

- 1) небулайзер трахеобронхиальный «DIVO I»:
 - компрессорный блок с сетевым шнуром – 1 шт.;
 - программное обеспечение – 1 шт.;
 - небулайзерная камера – 1 шт.;
- 2) небулайзер трахеобронхиальный «DIVO II»:
 - компрессорный блок с сетевым шнуром – 1 шт.;
 - небулайзерная камера – 1 шт.

Принадлежности:

- маска взрослая – 1 шт.;
- маска детская – 1 шт.;
- насадка для носа – 1 шт.;
- загубник – 1 шт.;
- соединительная трубка – 1 шт.;
- воздушный фильтр – 4 шт.

В комплект поставки входят инструкция по эксплуатации с гарантийным талоном, сумка для хранения и транспортировки.



Рис. 2. Небулайзер трахеобронхиальный «DIVO»

Работа выполнена в рамках федеральной целевой программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу», государственный контракт № 12411.1008799.13.031 от 5 мая 2012 г. «Разработка технологии и организация производства небулайзера трахеобронхиального с дыхательной трубкой и детской маской», шифр «3.3-Небулайзер».

Список литературы:

1. *Авдеев С.Н.* Устройства доставки ингаляционных препаратов, используемые при терапии заболеваний дыхательных путей // Русский медицинский журнал. 2002. № 10 (5). С. 255-261.
2. *Белобородов В.Б.* Пневмония, связанная с искусственной вентиляцией легких: новые аспекты аэрозольной доставки антибиотиков // CONSILIUM MEDICUM. Болезни органов дыхания. 2014. № 1.
3. *Miller D.D., Amin M.M., Palmer L.B. et al.* Aerosol delivery and modern mechanical ventilation: In vitro/in vivo evaluation // Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2003. Vol. 168. PP. 1205-1209.

Николай Ефимович Курносков,

д-р. техн. наук, профессор,

гл. научный сотрудник,

НИИ ФиПИ ПГУ,

Александр Николаевич Митрошин,

д-р. мед. наук, профессор,

директор Медицинского института ПГУ,

Игорь Иосифович Артемов,

д-р. техн. наук, профессор,

проректор по научной работе

и инновационной деятельности,

Константин Валерьевич Лебединский,

канд. техн. наук, доцент,

ст. научный сотрудник,

Андрей Александрович Николотов,

научный сотрудник,

НИИ ФиПИ ПГУ,

Андрей Александрович Земцов,

научный сотрудник,

НИИ ФиПИ,

ФГБОУ ВПО ПГУ,

г. Пенза,

e-mail: ttmo-pgu@mail.ru

А.С. Пугачук, А.В. Чернышев

Исследование неравномерности рабочих процессов в установках для подготовки проб ДНК

Аннотация

Данная статья посвящена изучению рабочего процесса течения раствора, содержащего различные органические структуры, через ячейки с порошком адсорбента, используемые для выделения молекул ДНК в установках пробоподготовки. Особое внимание уделяется экспериментальному и расчетно-теоретическому исследованию неравномерности течения рабочей среды через пористые тела в ячейках. Разработана математическая модель исследуемого процесса: модель течения рабочей среды через ячейку с пористым телом под действием перепада давления.

Введение

Широкое распространение в клинической лабораторной диагностике и научных исследованиях получил метод множественного копирования нуклеотидных последовательностей – полимеразная цепная реакция (ПЦР) [1]. Данный метод успешно применяется в медицинской диагностике, судебно-медицинской экспертизе, эволюционной биологии, генетической инженерии, генотипировании и других областях деятельности, в которых требуется проводить анализ присутствия в исследуемом образ-

це определенных биологических структур. Метод ПЦР имеет высокую чувствительность и производительность, однако для его качественного применения требуется иметь высокоочищенный от примесей исходный раствор исследуемого образца. Помимо целевой молекулярной структуры, количественное содержание которой в растворе необходимо увеличить, в нем имеются белковые соединения инородного происхождения. Такие примеси являются ингибиторами ПЦР и, следовательно, крайне негативно сказываются на результатах молекулярных исследований, так как могут привести к ложноотрица-

тельными выводами. С целью удаления ингибиторов ПЦР проводится предварительный этап очистки исходных растворов – этап пробоподготовки [2]. Он имеет не менее важное значение, чем этап анализа. Для проведения подготовки исходного раствора (пробы) к последующему ПЦР-анализу возможно применять несколько различных методов. На сегодняшний день широкое распространение получил метод сорбционной экстракции, основанный на избирательной сорбции высокомолекулярных соединений, например ДНК или РНК, на поверхности диоксида кремния в присутствии высокой концентрации хаотропных агентов. Метод сорбции, в свою очередь, делится по принципу отделения сорбированных молекул от раствора с примесями на метод разделения в гравитационном (метод центрифугирования) и магнитном поле (метод магнитных частиц) и метод вакуумной сепарации. Метод вакуумной сепарации является наиболее простым в применении и экономичным, однако не получил широкого распространения по причине нестабильности качества очистки раствора при автоматизации процесса пробоподготовки [3] и необходимости использования высококачественного вакуумного оборудования.

Целью рассматриваемой работы является разработка установки вакуумной сепарации ДНК со стабильным качеством очистки. Для обеспечения заданных технических характеристик и повышения конкурентоспособности еще на этапе проектирования установки вакуумной сепарации необходимо разработать математическую модель течения рабочей среды через рабочую ячейку блока вакуумной сепарации пневмовакuumной установки пробоподготовки, провести анализ рабочих процессов, экспериментальное и расчетно-теоретическое исследование.

Анализ рабочих процессов в установках вакуумной сепарации

Основным элементом существующих установок для проведения пробоподготовки методом вакуумной сепарации является планшет сорбции, содержащий рабочие ячейки, в которых происходит процесс связывания ДНК [4]. По нашему мнению, одной из главных причин низкой эффективности пробоподготовки (нестабильности качества очистки) с применением метода вакуумной сепарации является отсутствие равномерности прохождения биорастворов через рабочие ячейки планшета сорбции. В некоторых ячейках раствор застаивается и молекулярные биоструктуры не переносятся в готовую очищенную пробу. Основными задачами исследования являются математическое моделирование рабочих процессов в установке вакуумной сепарации и анализ неравномерности их протекания.

Экспериментальное исследование

Для детального изучения процесса вакуумной сепарации разработана [5] и изготовлена с применением аддитивных технологий экспериментальная установка вакуумной сепарации (УВС) растворов ДНК (рис. 1). Экспериментальная установка содержит блок вакуумной сепарации, который предназначен для проведения очистки растворов ДНК с использованием широко распространенных сменных планшетов сорбции, имеющих 96 рабочих ячеек. На сегодняшний день в мире используется несколько единых форматов планшетов сорбции по количеству рабочих ячеек. В рассматриваемой работе в качестве исследуемого планшета сорбции выбран

96-луночный планшет фирмы «Orochem» (США). Такие планшеты позволяют проводить очистку 96 проб одновременно, с последующим забором очищенных проб в специальное приемное основание. Отделение нуклеиновых кислот происходит благодаря удерживанию их на порошке сорбента внутри каждой ячейки в связанном состоянии. При этом ингибиторы ПЦР вместе с остальным раствором удаляются в специальную колбу посредством создания перепада давлений между полостью колбы, полостью блока сепарации и атмосферой. Перепад давлений обеспечивается благодаря встроенному в УВС вакуумному насосу. Рабочий процесс связывания ДНК происходит в том случае, если в ячейках сорбции созданы специальные условия, включающие в себя содержание определенных химических компонентов, а также поддержание температурного режима и характеристик движения рабочей среды.



Рис. 1. Экспериментальная установка вакуумной сепарации растворов ДНК

Экспериментальная модель УВС успешно прошла испытания на работоспособность, что позволило использовать ее в дальнейших исследованиях. Экспериментальное исследование проводилось для отдельных ячеек, через которые прокачивалась рабочая среда. В качестве рабочей среды использовалась фильтрованная вода. Измерялся расход рабочей среды через каждую исследуемую ячейку в зависимости от перепада давлений между полостью блока сепарации и атмосферой.

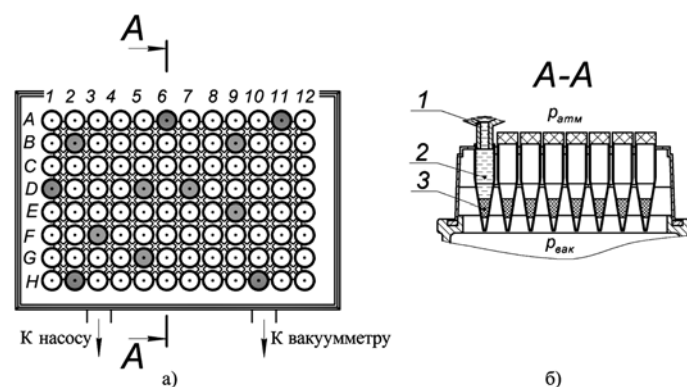


Рис. 2. Схема положения исследуемых ячеек на планшете сорбции (а) и разрез планшета по осям ячеек (б): 1 – устройство измерения расхода; 2 – раствор ДНК; 3 – пористое тело (адсорбент)

При каждой серии экспериментов исследуемые ячейки выбирались случайным образом. На рис. 2а можно видеть положение исследуемых ячеек на планшете сорб-

ции. Геометрически рабочая ячейка представляет собой усеченный конус. На *рис. 2б* показан разрез планшета по осям исследуемых ячеек.

В результате серии экспериментов получены расходные характеристики (зависимости расхода жидкости, протекающей через ячейку, от перепада давления между атмосферным давлением и давлением в блоке вакуумной сепарации) для двенадцати различных рабочих ячеек: В9, А6, Е9, D1, F3, D5, Н10, А11, В2, Н2, D7, G5. На *рис. 4а* представлены графические изображения расходных характеристик для девяти из исследуемых ячеек. Сравнение представленных характеристик позволяет сделать вывод о различии гидравлических сопротивлений ячеек планшета сорбции и оценить диапазон разброса коэффициентов вязкостного гидравлического сопротивления.

Из-за различия гидравлических сопротивлений ячеек возникает неравномерность прокачивания через них рабочей среды, что оказывает существенное негативное влияние на эффективность выделения ДНК в установках пробоподготовки и на возможность автоматизации процесса вакуумной сепарации. Разработка нового оборудования, в котором данные явления будут устранены или их воздействие сведено к минимуму, а особенно поиск новых конструктивных решений могут потребовать огромного количества времени и средств, если при проектировании будет использован только натурный эксперимент. Использование же вычислительного эксперимента значительно сократит временные и финансовые затраты на разработку. С целью получения возможности использования вычислительного эксперимента при разработке новых устройств пробоподготовки, основанных на методе вакуумной сепарации, проведено расчетно-теоретическое исследование рабочих процессов в установках вакуумной сепарации. Одной из основных задач этого исследования является создание математического аппарата, позволяющего описать рабочий процесс – течение рабочей среды в ячейках вакуумной сепарации. Первым этапом создания такого аппарата стала разработка математической модели течения рабочей среды через одну ячейку планшета сорбции. Отдельные вопросы, связанные с разработкой данной математической модели, рассмотрены в работе [6].

Математическая модель базируется на следующих допущениях:

- рабочая среда – несжимаемая жидкость;
- течение изотермическое;
- материал пористого тела изотропен;
- течение стационарное, установившееся, ламинарное.

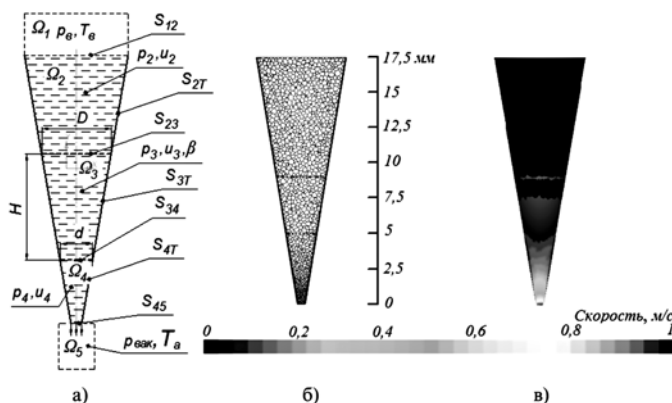


Рис. 3. Расчетная область математической модели (а), «сетка» модели (б) и распределение скоростей (в) на осевом разрезе ячейки

Расчетная область математической модели представлена на *рис. 3а*.

В расчетной области выделены области: Ω_1 – область источника рабочей среды; Ω_2 – область течения рабочей среды над пористым телом; Ω_3 – область пористого тела; Ω_4 – область течения рабочей среды под пористым телом; Ω_5 – область истечения рабочей среды – и границы: S_{12} – граница между областями Ω_1 и Ω_2 ; S_{23} – граница между областями Ω_2 и Ω_3 ; S_{34} – граница между областями Ω_3 и Ω_4 ; S_{45} – граница между областями Ω_5 и Ω_4 ; S_{2T} – граница между областью Ω_2 и окружающей средой; S_{3T} – граница между областью Ω_3 и окружающей средой; S_{4T} – граница между областью Ω_4 и окружающей средой.

Математическая модель основополагается на следующих расчетных зависимостях:

- уравнения движения рабочей среды Навье-Стокса в областях Ω_2, Ω_4 :

$$\begin{cases} \rho \frac{du_x}{dt} = -\frac{\partial p}{\partial x} + \mu \operatorname{div}(\operatorname{grad} u_x); \\ \rho \frac{du_y}{dt} = -\frac{\partial p}{\partial y} + \mu \operatorname{div}(\operatorname{grad} u_y); \\ \rho \frac{du_z}{dt} = \rho g - \frac{\partial p}{\partial z} + \mu \operatorname{div}(\operatorname{grad} u_z); \end{cases}$$

- уравнение Дарси для течения рабочей среды через пористые тела с учетом действия силы тяжести в области Ω_3 :

$$\bar{u} = -\frac{1}{\beta} (\operatorname{grad} p - \rho \bar{g});$$

- уравнение неразрывности рабочей среды:

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \operatorname{div}(\rho \bar{u}) = 0.$$

Одним из важнейших уравнений, на котором базируется разработанная математическая модель, является зависимость скорости течения рабочей среды \bar{u} через пористое тело с коэффициентом вязкостного гидравлического сопротивления β от давления p . Оно носит название закона Дарси [7].

В каждой области задаются начальные условия распределения давления p (Па), скорости \bar{u} (м/с) и температуры T (К), свойства жидкости в виде коэффициента динамической вязкости μ (Па·с), плотности ρ (кг/м³) и свойства пористого тела в виде коэффициента сопротивления β [кг/(м³·с)].

Математическая модель дополняется граничными условиями:

- на входе в расчетную область

$$p(\bar{R}) = p_e; \quad \bar{R}(r, \theta, z) \in S_{12};$$

- на выходе из расчетной области

$$p(\bar{R}) = p_{\text{вак}}; \quad \bar{R}(r, \theta, z) \in S_{45};$$

- на внутренних границах

$$\forall \vec{r} : \vec{r} \in S_{23}, \quad \vec{u}_2 = \vec{u}_3; \quad \forall \vec{r} : \vec{r} \in S_{34}, \quad \vec{u}_3 = \vec{u}_4;$$

- на внешних границах

$$u_x(\vec{r}) = u_y(\vec{r}) = u_z(\vec{r}) = 0; \quad \vec{r}(x, y, z) \in S_{2T} \cap S_{3T} \cap S_{4T}.$$

Разработанная модель описывает стационарное течение жидкости через ячейку планшета сорбции, представленную в виде конической расчетной области, под дей-

ствием перепада давления между верхним и нижним ее основаниями. Расчеты с использованием данной модели проводились на основе метода контрольных объемов, который предполагает создание так называемой сетки модели (рис. 3б) – разбиение расчетной области на множество расчетных ячеек [8]. На рис. 3в для примера показаны результаты расчета модели стационарного течения раствора при перепаде давления на ячейке 46,7 кПа (350 мм рт. ст.) и $\beta = 2,5 \cdot 10^8 \text{ кг}/(\text{м}^3 \cdot \text{с})$.

Серия расчетов при различных давлениях, заданных на границе нижнего основания расчетной области модели $p_{\text{вак}}$, и коэффициентах вязкостного гидравлического сопротивления пористого тела β позволила получить расчетные точки, которые аппроксимируются с помощью прямой. По экспериментальным данным расход рабочей среды близок к нулю в диапазоне перепадов давления 4...5 кПа. Данный факт объясняется предположительно действием капиллярных сил внутри пористого тела, препятствующих движению рабочей среды при небольших перепадах давления. Учет капиллярного эффекта в математической модели производится путем введения условного расхода Q_c (мл/с). Эта величина используется при обработке расчетных данных: полученная функция аппроксимации расчетных точек $y = Ax + B$ преобразуется в функцию $y = Ax + B - Q_c$. На рис. 4б представлены расчетные данные, полученные с помощью математической модели с учетом капиллярного эффекта, и экспериментальные данные, аппроксимированные с помощью прямых, для ячеек с наименьшим расходом (А6р, А6э), наибольшим расходом (Н10р, Н10э) и средним расходом (F3р, F3э), к которому близки значения расходов в большинстве исследованных ячеек. Коэффициент вязкостного гидравлического сопротивления β , полученный при расчете течения жидкости через ячейки со средним расходом, составил $2 \cdot 10^8 \text{ кг}/(\text{м}^3 \cdot \text{с})$, с наибольшим расходом – $1,65 \cdot 10^8 \text{ кг}/(\text{м}^3 \cdot \text{с})$, с наименьшим расходом – $4 \cdot 10^8 \text{ кг}/(\text{м}^3 \cdot \text{с})$.

Сопоставление расчетных данных, полученных с учетом капиллярного эффекта, и экспериментальных данных подтверждает адекватность разработанной математической модели. Наибольшая точность расчета с помощью математической модели достигается в моделировании течения рабочей среды в установке вакуумной сепарации в диапазоне перепадов давления между атмосферным давлением и давлением в блоке сепарации 10...30 кПа (60...225 мм рт. ст.), так как отклонение данных составляет не более 5...12 %.

Заключение

В целях повышения эффективности проведения молекулярно-биологических исследований в клинико-диагностических лабораториях разработана экспериментальная

установка вакуумной сепарации растворов ДНК. Проведен анализ рабочих процессов в УВС, получены экспериментальные характеристики расхода рабочей среды в зависимости от перепада давления между атмосферным давлением и давлением в рабочей камере установки. Разработана математическая модель процесса течения рабочей среды через рабочую ячейку блока вакуумной сепарации пневмовакuumной установки пробоподготовки. Данная модель позволяет с приемлемой точностью производить расчеты характеристик течения внутри планшета сорбции и может быть применена при разработке новых, более эффективных модификаций установок подготовки проб ДНК.

Список литературы:

1. Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю. и др. ПЦР «в реальном времени» / Под ред. Д.В. Ребрикова. – М.: БИНОМ, 2009. 223 с.
2. Преаналитический этап пробоподготовки / Коллектив авторов «West medica». 76 с.
3. Barlow K., Perry K. Buyers' guide: Automated nucleic acid extraction systems. – Centre for Evidence-based Purchasing. 2009. 60 с.
4. Пугачук А.С., Борисов Ю.А., Кузнецова Ю.С., Чернышев А.В. Разработка комплекса лабораторного оборудования выделения пробы для анализа ДНК методом ПЦР // Молодежный научно-технический вестник (электронный журнал). 2012. № 9. – М.: МГТУ им. Н.Э. Баумана.
5. Пугачук А.С., Чернышев А.В. Установка вакуумной сепарации / Патент 149159 РФ, МПК G01N 33/553. Оpubл. 20.12.2014. Бюл. № 35.
6. Пугачук А.С., Чернышев А.В. Разработка численной модели процесса вакуумной сепарации растворов ДНК // Вестник МГТУ им. Н.Э. Баумана. Серия «Машиностроение». 2012. Специальный выпуск № 4. С. 79-91.
7. Шейдеггер А.Э. Физика течения жидкостей через пористые среды / Пер. с англ. В.Н. Николаевского, под. ред. И.М. Муравьева. – М.: Гостоптехиздат, 1960. 254 с.
8. Мустафина Д.А., Скибин А.П. Конечно-элементный метод контрольного объема для решения задач подземной гидродинамики // Вестник МГТУ им. Н.Э. Баумана. Серия «Естественные науки». 2008. № 4. С. 72-88.

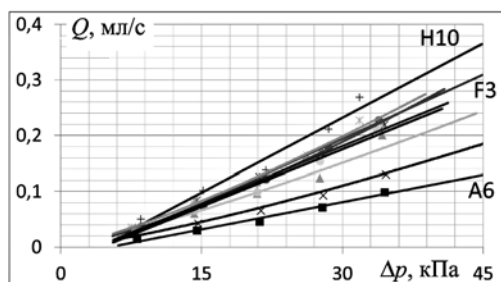
Александр Сергеевич Пугачук,
аспирант,

Андрей Владимирович Чернышев,
д-р техн. наук, профессор,

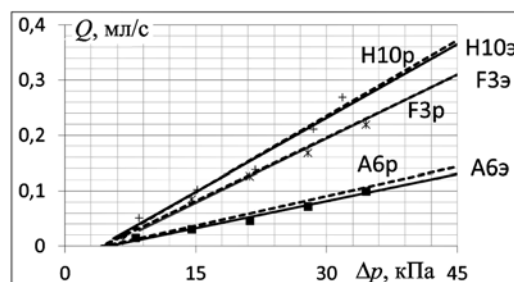
кафедра Э5 «Вакуумная и компрессорная техника»,
МГТУ им. Н.Э. Баумана,

г. Москва,

e-mail: pugachukalexandr@mail.ru



а)



б)

Рис. 4. Экспериментальные расходные характеристики различных рабочих ячеек (отмечены для ячеек Н10, F3, А6) (а) и зависимости расхода рабочей среды от перепада давления, полученные с помощью экспериментального (А6э, Н10э, F3э – сплошные линии) и расчетного (А6р, Н10р, F3р – штриховые линии) исследования с учетом капиллярного эффекта (б)