

Simulation der Strömung und der Scherbelastung von Zellen in einer Trägerlösung zur Optimierung eines Zell-Pipettors

Christoph Drobek, Hermann Seitz

Universität Rostock, Lehrstuhl für Fluidtechnik und Mikrofluidtechnik

Einführung

Für bioanalytische Untersuchungen sollen Zellen über einen Zeitraum von mehreren Stunden in Kochsalzlösung vital gehalten werden. Die Dichte der Zellen ist jedoch ca. 20% höher als die Dichte der Kochsalzlösung, sodass die schwereren Zellen bei unzureichender Vermischung zum Boden absinken. Dort verkleben sie miteinander, die Zellmembranen reißen auf und die Zellen sterben ab.

Zur Vitalhaltung steht ein Zell-Pipettor zur Verfügung, der aus einem Töpfchen aus PTFE und einer Standardpipette (Abbildung 1 oben) besteht und zur Durchmischung von 1 ml Zellsuspension ausgelegt ist. Eine Verdrängerpumpe saugt die Zellsuspension durch die Pipette aus dem Töpfchen und pumpt sie über die Pipette wieder dahin zurück. Dadurch sollen die Zellen homogen in der Trägerlösung verteilt werden. Da weniger als 0,1 ml Zellsuspension benötigt werden, können Kosten für die Zellsuspension gespart werden, indem das Volumen des Zell-Pipettors von 1ml auf 0,1 ml verringert wird. Dabei soll jedoch die Qualität der Durchmischung erhalten bleiben und die Belastung der Zellen durch hohe Scherraten nicht erhöht werden.

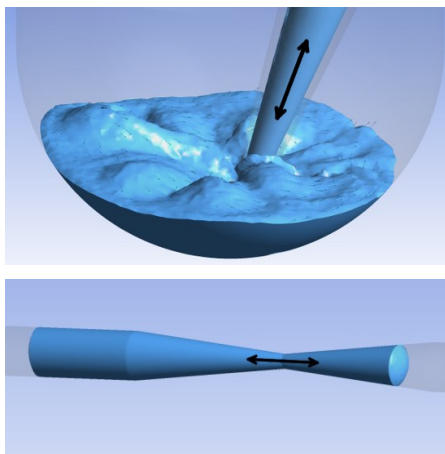


Abb. 1: Vorhandener Zell-Pipettor (oben) und Doppelpipette (unten)

Der vorhandene Zell-Pipettor soll dabei mit einem 10-fach volumetrisch herunterskalierten Modell und einem neuen Design einer Doppelpipette (Abbildung 1 unten) aus PTFE verglichen werden. Dabei soll unter anderem herausgefunden werden, ob es ausreicht, die vorhandene Geometrie lediglich herunterskalieren oder ob es nötig ist, auf das neue Design der Doppelpipette zu wechseln. Die Einstellung der Verdrängerpumpe und damit der Volumenstrom durch die Pipette soll nicht verändert werden.

In der Doppelpipette bewegt sich ein Tropfen aus Kochsalzlösung und Zellen durch eine Engstelle hin- und zurück und wird so durchmischert. Der Tropfen wird durch die Oberflächenspannung zusammengehalten. Form und Abmessungen der Doppelpipette entsprechen dabei denen der Pipette des existierenden Zell-Pipettors.

Aufbau des Simulationsmodells

Die Untersuchungen werden mit Hilfe der numerischen Strömungssimulation (CFD, Computational Fluid Dynamics) durchgeführt. Dafür wird der Solver FLUENT aus dem Softwarepaket von Ansys genutzt. Bei CFD werden die Erhaltungsgleichungen für Masse, Impuls und ggf. auch Energie, die Navier-Stokes-Gleichungen, für jede Gitterzelle eines Rechengitters numerisch gelöst. Dadurch können dann Informationen über die Druck- und Geschwindigkeitsverteilung in einer Flüssigkeit oder in einem Gas gewonnen werden [1].

Der vorhandene Zell-Pipettor, der 10-fach herunterskalierte Zell-Pipettor und die Doppelpipette sollen hinsichtlich der Durchmischung und der maximal in der Geometrie auftretenden Scherrate untersucht werden. Die Scherrate γ ist die Änderung der Strömungsgeschwindigkeit u quer zur Strömung (Geichung 1).

$$\gamma = \frac{du}{dy} \quad (1)$$

Auf beiden Seiten einer Zelle wirken bei hohen Scherraten deshalb sehr unterschiedliche Strömungsgeschwindigkeiten und damit starke Belastungen, die die Vitalität der Zellen negativ beeinflussen. Da die Geschwindigkeit an allen Wänden des Zell-Pipettors immer null ist, führen hohe Strömungsgeschwindigkeiten direkt zu hohen Scherbelastungen. Die Güte der Durchmischung kann über die Verteilung der Zellen im Zell-Pipettor bestimmt werden. Eine unzureichende Durchmischung kann dabei durch eine Erhöhung der Konzentration der Zellen am Boden bei gleichzeitigem Absinken der Konzentration im oberen Bereich des Zell-Pipettors ausgemacht werden. Während hohe Strömungsgeschwindigkeiten und damit Scherraten zur Zerstörung der Zellen führen können, führen zu geringe Strömungsgeschwindigkeiten zu einer unzureichenden Durchmischung und damit auch wieder dem Absterben von Zellen. Es liegt somit ein Zielkonflikt zwischen Scherbelastung und Durchmischung und damit ein Optimierungsproblem vor.

Um die Scherbelastung und die Qualität der Durchmischung für die drei Zell-Pipettor-Varianten zu bestimmen, muss neben der Kochsalzlösung und den Zellen die jeweils im Zell-Pipettor vorhandene Luft mitsimuliert werden. Dies gilt sowohl für die Luft, die den Tropfen Kochsalzlösung in der Doppelpipette von beiden Seiten umschließt, als auch für die Luft, die beim vorhandenen Zell-Pipettor über der Kochsalzlösung im Töpfchen steht. Die daraus entstehende Grenzfläche Kochsalzlösung-Luft muss mit einem entsprechenden Mehrphasenmodell beschrieben werden. Dafür wird in dieser Untersuchung das Volume-of-Fluid-Modell (VOF-Modell) verwendet [2].

Die Zellen, die sich in der Kochsalzlösung bewegen, sollen als feste Partikel mit dem Ansys Discrete Phase Model (DPM) über das Kräftegleichgewicht (Gleichung 2) in die Strömung eingekoppelt werden [3], damit

Aussagen über ihre Verteilung gemacht werden können.

$$m_p \frac{d\vec{u}_p}{dt} = \sum \vec{F}_i \quad (2)$$

Bei dieser sogenannten Euler-Lagrange-Methode wirken dem Partikel mit der Masse m_p und der Beschleunigung $\frac{d\vec{u}_p}{dt}$ so unter anderem die Widerstandskraft, die Druckkraft und Feldkräfte entgegen [4]. All diese Kräfte werden hier zusammengefasst in $\sum \vec{F}_i$.

Es werden Rechengitter mit 0,5 bis 6 Millionen Gitterzellen verwendet. Für die Turbulenzmodellierung wird das k- ω -SST-Modell verwendet. Die Stoffwerte der Kochsalzlösung (Dichte $\rho=1004 \text{ kg/m}^3$, dynamische Viskosität $\eta=0,98 \text{ mPa}\cdot\text{s}$, Oberflächenspannung $\sigma=0,0469 \text{ N/m}$, Kontaktwinkel mit Luft auf PTFE $\theta=126^\circ$) und der Zellen (Dichte $\rho=1200 \text{ kg/m}^3$) wurden bei 21°C und Umgebungsdruck experimentell ermittelt.

Ergebnisse und Diskussion

Die maximale Scherrate tritt wie erwartet an der Pipettenspitze auf, da dort der Innendurchmesser am geringsten und somit die Strömungsgeschwindigkeit und Scherrate am höchsten ist (Abbildung 2). Während sich die maximale Scherrate im herunterskalierten Modell verdreifacht, erhöht sich die maximale Scherrate in der Doppelpipette mit 10100/s nicht. Diese Ergebnisse zeigen die Eignung der Doppelpipette als Zell-Pipettor und bestätigen die Vorüberlegungen, dass ein einfaches Herunterskalieren der Geometrie bei gleichbleibendem Volumenstrom der Verdrängerpumpe nicht ausreicht. Da nämlich noch weitgehend unbekannt ist, bei welcher Scherbelastung die Zellen absterben, soll die Scherbelastung des existierenden Zell-Pipettors nicht überschritten werden.

Da für die korrekte Darstellung der Verteilung der Zellen in der Kochsalzlösung die Zellen, die Kochsalzlösung und Luft zusammenwirken, müssen VOF-Modell und DPM fehlerfrei

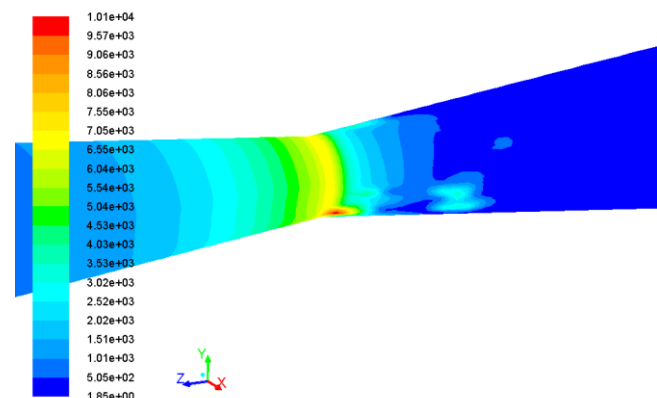


Abb. 2: Ausschnitt der Doppelpipette – Verteilung der Scherrate [1/s] an der Oberfläche der Doppelpipette

zusammenarbeiten. Momentan durchdringen die Zellen die Phasengrenze Kochsalzlösung-Luft jedoch noch.

Deshalb wird das Modell etwas vereinfacht, um zunächst das Absinken der Zellen zu beobachten. Der Tropfen wird nun nicht mehr durch die Engstelle hin- und herbewegt, um Turbulenz und Vermischung möglichst zu vermeiden und darüber hinaus das Verlassen der Kochsalzlösung durch die Zellen auf ein Minimum zu reduzieren. Stattdessen wird ein ruhender Tropfen Kochsalzlösung mit Zellen, die darin homogen verteilt sind, untersucht, um das Absinken der Zellen bzw. Sedimentation beobachten zu können.

Abbildung 3 zeigt das Absinken der Zellen in der Kochsalzlösung links von der Engstelle der Doppelpipette. Während die Konzentration der Zellen im oberen Teil absinkt, steigt sie unten zum Boden hin mit der Zeit immer weiter an, erkennbar an dem immer größer werdenden roten Bereich am Pipettenboden. Weiterhin ist gut erkennbar, dass parallel zum Absinken die Verteilung der Zellen durch leichte Verwirbelungen schnell inhomogen wird.

Obwohl diese ersten Ergebnisse vielversprechend aussehen, müssen weitere Untersuchungen am Modell durchgeführt werden. Beispielsweise müssen die Ergebnisse mit experimentellen Sedimentationstests verglichen werden. Weiterhin soll das Modell so verfeinert werden, dass das Verlassen der Kochsalzlösung durch die Zellen unterbleibt.

Zusammenfassung

Ein vorhandener Zell-Pipettor ist ausgelegt, um 1ml Zellsuspension für bioanalytische Untersuchungen aufzubewahren und die Zellen via Durchmischung vital zu halten. Da für diese Untersuchungen meist weniger als ein Zehntel dieser Menge benötigt wird, sollte ein neuer Zell-Pipettor entwickelt werden. Mit Hilfe von CFD-Simulationen wurden die Strömungsvorgänge

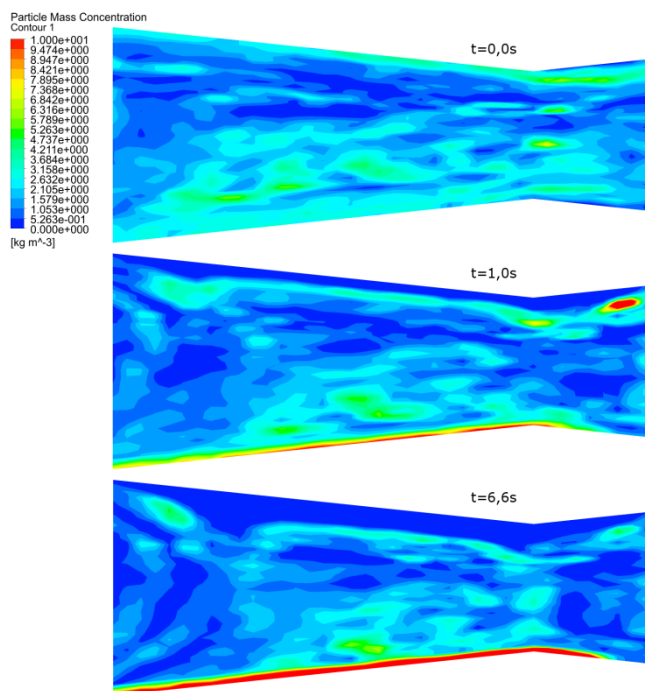


Abb. 3: Ausschnitt der Doppelpipette - das Absinken der Zellen wird verdeutlicht anhand der Partikelmassenkonzentration [kg/m³]

im vorhandenen Zell-Pipettor mit denen in zwei Designentwürfen verglichen. Während im herunterskalierten Modell deutlich höhere Scherraten auftraten, wurde in der Doppelpipette die maximale Scherrate des existierenden Pipettors nicht überschritten. Damit eignet sich das Design der Doppelpipette in Bezug auf die Scherbelastung ebenfalls als Zell-Pipettor, bringt jedoch den Vorteil eines deutlich geringeren Volumens mit, sodass Kosten für die Zellsuspension gespart werden können. Um auch die Durchmischung der Zellen im Zell-Pipettor erfolgreich untersuchen zu können, müssen die Modelle jedoch noch verbessert werden.

Literatur

- [1] Oertel jr, H.; Böhle, M.; Dohrmann, U.: *Strömungsmechanik*; Vieweg+Teubner; 5. Auflage 2009
- [2] Ansys Inc.: *Introduction to Multiphase modeling in Ansys FLUENT*; Darmstadt; Ansys Inc. 2010
- [3] Ansys Inc.: *Simulation of particle loaded flows*; Darmstadt; Ansys Inc. 2009
- [4] Sommerfeld, M.: *L3.1 Bewegung fester Partikel in Gasen und Flüssigkeiten*; VDI-Wärmeatlas; Springer Vieweg; 11. Auflage 2013

Danksagung

Das Projekt wurde im Rahmen des Förderprogramms „Innovative regionale Wachstumskerne“ vom Bundesministerium für Bildung und Forschung gefördert.