

На правах рукописи

ИВАНОВА Марина Викторовна

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ВИРУСОВ С ДЕТОНАЦИОННЫМИ
НАНОАЛМАЗНЫМИ МАТЕРИАЛАМИ И КОМПОЗИТАМИ
НА ОСНОВЕ ПОЛИАНИЛИНА**

03.02.02 – вирусология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва–2014

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт вирусологии имени Д.И. Ивановского» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук **Бурцева Елена Ивановна**

Официальные оппоненты:

Маркушин Станислав Георгиевич, доктор медицинских наук, заведующий лабораторией генетики РНК-содержащих вирусов ФГБУ «НИИ вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», РАМН Москва

Кордюкова Лариса Валентиновна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела хроматографического анализа «НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова», Москва

Ведущая организация

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт гриппа Министерства здравоохранения Российской Федерации», г. Санкт-Петербург

Защита диссертации состоится «___» _____ 2014 года в ___ часов на заседании Диссертационного совета Д 208.131.01 в ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава России по адресу: 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, 16.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава России

Автореферат разослан «___» _____ 2014 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук

Елена Ивановна Бурцева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Циркуляция в биосфере патогенных микроорганизмов среди восприимчивых организмов (человека, млекопитающих, птиц) определяет актуальность разработки средств и методов их дезактивации и удаления из среды. Распространение вирусных инфекций может осуществляться несколькими путями, среди которых наибольшую опасность по масштабности вовлечения в эпидпроцесс представляют воздушно-капельный и водный (Львов Д.К., 2008). Водная среда поддерживает жизнеспособность в природе энтеровирусов, вирусов гепатита А, аденовирусов, а также вирусов гриппа птиц. Инфицирование в начале XXI века людей и животных вирусами гриппа птиц А(Н5N1), А(Н7N7), А(Н7N3), А(Н9N2), а с 2013 года — А(Н7N9) представляет риск формирования нового пандемического варианта (WER 2002, 2003, 2004, 2009, WHO 2014). Одним из примеров стало появление в апреле 2009 года вируса гриппа свиней — тройного реассортанта А(Н1N1)pdm 09 вирусов гриппа птиц, свиней и человека. Его широкое распространение среди людей вынудило ВОЗ объявить уже в июне 2009 года 6-ую фазу пандемии (WER 2009, Львов Д.К., 2009). Ежегодно в мире регистрируют от 500 до 2000 заболеваний полиомиелитом у людей, что обуславливает присутствие вакцинного штамма вируса полиомиелита Сэбина типа 1 в списке вирусов, обязательных при исследовании эффективности вирулицидного действия дезинфицирующих средств (Носик Н.Н., Носик Д.Н., 2006). Удаление биологических патогенов из водных растворов может быть осуществлено с помощью фильтров, содержащих материалы, способных адсорбировать микроорганизмы.

Состояние научной разработанности проблемы. В научной литературе приводятся данные о взаимодействии вирусов с сорбентами. В России для вирусов гриппа были предложены: силикатные пористые сорбенты, соли BaSO_4 , анионообменные смолы, макропористое стекло, модифицированный графит (Железнова Н.В. и др., 1975; Закстельская Л.Я., Шендерович С.Ф., 1979; Рыбинская Л.Н. и др., 1982; Чубарова Н.И. и др., 1997; Иванова В.Т., Курочкина Я.Е. и др.,

2008). Успехи нанотехнологии в открытии и синтезе наноразмерных материалов, обладающих физико-химическими свойствами, отличными от своих макроскопических аналогов (Рамбиди Н.Г., Березкин А.В., 2009), позволяют рассматривать их в качестве возможных высокоэффективных сорбентов для вирусов. Открытые в России в 60-е годы XX века детонационные наноалмазы (ДНА) и их аналоги представляют интерес для биологов за счет наличия на их поверхности радикалов, содержащих атомы неуглеродной природы (O, H, N, S), обуславливающих способность сорбировать биологические объекты (Schrand A.M. et al., 2009). К началу наших исследований была известна только одна работа по сорбции белков вируса ВИЧ через конковалин А на ДНА (Fujimura T. et al., 2009). Способность некоторых полимеров, например, полианилина (ПАНИ) сорбировать вирусы (Иванова В.Т. и др., 2009) вызвала интерес к изучению ПАНИ композитов разной формы, в том числе с включением атомов серебра (Ag), поскольку присутствие Ag открывает возможность получения материалов, как с антивирусными, так и антибактериальными свойствами, присущими Ag (Щербаков Ф.Б. и др., 2006).

Цель исследования — изучить сорбционное взаимодействие вирусов гриппа человека и птиц, полиовируса (вакцинного штамма Сэбина типа 1), бычьего сывороточного альбумина, фрагментов ДНК с современными детонационными наноалмазными материалами и их модификациями, а также с полимерными композитами полианилина различной структуры, в т.ч. содержащими серебро, и произвести оценку этого взаимодействия по качественным и количественным показателям.

Задачи исследования

1. Изучить взаимодействие эталонных и эпидемических штаммов вирусов гриппа человека и птиц с рядом новых материалов различной природы, состоящих из микро- и наноразмерных частиц на основе: 1) углеродных материалов в виде углеродных нанотрубок, наноалмазных частиц и их производных, 2) проводящих полимеров на основе ПАНИ нанотрубок, композитов — ПАНИ нанотрубок и ПАНИ гранул, содержащих серебро.

2. Исследовать влияние ряда физических (температуры и времени воздействия) и биологических (систем культивирования и степени очистки вирусов) факторов на эффективность сорбции вирусов гриппа на детонационные наноалмазные материалы и их модификации.

3. Изучить сорбцию фрагментов ДНК на различные наноалмазные и полимерные наносорбенты.

4. Исследовать взаимодействие вируса полиомиелита на модели вакцинного штамма Сэбина типа 1 с наноалмазными и полимерными наносорбентами.

5. Оценить возможность использования выбранных сорбентов для удаления из растворов белков невирусной природы — бычьего сывороточного альбумина и иммуноглобулинов из иммунных сывороток.

6. Рассмотреть влияние исследуемых сорбентов на биологические объекты *in vivo* и *in vitro*.

Объект исследования. Эталонные, эпидемические, пандемические штаммы вирусов гриппа А и В, циркулировавшие в России и в мире в период с 1999 по 2013 годы; вирусы гриппа птиц с гемагглютинином Н5(реассортанты А(Н5N1) и А(Н5N2)); полиовирус вакцинного штамма Сэбина тип 1, фрагменты ДНК (полученные в результате амплификации РНК вирусов гриппа), иммуноглобулины.

Предмет исследования. Изучение взаимодействия вирусов гриппа человека, птиц, реассортантов, полиовируса, иммуноглобулинов, фрагментов ДНК с современными наноразмерными сорбентами различной природы (наноалмазные материалами и полимерными композитами) в зависимости от различных факторов: структуры вирусов, степени их очистки и методов культивирования, времени контакта вирусов с сорбентами, температуры среды, концентрации вирусов и сорбентов. Определение репродуктивной вирусной активности клеток и состояния животных после контакта с сорбентами.

Теоретические и методологические основы исследования. В основу научно-квалификационного исследования легли вопросы вирусологии, дезинфектологии. В работе применяли общенаучные и специальные методы исследования (методы культивирования вирусов и лабораторной медицинской

диагностики, молекулярно-биологические методы изучения структуры и свойств вирионов).

Информационная база исследования. В качестве информационных источников использовали научные публикации российских и зарубежных исследователей, представленных в журналах и книгах, материалы конгрессов и конференций, состоявшихся в РФ и за рубежом, методические инструкции и указания, инструкции к использованным в работе тест системам.

Основные научные результаты исследования, полученные лично автором.

Автором разработан метод удаления вирусов из водных растворов с помощью детонационных наноалмазных материалов. Проведена оценка влияния температурных, временных, количественных параметров, состава среды и антигенных свойств вирусов гриппа на сорбционное взаимодействие вирусов с изучаемыми сорбентами, проведена модификация наноалмазов (хлорирование, графитизация), изучено взаимодействие наноматериалов с вирусом полиомиелита, изучено влияние присутствия Ag в ПАНИ нанотрубках на сорбцию вирусов гриппа, полиомиелита, фрагментов ДНК. Проведена иммунизация животных, рассмотрено влияние исследуемых наноматериалов на культуру клеток тканей MDCK и гемопоэз лабораторных животных. Впервые установлена способность детонационных наноматериалов и их модификаций, композитов ПАНИ-нанотрубок и гранул, содержащих Ag и без него, сорбировать вирусы гриппа А и В из растворов (физиологического раствора, раствора культуральной питательной среды Игла MEM, аллантоисной жидкости куриных эмбрионов), фрагменты ДНК из ФР.

Впервые выявлена способность детонационных наноматериалов, ПАНИ нанотрубок и гранул, содержащих и не содержащих Ag, сорбировать полиовирус из раствора культуральной питательной среды Игла MEM.

Впервые установлено, что введение частиц Ag в структуру ПАНИ нанотрубок и гранул повышает их адсорбционную способность относительно вирусов гриппа А и В, фрагментов ДНК, полиовируса.

Положения, выносимые на защиту:

1. Вирусы гриппа и фрагменты ДНК (полученные в результате амплификации участков РНК вируса гриппа) активно сорбируются из растворов на ДНА содержащие наноматериалы .
2. Параметры эксперимента – температура и время взаимодействия не оказывают влияния (после 15 минут контакта) на эффективность взаимодействия вирусов гриппа с исследуемыми наноматериалами.
3. Вирусы гриппа и фрагменты ДНК способны сорбироваться из растворов на полианилиновые нанотрубки, содержащие серебро и без серебра. Присутствие серебра увеличивает сорбционное взаимодействие.
4. Вирус полиомиелита (вакцинный штамм Сэбина тип 1) способен сорбироваться из растворов на наноматериалы на основе полианилиновых нанотрубок с серебром и без него, а также на модифицированные наноалмазы.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты по изучению взаимодействия вирусов гриппа А и В, фрагментов ДНК, полученных при амплификации РНК вирусов гриппа, с детонационными наноматериалами (шихтой, наноалмазами и их аналогами с модифицированной поверхностью составили предмет заявки: ” Сорбенты - наноалмазсодержащие материалы, полученные в результате детонационного синтеза и модифицированные с помощью химических реагентов; способ получения иммуносорбента на его основе; способ иммобилизации специфических антител” на изобретение № 2013117675 от 17.04.2013г. Изложенный в заявке метод может быть рекомендован для деконтаминации растворов, содержащих вирусы гриппа А и В, в том числе пандемических штаммов А(Н1N1)pdm09, вирусов гриппа птиц из водных резервуаров в среде их обитания, фрагментов ДНК . Важно отметить, что ДНА материалы способны удалять из растворов вирус полиомиелита (вакцинный штамм Сэбина тип 1), внесенный в список вирусов обязательных для исследования противовирусных дезинфекционных средств (Носик Н.Н., Носик Д.Н., 2006).

Расширен спектр адсорбционных свойств ПАНИ материалов при добавлении в их состав серебра. Наряду с ранее установленными антибактериальным

свойствами Ag содержащих материалов данные композиты обладают антивирусной активностью и могут использоваться как материал для водных фильтров, обладающими как антивирусным, так и антибактериальным действием, имеющим практическое применение в медицине и быту.

Апробация результатов исследования. Результаты работ были представлены на международных симпозиумах, конференциях и выставках: VII Московском международном конгрессе «Биотехнология состояние и перспективы развития», 21-25 марта 2011; German-Russian Young Researchers Workshop on “Methods to study Influenza virus”, Berlin Germany 20–23.09. 2011; IV Nanotechnology International Forum, Rusnanotech 26–28 октября 2011; 6th Nanosmat conference, Krakov, Poland, 17-20th October 2011; XIX Менделеевском съезде по общей и прикладной химии 25–30 сентября 2011года, Волгоград; IV Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням, Москва, 26-28 марта 2012 г.; The Materials Research Society (MRS) Spring Meeting, Materials Research Society. Symp. 2012 April 9-13, San Francisco, California, USA; Международной научно-практической конференции «Фармацевтические и медицинские биотехнологии», Москва 20–22 марта 2012 г.; Юбилейной Всероссийской научной конференции “Отечественная эпидемиология в XXI веке: приоритетные направления развития и новые технологии в диагностике и профилактике болезней человека” Санкт-Петербург”. 19–20 апреля, 2012; Conference “Colloids and Nanomedicine 2012” 15–17 July 2012 г., Amsterdam ,The Netherlands; International conference “Options for the Control of Influenza VIII” . Cape Town, South Africa , 5–10 September 2013; 8-м Международном симпозиуме «Молекулярный Порядок и Подвижность в Полимерных Системах», 2–6 июня 2014 г., Санкт-Петербург, XII “International Conference on Nanostructured Materials”, Moscow, 13–18 July, 2014; на XII международной специализированной выставке «Мир биотехнологии – 2014», Москва , 2014 г., работа была отмечена дипломом и медалью.

Публикации по теме диссертации. По материалам диссертации опубликовано 20 научных работ, в том числе 4 статьи в реферируемых и

рекомендованных ВАК российских научных журналах, 2 статьи в американском и английском журналах, также 12 публикаций по материалам докладов в сборниках российских и международных конгрессов, и конференций. Оформлена 1 заявка на изобретение № 2013117675 от 17.04. 2013 РФ.

Структура и содержание диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания использованных материалов и методов, 4 глав собственных исследований, их обсуждения и выводов. Список литературы включает 85 отечественных и 104 зарубежных источников. Диссертация изложена на 140 страницах машинописного текста, включая 24 таблицы и 26 рисунков.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Материалы и методы исследования

Вирусы. Использовано 15 эталонных и эпидемических штаммов вирусов гриппа типов А(Н1N1), (Н3N2) и В двух эволюционных линий В/Виктория/2/87 и В/Ямагата/16/88- подобных, циркулировавших в России и в мире в период с 1999 по 2013г.; и в том числе пандемические штаммы А(Н1N1)pdm 09. Вирусы получены из Государственной коллекции вирусов, из коллекции вирусов ЦЭЭГ, НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского МЗ РФ, а также из справочных центров ВОЗ; реассортанты вирусов гриппа А(Н5N1), А(Н5N2) любезно предоставлены сотрудниками лаборатории физиологии ФГБУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского МЗ РФ (заведующий лабораторией д.м.н., проф. Каверин НВ); вирус полиомиелита — сотрудниками лаборатории онтогенеза ФГБУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского МЗ РФ (заведующий лабораторий д.м.н. проф. Носик Н.Н.)

Клеточные линии: клетки культуры ткани MDCK предоставлены Международным центром по гриппу, сотрудничающим с ВОЗ, Центров по контролю за заболеваемостью и профилактике (CDC&P) г. Атланта, США. Клетки культуры ткани Vero получена из коллекции клеточных культур НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского МЗ РФ.

Культивирование вирусов гриппа проводили на 10–11 дневных развивающихся куриных эмбрионах (КЭ) и на клетках культуры ткани MDCK по методу (Davies H.W. et al., 1978г.; Бурцева Е.И., 2002).

Гемагглютинирующую активность вирусов гриппа определяли в реакции гемагглютинации (РГА) по общепринятой методике, рекомендованной ВОЗ, с использованием 0,75% взвеси эритроцитов 0(I) группы крови человека.

Определение инфекционного титра вирусов гриппа проводили на 9–10 дневных эмбрионах и клетках культуры ткани MDCK, используя 10 кратные разведения в ФР вирусосодержащей жидкости до и после взаимодействия с сорбентом. Расчет инфекционных титров проводили по методу Рида и Менча.

Концентрированные и очищенные препараты вирусов гриппа получали дифференциальным центрифугированием в ультрацентрифуге фирмы Бекман L5-50 $v=25000$ об./мин., $t=1$ час.

Культивирование вируса полиомиелита (вакцинный штамм Сэбина тип 1) проводили в культуре клеток Vero при 34°C в течение 48-72 часов. Для индикации вируса в растворе использовали титрование его в 96 луночных панелях, содержащих клетки Vero и выявление по полному цитопатическому действию.

Электрофорез белков до и после сорбции на сорбенты проводили в 12% ПААГе в по методу Laemmli U.K. (1976).

Определение антител в иммунных сыворотках до и после их контакта с сорбентами и их комплексам с вирусами гриппа проводили в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) согласно ВОЗ.

Ампликоны — фрагменты ДНК, полученные при амплификации РНК вирусов гриппа Аи В в полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием тест-системы «ДНК технология».

Электрофорез фрагментов ДНК до и после сорбции на сорбенты проводили в 2% агарозном геле (Остерман Л.А., 1981).

Изменения в клетках культуры ткани MDCK *in vitro* после внесения 10 кратных разведений суспензий сорбентов определяли по состоянию монослоя с

помощью микроскопа и по ГА активности вируса гриппа в лунках микропанели в РГА.

Влияние сорбентов на гемопоэз изучали на лабораторных животных — белых крысах. Препарат вводили трижды внутрибрюшинно по 3 мг/ животное с интервалом три недели. Формулу крови до и после введения препаратов животным определяли используя атлас клеток (Козинц Г.И. 1998).

Электронную микроскопию выполняли совместно с д.б.н., проф. Манькиным А.А. (НИИ вирусологии МЗ РФ) и к.х.н., ст.н.с. Сапуриной И.Ю. (Институт высокомолекулярных соединений РАН, СПб),

Статистическую обработку результатов проводили стандартным методом Стьюдента, который включал вычисление средних квадратичных отклонений согласно Белякову В.Д. и др. (1981).

Сорбенты. Всего в работе было исследовано 17 сорбентов, детонационные наноалмазсодержащие материал: шихта и модифицированные наноалмазы (ДНА), и композиты ДНА с (ПАНИ), получены от предприятия «Синта» (Минск, Беларусь), модифицированы в Институте физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва, д.х.н. Спицыным Б.В., углеродные нанотрубки (УНТ) из фирмы «Таунит», г. Тамбов; органические — ПАНИ композиты с содержанием Ag и без него приготовлены в Институте высокомолекулярных соединений РАН, СПб — в.н.с., к.х.н. Сапуриной И. Ю.

Взаимодействие вирусов гриппа и фрагментов ДНК с наноалмазными и полимерными материалами

Факторами, обуславливающими выбор наноразмерных материалов и композитов на их основе, были их размеры, структура (углеродсодержащие и полимерные материалы), структура поверхностного слоя адсорбентов, форма, включение ионов металла. Из результатов электронно-микроскопического анализа сорбентов, представленных на рис. 1, следует, что в водной суспензии ДНА и шихта представляют набор различной формы агрегатов — кластеров в размере от 10 до

300 нм. Их поверхность имеет вид зернистой структуры. Композиты ДНА с ПАНИ, нанотрубки ПАНИ имеют форму хаотично переплетенных толстых гладких нитей с разным диаметром, нанотрубки ПАНИ с 30%Ag имеют шероховатую поверхность, композиты ПАНИ с 70%Ag находятся в гранулярной форме с варьируемыми размерами диаметра от 50 и до 100 нм .

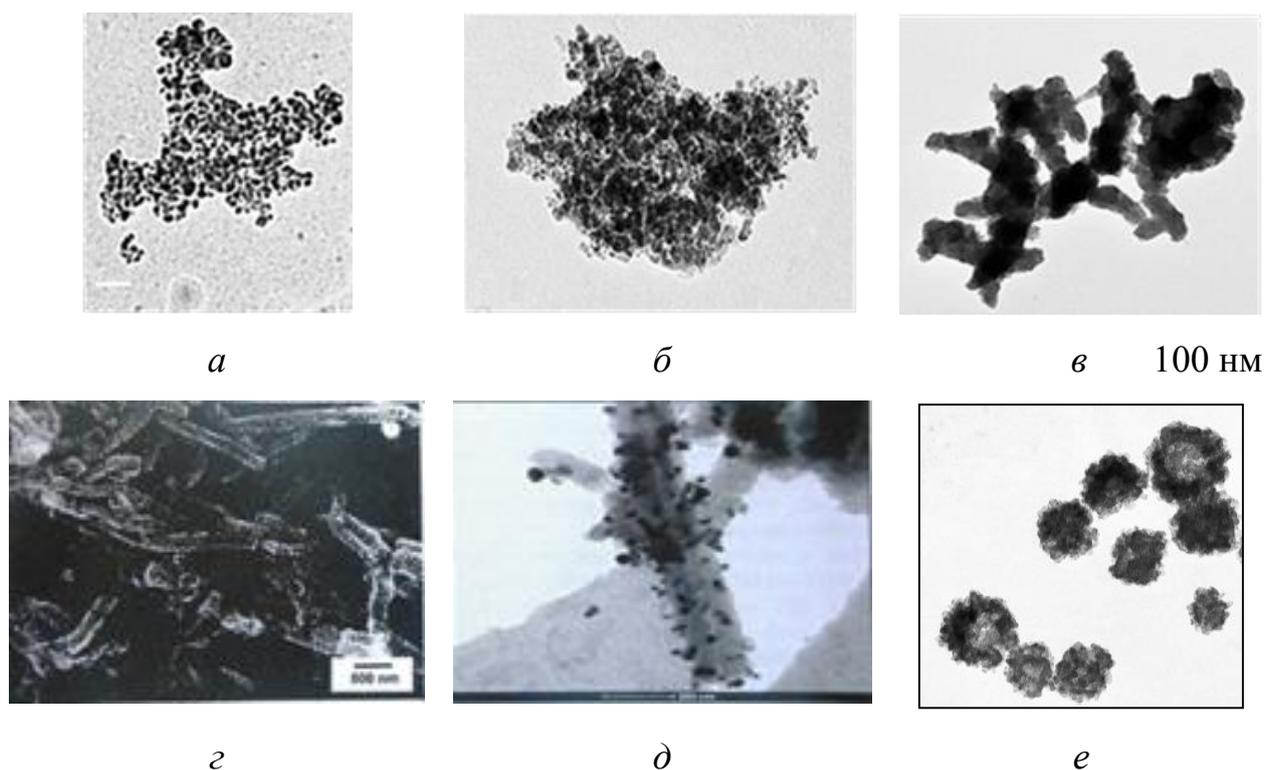


Рис. 1. Электронная микроскопия: а) наноалмазов, б) шихты, в) композитов ПАНИ с ДНА, ПАНИ нанотрубок без Ag (г) и с Ag (д), е) ПАНИ гранул с Ag

Результаты адсорбционной активности представителей оболочечных вирусов- вирусов гриппа А и В с вышеуказанными материалами представлены в табл. 1, 2, 3. Анализ полученных данных показывает, что после контакта с сорбентами регистрировали уменьшение ГА титра от 8 и до 2000 раз. Сорбционную активность наблюдали у вирусов гриппа с разными подтипами НА и NA, то есть она не зависела от антигенной формулы вирусов.

Таблица 1

Взаимодействие вирусов гриппа А и В с ДНА содержащими сорбентами при 22 °С

№	Сорбент	Вирус/ степень очистки /система культивирования	Титр вируса ГАЕ		
			До сорбции	После сорбции	После десорбции T=22°C
1	ДНА	А/Новая Каледония/20/99 (H1N1) очищ, конц. КЭ	128000	256	нс
2		А/Перт /16/09 (H3N2) конц . КЭ	128000	16	нс
3		В/Сичуань/379/99/ очищ, конц. КЭ	128	< 2	нс
3		В/Флорида/04/06 конц. КЭ	128	2	<2 ГАЕ
4		А/Калифорния/04/09 (H1N1) _{pdm09} аллантоис КЭ	32	2	<2ГАЕ
5		В/Флорида/04/06 аллантоис КЭ	32	8	нс
6	В/Москва/03/2010 МДСК	128	<2	нс	
7	ДНА Т	А/Перт /16/09 (H3N2)/ конц. КЭ	128000	8	нс
8		В/Флорида/04/06/ конц. КЭ	128	2	<2ГАЕ
9		В/Москва/03/2010 МДСК	128	<2	нс
10	Шихта	А/Новая Каледония/20/99 (H1N1)очищ, конц .КЭ	2048	2	нс
11		В/Флорида/04/06 конц .КЭ	2048	16	нс
12		А/Перт/06/09 (H3N2) аллан КЭ	64	2	нс.
13		В/Флорида/04/06 аллан. КЭ	128	32	нс.
14		В/Москва/6/11 МДСК	64	< 2	нс

Примечание: T_{десор} –ГА титр вируса после десорбции в ФР в течение 48ч. T=22° С.

Таблица 2

Адсорбция вирусов гриппа А и В на модифицированные ДНА

N	Сорбент	Вирус/антигенная формула/очистка	ГА титр		
			до сорбции	после сорбции	Десорб ГАтитр
1	ДНАграф	А/Перт/06/09 (H3N2), конц. в ФР	4096	256	-
		В/Флорида/04/06, конц. в ФР	128	32	-
2	ДНАамин	А/Перт/06/09 (H3N2), конц. в ФР	4096	128	-
		А/Висконсин/67/05 (H3N2), очищ., конц. в ФР	2048	8	-
		В/Флорида/04/06, конц. в PBS	128	16	-
3	ДНАхл	А/Южная Каролина/02/2010 (H1N1) _{pdm09} , концен. в ФР	128-256	32	-
		А/Перт/06/09 (H3N2), конц в ФР	4096	4	-
		В/Флорида/04/06, конц. ФР	128	32	-
		А/Висконсин/67/05 (H3N2), очищ., конц. в ФР	2048	4	-
4	ДНА Т	В/Флорида/04/06, конц. ФР	128	2	<2
5	ДНА Т+ ПАНИ	В/Сичуань/379/99 очищ, конц	64	8	<2
6	ДНА Т+ ПАНИ	А/Калифорния/4/09 (H1N1) _{pdm09} аллант.	32	4	-
7	ДНА Т+ ПАНИ	А/Новая Каледония/20/99 конц	8192	8	2

Примечание: * ГА титр вируса после десорбции в ФР в течение 48ч; при сорбция и десорбция T=22° С. – десорбция не изучалась

Сорбция вирусов гриппа на ПАНИ композиты

N	Сорбент	Вирус	Титр вируса ГАЕ в растворе		
			До сорбции	После сорбции	после десорбции T= 22 °C
1	ПАНИ нанотрубки	В/Флорида/04/06 концентрированный	128	2	2
2	ПАНИ нанотрубки Ag 30%		128	4	2
3	ПАНИ нанотрубки	А/Южная Каролина/02/2010 (H1N1) pdm09 Концентр.	128	8	-
4	ПАНИ нанотрубки Ag 30%		128	8	-
5	ПАНИ нанотрубки	А/утка/Приморье/2621/01 (H5N2) Аллантаоисный	128	64-128	-
6	ПАНИ нанотрубки Ag 30%		128	4	-
7	ПАНИ нанотрубки	А/Висконсин/67/05 (H3N2) (очищенный)	2048	<2	-
8	ПАНИ нанотрубки Ag 30%		2048	16	-

Примечание: *комплекс вирус+ сорбент, после осаждения при V= 3000 об/мин

Наибольшее падение ГА титров регистрировали у концентрированных и очищенных вирусов гриппа с высокими начальными титрами. При изменении способа получения ДНА из шихты или модифицировании поверхности ДНА при хлорировании, аминировании и графитизации взаимодействие вирусов с ДНА меняется, что подтверждается изменением ГА титров вирусов в растворах после контакта с сорбентами. Наибольшая активность была отмечена у шихты, и модифицированных ДНА, что связано с увеличением количества атомов N, O, H, Cl на поверхности ДНА и возникновением различного типа связей (ионных, донорно-акцепторных, Ван-дер-Ваальсовских и других) с функциональными группами аминокислот на поверхности ДНА и НА). Наименьшее падение ГА титров наблюдали у вирусов гриппа в растворах аллантаоисной жидкости КЭ и культуральной среде клеток MDCK. Это объясняется как более низкими начальными ГА титрами, типичными для вирусов, выращенных в этих системах, так и наличием в растворах белков невирусного происхождения: аллантаоисного белка КЭ и белков из телячьей сыворотки. При исследовании взаимодействия вирусов гриппа с ПАНИ композитами, содержащими Ag, было выявлено, что введение серебра в состав композита ПАНИ ведет к увеличению его сорбционной активности в ≥ 10 раз. Эти данные свидетельствуют о взаимодействии вирусов не

только с функциональными группами поверхности нанокompозитов ПАНИ, но и с Ag. Антибактериальные свойства серебра известны достаточно давно, в настоящее время предложено несколько объяснений механизма взаимодействия бактерий с серебром (Щербаков Ф.Б. и др., 2006).

Падение ГА титров вирусов после их сорбции на ДНА и ПАНИ содержащие сорбенты сопровождалось падением инфекционного титра вирусов гриппа А(Н3N2) в КЭ и на клетках культуры ткани МДСК в диапазоне от 2 до 6 lgЭИД₅₀ (табл. 4). Наименьшее падение 2 lgТЦИД₅₀ отмечено для ДНА_{жид фаз}. Во всех других случаях оно было ≥ 4.0 lg, что соответствует критериям хорошей сорбционной активности вирусов и соответственно эти сорбенты могут быть рекомендованы в качестве материалов при разработке противовирусных фильтров. Исследование инфекционной активности комплекса иммуносорбента (комплекса ДНА + вирус гриппа) показало наличие вируса в аллантоисной жидкости КЭ с титром 128 ГАЕ.

Таблица 4

Падение инфекционного титра концентрированных вирусов гриппа А(Н3N2) после сорбции на ДНА и ПАНИ содержащие сорбенты

Система	Сорбенты			ПАНИ нанотрубки Ag 30%
	Шихта	ДНАамин	ДНА жид фаз	
КЭ	вг*; 4.5lgЭИД ₅₀	вг** 6.0lgЭИД ₅₀	не проводили	вг** 6 lg ЭИД ₅₀
МДСК	вг**; 5 lgТЦИД ₅₀	вг** 4,26 lgТЦИД ₅₀	вг** 2 lgТЦИД ₅₀	вг** 4.5 lgТЦИД ₅₀

Примечание: вирусы гриппа (вг)*- А/Перт/06/09 , вг** А/Виктория/361/11 (Н3N2)

Проведено исследование зависимости сорбции концентрированных вирусов гриппа штамм А/Перт/06/09 (Н3N2) от следующих параметров эксперимента — концентрации сорбентов (от 5 до 50 мг/мл), времени контакта вируса с сорбентом от 15 мин до 2 ч. и температуры Т (от 4 до 37°С). Интенсивность сорбции зависела от концентрации сорбента в растворе и его структуры. Сравнительные исследования показали, сорбционная емкость для шихты составляла 500 ГАЕ/мг, ДНА — 200 ГАЕ/мг. Это коррелирует с различием в величинах удельной поверхности. У шихты она равняется 450 м²/г, у ДНА — 300 м²/г. Наиболее активная

адсорбция происходит в первые 10–15 мин. контакта сорбента с вирусом. Интенсивность сорбции не зависела от температуры. Сорбция вирусов из различных растворов происходила при температуре в диапазоне 4–37 °С в течение 20 мин. Десорбцию вирусов в ФР при 4 и 22°С не регистрировали в течении ≤48 часов. Эти исследования проводили при обычных условиях, максимально приближенных к действительности в периоде времени до 48 часов. Возможно получение других результатов при очень высоких рН или ионной силе, но изучение поведения комплексов вирусов с сорбентами в экстремальных условиях не входило в нашу задачу.

Проведение исследований по взаимодействию фрагментов ДНК с сорбентами обусловлено как теоретическим интересом – рассмотреть, происходит ли взаимодействие исследуемых материалов с нуклеиновыми кислотами, так и практическим – в связи с актуальностью проблемы загрязнения ампликонами (фрагментами ДНК) помещений, где проводится ПЦР диагностика. Электрофоретический анализ фрагментов ДНК в растворе до и после сорбции на разные сорбенты представлен на рис. 2.

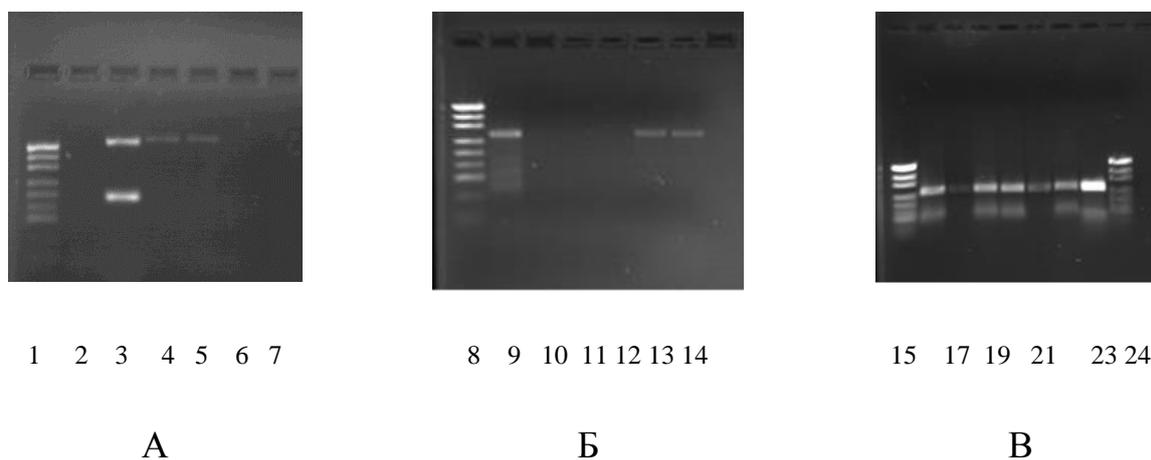


Рис. 2. Исследование сорбции фрагментов ДНК на nanoалмазные материалы (шихту, ДНА и их модификации, ПАНИ нанокompозиты и УНТ) с помощью электрофореза в 2% агарозе

А. Дорожки: 1,8,15, 24 - плазида PUC19; 3, 9,16- ДНК до сорбции; ДНК после сорбции на 4,5-ДНА_{газфаз}, 6,7 шихту; **Б.** 10 ДНА_{граф 600°С}, 11 - ДНК ДНА_{граф 800°С}, 12 ДНА_{граф 1000°С}, 13 - ДНА_{амин}, 14 ДНА_{хл.}; **В.** 17 ПАНИ нанотрубки Ag 30%, 18 ПАНИ, 19 УНТ+ ПАНИ, 20 ПАНИ нанотрубки, 22 УНТ, 23 полож. контроль.

Результаты эксперимента по сорбции фрагментов ДНК на ДНА содержащие материалы показали, что фрагменты ДНК с размерами больше 560 п.н. удалялись из растворов шихтой - полностью и ДНА-частично. Фрагменты меньшего размера – около 200 п.н. связывались полностью обоими сорбентами. При анализе модифицированных ДНА наибольшая сорбция наблюдали в случае шихты и графитизированных при разных температурах ДНА. В случае ПАНИ композитов наибольшая активность наблюдали у композитов, содержащих Ag. Эти данные показывают, что сорбционная активность ДНА зависит от размеров фрагментов ДНК и от состояния поверхности сорбентов. Создание композитов с включением атомов Ag в состав усиливает их взаимодействие с фрагментами ДНК.

Деконтаминация водных растворов, инфицированных вирусом полиомиелита, с помощью современных углеродсодержащих материалов и полимерных композитов

Выбор представителя безоболочечных вирусов — вакцинного штамма полиомиелита типа 1 Сэбина обусловлен распространением вируса в человеческой популяции, водным путем передачи инфекции, устойчивостью вириона к физико-химическим воздействиям, присутствием его в списке вирусов, рекомендованным при изучении активности дезинфицирующих средств. Результаты исследования взаимодействия вирусов с выбранными сорбентами показали, что он способен сорбироваться как на ДНА, так и ПАНИ содержащие материалы (табл. 5).

Падение инфекционных титров вируса после контакта с сорбентами составило от 1 до 2.5 lg ТЦИД₅₀. Содержание Ag в составе композита приводило к увеличению сорбционной активности вируса. Как и в случае вируса гриппа иммуносорбенты (комплексы вируса полиомиелита с сорбентами) обладали инфекционной активностью, титр вируса в комплексе варьировал в зависимости от сорбента от 2.5 до 4 lg ТЦИД₅₀ в 0.2 мл. Таким образом, установлено, что вирус полиомиелита (вакцинный штамм полиомиелита типа 1 Сэбина) способен

адсорбироваться на выбранных сорбентах, однако эффективность сорбции зависит от структуры самих сорбентов. Наиболее активное взаимодействие выявлено при контакте вируса с шихтой, ДНА_{граф} и композитами ПАНИ с серебром.

Таблица 5

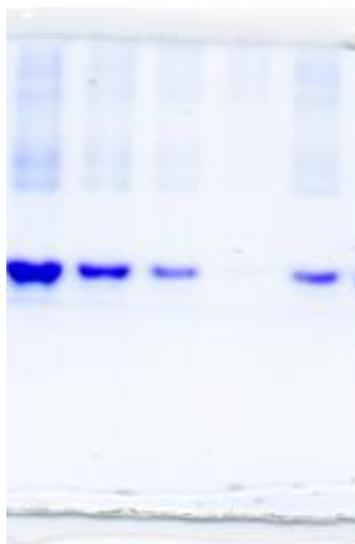
Инфекционная активность вирусов полиомиелита и их комплексов с сорбентами после взаимодействия с сорбентами разной природы

Вид материалов	№	Сорбент	Титр вируса, 0,2мл, lg ТЦИД ₅₀ до сорбции	Титр вируса полиомиелита, lg ТЦИД ₅₀ после сорбции	
				Надосадок	Иммуносорбент *
Углеродсодержащие материалы	1	Шихта	4,5	2,0	3,5
	2	ДНА (немодифицированный)	3,5	2,5	3,2
	3	ДНА _{граф} при T= 800 ⁰⁰ С в Ag	3,5	2,5	2,5
	4	ДНА _{граф} при T= 900 ⁰ С в Ag	3,5	1,5	2,7
	5	ДНА _{граф} при T= 1000 ⁰ С в Ag	3,5	1,5	2,5
	6	ДНА обработанный водородом в течении 6 часов	3,5	2,0	3,0
	7	ДНА _{хлор}	3,5	1,5	2,5
	8	УНТ	4,5	3,0	2,5
ПАНИ композиты	9	Нанотрубки ПАНИ	4,5	3,5	4,0
	10	нанотрубки ПАНИ + Ag 30%	4,5	2,5	3,5
	11	гранулы ПАНИ + Ag 70%	4,5	2,5	3,0

Примечание: *комплекс (вирус+ сорбент), после осаждения при V= 3000 об/мин

Изучение взаимодействия альбумина и иммуноглобулинов с ДНА содержащими материалами и композитами ПАНИ с Ag и без Ag.

Выявленный на примерах представителей оболочечных и безоболочечных вирусов эффект уменьшения сорбционной активности в растворах, содержащих белки невирусной природы, явился основанием для проведения исследования взаимодействия белков невирусной природы (альбумина) с выбранными сорбентами и их возможной конкуренции с вирусами за места связывания на сорбентах. Исследование проводилось в три этапа. На первом этапе исследуемые сорбенты обрабатывали раствором альбумина с концентрацией 1 мг/мл. Из электрофоретического анализа содержания альбумина в растворе после сорбции на ДНА содержащие сорбенты следовало, что альбумин с исходной концентрацией 1 мг/мл после контакта с шихтой отсутствует в растворе, после контакта с ДНА концентрация белка в растворе уменьшилась до 0.3 мг/мл (Рис.3).



1 2 3 4 5

Рис. 3. Электрофорез различных концентраций бычьего сывороточного альбумина до и после сорбции на шихту и ДНА

Дорожки: 1. альбумин $C=1$ мг/мл до сорбции, альбумин 2. $C= 0,5$ мг/мл; 3. $C= 0.25$ мг/мл; 4. альбумин после сорбции на шихту, 5. - ДНА жидкфаз.

На втором этапе образцы сорбентов обрабатывали сначала растворами альбумина $C_{\text{альб}}=1-4$ мг/мл, а затем вирусосодержащей жидкостью (вирус гриппа А(Н3N2)). Было установлено, что активная конкуренция за места связывания на сорбенте имела место до $C_{\text{альб}}= 4$ мг/мл (снижение ГА титра с 4096 до 256 ГАЕ) , при $C_{\text{альб}}=1$ мг/мл вирус полностью связывался с шихтой (снижение ГА титра вируса с 4096 ГАЕ до 2ГАЕ), т.е альбумин не мешал взаимодействию вируса с сорбентом. Сходные результаты были получены при конкурентном исследовании вирусов гриппа с альбумином на ПАНИ композитах. Третий этап включал исследование взаимодействия специфических антител из сывороток крыс, иммунизированных вирусом В/Флорида/04/06 с комплексами вирус+сорбент. Установлено, что после контакта разведенной 1:10 в ФР сыворотки к вирусу гриппа В/Флорида/04/06 с ДНА и ДНАТ сорбентами, титр сыворотки в РТГА с вирусом В/Флорида/04/06 падал с 1280 до ≤ 40 . Результаты эксперимента дают основание

полагать, что ДНА материалы могут быть использованы в качестве иммуносорбентов как относительно вирусов, так и антител при разработке тест-систем для диагностики.

Исследование влияния сорбентов на биологические объекты в опытах *in vitro* и *in vivo*

Для исследования влияния выбранных сорбентов (ДНА материалов, УНТ и ПАНИ композитов) на биологические объекты *in vitro* было использовано два подхода. Сначала сорбенты наносили на монослой клеток культуры тканей MDCK в концентрации от 1 мг/мл до $1 \cdot 10^{-8}$ мг/мл и через 48 часов проводили оценку его состояния. Результаты показали, что при концентрации сорбентов ≤ 1 мг/мл не выявлено нарушения клеточного монослоя клеток MDCK для всех изученных сорбентов, кроме УНТ, для которого монослой сохранялся при концентрации $C \leq 0.01$ мг/мл и менее.

Второй подход заключался в оценке сохранности клетками культуры ткани MDCK способности к репродукции вирусов гриппа после их контакта с сорбентами в течение 24 часов. В исследование были включены два вируса А/Москва/212/2014(Н3N2) и В/Москва/3/2014, и три сорбента (шихта, ДНА_{амин} и ПАНИ нанотрубки с 30%Ag), показавшие в предыдущих опытах максимальную эффективность. Начальный титр вируса составлял 128 и 64 ГАЕ/0.2 мл. Вирусы вносили в двух разведениях: 10^{-1} и 10^{-2} , для каждого сорбента эксперимент повторяли дважды. Концентрация сорбентов шихты, ДНА_{амин} ПАНИ нанотрубок с 30%Ag в опыте была в диапазоне от 1 до 10^{-6} мг/мл. Результаты опыта показали, что ЦПД вируса гриппа на клетки регистрировали при концентрации сорбентов 0,1 мг/мл и меньше, что было подтверждено результатами РГА. Таким образом, было показано, что клетки MDCK, содержащие наночастицы, сохраняли способность репродуцировать вирусы гриппа А и В после длительного контакта с сорбентами в концентрации 0,1 мг/мл и менее.

Кроме того определенный интерес представляло рассмотреть влияние изучаемых наноматериалов на гемопоэз крыс как один из показателей токсичности сорбентов на макроорганизмах. С этой целью крысам были введены нанотрубки

ПАНИ и ПАНИ с Ag30% внутривбрюшинно, трехкратно, разовая доза составляла 3 мг сорбента на одно животное (по две крысы в каждой группе) . Спустя неделю после третьего введения был произведен забор крови. Результаты анализа показали увеличение концентрации моноцитов от 4 до 7 раз, эозинофилов в 2 раза. В случае ПАНИ с Ag 30% отмечено уменьшение концентрации лейкоцитов в 2 раза.

Кроме того была изучена способность сорбированного вируса сохранять иммуногенные свойства. С этой целью животные (3 крысы в группе) были иммунизированны по общепринятой схеме комплексом ДНА + вирус гриппа А/Южная Каролина/02/2010 (H1N1)pdm09. Результаты показали что комплекс индуцировал выработку антител которые достигли титра 1/80 в то время как при иммунизации аллантаисным вирусом титр сыворотки составил 1/640. Результаты проведенной иммунизации говорят о возможности использования ДНА в комплексе с вирусами при разработках тест- систем для диагностики вирусных инфекций.

В настоящее время не выработаны единые критерии для оценки токсичности наноматериалов и нет необходимого набора методов исследования (De Stefano D. et al, 2012), поскольку нанотоксикология –молодая наука и токсичность наночастиц зависит от многих факторов. Наши исследования - первые шаги в этом направлении. Накопление и анализ совокупности данных и сопоставления результатов *in vitro* и *in vivo* позволят получить точную картину токсичности наноматериалов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данная работа была посвящена изучению взаимодействия оболочечных и безоболочечных вирусов с наноразмерными материалами, различающимися между собой по составу, структуре, и физико-химическим свойствам. Была произведена комплексная оценка этого взаимодействия по качественным и количественным показателям. Объектами нашей работы явились следующие вирусные модели: вирусы гриппа человека и птиц, вирусы полиомиелита, а также фрагменты ДНК , полученные в результате амплификации РНК вирусов гриппа. В результате проведенных исследований было установлено, что вирусы гриппа человека и птиц, независимо от антигенной структуры, вирусы полиомиелита, а также фрагменты

ДНК способны образовывать комплексы с углеродными материалами — детонационными наноалмазсодержащими сорбентами, полимерными материалами (полианилиновыми композитами — нанотрубками, содержащими Ag и без него, полианилиновыми гранулами, содержащие Ag), что приводит к их полному или частичному удалению из воды или растворов, и, как следствие, к деконтаминации водной среды. Это, в свою очередь, позволяет рассматривать использованные в нашей работе наноматериалы в качестве потенциальных компонентов очистительных систем. Наиболее перспективными по совокупности всех характеристик для производства фильтров являются детонационные наноалмазсодержащие материалы (шихта, модифицированные наноалмазы) и композиты — полианилиновые нанотрубки, содержащие Ag (30% по весу). Взаимодействие вирусов с данными сорбентами было активнее, чем с остальными, изученными в исследовании. И что особенно важно для практического применения цена на их производство является относительно низкой, особенно это касается шихты.

ВЫВОДЫ

1. Впервые выявлено эффективное сорбционное взаимодействие оболочечных (на примере вируса гриппа) и безоболочечных (на примере вируса полиомиелита) вирусов с детонационными наноалмазными материалами, а также композитами на основе полианилина.

2. Показано, что антигенные свойства вирусов гриппа А и В, а также их принадлежность к восприимчивым хозяевам (человек, птицы, свиньи) не оказывали влияния на эффективность сорбционного взаимодействия вирусов с изученными наноматериалами: детонационными наноалмазами и их модификациями, шихтой, композитами полианилина в виде гранул и нанотрубок.

3. Установлено, что размеры фрагментов ДНК определяют эффективность их сорбции на детонационные шихту и наноалмазы.

4. Впервые показано увеличение степени сорбционного взаимодействия фрагментов ДНК, аллантаисных вирусов гриппа и полиовируса (вакцинного штамма Сэбина типа 1) с композитами полианилина при введении в состав

композитов атомов серебра, что приводит к достоверному снижению гемагглютинирующих и инфекционных титров.

5. Процесс сорбционного взаимодействия вирусов гриппа с наноматериалами наиболее активно протекает в течение первых 15 минут контакта и не зависит от изменений температуры в пределах от 4° до 36°.

6. Выявлена конкуренция между вирусами гриппа и бычьим сывороточным альбумином за места связывания на сорбенте. При концентрации альбумина 1 мг/мл и менее, наблюдали наибольшее падение гемагглютинирующей активности вируса гриппа в растворе, обусловленное образованием иммуносорбентов — комплексов вирусов с сорбентами, содержащими наноалмазы.

7. Клетки культуры тканей MDCK сохраняли способность к репродукции вирусов гриппа при концентрации сорбентов 0,1 мг/мл и менее. Введение иммуносорбента (комплекса вирус гриппа + сорбент) лабораторным животным (крысам) вызывало индукцию антител к этому вирусу.

8. При создании фильтров для деконтаминации воды от вирусов (как оболочечных, так и безоболочечных) наиболее перспективными материалами являются: детонационная шихта, модифицированные наноалмазы и композиты полианилина, содержащие серебро.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК

1. Иванова, В.Т. Взаимодействие вирусов гриппа А и В с сорбентами на основе наноалмазов / Иванова В.Т., Иванова М.В., Бурцева Е.И., Гарина Е.О., Трушакова С.В., Шевченко Е.С., Манькин А.А., Исакова А.А., Корженевский А.П., Спицын Б.В. // Вопросы вирусологии. — 2012. — №2. — С. 9–13.

2. Урываев, Л.В. Вирусы как объекты и инструменты нанобиотехнологий / Урываев Л.В., Альховский С.В., Самохвалов Е.И., Беляев А.М., Бурцева Е.И., Воркунова Г.К., Гребенникова Т.В., Гущина Е.А., Забережный А.Д., Иванова М.В. и др. // Вопросы вирусологии, Прил.1. — 2012. — С. 52–65.

3. Иванова, В.Т. Деконтаминация водных растворов, контаминированных полиовирусом, с помощью современных углеродсодержащих материалов и

полимерных композитов / Иванова В.Т., Иванова М.В., Носик Н.Н., Бурцева Е.И., Кондрашина Н.Г. и др. // Биотехнология. — 2014. — №3. С. —67-72.

4. Сапурина, И.Ю. Полианилин и его композиты в качестве сорбентов вирусов гриппа / Сапурина И.Ю., Иванова М.В., Иванова В.Т., Бурцева Е.И., Трушакова С.В., Исаева Е.И., Кириллова Е.С., Курочкина Я.Е., Манькин А.А., Урываев Л.В. // Высокомолекулярные соединения. Серия А. — 2014 — Т. 56. — № 4. — С. 389–398.

Патенты

5. Иванова, В.Т. Сорбенты — детонационные наносодержащие материалы; способы получения иммуносорбентов на их основе и иммуносорбции / Иванова В. Т., Иванова М. В., Спицын Б. В., Трушакова С.В., Бурцева Е.И., Исакова А.А., Корженевский А. П., Денисов С.А., Олесик Ф.Н. — Заявка на патент РФ 2013117675 от 17.04.13.

Публикации в других изданиях

6. Ivanova, V. T., Interaction of nanodiamonds materials with influenza viruses. IV Nanotechnology International Forum (Rusnanotech 2011) / Ivanova V. T., Ivanova M. V., Spitsyn B.V., Garina K. O., Trushakova S. V., Manykin A A., Korzhenevsky A.P., Burseva E. I. // IOP Publishing Journal of Physics: Conference Series 345 .-2012.- 012019.

7. Ivanova , M. V. Adsorption of influenza A and B viruses on detonation nanodiamonds materials / Ivanova M. V., Burtseva E. I., Ivanova V. T., Trushakova S. V., Isaeva E.I. et al.// Materials Research Society. Symp. Proc.-2012.- V. 1 -.DOI: 10.1557/opl.2012.

8. Иванова, М.В., Сорбция пандемических вирусов гриппа А(H1N1)v наноразмерными алмазами и их комплексами с полианилином / Иванова М.В., Исакова А.А., Спицын Б.В. и др. // VI Московский международный конгресс “Биотехнология: состояние и перспективы развития”. Материалы конгресса. — 2011.- Часть 1, Т.2.- С.424-425.

9. Ivanova, M.V. Nanobiotechnology in study influenza viruses: Virus sorption at carbon nanoparticles in solution / Ivanova, M.V. // “Young scientist work shopping”. Booklet . Methods to study influenza viruses. Berlin. Freie Universitat.- 2011.- P. 23-24

10. Ivanova, V.T., The interaction of influenza A and B viruses with carbon nanomaterials/ Ivanova V.T., Isakova A.A , Ivanova M.V., et al. // “6th Nanosmat conference”, Krakov, Poland, Abstract book.- 2011.-P.114-115.

11. Иванова, В.Т. Современные подходы обеспечения биобезопасности водной среды/ Иванова В.Т., Бурцева Е.И., Иванова М.В., Трушакова С.В., Шевченко Е.С. и др. // “Юбилейная Всероссийская научная конференция “Отечественная эпидемиология в XXI веке: приоритетные направления развития и новые технологии в диагностике и профилактике болезней человека “.СПб. /Труды конференции.-2012.- С.163-164.

12. Иванова, М.В. Деконтаминация растворов, содержащих вирусы гриппа, с помощью сорбентов / Иванова М.В., Сапурина И.Ю., Бурцева Е.И., Трушакова С.В. и др. // Материалы IV Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням, Москва.-2012.-С. 159.

13. Исакова, А.А. Многофункциональные полимерные композиции на основе полианилина для определения биологических объектов/ Исакова А.А., Райтман О.А., Иванова М.В., Тверской В.А., Ванников А.В. // Международная научно-практическая конференция “Фармацевтические и медицинские биотехнологии” Москва.- 2012.- С. 342-343.

14. Ivanova, V. T. Adsorption of influenza viruses on polyaniline and carbon nanotubes / Ivanova V. T., Sapurina I.Yu. , Ivanova M.V., Trushakova S.V., Burtseva E.I. // “Colloids and Nanomedicine 2012” Amsterdam , The Netherlands. Abstracts.- 2012.-Colin2012_006.-P1.14. www.colloidsanomedicine.com.

15. Ivanova, M., Adsorption of Influenza A and B Viruses on nanodiamonds materials/ Ivanova M., Burtseva E., Ivanova V., Trushakova S. et al. // MRS Spring Meeting Symposium “Nanodiamond Particles and Related Materials”. San Francisco, California USA.- Abstract.- 2012.

16. Ivanova M.V. Detonation nanodiamond materials as the sorbents for influenza human and bird viruses /Ivanova M.V., Burtseva E.I., Trushakova S.V., Isakova A.A. et al. // International conference “Options for the Control of Influenza VIII”. Cape Town, South Africa. Abstracts.- 2013.- P.1-419.

17. Trushakova ,S. Monitoring of influenza viruses in Moscow region, 2009-2013/Trushakova S., Mukasheva E., Krasnoslobotsev K., Siluyanov E., Lavrisheva V., Kirillova E., Breslav N., Oskerko T., Kolobukchina L., Vartanyan R., Merkulova L., Ivanova M. и др. // International conference “Options for the Control of Influenza VIII” Cape Town, South Africa. Abstracts – 2013. - P2-641.

18. Исакова, А.А. Влияние природы детонационного наноалмаза на адсорбцию вирусов гриппа /Исакова А.А., Иванова М.В., Костина Ю.В. и др. // XIX Всероссийская конференция “Структура и динамика молекулярных систем ” Яльчик. Респ. Марий-Эл., Сборник тезисов докладов. Москва- Йошкар-Ола- Уфа- Казань.- 2012.- С. 78.

19. Иванова, В.Т. Современные подходы обеспечения биобезопасности водной среды/ Иванова В.Т., Бурцева Е.И., Иванова М.В., Трушакова С.В., Шевченко Е.С. и др. // Юбилейная Всероссийская научная конференция “Отечественная эпидемиология в XXI веке: приоритетные направления развития и новые технологии в диагностике и профилактике болезней человека”. Труды конференции. СПб -2012.- С.163-164.

20. Shishov, M.A., Polyaniline Based Sorbents For Removing Viruses From Solvents/Shishov M.A., Ivanova M.V., Burceva E.I., et al.//8-th International Symposium “Molecular Order and Mobility in Polymer Systems”, Book of Abstract. St. Peterburg.- 2014.-P.193.

21. Isakova, A. A.The study of physic-chemical properties of the nanodiamond materials and their interaction with different viruses/ Isakova A. A., Ivanova M.V., Burtseva E.I., Nosik N.N. // XII “International Conference on Nanostructured Materials” . Abstracts. Moscow.- 2014.-P.836.

Список сокращений

ВОЗ	— Всемирная организация здравоохранения
ЦЭЭГ	— Центр экологии и эпидемиологии гриппа
НА	— гемагглютинин
НА	— нейраминидаза
ГАЕ	— гемагглютинирующая единица
РГА	— реакция гемагглютинации
РТГА	— реакция торможения гемагглютинации
КЭ	— куриные эмбрионы
MDCK	— перевиваемая культура клеток почки собаки породы спаниель
Vero	— перевиваемая культура клеток почки зеленой мартышки
ЦПД	— цитопатическое действие
ТЦИД ₅₀	— 50% тканевая цитопатическая инфекционная доза
УНТ	— углеродные нанотрубки
ПАНИ	— полианилин
ДНА	— детонационные наноалмазы.
ФР	— физиологический раствор
ПААГ	— полиакриламидный гель
WER	— Weekly Epidemiologic Record

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую благодарность своему научному руководителю доктору медицинских наук, Бурцевой Елене Ивановне за научное руководство. Основные результаты получены в соавторстве с к.б.н. Исаевой Е.И., к.м.н. Кирилловой Е.С., к.б.н. Трушаковой С.В., д.б.н., проф. д.б.н. Манькиным А.А.; автор благодарен за внимание и ценные консультации при выполнении работы проф. д.м.н. Н.Н. Носику, а также коллегам за советы и моральную поддержку (ФГБУ Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского МЗ РФ), за предоставление сорбентов и консультативную помощь д.х.н. Спицыну Б.В. (Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва), к.х.н. Сапуриной И.В. (Институт высокомолекулярных соединений РАН, СПб). Автор глубоко признателен и благодарен своим соавторам.