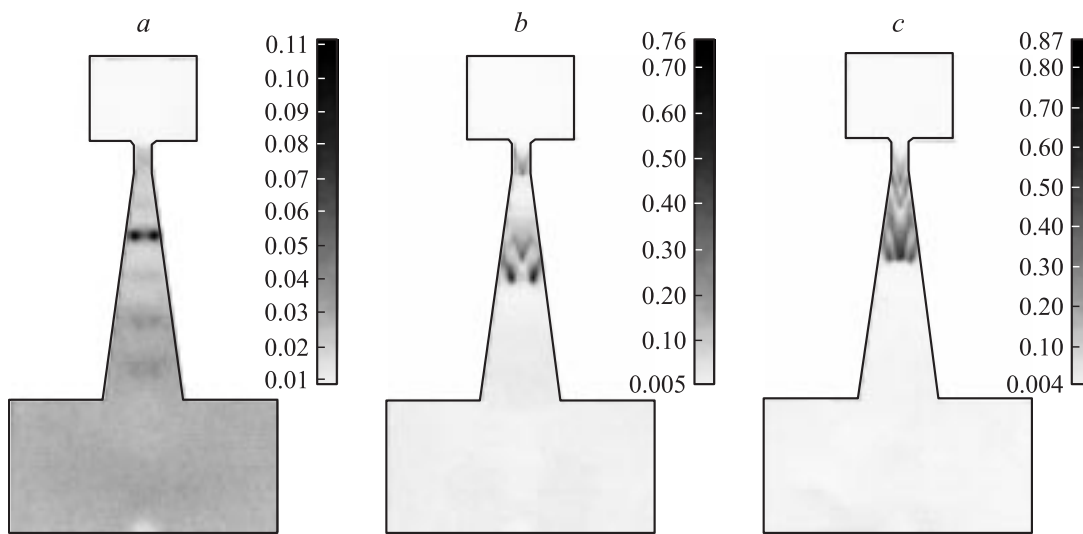


Рис. 5. Распределение объемной доли газовой фазы: a — $p = 3$; b — 5; c — 7 atm.

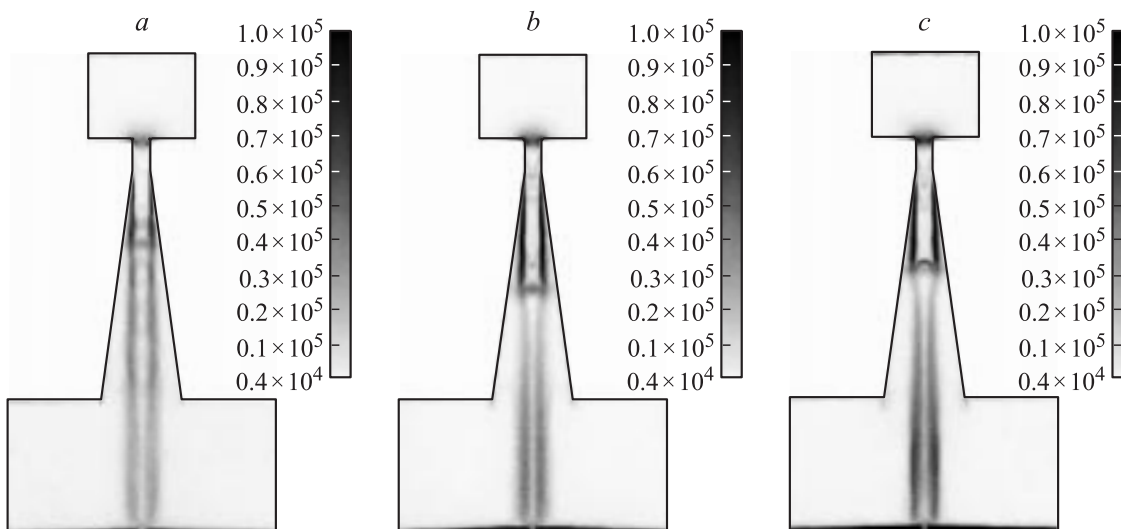


Рис. 6. Распределение скорости деформации, 1/с: a — $p = 3$, b — 5, c — 7 atm.

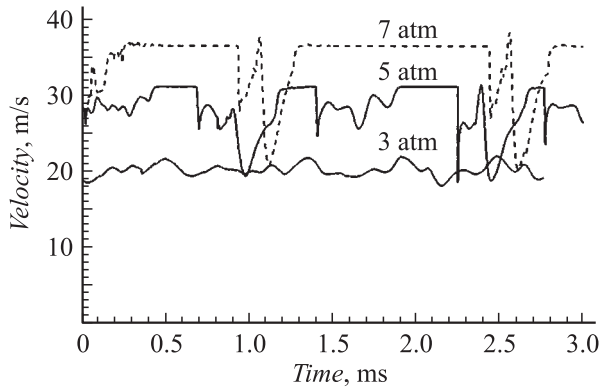


Рис. 7. Изменение во времени вертикальной скорости на оси сопла на срезе его прямолинейного участка ($\alpha = 15^\circ$).

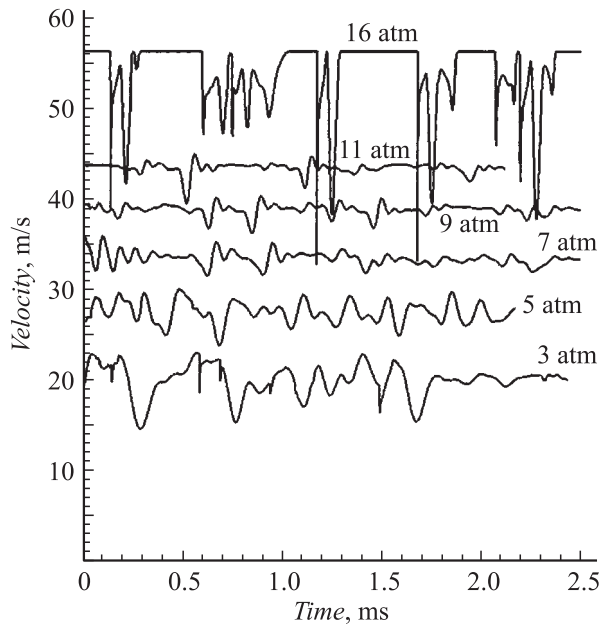


Рис. 8. То же, что на рис. 7, для $\alpha = 60^\circ$.

На рис. 7 показано изменение во времени вертикальной скорости на оси сопла на срезе прямолинейного участка. При давлении 3 atm изменение существенно нестационарно, при давлении 5 atm появились пологие участки с постоянной скоростью, продолжительность которых возросла при переходе к давлению 7 atm.

Таким образом, при увеличении входного давления возрастает скорость струи, скорость деформации, пространственный масштаб области кавитационного разрежения, но во временном поведении параметров появляются признаки относительно продолжительного истечения струи с квазистационарными параметрами. В целом это может неоднозначно повлиять на процесс кавитационной активации клеток, в зависимости от того, что важнее — абсолютное разрежение и скорость деформации или пульсации параметров среды.

Для сопла с углом $\alpha = 60^\circ$ также наблюдается уменьшение интенсивности пульсаций параметров потока с увеличением входного давления, но признаки периодического истечения струи с квазистационарными параметрами проявляются при значительно большем давлении, около 16 atm (рис. 8).

Результаты расчетов деформации модельной клетки

Структура клеток сложна и по механическим свойствам в большинстве случаев изучена неполно, поэтому расчеты по упрощенной модели имеют оценочный характер. За базовые были приняты параметры эритроцита — достаточно детально исследованного микробиообъекта. По данным [8], вязкость жидкости внутри эритроцита равна $0.001\text{--}0.006 \text{ Pa}\cdot\text{s}$, модуль поверхностной упругости мембраны лежит в пределах от 10^{-4} до $7 \cdot 10^{-6} \text{ N/m}$. Эритроцит — это легко деформируемый объект, свободно проникающий через капилляры, меньшие его по диаметру в несколько раз, поэтому расчеты с выбранными параметрами дают максимальную оценку уровня деформации клетки.

Расчеты выполнены при скорости деформации водной среды 10^5 1/s , из рис. 6 видно, что скорость деформации жидкости в значительном объеме сопла меньше выбранной величины, следовательно, в среднем уровень деформации клеток в реальных условиях будет меньше расчетного.

На рис. 9 показана эволюция формы микросферы с начальным диаметром $5 \mu\text{m}$ при поверхностном натяжении 10^{-4} N/m . Видно, что за время $5 \cdot 10^{-4} \text{ s}$ (порядок пролетного времени в сопле) разрыва объекта не произошло. Исследуемые в наших экспериментах клетки имеют меньшие размеры и, вероятно, большую упругость мембраны, что оказывает стабилизирующее влияние на их форму, следовательно, можно предположить, что кавитация оказывает на исследуемые клетки неразрушающее воздействие.

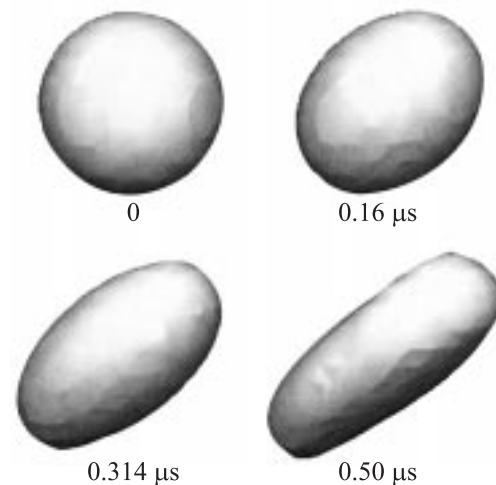


Рис. 9. Эволюция микросферы диаметром $5 \mu\text{m}$ при скорости деформации воды $15\,000 \text{ 1/s}$.

Результаты экспериментов

Содержание этанола в среде дрожжевой культуры после воздействия кавитации представлено в табл. 1, результаты роста биомассы — в табл. 2.

Из данных табл. 1 видно, что процесс повышения концентрации этанола имеет двухфазный характер. Наибольшая концентрация этанола отмечается при давлении 4 и 7–8 atm при угле сопла 60°. При работе с соплом 15° достоверных отличий от контроля не отмечается.

Из табл. 2 видно, что воздействие кавитации при давлении 7 atm приводит к увеличению роста колоний на 613%, при 8 atm — на 1000%. При возрастании давления до 10 и 11 atm рост колоний увеличивается на 100–200%. При давлении 6 atm выявлено достоверное снижение колониеобразующей активности микроорганизмов. В принципе, этот результат коррелирует с ранее полученными данными о снижении интенсивности пульсационного воздействия при высоком входном давлении.

Таблица 1. Содержание этанола в культуральной среде после воздействия кавитации

| Угол расширения сопла | Давление перед соплом, atm | Содержание этанола по отношению к контролю, % |
|-----------------------|----------------------------|---|
| 60° | 3 | 102.6 ± 8.6 |
| | 4 | 175.3 ± 5.4* |
| | 5 | 89.9 ± 4.2 |
| | 6 | 88.3 ± 3.3 |
| | 7 | 129.4 ± 4.1* |
| | 8 | 133.4 ± 9.4* |
| | 9.5 | 84.8 ± 5.1 |
| | 10 | 95.5 ± 9.1 |
| 15° | 11 | 113.8 ± 11.7 |
| | 4.5 | 102.7 ± 12.2 |
| | 5.5 | 122.6 ± 15.2 |
| | 7 | 103.3 ± 0.9 |

* Различия достоверны в сравнении с группой контроля.

Таблица 2. Количество выросших колоний на среде Сабуро после воздействия кавитации

| Угол расширения сопла | Давление перед соплом, atm | Количество колоний по отношению к контролю, % |
|-----------------------|----------------------------|---|
| 60° | 4 | 109.4 ± 5.2 |
| | 6 | 70.8 ± 2.4* |
| | 7 | 613.0 ± 13.0* |
| | 8 | 1490.0 ± 245.7* |
| | 10 | 228.2 ± 24.2 |
| | 11 | 337.0 ± 87.3 |
| 15° | 5 | 83.5 ± 2.5 |
| | 7 | 91.5 ± 2.5 |
| | 4 | 129.2 ± 12.0 |

* Различия достоверны в сравнении с группой контроля.

Таблица 3. Прирост биомассы дрожжевой культуры и лактобактерий, обработанных методом кавитации

| Угол расширения сопла | Давление перед соплом, atm | Исходное значение по отношению к контролю, % | Значение через 1 h по отношению к контролю, % | Значение через 1 сутки по отношению к контролю, % | |
|-----------------------|----------------------------|--|---|---|--------------|
| 60° | 3.3 | 100.3 + 10.4 | 100.2 + 8.6 | 97.5 + 9.2 | |
| | 4 | 180.4 + 18.7 | 166.7 + 20.1 | 114.4 + 8.4 | |
| | 5 | 60.7 + 5.2 | 55.5 + 6.3 | 57.9 + 4.8 | |
| | 6 | 140.0 + 17.1 | 66.7 + 8.2 | 114.3 + 10.1 | |
| | 7 | 83.7 + 26.7 | 68.1 + 6.7 | 71.2 + 4.4 | |
| | 8 | 69.5 + 9.3 | 81.0 + 10.8 | 79.5 + 10.5 | |
| | 10 | 91.7 + 8.4 | 94.5 + 8.5 | 87.2 + 5.2 | |
| | 15° | 4.5 | 92.9 + 6.2 | 88.9 + 10.5 | 95.0 + 8.9 |
| | | 6 | 133.6 + 26.5 | 103.6 + 18.5 | 133.8 + 23.8 |
| | | 7 | 155.7 + 14.6 | 128.7 + 8.1 | 79.5 + 9.5 |

Кавитационное воздействие на дрожжевую культуру в ответ на повреждение приводит также к выделению клетками биологически активных веществ. О наличии таких веществ можно судить по миграционной подвижности лейкоцитов в капилляре (общепринятый в медицине и биологии способ определения наличия биологически активных веществ). В зависимости от концентрации миграционного фактора они обладают либо хемокинетическим (торможение), либо хемотаксическим действием (усиление отталкивания).

Из табл. 3 следует, что в диапазоне 4–5 atm отмечается наибольшее снижение биомассы клеточной культуры, которое сопровождалось максимальным выходом цитокинов в культурную среду. При увеличении давления ускоряется миграционная подвижность лейкоцитов, что свидетельствует о выходе белков теплового шока и увеличении гидрофобизации клеток.

Один из выводов экспериментальной работы — это неоднозначная, но повторяющаяся в экспериментах немонотонность связи кавитационной интенсивности течения и активности выхода целевого продукта — белков теплового шока и цитокинов и наличие, по крайней мере, двух максимумов активности при кавитационном воздействии на клеточные культуры. Авторы предполагают, что одной из возможных причин такой реакции клеточной культуры на интенсивное механическое воздействие является наличие метаболических колебаний, отмеченных многими исследователями при изучении клеточных культур ([9,10]).

Заключение

1. Установлено, что при увеличении входного давления появляются признаки относительно продолжительного истечения струи с квазистационарными параметрами. Это может отрицательно повлиять на процесс кавитационной активации клеток. В сопле с большим уг-

лом расширения этот эффект проявляется при большем давлении.

2. Наличие корреляции между нестационарным механическим воздействием и возможным резонансным ответом клеток требует более тщательного изучения как механической природы воздействия с использованием фурье-анализа экспериментальных параметров, так и привлечения литературных данных по метаболическим осцилляциям клеток. Такое исследование представляется перспективным продолжением данной работы.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 04-01-00661.

Список литературы

- [1] Баранов Г.А., Беляев А.А., Оникиенко С.Б., Смирнов С.А., Хухарев В.В. // Письма в ЖТФ. 2004. Т. 30. Вып. 24. С. 20–25.
- [2] Баранов Г.А., Беляев А.А., Оникиенко С.Б., Смирнов С.А., Хухарев В.В. // Письма в ЖТФ. 2002. Т. 8. Вып. 17. С. 25–30.
- [3] Баранов Г.А., Беляев А.А., Оникиенко С.Б., Смирнов С.А., Хухарев В.В. // Письма в ЖТФ. 2003. Т. 29. Вып. 13. С. 57–63.
- [4] Баранов Г.А., Беляев А.А., Оникиенко С.Б., Смирнов С.А., Хухарев В.В. // Квантовая электроника. 2005. № 9. С. 867–872.
- [5] Senocak I., Shyy W. // 31st AIAA Fluid Dynamics Conf. & Exhibit. 11–14 Jule, 2001. Anaheim, CA. AIAA 2001–2907.
- [6] Wilcox D.C. Turbulence modeling for CED. 2nd ed. DCW Industries, California, 1998.
- [7] Hirt C.W. and Nicjols B.D. // J. Comp. Phys. 1981. Vol. 39. P. 201–225.
- [8] Левтов Б.А., Регирер С.А., Шадрин Н.Х. Реология крови. М.: Медицина, 1982. 272 с.
- [9] Palhano F.L., Orlando M.T., Fernandes P.M. // FEMS Microbiol. Lett. 2004. Vol. 233. P. 139–145.
- [10] Jules M., Francois J., Parrou J.L. // FEBS J. 2005. Vol. 272. P. 1490–1500.