

Действие ударных волн, генерируемых импульсными электрическими разрядами в воде, на клетки дрожжей и вирусные частицы

© А.Е. Гирдюк,¹ А.Н. Горшков,² В.В. Егоров,^{2,4} В.А. Коликов,¹ В.Н. Снетов,¹ Г.А. Шнеерсон¹

¹ ФГБУН Институт электрофизики и электроэнергетики РАН,
191186 Санкт-Петербург, Россия

² Научно-исследовательский институт Гриппа Минздрава России,
197376 Санкт-Петербург, Россия

³ Санкт-Петербургский технический университет,
195251 Санкт-Петербург, Россия

⁴ Петербургский институт ядерной физики Научно-исследовательского центра „Курчатовский институт“ grqq,
188300 Гатчина, Россия
e-mail: kolikov1@yandex.ru

(Поступило в Редакцию 7 февраля 2017 г.)

Цель этого исследования — определение оптимальных параметров электрических импульсов и генерируемых ими ударных волн для „мягкого“ разрушения оболочек вирусов и дрожжей без нарушения структуры антигенных поверхностных белков и морфологии самих клеток для использования их при производстве антивирусных вакцин и в биотехнологии. Исследованы импульсные электрические разряды в воде, различающиеся амплитудой, длительностью и скоростью нарастания тока. Разработана математическая модель для оценки оптимальных параметров импульсных электрических разрядов и ударных волн для полного численного разрушения оболочек дрожжевых клеток и вирусных частиц при минимальном количестве импульсов.

DOI: 10.21883/JTF.2018.02.45423.2196

Введение

В настоящее время широкое распространение при выполнении различных исследований в медицине, биологии и экологии получили импульсные электрические разряды и импульсные электрические поля [1–5]. Достоинства разрядов обусловлены физическими, техническими и экономическими факторами. В первую очередь это связано с высокой эффективностью поражения патогенных бактерий [6,7] и спор микроскопических грибов [8], эффектом пролонгированной микробной устойчивости воды [9,10] и очистки воды от химических загрязнений [11–13].

Возможной областью применения импульсных электрических разрядов в воде может стать биотехнология, где одной из проблем является поиск альтернативных методов „мягкого“ разрушения оболочек дрожжей и вирусов. Известные способы разрушения оболочек дрожжей и вирусов в своей основе используют высокие давления или химически активные вещества, у тех и других имеются недостатки: у первых — цикличность, у вторых — загрязнение продукта химическими соединениями. К достоинствам предлагаемого метода относятся непрерывность процесса разрушения, отсутствие денатурирующих веществ и низкая энергоёмкость. Важность и актуальность данных исследований определяются в том числе появлением новых крайне опасных вирусов с ранее неизвестными свойствами и отсутствием адекватных методов борьбы с ними. Решение этой проблемы может привести к возникновению новой базовой технологии

производства антивирусных вакцин и использованию импульсных электрических разрядов в качестве одного из этапов выделения рекомбинантных белков из дрожжевых клеток.

1. Электроразрядные установки

Исследования выполнялись в два этапа на двух видах исследуемых веществ. На первом этапе исследовалось воздействие ударных волн, генерируемых импульсными электрическими разрядами в воде, на дрожжевые клетки *Saccharomyces cerevisiae*. На втором этапе исследовалось воздействие ударных волн на вирусные частицы вакцинного штамма вируса гриппа на основе пандемического вируса A/California/07/09 (H1N1pdm) и штамма A/PR/8/34 (живая аттенуированная вакцина производства Института вакцин и сывороток).

Принято считать, что для разрушения оболочек бактерий, дрожжевых клеток и вирусных частиц ширина фронта ударной волны, зависящая от скорости нарастания разрядного тока, должна быть сопоставима с размером биологического объекта, а перепад давления во фронте ударной волны должен быть не менее 2 МПа.

При проведении исследований использовались два типа импульсных электроразрядных установок. К первому типу относятся установки с зарядным напряжением 35–60 кВ, разрядным током 20–100 А, длительностью униполярного импульса тока 10–20 мкс и скоростью нарастания тока $\sim 10^8$ А/с. Межэлектродное расстояние дуэстрийной электродной системы состав-

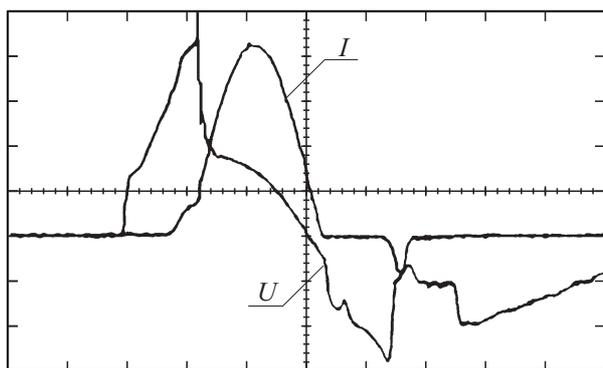


Рис. 1. Осциллограммы падения напряжения на дуге (U) и разрядного тока (I). Ток — 10 A/div , напряжение — 400 V/div , время — $10.0 \mu\text{s/div}$.

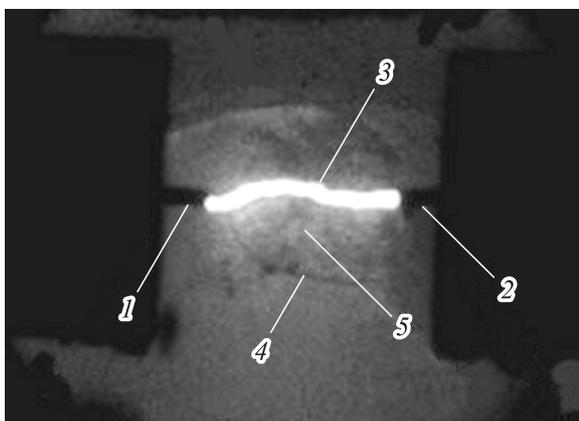


Рис. 2. Распространение ударных волн.

ляет $1.7\text{--}10.0 \text{ mm}$. Такие установки использовались в экспериментах с дрожжевыми клетками, при этом было получено 100%-ное разрушение оболочек клеток при экспозиции 150 импульсов.

На рис. 1 представлены осциллограммы разрядного тока и падения напряжения на дуге в серии экспериментов с дрожжевыми клетками.

Типичная картина ударных волн, генерируемых в результате импульсных разрядов в воде в момент времени $0.5 \mu\text{s}$ от начала процесса при величине межэлектродного промежутка 7 mm , представлена на рис. 2. Съемки выполнялись высокоскоростными цифровыми камерами K-011 и NanoGate-1. Камера K-011 позволяет регистрировать до 9 кадров с экспозицией $\geq 0.1 \mu\text{s}$ и межкадровой паузой до $0.1 \mu\text{s}$, NanoGate-1 — один кадр с экспозицией $\geq 10 \text{ ns}$, но с более высоким разрешением.

Дуга (3) горит между электродами (1 и 2), в результате чего на торцах электродов генерируются две ударные волны (4 и 5), имеющие одинаковые начальные скорости распространения. При этом к моменту времени $\sim 1 \mu\text{s}$ формируется ударная волна, распространяющаяся со скоростью, близкой к скорости звука [14].

Исследование воздействия ударных волн на вирусные частицы на установке, использованной ранее при работе с дрожжевыми клетками, показало, что в этой серии опытов вирусные частицы с разрушенной липидной оболочкой отсутствуют. В экспериментах с вирусными частицами использовались установки с более высокой скоростью нарастания тока и, как следствие, с большим градиентом давления во фронте ударных волн. Требование к повышению градиента давления, в конечном счете, обусловлено меньшими (в среднем на порядок) размерами вирусных частиц по сравнению с клетками дрожжей.

Дело в том, что при переходе от дрожжевых клеток к вирусам нами не учитывалось то, что для разрушения липидных оболочек вирусов ширина фронта ударной волны должна быть уменьшена, как минимум, на величину отношения размеров дрожжей и вирусов, т.е. в десять раз, или перепад давления во фронте ударной волны должен быть увеличен на такую же величину.

Для решения этой задачи была разработана электроразрядная установка со скоростью нарастания тока $3 \cdot 10^{10} \text{ A/s}$. Разрядный контур установки, образованный разрядником, высоковольтными конденсаторами и обратными токовыми, выполнен по коаксиальной схеме с целью уменьшения его индуктивности и повышения

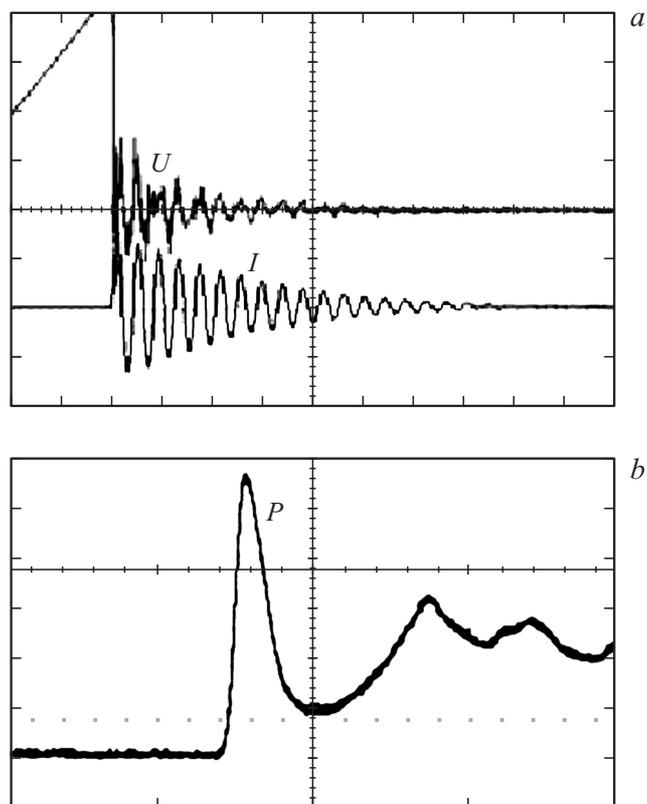


Рис. 3. Осциллограммы разрядного тока и падения напряжения на дуге (a) и импульсного давления (b), ток I — 500 A/div , напряжение U — 5 kV/div , время — 500 ns/div , давление P — 3 MPa/div , время — 500 ns/div , задержка $7 \mu\text{s}$.

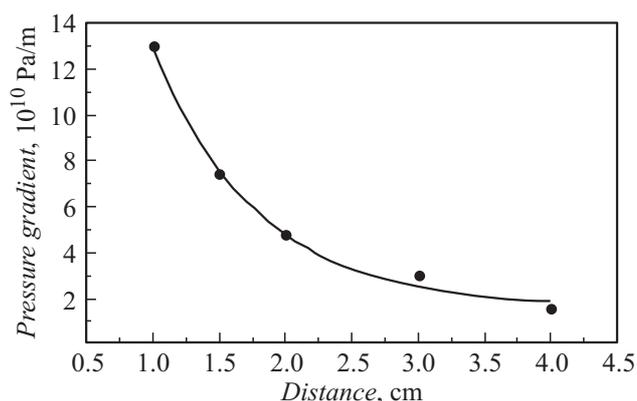


Рис. 4. Градиент давления во фронте ударной волны от расстояния до дуги.

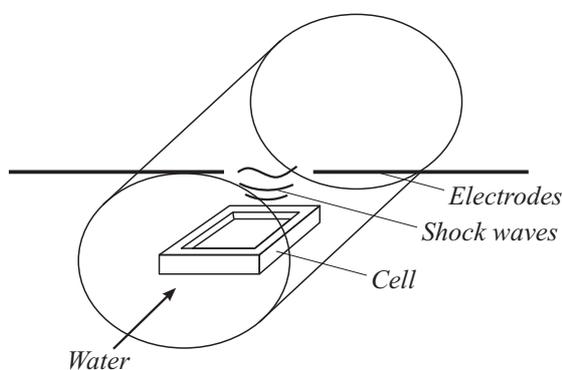


Рис. 5. Ячейка в разрядной камере.

скорости нарастания тока. В разрядной камере помещалось исследуемое вещество.

Использование новой установки позволило усилить воздействие ударных волн на вирусные частицы как за счет повышения скорости нарастания тока, так и за счет того, что ударные волны воздействовали на вирусы непосредственно в водной суспензии. При этом диаметр разрядной камеры был уменьшен с 10 до 3 мм.

На рис. 3 представлены осциллограммы разрядного тока и падения напряжения на дуге (а) и импульсного давления во фронте ударной волны (b). Давление регистрировалось пьезоэлектрическим датчиком PVDF M60-3 Muller Instruments с временным разрешением ≤ 10 ns, расположенным на расстоянии от 1 до 4 см от дуги.

Время нарастания давления во фронте ударной волны в зависимости от расстояния до дуги составляет от 60 до 80 ns. Градиент давления во фронте ударной волны от времени ее перемещения при скорости нарастания тока $3 \cdot 10^{10}$ A/s, построенный по усредненным величинам давления во фронте ударной волны, представлен на рис. 4.

Недостатком выполненных измерений давления на фронте ударной волны является вынужденная удаленность датчика давления от места возникновения удар-

ной волны, продиктованная необходимостью защитить датчик от воздействия интенсивных электромагнитных полей рассеяния при разряде.

2. Исследуемое вещество

2.1. Дрожжевые клетки

Исследуемое вещество объемом $\sim 200 \mu\text{l}$ содержит 1% дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, 2% пептона, 2% сахарозы и 95% дистиллированной воды. После инкубирования в течение 12 h при температуре 42°C препарат помещался в ячейку из поликарбоната. Ячейки после заполнения исследуемым веществом заклеивались полимерной пленкой для предотвращения побочного воздействия иных, помимо ударных волн, разрушающих факторов и вытекания препарата.

Ячейка с исследуемым веществом размещалась на дне разрядной камеры параллельно оси дуги и на расстоянии 3 mm от нее (рис. 5).

Число импульсов варьировалось от 25 до 150. Повреждение оболочек дрожжевых клеток выявлялось добавлением в обработанное исследуемое вещество красителя „метиленовый синий“. Целостность оболочек дрожжей определялась по цвету: неповрежденные клетки — светлые, поврежденные клетки — темные. Число целых и поврежденных клеток определялось прямым подсчетом с помощью оптического микроскопа Микромед Р1 с цифровой камерой Tourcam TP6 14000A.

2.2. Вирусные частицы

Для регистрации морфологии вирусных частиц после обработки их ударными волнами использовались просвечивающая электронная микроскопия и цифровая камера.

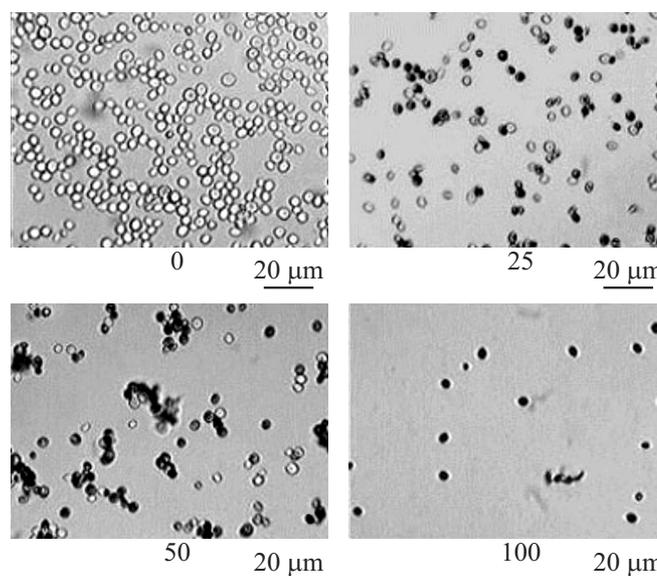


Рис. 6. Дрожжевые клетки до и после воздействия ударных волн.

Суспензия наносилась на медные сетки для электронной микроскопии, покрытые коллоидной подложкой. После адсорбции вирусов к подложке в течение 1 min сетки были дважды промыты дистиллированной водой. Далее в течение 1 min выполнялось негативное контрастирование образцов на сетках 2%-ным раствором натриевой соли фосфорновольфрамовой кислоты. После контрастирования сетки высушивались и исследовались просвечивающим электронным микроскопом JEOL JEM 1011. Электронные микрофотографии сделаны цифровой камерой Morada (Olympus Inc.).

3. Экспериментальные результаты

3.1. Дрожжевые клетки

Фотографии исходных дрожжевых клеток (0) и обработанных ударными волнами при числе импульсов от 25 до 150 представлены на рис. 6.

По результатам подсчета числа поврежденных и целых дрожжевых клеток построен график на рис. 7.

График показывает, что оболочки всех дрожжевых клеток разрушаются при числе импульсов ≤ 150 .

3.2. Вирусные частицы

Исследовался вакцинный штамм вируса гриппа на основе пандемического вируса A/California/07/09 (H1N1pdm) и штамма A/PR/8/34 (живая аттенуированная вакцина производства ИВС). Морфологию вирионов исследовали в исходной суспензии (a) и после обработки ударными волнами (b) (рис. 8).

Изучение морфологии вирусных частиц показывает, что в результате прямого воздействия на них как самих разрядов, так и генерируемых им ударных волн при экспозиции 20 и 95 импульсов (данные не показаны) заметных морфологических изменений по сравнению с контрольным образцом (рис. 8, a) не происходит.

При экспозиции 200 импульсов наблюдались как интактные вирионы (1), так и агрегаты поверхностных белков (2) разрушенных оболочек вирусов (рис. 8, b).

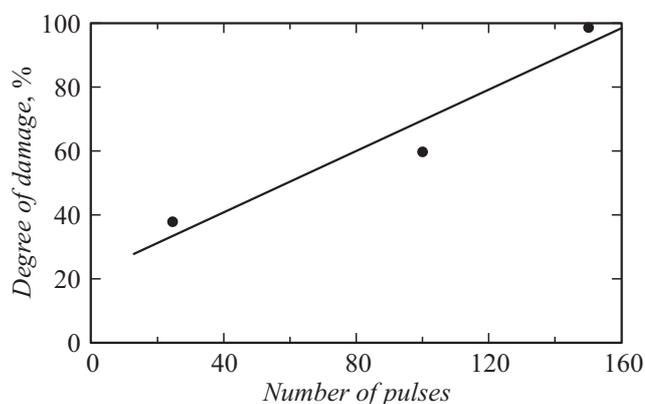


Рис. 7. Процент поврежденных дрожжевых клеток от числа импульсов.

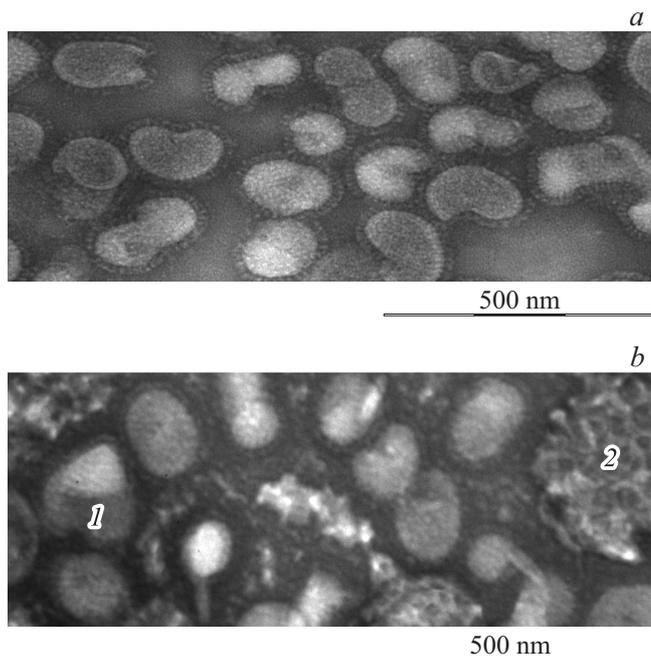


Рис. 8. Интактные вирусные частицы (a), вирусные частицы после воздействия 200 импульсов (b). Интактные вирионы (1), белки разрушенных вирусных оболочек (2).

Следует признать, что на данном этапе удалось осуществить частичное разрушение мембранных структур вирусов при помощи ударных волн. Это дает основание предполагать, что при увеличении градиента давления во фронте ударной волны эффективность разрушения оболочек вирусов возрастет. Вместе с тем данный метод даже при существующих параметрах экспериментальных установок применим для разрушения оболочек вирусов большего размера и вытянутой формы (таких, как филовирусы), или для решения биотехнологических задач, связанных с получением рекомбинантных белков и включающих этап вскрытия дрожжевых клеток.

4. Модель разрушения оболочки вируса

На основании экспериментальных полученных параметров ударной волны и данных работы [15] была разработана математическая модель разрушения оболочек вирусов.

Рис. 9 показывает графический результат расчета с использованием программы „Comsol Multiphysics“ деформации липидной оболочки вируса от воздействия на нее ударной волны.

Исходные данные для расчета:

- Диаметр сферической оболочки вируса — 100 nm.
- Толщина стенки оболочки — 3 nm.
- Модуль упругости материала оболочки — 65 МПа.

Предполагалось, что давление P в воде при начальном значении P_0 изменяется по оси z по зако-

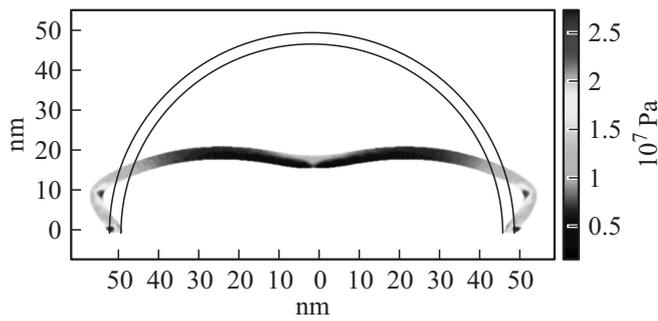


Рис. 9. Деформация липидной оболочки вируса от воздействия ударной волны.

ну $P = P_0 - (\partial P / \partial z)z$. Для прогиба оболочки вируса на 30 nm градиент давления $\partial P / \partial z$ должен составлять $\sim 3 \cdot 10^{13}$ Pa/m, что соответствует механическому напряжению в стенке оболочки вируса $\sim 3 \cdot 10^7$ Pa, достаточному для разрушения оболочки [15].

Градиент давления во фронте ударной волны можно оценить по формуле

$$\frac{\partial P}{\partial z} \approx \frac{P_m(r)}{ct_m}, \tag{1}$$

где c — скорость распространения ударной волны, t_m — время нарастания давления на фронте ударной волны, P_m — амплитуда давления.

Для оценки зависимости градиента давления от скорости нарастания тока использована модель, описывающая расширение сферической полости в воде. Эта модель не описывает стадию пробоя, когда ток еще мал, и в нашем случае используется для описания более поздней стадии разряда. В модели r_0 обозначает начальный радиус сферы, а σ — проводимость плазмы в полости, которую считаем одинаковой по объему и не изменяющейся во времени.

Расширение сферической полости радиусом R можно приближенно описать уравнением Рейля [16]

$$\frac{3}{2} \left(\frac{dR}{dt} \right)^2 + R \frac{d^2R}{dt^2} = \frac{1}{\rho_0} (P_k - P_0), \tag{2}$$

где ρ_0 — плотность невозмущенной воды, P_k — давление в сферической полости, P_0 — внешнее давление.

На расстоянии $r \gg R$ скорость ударной волны мало отличается от скорости звука в невозмущенной жидкости c_0 . Давление во фронте сферических ударных волн убывает по закону $1/r$ [17], что близко к экспериментальной кривой.

В оценочных расчетах используется приближенное выражение для давления во фронте ударной волны на расстоянии r от точки ее возникновения [17]

$$P(r) \approx \frac{R(t)}{r} \left[P_k \left(t - \frac{r}{c_0} \right) + \frac{P_0}{2} \left(\frac{dR}{dt} \right)^2 \left(1 - \frac{R^2}{r^2} \right) \right]. \tag{3}$$

В использованном приближенном выражении для давления во фронте слабой ударной волны второй член

можно не учитывать. В этом приближении давление во фронте ударной волны на расстоянии r отличается множителем r/R от давления в полости в момент $t - r/c_0$.

Расчет давления в полости требует совместного решения уравнения (2) и уравнения баланса энергии. Мощность разряда в полости при протекании тока i можно оценить по формуле

$$\frac{dW}{dt} = R' i^2, \tag{4}$$

где W — энергия, $R' \approx 2/(\pi R \sigma)$ — приближенное значение сопротивления плазмы в цилиндрической полости диаметром и длиной $2R$, аппроксимирующей сферу диаметром $2R$.

При таком допущении уравнение баланса энергии без учета потерь на излучение имеет вид

$$\frac{3i}{2\pi R \sigma} = \frac{1}{\eta - 1} \frac{d}{dt} (\pi R^3 P_k) + P_k \frac{d}{dt} (\pi R^3). \tag{5}$$

Целесообразно привести уравнения (2) и (5) к безразмерному виду

$$y_1 = y_0 \frac{dy_0^2}{dx^2} + \frac{3}{2} \frac{dy_0}{dx}, \tag{6}$$

$$\frac{x^2}{y_0} = \frac{1}{\eta - 1} \frac{d}{dx} (y_0^3 y_1) + y_1 \frac{dy_0^2}{dx^2}, \tag{7}$$

где $y_0 = R/r_0$; $y_1 = P_k \rho_0^{-2/5} (i')^{-4/3} r_0^{-2/5} \sigma^{2/5} \pi^{4/3}$; $x = t (i')^{2/5} (2\pi^2 \sigma \rho_0 r_0^6 / 3)^{-1/5}$.

В этих уравнениях присутствуют скорость нарастания тока i' , начальный радиус сферы r_0 и проводимость плазмы в полости σ . В этой модели расширение сферической полости описывается начиная с момента завершения пробоя $t = 0$. Радиус сферы в этот момент времени принимается равным r_0 . Расчетная зависимость давления во фронте ударной волны от времени ее перемещения качественно соответствует экспериментальным данным. В начальной фазе процесса давление растет вследствие нагрева плазмы, а затем уменьшается по мере расширения канала разряда. Максимум давления соответствует значениям переменных $y_1 \sim 0.6$ и $x \sim 2.5$. Практический интерес представляют режимы, в которых давление во фронте ударной волны много больше его начального значения, что позволяет принять начальное давление равным нулю.

На основании экспериментальных данных опытов со скоростью нарастания тока $3.6 \cdot 10^{10}$ A/s определена амплитуда давления во фронте ударной волны для $r = 1$ см. Далее по формуле (3) рассчитана амплитуда давления в канале разряда P_m , при этом время нарастания давления до максимума было определено по осциллограмме. Последующие оценки с использованием формул (6), (7) дают значения эмпирических параметров: $r_0 = 10^{-5}$ м, $\sigma = 2 \cdot 10^4$ ($\Omega \cdot \text{м}$) $^{-1}$.

Полученная в результате оценок величина градиента давления, равная $3 \cdot 10^{13}$ Па/м, соответствует механическому напряжению в стенке оболочки вируса $\sim 3 \cdot 10^7$ Па, необходимому для ее разрушения, может рассматриваться как „порог“, при превышении которого происходит полное численное разрушение оболочек вирусов.

В экспериментах величина градиента давления во фронте ударной волны в точке, отстоящей на расстоянии 1 см от места ее возникновения, составляет $1.3 \cdot 10^{11}$ Па/м (рис. 4), что меньше оценочной величины „порога“ разрушения. Тем не менее в выполненных экспериментах доля механически разрушенных оболочек вирусных частиц при воздействии 200 импульсов составила $\sim 20\%$.

Для достижения полного численного разрушения вирусных частиц при минимальном числе импульсов необходимо увеличить градиент давления во фронте ударной волны до значения, превосходящего указанный выше „порог“. Расчет с использованием упомянутых эмпирических параметров r_0 и σ показывает, что для достижения этой цели скорость нарастания тока должна превышать $2.5 \cdot 10^{11}$ А/с, что потребует модернизации электроразрядной установки.

Заключение

Показана возможность использования импульсных электрических разрядов в воде (как источника интенсивных ударных волн) для разрушения оболочек дрожжевых клеток и вирусных частиц, что может быть использовано в технологиях приготовления вакцин и рекомбинантных белков.

Впервые получено разрушение липидных оболочек вирусов гриппа под воздействием ударных волн, генерируемых импульсными электрическими разрядами в воде.

Разработана математическая модель, с помощью которой определены параметры электрического импульса и ударной волны, необходимые для полного численного разрушения оболочек вирусов при минимальном числе импульсов.

Авторы выражают признательность А.Е. Гирдюку за участие в разработке модели разрушения липидных оболочек вирусов.

Работа выполнена при поддержке РФФИ, проект № 14-08-01279.

Список литературы

[1] Rutberg Ph.G., Gorjachev V.L., Kolikov V.A., Snetov V.N., Stogov A.Yu. // J. High Temperature Mater. Proc. 2010. Vol. 14. N 1. P. 167–174.
 [2] Rutberg Ph., Kolikov V., Snetov V., Stogov A., Moshkin A., Khalilov M. // J. Phys. Conf. Ser. 2011. Vol. 275.

[3] Rutberg Ph., Kolikov V., Snetov V., Stogov A., Noskin L., Landa S., Arutjuman A., Egorov V., Sirotkin A. // J. High Temper. Mater. Proc. 2009. Vol. 13, N 3. P. 277–284.
 [4] Рутберг Ф.Г., Дубина М.В., Коликов В.А., Моисеевко Ф.В., Игнатьева Е.В., Волков Н.М., Снетов В.Н., Стогов А.Ю. // ДАН. 2008. Том 421. № 2. С. 274–276.
 [5] Schoenbach K.H., Peterkin F.E., Kldew R.W., Beebe S.J. // IEEE Trans. Plasma Sci. 1997. Vol. 25. N 2. P. 284–292.
 [6] Богомаз А.А., Горячев В.Л., Ременный А.С., Рутберг Ф.Г. // Письма в ЖТФ. 1991. Vol. 12. N 12. P. 65–68.
 [7] Edebo L., Selin I. // Gen. Microbiol. 1968. P. 253–259.
 [8] Богомолова Е.В., Горячев В.Л., Коликов В.А., Кулишевич А.И., Курочкин В.Е., Панина Л.К., Рутберг Ф.Г., Юлаев Ф.Г. // Проблемы медицинской микологии. 2003. Том 5. № 2. С. 75.
 [9] Rutberg Ph.G., Kolikov V.A., Kurochkin V.E., Panina L.K., Rutberg A.Ph. // IEEE Transactions on Plasma Science. 2007. Vol. 35. N 4. P. 1111–1118.
 [10] Kolikov V., Rutberg Ph. Pulsed Electric Discharges for Medicine and Biology. Techniques, Processes, Application, Springer. 2015. P. 215.
 [11] Малинин А.Н., Сабинин В.Е., Сидоров А.Н. // Письма в ЖТФ. 1994. Т. 20. Вып. I. С. 57–61.
 [12] Lukes P., Locke B. // J. Phys. D: Appl. Phys. 2006. Vol. 38. P.4047–4081.
 [13] Горячев В.Л., Рутберг Ф.Г., Федюкович В.Н. // Известия Академии наук, Энергетика. 1998. N 1. С. 40–55.
 [14] Pinchuk M.E., Kolikov V.A., Rutberg Ph.G., Leks A.G., Dolinovskaya R.V., Snetov V.N., Stogov A.Yu. // J. Physics: Conference Series. 2012. Vol. 406. P. 012034.
 [15] Li S. Atomic force microscopy study on the mechanics of influenza viruses and liposomes, Dissertation for the award of the degree „Doctor rerum naturalium“, Göttingen, 2012.
 [16] Наугольных К.А., Рой Н.А. Электрические разряды в воде. Москва, Наука. 1971. С. 155.
 [17] Кедринский В.К. Гидродинамика взрыва. Эксперимент и модели. Новосибирск: Издательство СО РАН, 2000. С. 434.