

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ

«Научно-исследовательский институт вирусологии имени Д.И.
Ивановского»

МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Иванова Марина Викторовна

Взаимодействия вирусов с детонационными наноалмазными материалами и
композитами на основе полианилина

03.02.02 – вирусология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:

Доктор медицинских наук

Е.И.Бурцева

Москва 2014

Оглавление.....	2
ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ	
Введение.....	5
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
Глава 1. Вирус гриппа птиц как источник возможных пандемических штаммов	
1.1 Роль водной среды в распространении вирусных инфекций.....	12
1.2 Структура, свойства, распространение вирусов гриппа А и В.....	13
1.3. Распространение вирусов гриппа птиц в мире	18
1.4. Интродукция вируса гриппа птиц в человеческую популяцию.....	21
Глава 2. Вирус полиомиелита, распространение, структура, свойства ...	24
Глава 3. Сорбенты, взаимодействие их с вирусами, белками и нуклеиновыми кислотами и области применения	27
3.1. Сорбция как метод удаления веществ из разных средств.....	27
3.2. Взаимодействие микро и наноразмерные сорбентов с вирусами и другими биологическими объектами, иммуносорбенты.....	29
3.3. Наноалмазы, структура и свойства, перспектива использования в качестве сорбентов для вирусов	36
3.4. Влияние наночастиц на клетки <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>	42
Глава 4. Взаимодействие белков, нуклеиновых кислот, вирусов с материалами, содержащими Ag; использование препаратов в медицине, биологии и для дезинфекции воды; исследования их токсичности.....	44
РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	48
Глава 1. Материалы и методы исследований	48
1.1. Вирусы гриппа А и В	48
1.2 Вирус полиомиелита, вакцинный штамм Сэбина тип 1.....	49
1.3 Клеточные линии.....	49
1.4. Сорбенты	49

1.4.1	неорганические - шихта и детонационные наноалмазы.....	50
1.4.2.	композиты ДНА содержащих материалов с полианилином	51
1.4.3	углеродные нанотрубки.....	51
1.4.4.	органические -полианилиновые трубки	52
1.4.5.	композиты --полианилиновые нанотрубки с содержанием Ag 30% и полианилиновые гранулы с содержанием Ag 70%.....	52
1.5.	Иммунные сыворотки к эталонным штаммам вируса гриппа	52
1.6.	Культивирование вирусов гриппа на куриных эмбрионах.....	52
1.7	Культивирование вирусов гриппа на культуре клеток MDCK	53
1.8.	Реакция гемагглютинации (РГА).....	54
1.9.	Определение инфекционного титра вирусов гриппа.....	53
1.10.	Реакция торможения гемагглютинации (РТГА).....	53
1.11.	Получение концентрированных препаратов вирусов гриппа проводили дифференциальным центрифугированием.....	53
1.12.	Метод изучения взаимодействия биологических материалов с сорбентами.....	54
1.13.	Электрофорез белков в полиакриламидном геле	54
1.14.	Получение фрагментов ДНК.....	56
1.15.	Электрофорез фрагментов ДНК в агарозном геле.....	56
1.16.	Влияние сорбентов на биологические объекты <i>in vitro</i>	57
1.17.	Влияние сорбентов на биологические объекты <i>in vivo</i>	58
1. 18.	Определение формулы крови иммунных животных.....	58
1.19	Электронная микроскопия сорбентов.....	58
1.20.	Статистическая обработку результатов	58
1.21.	Элементный анализ ДНА материалов	58
1.22.	Инфракрасная спектроскопия (ИК спектроскопия).	58
Глава 2. Взаимодействие вирусов гриппа и ДНК с наноалмазными и полимерными материалами		59
2.1	Свойства наноалмазных сорбентов.....	59

2.2 Взаимодействия вирусов гриппа и ДНА с наноалмазными материалам и их модификациями	61
2.3 Взаимодействие вирусов гриппа с ДНА содержащими материалами в зависимости от различных параметров.....	64
2.4. Взаимодействие вирусов гриппа и кДНК с модифицированными наноалмазами...	71
2.5. ИК-спектры ДНА с разной сорбционной активностью по отношению к вирусам....	75
2.6. Взаимодействие вирусов гриппа с ДНА материалами, покрытыми ПАНИ.....	76
2.7. Сравнительное исследование УНТ и полимерных композитов, содержащих наночастицы Ag и без Ag, в качестве сорбентов вирусов гриппа А и В и к ДНК..	78
Глава 3. Деконтаминация водных растворов, содержащих вирусом полиомиелита, с помощью современных углеродсодержащих материалов и полимерных композитов.....	89
Глава 4. Изучение взаимодействия альбумина и иммуноглобулинов с ДНА содержащими материалами и композитами полианилина с Ag и без Ag.....	96
Глава 5 . Исследование влияния сорбентов на биологические объекты опытах <i>in vivo</i> и <i>in vitro</i>.....	104
5.1.Влияние сорбентов на клетки MDCK и репродукцию вирусов гриппа.....	104
5.2 Влияние сорбентов на основе ПАНИ на животных.....	111
5.3.Исследование влияние введения животным комплексов ДНА+вирусы гриппа	113
Обсуждение результатов	115
Заключение.....	121
Выводы.....	123
Список литературы.....	124
Список публикаций по теме диссертации.....	142
Список сокращений и условных обозначений.....	146

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Введение

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 [43]. 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 2013г. -А(Н7N9) представляет риск формирования нового пандемического варианта [120,184,185,186,187]. Одним из примеров стало появление в апреле 2009г. 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 г. 6-ую фазу пандемии [43,120,144]. Массовые заболевания полиомиелитом у людей, вызываемого полиовирусом, обусловили проведения исследований с вакцинным штаммом вируса полиомиелита Сэбина типа 1, поскольку он присутствует в списке вирусов, необходимых при исследовании эффективности вирулицидного действия дезинфицирующих средств [53]. Удаление биологических патогенов из водных растворов может быть осуществлено с помощью фильтров, состоящих из веществ, способных адсорбировать микроорганизмы.

Состояние научной разработанности проблемы. Наиболее древними в истории человечества были угольные сорбенты, в состав которых входил древесный уголь. В дальнейшем в качестве сорбентов для вирусов гриппа были предложены: силикатные пористые сорбенты [19], соли $BaSO_4$ [20], анионообменные смолы [63], макропористое стекло из расплава кремниевого и борного ангидридов [78], модифицированный гидротермической обработкой графит [27]. В настоящее время актуальным является поиск новых методологических решений для усовершенствования защитных мер (высокоэффективных сорбентов) с привлечением современных достижений различных областей науки, в том числе и быстро развивающейся нанотехнологии. Как показали исследования, наноразмерные материалы обладают физико-химическими свойствами (оптическими, магнитными, электрическими, сорбционными и др.) отличными от своих макроскопических аналогов [60]. Так, например, для применения в сорбционных процессах

были разработаны нанопористые адсорбенты с серосодержащими функциональными группами. Открытые в России в 60-е годы 20 века детонационные наноалмазы (ДНА) и их аналоги синтезируют, исследуют и некоторые из них используются в промышленности [64,168]. Они также представляют интерес для биологов за счет наличия на них поверхностных радикалов, содержащих атомы неуглеродной природы (O, H, N, S), обуславливающей способность сорбировать биологические объекты [161]. Эти свойства позволяют рассматривать применения ДНА в качестве медицинских средств в терапии - как носителей лекарств к пораженным клеткам, комплексы ДНА с ферментами - для создания новых тест систем, для сорбции бактерии, например, *E. coli* [86, 136]. К началу наших исследований по взаимодействию ДНА с вирусами было известна только работа по возможности использовать ДНА, соединенных с конковалином А, при создании вакцины против ВИЧ инфекции [111]. Это обусловило наш интерес по исследованию ДНА материалов с вирусами, отнесенными к другим семействам. Интерес к другому классу соединений - полимерных композитов был обусловлен открытием способности полианилина сорбировать вирусы [29]. Создание из полианилиновых нанотрубок композитов с включением ионов Ag представило для нас интерес относительно их взаимодействий с вирусами. Исследование композитов полианилиновых нанотрубок с Ag обусловлено известными антибактериальными свойствами этого материала [83], то есть возможно получение материалов, как с антивирусными, так и антибактериальными свойствами. Одно из современных течений в нанотехнологии является создание соединения композитов, материалов, в состав которых добавлены ионы Au, Fe, Ag, Ti, Ni металлов, которые, возможно, изменят их физико-химические свойства [93, 89, 151, 173]. Магнитные сорбенты, содержащие ионы Fe, предлагалось использовать для селективного концентрирования вирусы гриппа А/Н5N1 [17], для детекции гемагглютинаина вирусов гриппа А/Н5N1 [128]. Недавно появившаяся новая отрасль науки нанотоксикология ставит своей задачей изучение влияния на биологические объекты наноматериалов. Исторически углеродсодержащие материалы рассматриваются как инертные с минимальной реактивностью для клеток тела [110]. Наноразмерные формы углерода имеют свои особенности. Исследования *in vitro* на разных клетках показали, что наноалмазы более толерантны к клеткам, чем многие другие углеродсодержащие материалы - нанотрубки и фуллерены [161]. Исследования влияния ДНА-содержащих материалов на жизнеспособность животных (белых мышей и белых крыс), количество лейкоцитов в их крови, изменения органов после перорального введения или инъекций показало, что эти показатели зависят от количества, частоты и способа введения ДНА-содержащих проб [59]. Однако, этот вопрос требует дальнейшего изучения. Представляло

интерес изучить некоторые аспекты этой проблемы относительно взятых для исследования сорбентов.

Таким образом, является актуальным получение новых данных по взаимодействию вирусов с разными представителями углеродных и полимерных материалов. Это создает основу для создания в будущем современных высокоэффективных противовирусных фильтров и сорбентов, а также устройств для создания новых тест-систем для диагностики вирусных инфекций.

Цель исследования. Изучить способность и условия сорбции вирусов гриппа человека и птиц, полиовируса (вакцинного штамма Сэбина типа 1), ряда белков, фрагментов ДНК на современные детонационные наноалмазные материалы, их модификации и полимерные композиты полианилина различной структуры, содержащие серебро и без него.

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 полианилиновых нанотрубок, композитов -полианилиновых нанотрубок и гранул, содержащих серебро.
2. Исследовать влияние ряда физических (температуры и времени воздействия), и биологических (систем культивирования и степени очистки вирусов) факторов на эффект сорбции вирусов гриппа на модифицированными различными методами детонационные наноалмазные материалы,.
- 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 полимерные наносорбентами.
- 5.Установить возможность использования выбранных сорбентов для удаления из растворов белков невирусной природы - бычьего сывороточного альбумина и иммуноглобулинов из иммунных сывороток.

6. Оценить влияние выбранных сорбентов на биологические объекты в опытах *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 H5(реассортанты А(H5N1) и А(H5N2)); 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 материалы и полимерными композитами) в зависимости от различных факторов: структуры биологических объектов, степени их очистки и методов культивирования, времени контакта объектов с сорбентами, температуры среды, концентрации вирусов и сорбентов в растворе. Изучение влияния сорбентов на состояние культуры клеток и животных, используемых для вирусологических исследований.

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, методологические 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 вирусами полиомиелита, изучено влияние присутствия Ag в ПАНИ

нанотрубках на сорбцию вирусов гриппа, полиомиелита, фрагменты ДНК. Проведена иммунизация животных, рассмотрено влияние исследуемых наноматериалов на клетки культуры тканей МДСК и гемопоэз лабораторных животных. Проведены анализ и интерпретация полученных данных. 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 установлена способность детонационных наноматериалов (шихты, наноалмазов, их модифицированных аналогов), композитов полианилина-полианилиновых нанотрубок, полианилиновых нанотрубок и гранул, содержащих серебро, сорбировать вирусы гриппа А и В из растворов (физиологического раствора, раствора культуральной питательной среды Игла MEM, аллантоисной жидкости куриных эмбрионов).

Впервые обнаружена способность детонационных наноматериалов (шихты, наноалмазов, их отобранных модифицированных аналогов, композитов полианилина - полианилиновых нанотрубок, полианилиновых нанотрубок и гранул, содержащих серебро) сорбировать фрагменты ДНК из физиологических растворов.

Впервые выявлена способность детонационных наноматериалов (шихты, наноалмазов и их модифицированных аналогов) и полианилиновых нанотрубок, и гранул, содержащих и не содержащих серебро, сорбировать полиовирус (вакцинный штамм Сэбина тип 1) из раствора культуральной питательной среды Игла MEM.

Впервые установлено, что введение частиц серебра в структуру полианилиновых нанотрубок и гранул повышает их адсорбционную способность относительно вирусов гриппа А и В, фрагментов ДНК, полиовируса (вакцинного штамма Сэбина типа 1).

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 модифицированные наноалмазы.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты по изучению взаимодействия вирусов гриппа А и В, ДНК с детонационными наноматериалами (шихтой, наноалмазами и их аналогами с модифицированной поверхностью при хлорировании, аминировании и графитизировании при разных температурах) 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 17.04.2013.

Изложенный в заявке метод может быть рекомендован для деконтаминации растворов, содержащих эпидемические штаммы вируса гриппа человека, пандемический штамм А(Н1N1)pdm09, вирусы гриппа птиц из водных резервуаров в среде их обитания, фрагменты ДНК. Важно отметить, что ДНА материалы способны удалять из растворов вирус полиомиелита (вакцинный штамм Сэбина тип 1), внесенного в список вирусов обязательных для исследования противовирусных дезинфекционных средств [53].

Расширен спектр адсорбционных свойств полианилиновых материалов при добавлении в их состав серебра. Наряду с ранее установленными антибактериальными свойствами Ag содержащих материалов данные композиты обладают противовирусной активностью и могут использоваться материал для водных фильтров, обладающих как противовирусными, так и антибактериальным действием и 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

2012г.; 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; 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 , 2014г. 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 17.04.13 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 189 отечественных и зарубежных источников. Диссертация изложена на 142 страницах машинописного текста, включая 24 таблицы и 26 рисунков.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Глава 1. Вирус гриппа птиц как источник возможных пандемических штаммов

1.1 Роль водной среды в распространении вирусных инфекций

Без воды жизнь на земле невозможна. Вода является также средой обитания различных организмов: простейших (например, амёб), рыб, мелких и крупных млекопитающих (тюленей, китов и пр.). Вода содержит вещества, необходимые для питания и размножения этих организмов. В воде присутствуют продукты их жизнедеятельности, в том числе и продукты их выделения и разложения. Наряду с вышеуказанными организмами в водной среде присутствуют микроорганизмы, в том числе патогенные для живых существ, включая человека. К ним относятся бактерии и вирусы, которые используют большие и малые водоёмы как среду для передачи соответствующей инфекции. Анализ существующей литературы показывает, что спектр вирусов, выделенных из воды, включает вирусы, поражающие различных представителей живого мира, обладающих различной структурой белков и типами нуклеиновых кислот. Очень широк диапазон размеров вирионов.

Недавно открытые гигантские вирусы имеют размеры до 750 нм. К ним относятся мимивирусы, поражающие амёб, отнесенные, к семейству *Megaviridae* [89]. У больного с диагнозом пневмония обнаружены антитела к представителю этого семейства, что предполагает потенциальную роль этих вирусов как респираторных патогенов [133]. Гигантские вирусы водорослей были впервые изолированы в водах солёных озёр восточной Антарктиды в декабре 1999 г. [177].

Вирусы, вызывающие инфекционные болезни пресноводных и морских рыб, также распространяются через воду. В зависимости от возбудителя заболевания может носить острой или хронической характер, затрагиваются разные органы: кожа, глаза, жабры, желудочно-кишечный тракт. Геном вирусов рыб может быть представлен как РНК, так и ДНК. Вирусы рыб: *Rhabdovirus*, *Herpesvirus*, *Iridovirus*, *Birnavirus*, *Fish Pox*, относятся к 5 семействам. Представители некоторых семейств вызывают заболевания рыб сходные с заболеваниями людей (герпес, оспа) [96, 172]. Водный путь является одним из основных для таких инфекций у людей как грипп, полиомиелит, гепатит А, ротавирусные инфекции и др. Рассмотрим более подробно структуру и свойства вирусов гриппа, вызывающие эпидемии и пандемии в разных странах и континентах т эпизоотии у птиц и млекопитающих.

1.2 Структура, свойства, распространение вирусов гриппа А и В

Вирус гриппа впервые был изолирован Ричардом Шопом в 1931 г. в США от свиней штамм A/Swine/Iowa/31 [164]. В 1933г. используя его методический прием - введение носоглоточных смывов от больного гриппом в нос не иммунным животным хорькам - ученым В. Смит, К. Эндриус, П. Лейдлоу в Лондоне (Великобритания) удалось изолировать от людей первый штамм вирус гриппа А - A/WS/33 в расшифровке A/Wilson-Smith/33 [87]. Вариант этого штамма A/WSN/33, был получен в 1940 при репликации прототипного штамма в мозгу мышей [109]. В 1940г. Т.Фенсисом и независимо Магиллом Т.П. был изолирован первый вирус гриппа В- штамм B/Lee/40 [108,117]. Вирус гриппа С был открыт Тейлором в 1951 г. [174]. Вирусы гриппа, сгруппированные в рода Influenza A, Influenza B и Influenza C, принадлежат семейству Orthomyxoviridae. Кроме вирусов гриппа в это семейство входят также вирусы родов Isavirus и Thogotovirus. Антигенные свойства внутренних белков вириона (M1 и NP) определяют принадлежность вируса гриппа к определенному роду А, В или С. Дальнейшее деление вирусов гриппа А проводится согласно структуре поверхностных белков гемагглютинина (НА) и нейраминидазы (NA). В соответствии с антигенной специфичностью поверхностных гликопротеидов НА и NA в настоящее время известно 17 подтипов НА и 10 подтипов NA [82,155]. Вирусы гриппа с новым подтипом гемагглютинина Н17 и нейраминидазы N10 изолированы недавно от желтоплечих листоносов - видов фруктоядных летучих мышей - в Гватемале [176]. Эпидемическое значение для людей имеют вирусы гриппа А с тремя подтипами НА (Н1, Н2, Н3) и двумя подтипами NA (N1, N2). Вирусы гриппа А и В содержат NA и НА в качестве основных структурных и антигенных компонентов вирусной частицы, обладающих гемагглютинирующей и нейраминидазной активностями. Было показано, что у вируса гриппа С нет NA, он обладает вместо этого гемагглютинин-эстеразным белком (HEF). Геном вируса гриппа представлен однонитевой сегментированной линейной РНК. Вирус гриппа относится к группе вирусов с "негативным" геномом. У вирусов гриппа разных типов количество сегментов РНК различно: 8 сегментов у гриппа типов А и В, длина которых для вируса гриппа А варьирует от 890 до 2341 нуклеотидов, которые кодируют 11 белков: PB2, PB1, PB1-F2, PA, НА, NP, NA, M1, M2, NS1, NS2 [132]. PB1-F2 – короткий белок вирусов гриппа А, который транслируется с рамки считывания +1 гена PB1 [98]. 7 сегментов у гриппа типа С. Установлено, что у вирусов гриппа А и В наиболее крупные сегменты 1, 2, 3 кодируют белки полимеразного комплекса (PB2, PB1, PA); гены 4 и 6 – поверхностные гликопротеины НА и NA; ген 5-нуклеопротеин NP; 6, 7, 8 сегменты РНК являются бицистронными генами, кодируя по два белка; 6 фрагмент, кодирует NA, у

вирусов гриппа А, а у вируса гриппа В и белок NB. Сегмент 7 кодирует матриксный белок М1 и, в основном регистрируемый в клетке, мембранный белок М2 [132]. Сегмент 8 кодирует 2 неструктурных белка NS1 и NS2, обнаруживаемые в клетке [150]. Сегменты РНК покрывают “чехол”, состоящий из NP и полимераз, образуя комплексы RNP. При этом каждый такой сегмент (комплекс) действует самостоятельно. Схематическое строение вириона вируса гриппа с расположением белков и фрагментов РНК, их кодирующих представлено на рис.1.

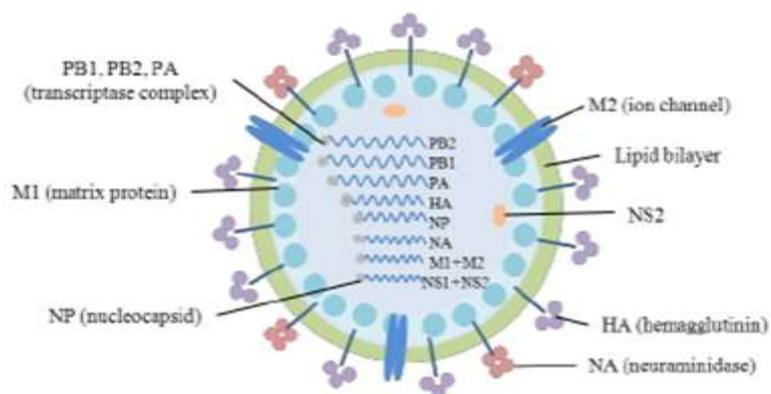


Рис. 1. Схематическое изображение строения вируса гриппа

Электронно-микроскопические исследования показали, что форма вирусных частиц сильно варьирует. Сферическая форма примерно 80-120 нм в диаметре выявлена у длительно пассируемых лабораторных штаммов, длинные, нитевидные формы в основном присутствуют в первичном материале или в материале, прошедшем ограниченное число пассажей через куриные эмбрионы и на культуре тканей.

Для данной работы наиболее интересна структура поверхностного белка гемагглютинаина (НА) - гликопротеида, который отвечает за прикрепление и последующее проникновение вируса в клетку (рис.2). Гемагглютинин составляет от 25% до 35% всех вирионных белков. На поверхности вириона может быть от 400 до 600 единиц НА. НА тример состоит из трех идентичных полипептидов, каждый из которых является комплексом НА1+НА2. Полипептид НА1 состоит из 319-328 аминокислотных остатков, имеет молекулярную массу 50 000, НА2 представляет собой легкую цепь молекулы НА с молекулярной массой 27 000 и состоит из 221-222 аминокислотных остатков [179]. Гидрофобная С-концевая область

HA2 (аминокислотные остатки в позициях 185-211) находится в липидном бислое, аминокислоты в позициях 211-221 – в вирионе. Гемагглютинин содержит 3-9 связанных гликозидных цепочек в одной молекуле мономера HA. Наличие углеводных цепочек влияет на гемагглютинацию, отсутствие последних приводит к потере данного свойства. В зависимости от клетки-хозяина изменяется число цепочек олигосахаридов, наибольшее количество возникает при пассировании вируса в клетках млекопитающих [163].

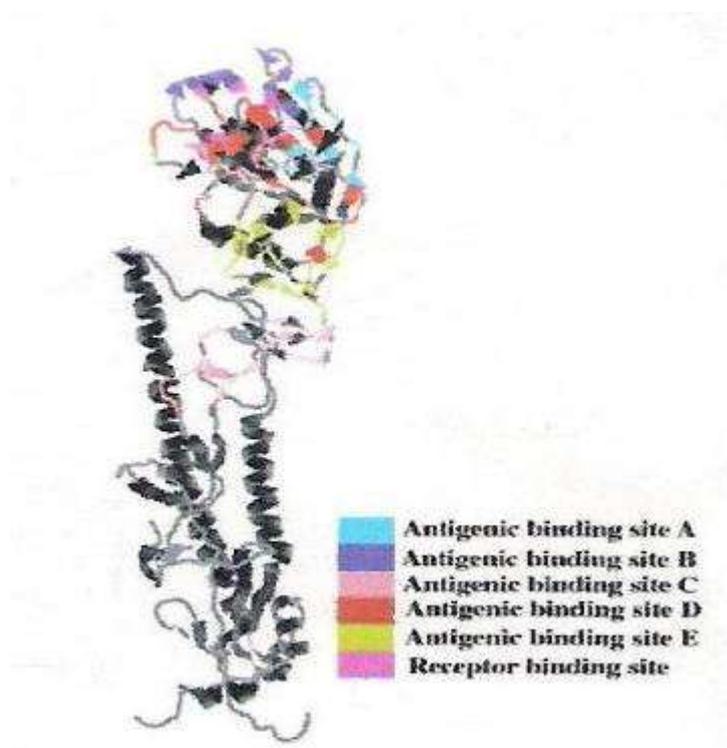


Рис.2. Схематическое изображение мономера гемагглютинина вируса гриппа А

Аминокислотная последовательность определена для большого числа HA вирусов гриппа А и В. В настоящее время она определяется методами секвенирования гена, кодирующего HA. На поверхности головки мономера HA расположены антигенные сайты А, В и С, рецепторный сайт. Изменения в аминокислотах, входящих в эти сайты, приводят к появлению новых эпидемических штаммов, способных преодолеть иммунитет населения и вызвать очередную эпидемию гриппа.

Изменчивость – особенное свойство вируса гриппа, приводящее к изменению структуры вирионных белков, что в конечном счете может привести к появлению новых эпидемических или достаточно редко пандемических штаммов. Изменчивость вирусов обусловлена двумя разными механизмами – антигенным дрейфом и антигенным шифтом. Изменения в геноме вируса гриппа в результате точечной замены нуклеотидов в разных областях нуклеотидных последовательностей могут привести в зависимости от места

локализации к замене аминокислоты или к так называемым молчащим мутациям, которые не приводят к замене аминокислоты. Если мутации затрагивают области гена гемагглютинина, которые кодируют аминокислоты, формирующие «головку» гемагглютинина, особенно антигенные или рецепторные сайты, то это может привести к появлению, новых эпидемических штаммов. В качестве примера антигенной изменчивости- почти ежегодное появление новых штаммов вирусов гриппа А(Н3N2), и реже у А(Н1N1) и В. Рецепторная специфичность вирусы гриппа в процессе эволюции выявлена у подтипов А(Н1N1) и А(Н5N1). Рецептор-связывающий сайт находится на «верхушке» головной части первой субъединицы гемагглютинина НА1: в него входят аминокислоты в положениях 190-198, 133-138, и 220-229. Клеточный рецептор для вирусов гриппа А представлен двумя основными типами ковалентной связи терминального остатка нейраминовой кислоты со следующим моносахаридом в составе сиалогликанов: α 2-6 (для НА эпидемических штаммов) и α 2-3 (для НА штаммов, изолированных от птиц). Искусственные замены в рецепторном сайте НА может привести к усилению патогенных свойств вируса гриппа в лабораторных условиях [40].

Реассортация обусловлена сегментарностью генома вируса гриппа. Благодаря этому свойству возможно возникновение вирусов – реассортантов, содержащих набор генов разного происхождения: часть генома вирусов гриппа птиц, различных млекопитающих и человека. Наиболее наглядный пример реассортации это геномы пандемических штаммов двадцатого – двадцать первого века.

Самая большая пандемия гриппа, названная «испанкой», охватила большую часть населения Земли и привела к гибели в 1918-1919 гг. более 40 млн. человек. Филогенетические данные предполагают, что вирус А(Н1N1), вызвавший пандемию, произошел от вируса птиц и перешел к людям и свиньям до 1918г. [181].

Пандемия 1957-1958 гг. была вызвана азиатским вирусом А/Сингапур/57 А(Н2N2), который содержал 3 гена (PB1, НА, NA) от вирусов гриппа птиц и остальные гены от циркулировавшего до этого вируса гриппа человека А(Н1N1) [129].

В 1968г. пандемия была вызвана новым пандемическим вирусом гриппа А/Гонконг/1/68(Н3N2), у которого 2 гена (PB1 и НА) были, возможно, от вируса гриппа уток и 6 генов - от вирусов гриппа А(Н2N2), до этого циркулировавшего у людей [181].

В 1977г., вирус А(Н1N1) вызвал большую эпидемию, по мнению некоторых ученых, пандемию. Она охватила в основном, молодое поколение в возрасте до 20 лет.,

Практически полное сходство структуры белков вирусов гриппа A(H1N1)77 и белков штаммов A(H1N1), изолированных в 1950г., послужило основанием для версии, что штамм A(H1N1)77 результат лабораторной утечки вируса [76]. В 2009 г. ВОЗ объявил 11 июня 2009г. о начале пандемии гриппа XXI века. Пандемический штамм A/Калифорния/07/09 (H1N1) pdm09 - был тройным реассортантом. Все восемь сегментов генома происходят от вирусов гриппа птиц и в составе различных вирусов были получены свиньями непосредственно от птиц или через промежуточного носителя (рис.3). Вирусы гриппа A(H1N1)pdm09 отличались по клиническим признакам, вызываемых у больных, такими как рвота, диарея [102], а также по возрастному спектру переболевших. 94% составляли лица старше 64 лет в случае сезонного гриппа, в случае заболеваний, вызванных вирусами гриппа A (H1N1)v, они составляли 19%. Наибольшее число случаев заболевания- 39% приходилось на возрастной диапазон 15-44 года [144]. Следует отметить, что появление новых пандемических штаммов в 1957 и 1968гг. приводило к исчезновению из циркуляции в человеческой популяции ранее доминировавшие пандемические штаммы A(H1N1) и A(H2N2), соответственно. С 1977г. в мире стали циркулировать и социркулировать вирусы гриппа А подтипов A(H1N1), A(H3N2) и вирусы гриппа В двух эволюционных линий. С 2009 г. регистрируют вирусы гриппа А (H1N1) pdm09, A(H3N2) и вирусы гриппа В двух эволюционных линий в разных сочетаниях и с разной интенсивностью [46,166].

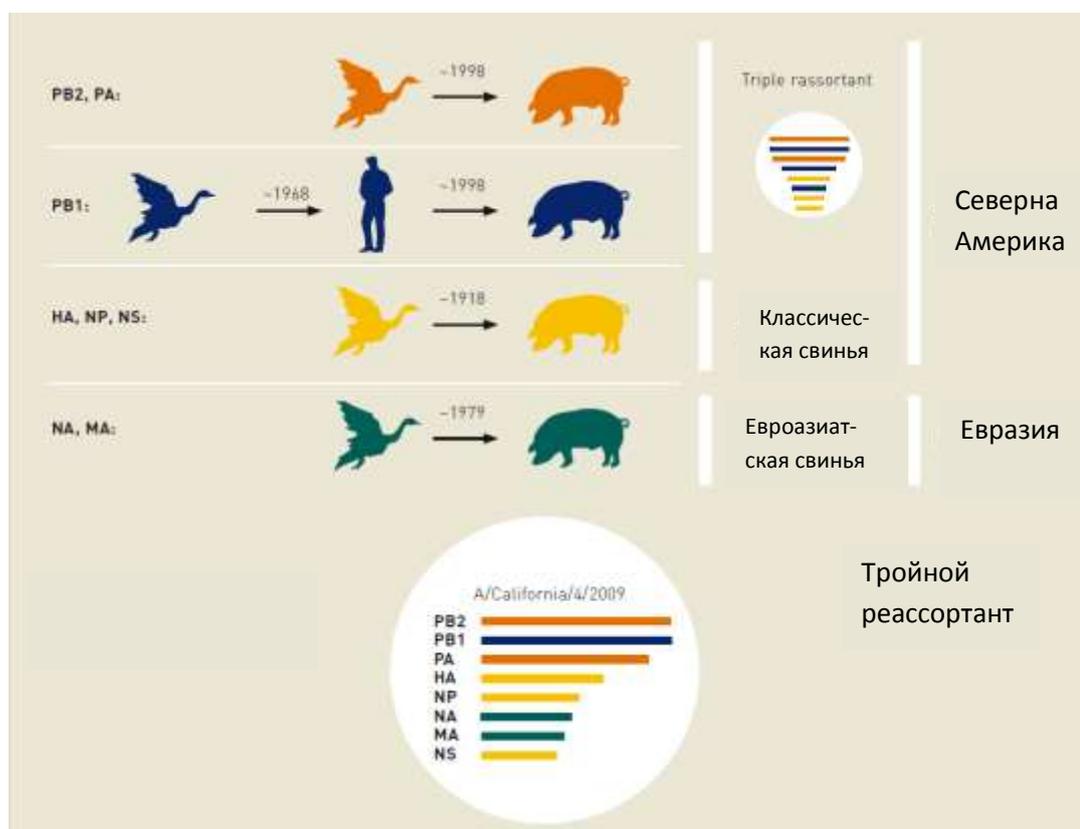


Рис.3. Происхождение вирусов гриппа А (H1N1)v [144].

1.3. Распространение вирусов гриппа птиц в мире

Вирусы гриппа А активно циркулируют в мире. Они инфицируют не только человека, вызывая эпидемии и пандемии, но и многие виды млекопитающих, в их число входят свиньи, верблюды, лошади, хорьки, тюлени, киты. Вирусы гриппа вызывают эпизоотии среди диких и домашних птиц, кур и особенно уток. Вирус гриппа В поражает только людей. В настоящее время известно 116 вирусов с различными сочетаниями подтипов гемагглютинина и нейраминидазы. Большинство из них -114 изолировано от диких и домашних птиц [82]. Большинство вирусов с разным сочетаний гемагглютинина и нейраминидазы изолировано от диких и домашних птиц, главным образом от птиц, водного и околородного комплекса (дикие и домашние утки, гуси, чайки и т.д.) Близкий контакт человека и животных способствует переходу в обе стороны вирусов - инфицированию людей вирусами гриппа птиц и млекопитающих и наоборот.

За 5 лет до появления вируса гриппа А (H3N2), вызвавшего пандемию в 1968г., были выделены два штамма вируса гриппа: А/лошадь/Майами/1/63 (Неq2Неq2) и А/утка/Украина/1/63 (Наv7Неq2). Гемагглютинин и нейраминидаза здесь обозначены по старой классификации вирусов гриппа. Гемагглютинин вирусов, выделенных от лошадей и

уток, оказался антигенно близкими НА штамма А/Гонконг/1/68 [182]. Эти факты свидетельствовали о циркуляции еще в 1963г. в генном пуле вирусов гриппа птиц и животных гена гемагглютинина, который в составе вируса А/Гонконг/1/68 вызвал пандемию среди людей.

Отсутствие регистрации в человеческой популяции ранее доминировавших пандемических штаммов не свидетельствует о полном их исчезновении. Вирус или его гены могут продолжать циркулировать в природе. Наглядный пример циркуляция вирусов гриппа А(Н2N2) после их исчезновения из человеческой популяции в 1968 г. В животном мире вирусы гриппа А(Н2N2) продолжали циркулировать в птичьих популяциях у диких и у домашних птиц (1975, 1979, 1983). Серологическая диагностика вируса А(Н2N2) была проведена с положительными результатами в 157 индюшачьих фермах в различных частях США в 1988-1989 гг. Заболевания, вызванные вирусом А(Н2N2) в инфицированных стаях, варьировали по клинике от бессимптомных до бурных респираторных поражений с высокой смертностью в некоторых стаях. Двадцать восемь штаммов вирусов гриппа А(Н2N2) были изолированы от птиц на рынках США в 1990-1991 г. Таким образом, после исчезновения в 1968 г из человеческой популяции вирусы гриппа А(Н2N2) или их гены в составе других вирусов продолжали активно персистировать у птиц.

Заболевание гриппом у птиц протекает по-разному: от бессимптомного течения до поражения центральной нервной системы, развиваются параличи, многие птицы гибнут в течение недели. У других птиц болезнь протекает по типу острой кишечной инфекции. У третьих появляется кашель, насморк. Следует иметь ввиду, что вирус гриппа у птиц размножается как в респираторном, так и в кишечном тракте [44]. Вирус А(Н5N1) является самым вирулентным вирусом гриппа птиц, как показали исследования вирусов в течении 40-летнего наблюдения за циркуляциями и свойствами вирусов гриппа птиц [180]. Столь высокая вирулентность обусловлена чувствительностью гемагглютинина к клеточным протеазам, приводящим к расщеплению молекул гемагглютинина на субъединицы НА1 и НА2. Водоплавающие птицы передают вирусы гриппа фекально-оральным путем через контаминированную воду [118]. Вирусы гриппа реплицируются в основном в клетках, выстилающих кишечник, и выделяются в высоких концентрациях в фекалиях. Сохранение вируса в воде зависит от ряда факторов: концентрация солей, рН и температуры. При 17 °С некоторые штаммы остаются инфекционными до 207 дней, при 4 °С значительно более длительное время [169,170]. Через контаминированную воду возможна передача вирусов другим особям, в том числе, новым хозяевам, а также возникновение в них реассортантных вирусов, содержащих различные гены вирусов птиц. Сезонная смена среды обитания птиц,

пути их миграции, оказывают существенное влияние на распространение генного пула. Птицы, мигрирующие вдоль континента по долготе, возможно, играют ключевую роль в процессе эволюции вирусов гриппа. Гены NP вирусов гриппа птичьего происхождения были идентифицированы в вирусах, изолированных в Европе: А/Норка/Швеция/84 (H10N4), А/Свинья/ Нидерланды/ 85 (H1N1), А/Свинья/Германия/81 и в вирусах, изолированных в северо-восточном Китае А/Лошадь /Юлин /89 (H3N8). Поэтому циркуляция вирусов гриппа у индюков, лошадей и свиней рассматривается как механизм реассортации генов вируса гриппа, изолированных из разных мест земного шара.

1.4. Интродукция вируса гриппа птиц в человеческую популяцию

Активная циркуляция вирусов гриппа у птиц и в случае близкого контакта с заболевшей птицей может и приводит к инфицированию людей этим вирусами. При инфицировании человека вирусом гриппа птиц наблюдается повышение температуры, катаральные симптомы (ринит, боль в горле). При этом у 50% больных наблюдается дисфункция желудочно-кишечного тракта в виде повторной рвоты и диареи.

Вирусы гриппа птиц с подтипами гемагглютинина А/Н5, А/Н7, А/Н9, А/Н6 вызывают заболевания у людей. Эти вирусы обладают различными сочетаниями этих подтипов гемагглютининов и подтипами нейраминидаз. Наибольшей патогенностью для человека характеризуются вирусы с подтипом гемагглютина А/Н5. Более 50% заболеваний заканчиваются летальным исходом [189].

Впервые идентификация вирусов гриппа птиц у больного человека была в 1997 г. в Гонконге, когда от ребенка был выделен вирус гриппа с гемагглютинином А/Н5 штамм А/Гонконг/ 97 (H5N1). С этого времени вирус А/Н5N1 стал регулярно регистрироваться в странах Юго-Восточной Азии. Всего за период с 1997 по 2013 гг. высокопатогенный штамм вируса H5N1 вызвал заболевания в 15 странах. Общее число заболевших, подтвержденных лабораторными исследованиями на 6 мая 2014 г. составляло 664 случая, 391 которых закончились летальным исходом. Наибольшее число случаев зафиксировано в Юго-Восточной Азии, в Китае, Бангладеш, Камбодже, Индии, Вьетнаме и на севере Африки- в Египте [121]. Показано, что люди заражались непосредственно от инфицированных птиц. В отдельных случаях на основании выявления специфических антител к вирусу гриппа А(H5N1) можно было предположить на возможность передачи вируса от человека к человеку. Начиная с 2004 г., в этом регионе стал циркулировать вирус с большей патогенностью, и как результат, заболевание заканчивалось в 59% случаев летальным исходом. В РФ с июля 2005 г. были выявлены эпизоотии среди домашней птицы в Западной

Сибири, Южном Урале и европейской части нашей страны. На территории России были выявлены циркуляции как слабо, так и высокопатогенных штаммов вирусов гриппа А(Н5N1), но инфицирование людей не было зафиксировано [35, 81].

В марте 2003 г. в Нидерландах была выявлена вспышка гриппа, вызванная высоко патогенным штаммом А(Н7N7). Из 89 заболевших 78 пациентов имели симптомы конъюнктивита, остальные – симптомы ОРВИ и конъюнктивита или стертую симптоматику. В марте 2004 г. в Канаде были выявлены 2 случая заболевших с диагнозом гриппа А(Н7N3), который был подтвержден лабораторно [122]. С 2013 г. начали регистрировать лабораторно подтвержденные случаи инфицирования людей вирусом гриппа птиц А(Н7N9). В основном эти случаи были отмечены на востоке Китая. Молекулярно-генетические исследования показали, что они представляют собой реассортанты, гены которых идентичны генам вирусов птиц, выделенных в разных странах Южной Кореи, Чешской республике, Китае в период 2005-2011 гг. [135]. Вирусы гриппа А(Н9N2) были идентифицированы в Гонконге в 1999 – 2003 гг. Заболевания были средней тяжести, летальные исходы не были зарегистрированы [147, 160].

Вирус гриппа птиц А(Н6N1) был впервые зарегистрирован в 2013 г. на Тайване. Ранее о перенесении данной инфекции определяли по серологическим признакам ретроспективно [119] .

В 2012 г. в США были зарегистрированы инфицирования людей вирусами гриппа свиней А(Н1N2) и А(Н1N1) [120] .

Таким образом, приведенные данные показывают возможность инфицирования людей вирусами гриппа птиц и животных. Межвидовой переход вируса гриппа зависит от очень многих факторов и происходит достаточно редко, в основном, в юго-восточной Азии. Такими факторами являются: близкий контакт с больной птицей (рынки, птицеводческие фермы, домашние хозяйства), отсутствие иммунитета у населения к данному вирусу, скученность населения, климатические и географические условия (теплый климат, наличие водных резервуаров). Важную роль играет такое свойство вируса как патогенность возбудителя, которое определяется особенностью структуры генома (наличие мутаций в определенных сайтах в молекуле гемагглютинина), рецепторной специфичностью данного вируса и др. факторами [6] .

Резюме к главе 1.

В главе 1 рассмотрена роль водной среды в распространении инфекций, вызванных вирусами разных размеров (от 25 до 750 нм) структуры (ДНК и РНК содержащих), поражающих разных представителей мира растений и животных а также человека. Основное внимание уделено описанию истории открытия классификации, строения и особенностей свойств вирусов гриппа А и В, обуславливающих их широкое распространение среди мира животных, способности вызывать эпидемии и пандемии у людей, эпизоотии у животных и птиц. Описаны случаи идентификации вирусов гриппа с гемагглютинидами подтипов А/Н3, А/Н2, типичных для вирусов гриппа человека в мире животных и птиц. Показано, что репликации вирусов в организме птиц происходят в респираторном и желудочно-кишечном тракте и затем выделяются во внешнюю водную среду с фекалиями. Описаны случаи интродукции вирусов гриппа птиц с гемагглютинидами А/Н5, А/Н7, А/Н9 в человеческую популяцию в конце 20-го и начале 21-го века. Приведенные литературные данные обуславливают важность выбора вирусов гриппа в качестве вирусной модели для исследовательских работ по изучению взаимодействия вирусов с сорбентами в водной среде.

Глава 2. Вирус полиомиелита, распространение, структура, свойства

Полиомиелит – болезнь, известная еще в древнем Египте (14-19 века до нашей эры). Описание паралитических заболеваний имелись уже во времена Гиппократа — древнегреческого врача (460- 356-377 до н. э.). В 1840 г. немецкий ортопед Гейне (J. von Heine) выделил полиомиелит как самостоятельную болезнь, а шведский педиатр Медин (Medin K., 1890) отметил его эпидемическое распространение и предположил инфекционную природу. Название полиомиелит - воспаление серого вещества спинного мозга впервые предложено немецким врачом А. Кусмаулем (1822-1902 гг.). В конце XIX — начале XX века эпидемии полиомиелита стали часто возникать в странах Европы и Северной Америки. В 40-х — начале 50-х гг. заболеваемость полиомиелитом резко возросла во многих европейских странах, США, Канаде, Австралии. Для полиомиелита характерна сезонность: в странах умеренного климата – летне-осеннее, в тропиках – в период дождей. Заболевания с тяжелыми исходами (до 10% летальности и 50 % остаточных параличей) зарегистрированы практически во всех странах мира [21].

В естественных условиях полиомиелитом болеет только человек. Инфицированный человек выделяет вирусы со слизью носоглотки и верхних дыхательных путей (в последние дни инкубации и первые дни острого периода) и с фекалиями (в первые недели заболевания или в течение одного – двух месяцев или редко – в течение периода большей длительности). Основной путь передачи фекально-оральный. Инфицирование воды, продуктов питания, сточных вод, обусловлены выделением вирусов из фекалий. Инкубационный период 7–14 дней (может варьировать от 2 до 35 дней). Полиовирус размножается в лимфоидных клетках слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта. Разрушая эти клетки при размножении, вирус переходит в слизистое отделяемое ротоглотки и ротовой полости, в фекалии. Почти у восьмидесяти процентов инфицированных лиц инфекция протекает бессимптомно, у 15% - как легкое или средней тяжести лихорадочное заболевание, у 0,1 -1% инфекция протекает с поражением ЦНС – параличами, парезами, в организме образуются специфические антитела. Формируется пожизненный иммунитет [15].

Установлено, что полиомиелит вызывает 3 антигенно различных вируса (полиовирусы, получившие название вирусы полиомиелита типа 1, 2, и 3. Иммунитет к одному из них не создает защиты от других типов. В середине прошлого века около восьмидесяти процентов всех паралитических случаев полиомелита вызывались вирусом первого типа [95] .

Вирус входит в состав семейства пикорнавирусов (Picornaviridae). Это одно из самых больших вирусных семейств, название которого происходит от итальянского "pico" - маленький и RNA (РНК- рибонуклеиновая кислота) относится к числу кишечных вирусов. Семейство Picornaviridae состоит из девяти родов: Enterovirus и другие рода [44]. (сборник Львова 2008). Вирус полиомиелита (типы 1-3) относится к роду Enterovirus, (от греческого Enteron – что в переводе означает кишечник), в который входят и группы непوليوмиелитных энтеровирусов. Пикорнавирусы, поражающие желудочно-кишечный тракт, являются безоболочечными вирусами, не имеющие липидной оболочки.

Геномная РНК является инфекционной и при репликации пикорнавирусов выступает в качестве мРНК. Инфекционность геномной РНК примерно в 10 раз меньше, чем у интактной вирусной частицы. Капсид имеет икосаэдрическую симметрию с 60 субъединицами, каждая из которых состоит из 5 протомеров. Протомер состоит из 4 полипептидов: VP1, VP2, VP3, VP4, которые являются производными протомера VP0. Диаметр вириона 27-30 нм, длина генома примерно 25 нм. Репликация пикорнавирусов происходит в цитоплазм. РНК пикорнавирусов транслируется полисомами, синтезируется один полипептид. Этот полипептид имеет области с протеолитической активностью цистеинпротеазы, благодаря чему он разрезается на 3 белка-предшественника: P1, P2 и P3. Белок P1, в свою очередь, расщепляется VP0, VP1 и VP3, VP0 образует VP2 и VP4. P2 и P3 не являются источниками структурных белков. Белки, происшедшие из P3, являются вирусной репликазой и ферментами, которые модифицируют поведение клетки – хозяина. P2 – источник белков, модифицирующих клетку.

Основная часть заболеваний полиомиелита sporadических и эпидемических, связана с вирусом типа I. Установлена способность вируса полиомиелита размножаться в культурах не нервных клеток приматов с разрушением этих клеток в результате цитопатического действия [104].

Вирусы рода Enterovirus характеризуются устойчивостью к обработке эфиром, дезоксихалату и ряду других детергентов, стабильностью при pH 3.0 – 10.0. Полиовирус инактивируется в течение 30 мин при t° 50°C и при пастеризации. Кипячение и автоклавирование почти немедленно инактивируют его. При комнатной температуре вирус сохраняется в течение нескольких дней, при 4—6°C — в течение нескольких недель или месяцев, в замороженном виде при T = -20°C и ниже — в течение многих лет. Быстро инактивируют вирус высушивание, действие ультрафиолетового излучения, свободного остаточного хлора (0,3—0,5 мг/л), формальдегида (в концентрации 0,3% и выше) [3].

Массивное выделение вируса полиомиелита с фекалиями в окружающую среду создает возможность его распространения через воду, пищевые продукты, руки, а также мухами. В городских сточных водах вирус может обнаруживаться в течение всего года. Обычные методы обработки не всегда освобождают их от вируса. Известны случаи выделения полиовируса из водопроводной воды.

К факторам, способствующим распространению вируса, относятся скученность населения, перенаселенность жилищ, отсутствие водопровода и канализации, нарушение санитарно-гигиенических правил, особенно в детских учреждениях.

Полиомиелитные вакцины являются единственным средством борьбы с полиомиелитом [44]. Из культуральных вирусов, разработанных Д. Солком, была создана трехвалентная инактивированная формалином вакцина [159]. Затем А.Сэбином были получены аттенуированные штаммы 1-го, 2-го и 3-го типов [158]. Эти штаммы были использованы для получения живой вакцины против полиомиелита 1959 г. в СССР [41].

Введение в практику инактивированной (1953г.), а затем живой вакцины обусловило резкое снижение заболеваемости полиомиелитом в Европе, Северной Америке и ряде стран других регионов. Использование вакцины позволило снизить заболеваемость, носившую эпидемический характер в 3-5 раз. Недостатком живой вакцины является вызываемой ею редкие случаи вакциноассоциированного паралитического полиомиелита (1 случай на 135 тысяч вакцинированных), реверсия вакцинного вируса в кишечнике привитых к вирулентному фенотипу и чрезвычайно редкие случаи многолетнего носительства и выделения реверсировавшего вакцинного вируса. Полная ликвидация полиомиелита не может быть осуществлена в настоящее время из-за невозможности проведения полной вакцинации по разным причинам и трудно диагностируемых неустраняемых случаев многолетнего носительства и выделения реверсивного вируса.

Резюме к главе 2

Полиомиелит – болезнь, известная уже более 2000 лет, получила широкое распространение в мире начиная с конца 19 – начала 20 века. В тексте главы приведены клинические проявления заболевания. Указано, что основной путь передачи инфекции – фекально-оральный. Возбудитель – безоболочечные РНК содержащие вирусы, которые по своим свойствам и структуре относятся к семейству Picornaviridae. Основная профилактика – вакцинация населения. Из разработанных 3-х аттенуированных вирусов, используемых при приготовлении вакцин, штамм Сэбина типа 1 является наиболее устойчивым к

химическим воздействием. Он включен в список обязательных вирусов, использованных при изучении различных дезсредств. Поэтому в качестве второй вирусной модели для исследований взаимодействия вирусов с сорбентами был выбран вакцинный штамм Сэбина типа 1.

Глава 3. Сорбенты, взаимодействие их с вирусами, белками и нуклеиновыми кислотами и области применения

3.1 Сорбция как метод удаления веществ из разных средств

Эта глава посвящена сорбентам, которые могут быть использованы или уже используется для сорбции вирусов и других биологических объектов из водных растворов. Слово сорбент происходит от лат. sorbens, родительный падеж sorbentis — поглощающий.

В настоящее время приняты следующие названия сорбционных процессов.

Сорбция - поглощение твердым телом или жидкостью какого-либо вещества из окружающей среды. Разновидности – адсорбция, абсорбция, хемосорбция.

Адсорбция - поглощения вещества из газовой или жидкостной среды поверхностным слоем твердого тела (адсорбента) или жидкости.

Абсорбция - поглощение вещества из газовой или жидкой среды всей массой другого вещества (абсорбента).

Хемосорбция - поглощение вещества поверхностью какого-либо тела (хемосорбента) в результате образования химической связи между молекулами вещества и хемосорбента.

Иммунсорбция – (Иммуно- от лат. immunis - свободный, освобожденный) – извлечение антител или антигенов из сложных смесей с помощью иммунсорбентов, основанное на реакции антиген-антитело («Энциклопедический словарь медицинских терминов», 1982).

Впервые употреблять сорбенты в для профилактики заболеваний предложил средневековый персидский учёный, философ и врач Авиценна (Абу́ Али́ Хусей́н ибн Абдалла́х ибн Сина) (980- 1037). В Древней Греции, Индии, Египте использовали сорбенты для очистки организма от ядов, токсинов. Активированным углем дезинфицировали раны, принимали во внутрь как сорбент. Кроме угля в качестве сорбентов использовали туф, глину и природные компоненты, которые обладали очищающим действием. Они применялись от желтухи, дизентерии, различных отравлениях. На Руси в тех же целях использовали древесный или березовый уголь <http://www.medmoon.ru/krasota/>.

Интерес к сорбентам возобновился в начиная с тридцатых годах XX века, когда начали разрабатывать и начиная с 60-х применять гемодиализ, плазмофорез и плазмоферез для очищения крови, основанные на фильтрации и сорбции компонентов крови. Слово фильтр французского происхождения filtre, от позднелатинского filtrum (войлок) - прибор,

приспособление или пористое тело для отделения жидкости или газа от взвешенных в них частиц. Очищение крови осуществляется с использованием искусственной мембраны, которая работает как фильтр, работающий на принципе молекулярного сита (размера пор).

Для создания высокоэффективных сорбентов, наряду с применением уже известных, идет активный поиск новых материалов, в том числе с использованием новейших технологий и в последние десятилетия на стыке разных наук - в том числе нанотехнологии. Современные наноматериалы, синтезированные учеными физиками и химиками, находят все более широкое применение в биологии и медицине. Термин нанотехнология был предложен Н. Танигучи (Япония) в 1974 г. Слово *нано* происходит от слова *nanos*, что в переводе с греческого означает карлик. Единица длины 1 нм (nm) равен 10^{-9} м. Наноматериалы вызывают большой интерес из-за ряда их уникальных свойств, таких как высокие дисперсионные свойства, большая удельная поверхность, малый размер и другие свойства. Под наноматериалами подразумеваются материалы с размером от 1 до 100 нм (Нанотехнологии, 2008).

3.2 Взаимодействие микро и наноразмерных сорбентов с биологическими объектами, иммуносорбенты

В литературе имеется ограниченное число работ по сорбции вирусов гриппа или противогриппозных антител из растворов для удаления комплементарных антигенов или антител из раствора. Одними из первых сорбентов для вирусов гриппа были предложены куриные эритроциты. Формализованные куриные эритроциты использовали для получения очищенных вирионов вирусов гриппа. Метод состоял из этапов сорбции из аллантаоисной жидкости куриных эмбрионов, затем их элюции с них для получения препаратов достаточно очищенных и концентрированных вирионов вирусов гриппа А, В, и С. Иммуносорбенты (вирусы, сорбированные на эритроциты) использовали для получения набора вирусспецифических антител к вирусу гриппа в антигриппозных сыворотках (Ровнова З.И., 1959). Обработанные иммуносорбентами сыворотки в дальнейшем использовали для изучения антигенных сайтов гемагглютиниона вирусов гриппа, например А(Н1N1) (Исаева Е.И и др., 1986).

Макропористое стекло с размером пор до 0,5 мкм, полученное из расплава кремниевого и борного ангидридов, предлагалось для хроматографической очистки вируса гриппа А/Виктория/1/88(Н1N1) для производства противогриппозной вакцины (Полянская Н.Ю. Жебрун А.Б., 1982; Чубарова Н.И. и др., 1997).

В качестве неорганических сорбентов были предложены соли $BaSO_4$. Иммуносорбенты (вирусы, соединенные с солями $BaSO_4$) могут быть использованы для анализа спектра антител в иммунных сыворотках и для удаления противогриппозных тел из диагностических сывороток (Закстельская Л.Я., Шендерович С.Ф. и др., 1979).

Аниониты и катиониты в методе ионно-обменной хроматографии предлагалось использовать для сорбции и изоляции вирусов гриппа (Рыбинская Л.Н. и др., 1979), которые обладали низкой сорбционной емкостью, трудоемкостью и длительностью выполнения операций.

Силикатные пористые сорбенты предложено использовать для очистки и концентрирования различных штаммов вирусов гриппа (Железнова Н.В и др., 1975).

Для приготовления иммуносорбентов в качестве сорбентов предложены целлюлозные матрицы (Гурвич А.Е., 1987).

Показано, что полимерные материалы, приготовленные в виде гранул из криогеля поливинилового спирта, способны фиксировать вирусоспецифические антитела для последующего выделения вируса гриппа из растворов. Следует отметить, что для приготовления такого сорбента требуется фабричная специальная криогранулярная установка, приготовление и иммобилизация антител на сорбент (Плиева Ф.М и др., 1998; Лозинский В.И., Зубов А.Л., 1992).

Модифицированный графит, полученный с помощью гидротермической обработки, может быть использован как вирусный сорбент. Установлено, что вирусы гриппа активно взаимодействуют с веществом, независимо от антигенной структуры поверхностных белков в широком диапазоне температур от 8-34°C в течение уже первых 15 мин. контакта вируса с сорбентом. Падение гемагглютинирующего титра вируса в растворе после контакта с сорбентом составляло от 4 до 256 раз. Комплексы модифицированного графита с вирусами были способны взаимодействовать с гомологичными антителами из иммунных сывороток. Кроме вирусов гриппа модифицированный графит способен был сорбировать белки не вирусной природы-белки аллантоисной жидкости куриных эмбрионов, иммунной сыворотки, 1% бычий сывороточный альбумин (Иванова В.Т., Курочкина Я.Е и др., 2008; Иванова В.Т., Курочкина Я.Е., и др. патент 2007). При сравнении с бактериофагом показано, что его сорбция идет менее интенсивно, чем в случае вируса гриппа (Курочкина Я.Е., диссертация 2010). Десорбция вирусов с сорбента была крайне слаба.

Среди полимеров в качестве сорбентов большой интерес вызывает полианилин (ПАНИ). Этот полимер обладает дырочной проводимостью в отличие от большинства известных полимеров, которые при нормальных условиях являются изоляторами. Основание полианилина является изолятором, а его производные (соли и интерполимерные комплексы с различными кислотами) – полупроводниками. Полианилин состоит из повторяющихся N-фенил-п-фенилендиаминных и хинондииминных блоков. Наличие различных функциональных групп на поверхности полимера позволяет ему организовывать различные связи с органическими молекулами. Установлена способность основания полианилина, а также солей полианилина ПАН ПАМПСК (полученных с помощью низкомолекулярных и полимерных кислот) сорбировать из воды и различных растворов эталонные, эпидемические и пандемические штаммы вирусов гриппа А(Н1N1), А(Н3N2), А(Н1N1) pdm09 и вирусы гриппа В, изолированные в период с 1977 по 2009гг., отличающиеся антигенными свойствами и термочувствительностью гемеагглютинина. Во временном интервале 15-120 минут интенсивность сорбции была одинаковая в температурном диапазоне от 4 до 7 °С. На эти сорбентах показана возможность сорбции энтеровирусов (вирус полиомиелита вакцинный штамм Сэбина типа 1) и бактериофага Т4D, а также показана возможность сорбции белков невирусной природы: бычьего сывороточного альбумина, белков иммунной сыворотки (иммуноглобулинов), белков аллантоисной жидкости куриных эмбрионов. Комплексы вирусов с сорбентами были способны взаимодействовать с гомологичными антителами из растворов иммунных сывороток (Иванова В.Т. и др., 2009; Курочкина Я.Е., Тимофеева А.В., 2009). Фрагменты кДНК (апликоны вирусов гриппа А(Н1N1) были также способны взаимодействовать с полианилином и ПАН ПАМПСК сорбентами (Трушакова С.В. диссертация, 2010).

Кроме функции сорбента полианилин может использоваться при биоинженерных исследованиях в качестве подложки для роста кардио или нервной тканей, где требуется биосовместимость с проводящими полимерами (Bidez P.R., 2006). Возможно использование проводящих полимеров, в частности полианилина, в медицине для лечения заболеваний периферической нервной системы (McKeon K.D., 2009).

Пленки полианилина толщиной от 30 до 105 нм также способны сорбировать вирусы гриппа А/Новая Каледония /20/99 А(Н1N1), антитела из иммунных сывороток к штаммам А/Новая Каледония /20/99 (Н1N1) и штамму В/Флорида/04/06 и фрагменты кДНК, полученные из вирионных РНК в результате полимеразной цепной реакции. Эти результаты были получены методом поверхностного плазмонного резонанса (Трушакова С.В., диссертация, 2010; Исакова А.А., Иванов В.Ф., Иванова В.Т. и др., 2010).

Углеродные нанотрубки и углеродные нанотрубки, покрытые полианилином способны сорбироваться на из водных и физиологических растворов вирусы гриппа А(Н5N2) и А(Н7N7), а также эпидемические и пандемические штаммы А(Н3N2) и А(Н1N1)pdm09. При этом покрытие углеродных полианилином приводило к увеличению сорбции вирусов из водных растворов (Курочкина Я.Е. диссертация, 2010)

Сложные композиты на основе полианилиновых пленок с сорбированными антителами, способны образовывать преципитационные комплексы с гомологичными вирусами при покрытии пленки нематическими жидкими кристаллами. Этот эффект может быть использован для детекции вируса В.Т. гриппа А и В (Иванов В.Ф., Иванова В.Т., Томилин М.Г., 2006а; Иванов В.Ф, Иванова В.Т., Томилин М.Г. и др. ,2006).

Интродукция вирусов гриппа птиц А/Н5N1 в человеческую популяции вызвала активный интерес в различных направлениях в том числе диагностики и дезинфекции среды от возбудителей. Разработан магнитный носитель ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), покрытый полианилином, который способен сорбировать вирусы гриппа. Сенсор предлагалось использовать для детекции гемагглютинаина вирусов гриппа А/Н5N1 (Kamikawa T.L., 2010).

Для мониторинга открытых водных объектов на наличие патогенных вирусов гриппа предлагается магноиммуносорбенты, матрицей которых является твердая магнитная основа с иммобилизованными (фиксированными) гомологичными антителами. Для селективного концентрирования для выявления вирусов гриппа птиц А/Н5N1 предложен сложный композит, в состав которого наряду с полимерами входят несколько ионов металлов (Ефременко В.И. и др. , 2008).

Сорбенты и иммуносорбенты могут быть использованы и для вирусов, структура которых отлична от вирионов вируса гриппа.

Глина или древесный уголь рассмотрены как сорбенты для рота - и коронавируса коров, вызывающих гастроэнтериты у млекопитающих и птиц (Clark K.J. et al., 1998). В патенте (Тремблен М. Э. Фиштер С. Г., Коллиас Д. Йо., 2004) предложен углеродный сорбент, представляющий собой частицы активированного угля, способный удалять из воды бактериофаг MS-2, имеющий размер от 25 нм. Активированные угли получают из разных материалов (древесный уголь, древесные опилки, скорлупа орехов, косточки плодов фруктовых деревьев (Химическая энциклопедия, 1988). Сорбционные свойства зависят от нескольких факторов: состава, способа его получения, распределения пор по размерам и

величины удельной поверхности. При этом активированные угли могут резко отличаться природой поверхности из-за способа и условий получения и хранения.

Следует отметить, что углеродные сорбенты, являются наиболее древними сорбентами в истории человечества. Кроме сорбции вирусов, активированный уголь используется в качестве адсорбента для очистки воздуха от CS_2 , улавливания паров других летучих растворителей, для очистки водных растворов, гемосорбции, поглощения вредных веществ из желудочно-кишечного тракта и т. д.

Использование мембран из современных материалов - полипиррола позволяет удалять из водных растворов ряд вирусов животных, включающих полиовирусы, коксаки, эхо, и другие энтеровирусы, рео, рота, гепатит (Chandra A. S., Singh R. et al., 1999). Для выявления вирусспецифических антител к вирусу гепатита С в качестве матрицы (носителя) предложен полимер-полистирол, с фиксированным (иммобилизованным) на нем вирусспецифическим рекомбинантным белком или синтетическим пептидом (Падюков Л.Н. Бобкова М. Р. 1997; Мукомолов С.Л., Плотникова В.А., Жебрун А.Б. и др. Иммуносорбент для обнаружения антител к ядерному белку вируса гепатита с в сыворотке крови Патент РФ, 2138286. 27.09.1999.

Рассматриваются монодисперсные и наноэмульсионные гели для применения в качестве сорбента для включения рекомбинантного антигена гепатита В при усовершенствовании интра-оральной вакцинации рекомбинантным HBsAg (Rachmawati H. et al., 2012).

Современные сорбенты создаются не только как противовирусные материалы, но и для создания своеобразных платформ для соединения с различными лечебными препаратами и затем доставки лекарств в организмы.

Комплексы – никель-агарозные частицы (везикулы), предлагается использовать как платформы для адресной доставки лекарств, плазмидных ДНК, белков и вирусов (Asghari F. et al., 2012) .

Титановые нанотрубки, модифицированные присоединением различных функциональных групп, разработаны и предложены для создания носителя молекул для терапии носа (Talon R.M. et al., 2012).

Разные производные одних и тех же соединений могут быть использованы в разных направлениях медицины и для улучшения жизнедеятельности человека.

Композиты оксида графена (производного графита), помеченные флуоресцентной меткой, предлагается использовать, для создания платформы для адресной доставки лекарств и светотермальной терапии, для диагностики рака (Hu S.H. и др., 2012).

Соединение графена, содержащее холестеринбромидпиридин, может быть использовано как лекарство против рака груди, которое вызывает апоптоз в трансформированных раковых клетках (Misra S.K. et al., 2012).

Графен, в структуру которого включены ионы железа, предлагается использовать как новый катализатор для разложения нитроароматических соединений. Это позволит предотвратить загрязнения окружающей среды нитроароматические соединения, которые используются в таких областях как фармацевция, агрохимия (Atar N. et al., 2012).

Фуллерены и углеродные нанотрубки благодаря своему строению обладают большей сорбционной способностью, чем угли и графиты. Фуллерены могут быть использованы как средства целевой доставки лекарств и вакцин и в фармацевции для создания новых лекарств в качестве эффективных антиоксидантов (Носик Д.Н., Носик Н.Н., 2008; Андреев С.М. Бабахин А.А., 2008).

Кроме использования углеродных нанотрубок (УНТ) в качестве сорбентов для вирусов гриппа (выше указано), они могут быть рассмотрены, в качестве контейнеров для адресной доставки лекарств. Лекарства помещают в трубки и «запаянном» виде безопасно транспортировать в место назначения, где нанотрубки раскрываются с одного и выпускают свое содержимое в строго определенных дозах назначения с заданными свойствами (Дьячков П.Н., 2008; Шляхто Е.В., 2007). Модификация УНТ влияет на биологические объекты. Проведены исследования УНТ, соединенных с различными карбоксилированными группами. Изучено влияние на В и Т клетки у мышей, и выявлены различия в кинетике адсорбции данных композитов при сравнении с углеродными нанотрубками с карбоксилированными группами (Krang D. et al., 2012). Одно из вариантов использования УНТ является приготовление из них воздушных фильтров. Исследования показали, что количество адсорбированного на углеродных нанотрубках диоксина во много раз выше, чем в случае активированного угля (Long R.Q., Yang R.T., 2001). Для очистки питьевой воды от свинца и химических соединений также предложено использовать углеродные нанотрубки (Филатов С.А. и др., 2008).

Другое направление - это создание материалов, для биологических и медико-биологических работ по диагностике. Композиты золота (Au) с полимерами предложено

для биометрических меток при исследовании *in vivo* и *in vitro*. Соединение композитов со структурами клеток позволяет получать стабильные агрегаты частиц, которые могут быть исследованы методами поверхностного плазмонного резонанса, поляризационной световой спектроскопии и рамановского излучения (Blakey et al., 2012).

Некоторые современные сорбенты способны взаимодействовать с антибиотиками для последующей сорбции микроорганизмов. Цель- инактивации микропатогенов или активного удаления из растворов. Разработаны органеллы – микроструктуры, образованные из органических жидкостей и представляющие собой нити, способные соединяться с антибиотиком- ципрофлоксацином. Этот комплекс обладает хорошими антимикробными свойствами относительно бактерий *B. subtilis* и *E. coli* (Behera B. et al., 2012).

Показана возможность сорбции некоторых антибиотиков на выше указанные сорбенты (ультрадисперсный графит, полианилин, УНТ и углеродные нанотрубки, покрытые полианилином). Изучение сорбции с помощью биологических объектов более простого, чем вирусы строения, например, антибиотики показало, что активность взаимодействия сорбентов с антибиотиками зависела от структуры как сорбентов, так и антибиотиков (Катруха Г.С., Тимофеева А.В., Буравцев В.Н. и др., 2009). Композиты - углеродные нанотрубки, покрытые полианилином, обладали большими гидрофобными свойствами, чем основание полианилина, гидрофобные антибиотики грамицидин S и тейкопланин A2 взаимодействуют с углеродными нанотрубками, покрытыми полианилином более интенсивно (Ivanova V.T., Katrukha G.S. et al., 2011). В процессе элюции с УНТ, покрытых полианилином, антибиотики элюировали за 1 час, с основания полианилина за 18 час. (Ivanova V. T., Sapurina I. Yu., Ivanov V. F., et al., 2009; Ivanova V.T., Katrukha G.S. et al., 2011). Многостенные углеродные нанотрубки типа «Таунит» оказались способны сорбировать ряд антибиотиков: грамицидин S, и тейкопланин A2, пеницилин G, бацитрацин, телломицин, этамицин, гризеверидин в течение 18 часов. Однако, возможность десорбции выявлена только для тейкопланина A2 и грамицидина S (выход составлял 86 и 65% соответственно, остальные практически не элюировали с данного сорбента (Тимофеева А.В., Ильина М.В., и др. 2013; M. V. P'ina, Timofeeva A. V. et al., 2012).

Важными свойствами сорбентов является эффективность сорбции и отсутствие токсичности для человека. В настоящее время существует много фильтров, которые устраняют бактерии из воды, но, когда речь идет о вирусах, мы сталкиваемся с проблемой размер пор, так как большинство вирусов имеют нано-размеры, и большинство современных систем фильтрации не способны очистить воду от вирусов. Поэтому идет

активный поиск новых сорбентов на основе новых наноматериалов. В конце XX века были получены новые углеродсодержащие материалы - детонационные материалы - шихта, наноалмазы, шихта, углеродные нанотрубки.

3.3 Наноалмазы, структура и свойства, перспектива использования в качестве сорбентов

Наноалмазы были впервые получены в 60-х годах истекшего столетия в СССР, однако широкое исследование закономерностей синтеза, особенностей структуры и свойств порошков наноалмаза, а также его практического применения были развернуты только в последние два десятилетия (Сакович Г.В. и др., 2011). Детонационные наноалмазы (ДНА) или ультрадисперсные алмазы можно рассматривать как специфический наноуглеродный материал, входящий в обширное и все более популярное семейство наноуглеродных кластеров, состоящее из фуллеренов, нанотрубок, наногрифта, «луковичной» формы углерода. ДНА – один из немногих наноматериалов, выпускаемый в странах СНГ и за рубежом (Китай, Япония, Южная Корея и другие страны), в масштабах тонн в год. Несмотря на большой объем, он еще недостаточно изучен. Одна из причин является изменение его химического состава в зависимости от условий синтеза и очистки. Кристаллы наноалмазов (2-10 нм) образуются обычно при взрыве смесей гексогена и тринитротолуола. Их получают из первичного продукта детонационного синтеза вещества – шихты, которая остается после взрыва на поверхности камер и затем снимается механически (скребки). Именно из нее путем различных методов очистки (кислотных, газовых и т.д.) получают наноалмазы. Наноалмаз не является чисто углеродным материалом, а сам углерод находится в нем одновременно в нескольких модификациях, и только одна из них соответствует структуре алмаза. Наноалмаз представляет собой особый тип алмазного материала, свойства которого в наибольшей степени определяются химическим состоянием его поверхности. Благодаря очистке происходит удаление не алмазных форм углерода с поверхности кристаллитов ДНА и удаления не углеродных примесей (Кулакова И.И., 2004). Блок-схема процесса получения ДНА представлена на рис.4 .

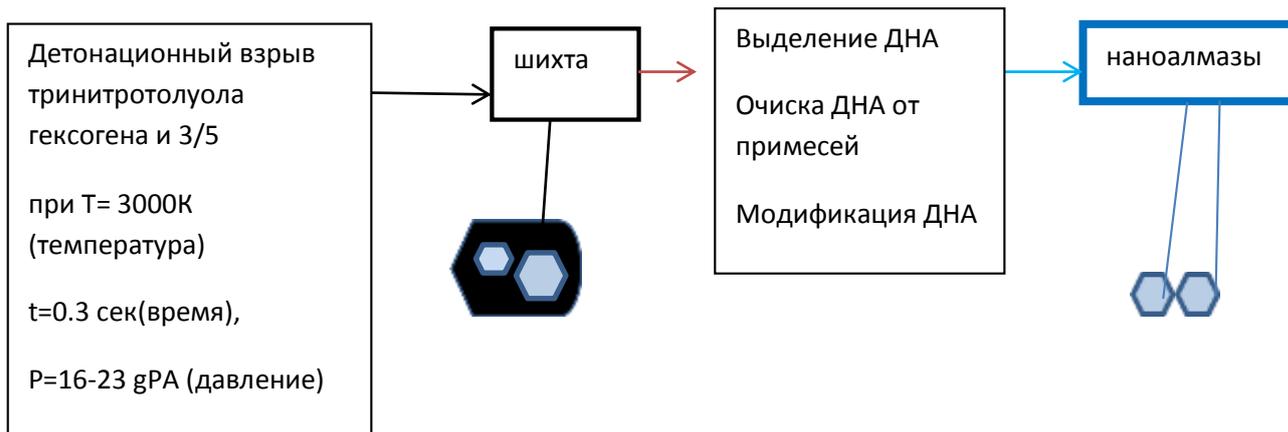


Рис. 4. Блок схема получения детонационного наноалмаза

На рис. 5 представлена лабораторная установка для получения ДНА. Следует отметить, что при промышленном производстве установка имеет значительно большие размеры. На фирме "Sinta" (Минск, Беларусь) она имеет вид цилиндра с высотой до 3 м и диаметром основания до 2 м.



Рис. 5. Лабораторная установка для получения детонационного наноалмаза

Очищенные ДНА отличаются от шихты по ряду параметров. Удельная поверхность шихты составляет $450 \text{ м}^2/\text{г}$, что существенно выше, чем удельная поверхность у наноалмазов, которая составляет примерно $300 \text{ м}^2/\text{г}$., кроме того имеются отличия и в элементном составе этих материалов. Существенные отличия поверхностных свойств

Анализ химического состава наноалмазов отражен в таблице 1. В случае кислорода (О) он может достигать 10% (Долматов В.Ю., 2001). На поверхности ДНА, выделенного из шихты, обнаруживаются различные функциональные группы. Это углеводородные группы (метиленовые, метильные); кислородсодержащие (гидроксильные, карбонильные, альдегидные; серо и азотсодержащие (сульфогруппы, нитрогруппы) и др.

Таблица 1

Химический состав наноалмазов

Элемент и его	Содержание %(масс)	Химическая форма элемента	Характеристика примеси
C _{общ}	80-88	Алмазный С (90-97%) Неалмазный С (3-10%)	Трудноудаляемый неалмазный углерод
О	10	Адсорбированные газы, вода, кислоты	Трудноудаляемые Летучие вещества
Н	0,5-1,0		
N	2-3		
Fe, Ti, Cr, Cu, K, Ca, Si, Pb и др.	0,5-8,0	Оксиды, соли, карбиды	Трудноудаляемые твердые вещества

Поверхность наноалмазов может быть изменена путем различных манипуляций, в результате чего процент определенных примесей может быть увеличен. Функциональные группы можно изменить при окислении, восстановлении, разрушении при температуре, удалить или присоединить к ним различные органические и неорганические молекулы (Кулакова И.И. 2004). Модификация ДНА может быть проведена на установке, представленной на рис. 7. Данные элементного анализа исходного и модифицированного воздухом и водородом наноалмаза представлены в таблице 2.

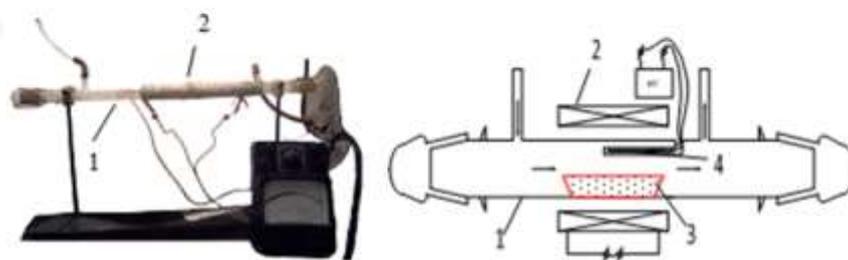


Фото (слева) и схема кварцевого реактора (справа) для химического модифицирования НА порошков в высокотемпературных газовых средах: 1 – кварцевый реактор, 2 – нагреватель, 3 – лодочка с образцом, 4 – термопара.

Рис.7. Схема и фото установки для химического для модифицирования порошков наноалмаза.

Таблица 2

Элементный состав модифицированного газами наноалмаза.*

Условия модифицирования	Содержание, % (масс.)			
	Углерод	Азот	Водород	Кислород + несгораемый остаток
Исходный образец	77,87	2,59	0,82	18,72
Воздух, 673 К, 5 ч	82,07	2,76	0,0	15,17
Водород, 1123 К, 7 ч	89,26	2,74	1,01	6,99

Примечание. Рассчитано по разности. Так как содержание несгораемого остатка в навесках было постоянным (D1% масс.), то значения, приведенные в этой колонке, характеризуют изменение именно содержания кислорода.

Количественный состав функционального покрова поверхности ДНА определяется методами кислотно-основного титрования и инфракрасной спектроскопии. При модифицировании образцов может наблюдаться изменение их окраски: при обработке воздухом они светлеют (выгорает неалмазный углерод). При обработке водородом они темнеют, что может быть обусловлено частичной графитизацией ДНА. При

термообработке в результате разложения, обмена, окисления изменяется поверхностный слой ДНА. В таблице 2 представлены данные исходного и модифицированного воздухом и водородом ДНА. При обработке воздухом окисляются исходные водородсодержащие группы. В результате водород отсутствует в составе модифицированного ДНА. При обработке водородом происходит восстановление поверхностных карбонильных групп до углеводородных и гидроксильных групп. В результате наблюдается уменьшение содержания кислорода и увеличение содержания водорода. В инфракрасных (ИК) спектрах могут наблюдаться полосы поглощения карбонильных групп ($1730-1790\text{ см}^{-1}$) и гидроксильных групп ($1640, 3400\text{ см}^{-1}$). Таким образом, ДНА после различных методов очистки и модификации отличаются по (ИК) спектрам (Кулакова И.И., 2004).

Первый этап в исследовании ДНА после их открытия состоял в изучении их физико-химических свойств и возможного применения в промышленности, например оптоэлектронных технике, солнечной энергетике, нанoeлектронике. Целью следующего этапа в изучении наноалмазов было исследования возможности их использования в биологии и медицине. Установлено, что соединенные в кластеры до 100 нм ДНА способны сорбировать лекарства и доставлять их к раковым клеткам (Adnan A., Lam R., Chen H et al., 2011). Показано, что наноалмазы способны взаимодействовать с белками (Бондарь В. С. и др., 2008). На момент начала наших исследований в научной литературе присутствовал патент США (Fujimura T. et al., 2009), в котором предлагалось использование детонационных алмазов как основание сорбентов для удаления вирусов ВИЧ и ДНК из растворов, конечная цель была создание вакцин анти ВИЧ. По сути, удаление биологических объектов проводили комплексами, состоящими из наноалмазов и полимерных молекул - лигандов, то есть эти комплексы являлись аналогами иммуносорбентов. В случае вируса в качестве переходного лиганда предлагается использовать конковалин А, который представляет собой лектин -карбогидрат связывающий растительный протеин, получаемый из особого вида фасоли - *Canavalia ensiformis*, которая произрастает в Бразилии и обладает сильной токсичностью. Конковалин А связывает определенные структуры в сахарах, соединяясь с разными рецепторами, содержащимися в манозных карбогидратах (Goldstein I.J., Poretz R.D., 1986). Большим достоинством наноалмазов является низкая токсичность для живых клеток и животных (Пузырь А.П., Бондарь В.С., Селимханова З.Ю. и др., 2004). Эти результаты следует рассматривать как важный начальный этап в исследовании токсических свойств ДНА материалов. Для практического применения наночастиц в биологии и медицины

необходимо проведение всесторонних исследований их на токсичность как на различных культурах клеток *in vitro*, так и на лабораторных животных *in vivo*.

3.4. Влияние наночастиц на клетки *in vivo* и *in vitro*

Нанотоксикология – это молодая наука, один из первых симпозиумов, посвященных результатам исследований в этом направлении, состоялся в Амстердаме, Голландия в 2013 году. Дело в том, что после создания наночастиц следовал этап изучения физико-химических свойств и их возможное применение в различных сферах человеческой деятельности. Изучение биологических свойств наночастиц и возможность их применения в биологии и медицине как задача сформировалась позднее, на следующем этапе их исследования. Именно этим объясняется небольшое число работ по токсикологии наночастиц в том числе и для ДНА материалов.

Обзор данных, приведенных в работе De Stefano D. и др. (2012) говорит о том, что на свойства наночастиц оказывает существенное влияние степень их агрегации. Агрегированные наноматериалы могут аккумулироваться в клетках или в органах, что в некоторых случаях может приводить к разрушению в клетках также как и не агрегированные материалы. В настоящее время неизвестно, какие факторы могут оказывать доминирующее влияние на клетки. Возможно, что это совокупность разных факторов. В литературе имеется на этот счет много противоречивых результатов. Токсичность частиц может быть вызвана композициями, размерами, формой, поверхностным зарядом, модификацией используемых частиц. Кроме того, на результаты и их интерпретацию оказывают влияние использование различных биологических моделей *in vivo* и *in vitro*, исследования, проведенные различными методами, методы оценки состояния клетки, концентрации наночастиц и времени воздействия их на клетки. В силу этого крайне важно проведение исследований по многим направлениям. Результаты накопления и анализа совокупных данных позволят получить точную картину о токсических свойствах данного материала.

Резюме к главе 3

В начале главы определены разные виды сорбции, краткий исторический обзор об использовании сорбентов в прошлом и возобновлении интереса к ним в 20-м веке. Приведены данные о сорбции вирусов гриппа, полиовируса, коксаки, рото- и коронавирусы на сорбентах разной природы, в том числе углеродных сорбентах и полимерных сорбентах.

Отмечено, что сорбенты могут быть использованы для адресной доставки лекарств, ферментов, вакцин в организмы животных и человека. На основании литературных данных

Глава 4. Взаимодействие белков, нуклеиновых кислот, вирусов с материалами, содержащими Ag; использование препаратов в медицине, биологии и для дезинфекции воды; исследования их токсичности

Одно из направлений борьбы с вирусными инфекциями является дезактивация возбудителей. Наиболее известными веществами, используемые в настоящее время, являются серебро и его соединения, хлор и его соединения, озон и другие вещества.

История использования серебра для обеззараживания воды и для лечебных целей насчитывает порядка 2500 лет. Использование серебряных сосудов для безопасного хранения жидкостей было известно с давних времен. В 550 – 529 гг. до нашей эры. Сугус Great, царем Персии было установлено, что безопасное долговременное хранение воды и водных растворов должно осуществляться в серебряных сосудах [116]. В 78 г. нашей эры римский ученый Плиний Старший писал, что обожженное серебро обладало целебными свойствами при добавлении его в составе пластырей для перевязки ран [149]. В 1884 г. Ф. Крит предложил использовать 1% раствор для предотвращения инфекций глаз, вызванных бактериальным возбудителем – гонококком. Впервые серьезные научные исследования серебра как антисептика были начаты в 1887г. Von Behring, который обнаружил, что нитрат серебра за 48 часов разрушает споры сибирской язвы [83].

Об антибактериальных свойствах серебра и применении этого эффекта в медицине имеется достаточно число публикаций [83]. Недавние исследования показали, что биохимические реакции йонного серебра приводят к инактивации бактерий, грибов,

протозоа, спирохет, вирусов, протеиновых мембран [156]. Предложено три механизма, с помощью которых серебро взаимодействует с микроорганизмами:

1. Разрушение микроорганизмов посредством окисления, катализируемого серебром;
2. Разрушение транспорта электрона в бактериях с помощью одновалентного серебра, и/или предотвращение раскручивания ДНК в вирусах с заменой ионов водорода одновалентным серебром.
3. Разрушение бактерий и вирусов с помощью дву- и тривалентного серебра.

Установлено, что атомарный кислород, адсорбированный на поверхности серебра, мгновенно окисляет органические вещества при контакте. Показано, что взаимодействие Ag с тиоловыми группами ферментов играют важную роль в инактивации бактерий [71]. Суммарный кислород, адсорбированный на серебре, в водной фазе реагирует с парой (-S-H-) группой, на поверхности бактерий или вирусов, заменяя атом водорода в паре атомов серы на R-S-S-R – связи, которая блокирует дыхательный и электронный транспорт [100]. При исследовании ионов Ag с серосодержащими аминокислотами и цистеинсодержащими пептидами обнаружено, что наибольшим сродством к ионам Ag обладают цистеин и гомоцистеин [51]. Спектроскопические исследования взаимодействия Ag с нуклеиновыми кислотами в водных растворах показали, что при постоянной концентрации ДНК или РНК и различных концентрациях Ag формирует комплексы с ДНК путем связывания катиона с гуанином (при низкой концентрации) и с аденином (при более высоких концентрациях). Взаимодействие Ag не происходит с боковыми фосфатными группами [88].

В настоящее время нет больших исследований, посвященных инактивации вирусов с помощью Ag. В структуре вирусов отсутствует в отличие от бактерий клеточная мембранная оболочка. Однако наличие в вирионных белках групп с (-S-H-) связью говорит о том, что реакция с Ag может протекать у вирионных белков по механизму, предложенному для бактериальных белков. Известно, что соединение серебра с сульфадиазином, эффективно против герпеса и везикулярного стоматита [175].

Исследования наноматериалов, содержащих серебро, ставят своей целью как создание новых антимикробных материалов и усиление антимикробных свойств существующих, так и создание новых лекарств против известных возбудителей в связи с проблемой резистентности многих патогенов к современным лекарствам. При этом основными объектами исследования являются микропатогены не вирусной природы. Препараты, содержащие наночастицы серебра, которые подавляют активность белков плазмодия путем

взаимодействия с тиоловыми (SH) группами этих белков, предлагаются использовать против заболеваний малярией. Интерес к соединениям Ag, вызван возникновением у *Plasmodium falciparum* резистентности к лечебным препаратам [139].

В связи с развитием резистентности к грамположительным и грамотрицательным бактериям и грибковым штаммам предлагается использовать серебросодержащие гидроапатитные наночастицы $\text{Ca}_{10}\text{-x.Ag}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ [151] .

Гидроксиапатит, допированный серебром, является многообещающим средством для устойчивой тканевой регенерации из-за антибактериальных свойств серебра и остеопроводимости гидроапатита

Композиционные пленки, содержащие серебро и полимерные матрицы (полисахариды), предлагается использовать в качестве упаковочного материала для пищевых продуктов , т.к. по данным исследователей такие пленки разрушают споры грибка *Aspergillus niger*, поражающие пищевые продукты. [148].

Показано, что наночастицы серебра, введенные в ткани из хлопка (100%) или ткань, содержащая полиэстер вискоза 50/50 и которые в производстве одежды обладают антибактериальными свойствами относительно грамположительных и грамотрицательных бактерий-*Staphylococcus* и *Esherichia coli* [142] .

Композиты –грибки, поражающих растений, соединенные с наночастицами серебра, обладали антимикробной активностью против патогенов человека, таких как *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhy* , *Esherichia coli*, *Candida albicans* [112]. Наночастицы, представляющие собой шарики с ядром $\text{Ag} @ \text{SiO}_2$, покрытые полимером, и соединенные с флуоресцентной меткой, предлагается использовать как метку при изучении клеток рака легких. Установлено, что наличие Ag внутри ядра увеличивает интенсивность флуоресценции. Данные частицы монодисперсны и обладают низкой токсичностью.

Нанокompозиты, содержащие серебро и полимер -полиэтилбутилакрилат, предлагается использовать в качестве метки при биодетекции в рамановской спектроскопии [106]. Примером промышленного использования антибактериальных свойства серебра являются водоочистительные приборы, которые используются уже в 20 веке для предотвращения бактериального загрязнения воды. С этой целью в небольших установках соединения серебра включают в материалы фильтров или проводят обработку воды ионами серебра. Исторически серебро использовали как в металлическом, так в ионном виде. Кульский П.А. в 1987 показал, что серебряная вода активнее хлора, хлорной извести, гипохлорита натрия

и других сильных окислителей, в 1750 раз сильнее карболовой кислоты и в 3.5 раза - сулемы (в одинаковых концентрациях). Этот эффект был использован для консервирования питьевой воды ионаторами ЛК-28(ИЭМ-50)– аппаратами, обеспечивающими анодное растворение серебра в воде. В СССР ионаторами было оснащено свыше 70 крупных морских судов черноморского, балтийского и мурманского флотов [84]. Кроме того, аналогичное оборудование использовалось для космических полетов различной продолжительности. На американских судах использовалась комбинированная очистка воды целлюлозой и ионным серебром до 0,025 мг/ л. [83].

Серебро для очистки воды применяется только при наличии специальной технологии, поскольку его предельно допустимая концентрация в питьевой воде не должна превышать 0.05 мг/л.

Десятки тысяч бассейнов для плавания в Европе и США оборудованы серебро-медь ионными генераторами, что позволяет уменьшить существенно присутствие хлора или вообще его исключить из- за аллергических реакций человеческого организма на хлор.

О токсичности серебра написано большое количество статей и обзоров. В России первые работы на эту тему были опубликованы в начале 20-го века [62]. Введение разными способами серебра в организм приводит к следующему: при втирании и подкожном введении серебро фиксируется кожей и клетчаткой, при внутривенном введении серебро быстро удаляется из организма. За 100 лет клинических исследований не было зарегистрировано ни одного смертного случая, обусловленного действием серебра и его соединений [10]. Однако, серебро в ионной растворимой форме токсично для водных организмов, в то же время для млекопитающих токсичность серебра низка, при этом нет данных о мутагенной или канцерогенной активности соединений серебра [114,115,154]. Токсичность серебросодержащих наночастиц зависела не только от времени контакта, но и от дозы. На клетках пуповины вены человеческого эмбриона при исследовании методом электронной микроскопии, ультрафиолетовой спектроскопии, а также с помощью микропроточной установки установлено, что наночастицы имеют низкую цитотоксичность и гомогенное распределение частиц в культуральной среде за время наблюдения биологических объектов [107].

Резюме к главе 4

В тексте главы приведен краткий обзор литературных данных об истории использовании серебра в лечебных целях и в качестве дезсредства для получения питьевой

воды. На основании изучения взаимодействия серебра с химическими соединениями и с бактериями описаны возможные механизмы, обуславливающие действие серебра на биологические объекты. Приведены данные об использовании серебра для очистки воды в промышленности, при получении лечебных и антибактериальных материалов, в том числе и для одежды. Обзор данных позволяет сделать вывод, что, несмотря на многочисленные публикации о воздействии серебра на бактерии и значительно меньшие информации о воздействии серебра на грибы, в литературе имеются единичные работы о воздействии серебра на вирусы. Это дало основание для проведения настоящего исследования по взаимодействию серебрясодержащих материалов (композитов) на вирусы.

Заключение ко всем главам литературного обзора

В главах лит. обзора были рассмотрены распространение, свойства и строение разных вирусов: гриппа, полиомиелита, играющих значительную роль в жизнедеятельности человека и имеющие водный путь передачи. Чтобы обеспечить безопасность используемой воды, необходимо создание фильтров, способных очищать воду не только от механических примесей и химических элементов, а также и от патогенной микрофлоры. В связи с этим были изучены различные материалы, полученные в разное время, иммуносорбенты, способы их получения, а также их свойства и отобраны наиболее перспективные в качестве сорбентов. Среди них были вещества на основе углерода и полимеров, а также композиты, полученные с использованием нанотехнологий и обладающие новыми свойствами. Направлением исследования настоящей работы являлось изучение взаимодействия выбранных материалов с разными вирусами для определения возможности использования их в качестве сорбентов для очистки воды и других жидкостей от вирусов, белков и ДНК; в лечебно – профилактических целях как подход для производственных целей - концентрирования вирусов при наработке гриппозных вакцин и иммунопрепаратов; для биосенсоров в тест- системах.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Глава 1. Материалы и методы исследования

1.1. Вирусы гриппа А и В

Использовано 9 эталонных и 6 эпидемических штаммов вирусов гриппа типов А и В, циркулировавших в России и в мире в период с 1999г. по 2013г.; в том числе 4 пандемические штаммы А(Н1N1)pdm09, выделенные в лаборатории этиологии и эпидемиологии гриппа (таблица 3). Вирусы были получены из Государственной коллекции вирусов, из коллекции вирусов лаборатории этиологии и эпидемиологии гриппа ФГБУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского МЗ РФ, а также из справочных центров ВОЗ.

Таблица 3

Вирусы гриппа А и В, использованные в работе

№	Тип вируса	Международное название штаммов
1	А(Н1N1)	А/Новая Каледония/20/99*
2	А(Н3N2)	А/Висконсин/67/05
3		А/Перт/16/09*
4		А/Виктория /361/11 *
5		А/IV- Moscow/01/2009sw
6	А(Н1N1)pdm09	А/Калифорния/04/09*
7		А/Южная Каролина /02/2010*
8		А/IV- Moscow/34/2011
9		А/IV- Moscow/ /37/2011
10		А/IV- Moscow/ /38/2011
11	В/Ямагата/16/88	В/Флорида/04/06*
12	линия	В/Сичуань/379/99 *
13		В/Бангладеш/3333/07*
14	В/Виктория/2/87	В/Москва/03/2010
15	линия	В/Москва/06/2011
17	А(Н5N2)	А/Утка/Приморье/2621/01
18	А(Н5N1) реассортант R22/II	А/ Утка/Приморье//2621/01 х PR/8/34
19	А(Н5N2) реассортант R22	А/ Утка/Приморье/ 2621/01 х PR/8/34

Примечание* эталонные штаммы

Вирус гриппа птиц А/Утка/Приморье /2621/01 (H5N2) и 2 реассортанта вируса гриппа птиц и штамма А/PR/8/34: R22/II А(H5N1), R22 А(H5N2) были любезно предоставлены академиком РАМН, д.м.н. проф. Н.В. Кавериным (лаборатория физиологии ФГБУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского МЗ РФ).

1.2. Вирус полиомиелита, вакцинный штамм Сэбина тип 1

Вирус полиомиелита предоставлен д.м.н., проф. Носиком Н.Н. (лаборатория онтогенеза, ФГБУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского МЗ РФ)

1.3. Клеточные линии: Клетки культуры ткани MDCK предоставлена из Международного центра по гриппу, контролю и предотвращению заболеваемости- CDC&P, г. Атланта, США, сотрудничающего с центрами ВОЗ. Клетки культуры ткани Vero получены из коллекции клеточных культур ФГБУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского МЗ РФ.

1.4. Сорбенты: для исследования было отобрано 17 наноматериалов. Все в виде порошков. Среди них наибольшая группа состояла: из 13 ДНА содержащих сорбентов и их композитов с ПАНИ см табл. 2. Кроме того в список изученных сорбентов входили углеродные нанотрубки, полианилиновые нанотрубки и композиты : полианилиновые нанотрубки , содержащие Ag 30% и -полианилиновые гранулы, содержащие Ag 70%.

1.4.1 неорганические - шихта и детонационные наноалмазы были получены от предприятия Синта (Минск, Беларусь). В данной работе изучались ДНА после их выделения из шихты разными методами, а также после модификации их поверхностей. Модифицирование наноалмазов осуществляли под руководством д.х.н. Б.В. Спицына в Институте физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва по методу [168]. Наноалмазсодержащие сорбенты, полученные разными методами, представлены в табл. 4. Использовали также ДНА, поверхность которых подвергалась целенаправленному изменению путем модифицирования, включающего обработку поверхности наноалмазов химически активными жидкими и газообразными веществами при повышенных температурах.

1.4.2. композиты ДНАсодержащих материалов с полианилином получены согласно [66]. Они представляли собой ДНА материалы, покрытые ПАНИ.

Список детонационных ДНА-содержащих сорбентов, использованных в работе

№	Обозначение	Получение
1	Шихта	извлекается со стен взрывной камеры после взрыва смеси ТНТ /гексоген = 50/50, подвергается нагреву при в течение 1 ч. температуре $T = 120^{\circ}\text{C}$ для очистки от летучих примесей.
2	ДНАгазфаз,	Детонационные ДНА, полученные в результате газофазовой (газфаз) очистки шихты, в парах азотной кислоты при температуре до 300°C , в ходе чего происходит окисление неалмазных форм углерода. Последующая очистка порошка ДНА от неуглеродных примесей проводится в токе осушенного хлористого водорода при температуре 850°C , рН суспензий такого ДНА с концентрацией 1 г/л составляет 5.
3	ДНАгазфаз Т	Детонационные ДНАгазфаз, прогретые при 450°C в течение 1 часа
4	ДНАжидфаз,	Детонационные ДНА, полученные в результате жидкофазной (жидфаз) очистки шихты, в разбавленной азотной кислоте при давлении ~ 80 атм и температуре $\sim 220^{\circ}\text{C}$ с последующей многостадийной отмывкой порошка ДНА от кислоты, использованной в процессе очистки шихты. рН суспензии составляет 6,2 при концентрации ДНА 1г/л.
5	ДНАграф ₁₀₀₀ ,	Детонационные графитизированные ДНА получаемые из ДНАжидфаз, (подвергнутые частичному фазовому переходу алмаз – графит) в течение 1 ч. нагревом в аргоне высокой чистоты при $T = 1000^{\circ}\text{C}$.
6	ДНАграф ₉₀₀ ,	Детонационные графитизированные ДНА, получаемые из ДНАжидфаз, (подвергнутые частичному фазовому переходу алмаз – графит) в течение 1 ч. нагревом в аргоне высокой чистоты при $T = 900^{\circ}\text{C}$.
7	ДНАграф ₈₀₀ ,	Детонационные графитизированные ДНА, получаемые из ДНАжидфаз, (подвергнутые частичному фазовому переходу алмаз – графит) в течение 1 ч. нагревом в аргоне высокой чистоты при $T = 800^{\circ}\text{C}$.
8	ДНАграф ₆₀₀ ,	Детонационные графитизированные ДНА, получаемые из ДНАжидфаз, (подвергнутые частичному фазовому переходу алмаз – графит) в течение 1 ч. нагревом в аргоне высокой чистоты при $T = 600^{\circ}\text{C}$.
9	ДНАхл,	Детонационные хлорированные наноалмазы которые получены нагревом ДНАжидфаз в парогазовой смеси CCl_4/Ar , содержащей CCl_4 в 3 мол.%, при температуре $T = 450^{\circ}\text{C}$ в течение 2 ч.
10	ДНАамин	Детонационный аминированный ДНАамин получен из ДНАхл нагревом в аммиаке высокой чистоты при давлении 1 атм. в течение 1 часа при температуре $T = 400^{\circ}\text{C}$.
11	ДНА Т +ПАНИ	В пробирку с ДНА добавляли анилин с соляной кислотой, диспергировали при 4°C при перемешивании, добавляли окислитель - персульфат аммония, в присутствии окислителя проходила реакция
12	шихта+ПАНИ1	полимеризации, комплекс ДНА или шихта +полианилин (ПАНИ)
13	шихта+ПАНИ2	выпадал в осадок, его отмывали последовательно ацетоном и спиртом. покрытые ПАНИ.

1.4.3 углеродные нанотрубки многостенные углеродные нанотрубки, полученные методом каталитического пиролиза углеводородов и очищенные от катализатора, приобретены у фирмы "ТАУНИТ" г. Тамбов.

1.4.4 органические -полианилиновые трубки

Нанотрубки ПАНИ, получены методом окислительной полимеризации анилина под действием пероксидисульфата аммония в присутствии уксусной кислоты [65, 183].

1.4.5 композиты -полианилиновые нанотрубки с содержанием Ag30% и полианилиновые гранулы с содержанием Ag 70% – композиционный сорбент ПАНИ-Ag получен путем модификации нанотрубок ПАНИ, либо ПАНИ гранулярной морфологии частицами серебра [173]. Нанесение серебра проходило в результате взаимодействия ПАНИ с азотнокислым серебром $AgNO_3$ в водной среде. Содержание серебра определялось по приросту массы композита и составляло от 15 до 30 весовых процентов. Серебро восстанавливалось на поверхности ПАНИ в виде частиц диаметром 30-50 нм, либо более крупных образований.

Композиты приготовлены в Учреждении Российской Академии Наук Институте высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург, к.х.н. Сапуриной И. Ю.

1.5. Иммунные сыворотки к эталонным штаммам вируса гриппа А/ Южная Каролина /02/2010 А(H1N1) pdm09), вирусу гриппа В/Бангладеш/3333/07 были приготовлены в лаборатории этиологии и эпидемиологии гриппа НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского МЗ РФ. Иммунизацию животных (крыс) проводили аллантоисным вирусом внутривентриально по 5 мл/животное. Проводили 3 иммунизации. Интервал между иммунизациями составлял 2 недели. Через 5 дней после последнего заражения производили забор крови.

1.6 Культивирование вирусов гриппа проводили на 10-11 дневных развивающихся куриных эмбрионах (КЭ) по методу [18]. Большинство эпидемических штаммов прошло не более 1-2 пассажей.

1.7 Культивирование вирусов гриппа на монослое клеток культуры ткани MDCK осуществляли по методу [100]. Для определения вируса использовали реакцию РГА.

1.8. Реакция гемагглютинации (РГА). Гемагглютинирующую (ГА) активность вирусов гриппа в аллантоисной жидкости КЭ, в культуральной жидкости, в растворах до и после сорбции определяли в РГА по общепринятой методике, рекомендованной ВОЗ с использованием 0,75% взвеси эритроцитов 0(I) группы крови человека. За гемагглютинирующий (ГА) титр вируса принимали последнее разведение, показавшее положительный результат [13].

1.9. Определение инфекционного титра вирусов гриппа в растворах до и после сорбции на сорбенты проводили в двух системах: 1-ая-система- 9-10 дневные куриные эмбрионы. При их заражении используют 10 кратные разведения в ФР вирусосодержащей жидкости от 10^{-1} до 10^{-8} до и после взаимодействия с сорбентом. После вскрытия зараженных эмбрионов разными разведениями вируса определяли ГА титр аллантоисной жидкости. Инфекционный титр вируса – разведение вируса, при котором в аллантоисной жидкости в 50 % КЭ обнаруживается гемагглютинирующая активность вируса, в остальных КЭ она не обнаруживается. 2-ая используемая система - культура клеток MDCK в культуральной питательной среде с антибиотиками. Использовали 10 кратные разведения в ФР вирусосодержащей жидкости от 10^{-1} до 10^{-5} . Инфекционный титр рассчитывали по формуле [157].

1.10. Реакция торможения гемагглютинации (РТГА) использовали для определения наличия антител в сыворотках крыс, иммунизированных иммуносорбентом (ДНА +вирус А(Н1N1) и оценки взаимодействия сорбентов с белками невирусной природы – иммуноглобулинами, содержащимися в иммунных сыворотках, полученных к вирусам гриппа А и В проводили с использованием, с эталонных штаммов, циркулировавших в этот период в мире и иммунных сывороток, приготовленных к ним в ЦЭЭГ, и из диагностических наборов ВОЗ. Реакцию ставили по общепринятому методу, рекомендованному ВОЗ, и в методических указаниях [48]. Иммунные сыворотки, полученные к цельным вирионам, обрабатывали нейраминидазой нехолерного вибриона (RDE). Интенсивность сорбции оценивали по разнице в титрах антител в иммунных сыворотках до и после их контакта с сорбентом. Уменьшение титра антител в растворе в 4 раза после контакта с сорбентом с достоверностью свидетельствовало о том, что часть антител остались на сорбенте, образуя иммуносорбент.

1.11. Получение концентрированных препаратов вирусов гриппа проводили дифференциальным центрифугированием в ультрацентрифуге фирмы Бекман L5-50,

Для осаждения вируса из аллантаоисной жидкости использовали угловой ротор Ti-35, скорость центрифугирования составляла $v=25000$ об./мин., время центрифугирования $t=1$ час. Вирус ресуспензировали в ФР и хранили при -20°C .

1.12. Метод изучения взаимодействия биологических материалов с сорбентами.

Процедуру сорбции вирусов, белков и ДНК на сорбенты проводили аналогично разработанной ранее для вирусов [28]. Блок схема метода приведена на рис.8. Сорбент (от 1 до 10 мг) добавляли к анализируемому объекту (вирусосодержащему, антителсодержащему или ДНК содержащему раствору, объемом $V=150, 200, 300$ мкл) и емкость с раствором помещали на шейкер для активного контакта аналита с сорбентом в течение 20- 60 мин. С сорбентами не проводили до начала опыта стерилизацию. После контакта вируса или фрагментов ДНК с сорбентом смесь центрифугировали при 2 000 об/мин в течение 4 мин, надосадочную жидкость исследовали на наличие аналита в различных реакциях: вируса в РГА, или ДНК при электрофорезе в агарозе и так далее.

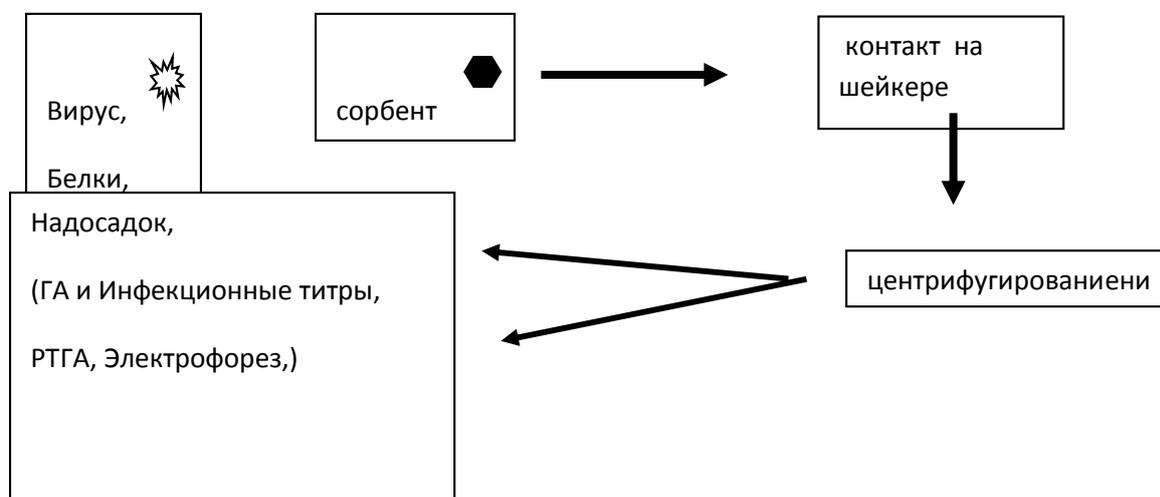


Рис.8. Общая схема сорбции биологических объектов (вирусов) на сорбенты

В последующем осадок, содержащий сорбент и иммобилизованный вирус, т.е. иммуносорбент, исследовали в экспериментах по взаимодействию с гомологичными антителами, по десорбции вируса, по сорбции антител на иммуносорбент, на инфекционную активность. Надосадок использовали для изучения гемагглютинирующего титра вирусов после сорбции и инфекционного титра вируса.

1.13. Электрофорез белков в полиакриламидном геле. Препараты белка - альбумина до и после сорбции на сорбенты анализировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле, в 12 или 15% ПААГ в не восстанавливающих условиях по методу [131].

Растворы для электрофореза

Таблица 5 (1-9)

Раствор мономеров: готовится 30 % (АА) Stock solution

(АА /МБА = 33/1).

АА: акриламид;

1. МБА: метилен-бис-акриламид.

Дистил. вода	50 мл	100 мл
1. Акриламид	15 г	30 г
2. Бисакриламид	0,4 г	0,8 г

2. Буфер 5 x L (Stock solution для разделяющего геля). рН 8,8.

1. Трис	11,35 г
2. рН 8,8 доводят 10 н НСІ*(примерно 2,7 мл)	
3. Дистил. вода	Доводят до50 мл
4. SDS	0,25 г

*10 н НСІ = 10 мл Н₂О + 1 мл НСІ_{конц.}**3. Буфер 5 x U (Stock solution для концентрирующего геля). рН 6,8**

1. Трис	3,8 г
2. рН 6,8 доводят 10 н НСІ*(примерно 3 мл)	
3. Дистил. вода	Довести до 50 мл
4. SDS	0,25 г

4. Буфер образца x 2. рН 6,8 (не доводится).

Ингредиенты	Количество	Окончательная конц. в растворе

1. Буфер 5 x U	0,5 мл	0,0625 M
2. SDS (10% водный)	1мл	2%
3. Мочевина	1,8 г	6 M
4. Глицерин	1 мл	20%
5. Дистил. вода	Доводят до 5 мл	~0,5 мл
6. Бромфеноловый синий	10 мкл	0,01 %

5. 10% PSA.

Ингредиенты	1 гель	1-2 гель
1. H ₂ O	200 мкл	1 мл
2. PSA	20 мг	100 мг

6. Электродный буфер x 10, pH 8,3 (не доводится)

Ингредиенты	Количество
1. Трис	15,15 г
2. Глицин	72,06 г
3. SDS	5 г
4. Дистил. вода	Довести до 500 мл

Перед использованием развести дистил. водой в 10 раз!

7. 12 % разделяющий гель

Ингредиенты	1 гель	2 геля
1. H ₂ O	4,2 мл	8,4 мл
2. Stock AA / МБА	3 мл	6 мл
3. Буфер 5 x L	2,5 мл	5 мл

(разделяющий), pH 8,8		
4. 10% PSA	30 мкл	60 мкл
5. TEMED	20 мкл	40 мкл

8. 5 % концентрирующий гель

Ингредиенты	1 гель	2 геля
1. H ₂ O	2,475 мл	4,95 мл
2. Stock AA / МБА	0,625 мл	1,25 мл
3. Буфер 5 x U (концентрирующий), pH 6,8	1,6 мл	3,2 мл
4. 10% PSA	30 мкл	60 мкл
5. TEMED	20 мкл	40 мкл

9. Пробка между стеклами для 1-2 гелей.

12% гель без 1% PSA и TEMED	1 мл
10% PSA	20 мкл
TEMED	10 мкл

1.14. Получение фрагментов ДНК Ампликоны - фрагменты ДНК получены при амплифицировании РНК современных штаммов вирусов гриппа А и В в полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием тест – систем фирм “ДНК технология” и “Амплисенс” согласно инструкциям, прилагаемым к тест системам.

1.15. Электрофорез фрагментов кДНК использовали для определения их наличия в растворах до и после взаимодействия с выбранными сорбентами [55]. Электрофорез проводили в 2% агарозном геле в течение 1,5 часа при напряжении 80V, в качестве положительного контроля использовались контрольные образцы входящую в тест-системы.

Реагенты:

Агароза Analitical Grad ,

Продажный -10 кратный буфер Трис (на котором разводится агароза и он же разведенный является электродным). Используется многократно, пока не пожелтеет. Для работы он разводится в 10 раз (1+9). В буфер добавляется раствор этидиум бромид (краска для ДНК) продажный, разведенный препарат хранится в холодильнике.

Приготовление буфера:

0.5 л - 50 мл TBE +450 дист вода +20 мкл этидиум бромид

Приготовление агарозы: 10 мл 1-о кратного буфера + 2 г агарозы

(этидиум бромид не добавляют отдельно в агарозу, поскольку агароза разводится на буфере с этидиум бромидом). Агароза в буфере разводится в буфере затем смешиваются и разогревается в свч печи затем заливка на горизонтальные пластины

Приготовление образца

Объем конечный 10 мкл,(6 мкл образца + 3 мкл красителя- 6xDNA Loading Fermentas хранится в центрифужной и в морозилке в ПЦР-ной в верхней камере в пакете, где все препараты этой фирмы Fermentas). Пробы помещают на парафин и затем в каналы, вырезанные в агарозном геле , приготовленном для электрофореза.

Использовали препараты, полученные от фирмы ДНК технология к вирусу А/Перт//16/09 – к М1 белку и к М1 белку штамма В/Москва/6/11. Часть препаратов получено от фирмы Амплисенс.

1.16. Влияние сорбентов на биологические объекты *in vitro* изучали тремя способами. Для качественной оценки изменения клеточного слоя культуры клеток MDCK при добавлении различных концентраций сорбентов к клеткам. Начальная концентрация сорбента составляла $C = 10$ мг/мл. 10 кратные разведения суспензий сорбентов добавляли в клетки, далее контакт при $37^{\circ}C$ в течение 48 часов в термостате. Состояние монослоя определяли с помощью инвертированного светового микроскопа Olympus. Разрыв монослоя или его отсутствие свидетельствовало о токсичном влиянии исследуемых сорбентов в данном разведении на выбранные клетки по сравнению с контрольными клетками, не содержащими сорбентов. Во втором методе после контакта с сорбентами в лунки добавляли вирус гриппа и после контакта в термостате оценивали ЦПД и определяли ГА активность растворов в лунках.

Третий метод -МТТ-тест. Реактив МТТ – тиазолий синий тетразолин бромид (3-(4.5-диметилтиазол-2 ил)-2.5-дифенилтетразолий бромид). Метод основан на способности дегидрогеназы митохондрий активных клеток превращать неокрашенный МТТ в окрашенные кристаллы формазана. Содержание формазана оценивали по оптической плотности растворов, которую определяли с помощью ридера при длине волны $\lambda = 540$ нм. Количество выживших клеток рассчитывали в процентах от контроля, котором являлись клетки без добавления препарата [12, 68]

1.17. Влияние сорбентов на биологические объекты *in vivo* изучали на модели лабораторных животных – белых крысах. Одноразовая доза введения препарата составляла 3 мг/животное, объем суспензии физиологического раствора (ФР) равен $V=1.2$ мл. Препарат вводили трижды внутрибрюшинно с интервалом три недели. Были исследованы 2 вида сорбентов: 1.иммуносорбенты - комплексы ДНА содержащий концентрированный вирус А/Южная Каролина/02/2010 (H1N1)pdm09, контролем были аллантоисные вирусы гриппа А/Южная Каролина/02/2010 (H1N1)pdm09 и вирус В/Бангладеш/3333/07, 2. полианилиновые нанотрубки ПАНИ без и с содержанием Ag 30%, в качестве контроля аллантоисный вирус А (H3N2) и ФР.

Перед вскрытием животных осуществляли замер веса крыс в исследуемой и контрольной группах. Далее осуществляли забор крови от каждого животного. Затем следовало определение титра антител к вирусу гриппа в составе иммуносорбента в случае иммунизации крыс иммуносорбентами. В обоих случаях (введения иммуносорбентов или разных видов Пани нанотрубок) проводили определение формулы крови как у животных получивших препараты, так и у контрольных животных.

1. 18. Определение формулы крови проводили до и после введения препаратов. В мазке крови, по методу Романовского-Гимза определяли нейтрофилы, моноциты, лимфоциты, эозинофилы, которые различаются по величине, форме ядра и окраске. Препарат просматривали под микроскопом из расчета 200 клеток, далее вычисляли процент исследуемых клеток. Идентификация клеток проводится при использовании фотографий клеток согласно [2]. Работа проводилась совместно с кбн внс Исаевой Е.И. Институт вирусологии Д.И.Ивановского Минздрав РФ.

1.19 .Электронную микроскопию выполняли совместно с д.б.н., проф. Манькиным А.А. (ФГБУ НИИ вирусологии МЗ РФ) и кхн ст.н.с Сапуриной И.Ю. Электронно-

микроскопические исследования выполняли с помощью сканирующего и просвечивающего микроскопов SUPR -55VP Zeiss, Germany и JSPM-5400 JEOL, Japan. Негативное контрастирование препаратов осуществляли с помощью 2% водорастворимой фосфорно-вольфрамовой кислоты, pH=6,0 (ФВК) и 2% водного раствора уранилацетата.

1.20. Статистическую обработку результатов проводили стандартным методом Стьюдента, который включал оценку значений оптической плотности растворов при изучении цитотоксичности сорбентов методом МТТ: среднего геометрического титра, средних квадратичных отклонений.

1.21 Элементный анализ ДНА материалов проводили в Институте биоорганической химии РАН, Москва **методом лазерной масс-спектрологии** на анализаторе фирмы «Carlo Erba» Италия, модель EA-1105. Этот метод позволял оценивать химический атомный состав наноалмазных материалов. Регистрация йонов осуществляется электрическими методами, в масс-спектрографах - по потемнению фоточувствительного слоя [74].

1.22 Инфракрасная спектроскопия (ИК спектроскопия). Этот метод использовался для быстрого выявления различий в структуре ДНА материалов. Число полос поглощения в спектре ИК, их положение, ширина и форма определяется структурой и химическим составом поглощающего вещества (ФЭС, 1983, С.226-227). ИК-спектры регистрировались на приставке НПВО (ATR, кристалл ZnSe), помещенной в кюветное отделение ИК-фурье вакуумного спектрометра IFS 66v/s фирмы Брукер, США, образцы выкладывали на кристалл, прижимались до упора, регистрировали ИК-спектр, обработка спектров проводили в программном пакете OPUS.

Глава 2. Взаимодействие вирусов гриппа и фрагментов ДНК с наноалмазными и полимерными материалами

Целью работы, изложенной в данной главе, являлось исследование способности ряда новых современных материалов различной природы (наноалмазсодержащих материалов, их модификаций, углеродных нанотрубок, полимерных материалов-полианилиновых (ПАНИ) нанотрубок, полианилиновых нанотрубок и гранул, содержащих серебро), сорбировать эталонные и эпидемические вирусы гриппа человека, птиц и фрагментов ДНК. В задачу входило также изучить влияние ряда физических, и биологических факторов на эффект сорбции вирусов гриппа на детонационные наноалмазные материалы, модифицированные различными методами к композитам ПАНИ. В данном разделе главы представлены результаты изучения взаимодействия детонационных наноалмазов (ДНА) с биологическими материалами – вирусами гриппа и фрагментами ДНК. Детонационные наноалмазы (ДНА) или ультрадисперсные алмазы можно рассматривать как специфический наноуглеродный материал, входящий в обширное и все более популярное семейство наноуглеродных кластеров, состоящее из фуллеренов, нанотрубок, нанографита, «луковичной» формы углерода.

2. 1 Свойства наноалмазных сорбентов

Детонационных наноалмазы и шихта образуются при детонации взрывчатых веществ. Электронно-микроскопическое исследование взятых для исследования образцов наноалмазов и шихты, представлены на рис. 9. Установлено, что в растворе ДНА и шихта представляют набор различной формы агрегатов - кластеров в размере от 10 до 300 нм. Причем их поверхность имеет вид зернистой структуры.

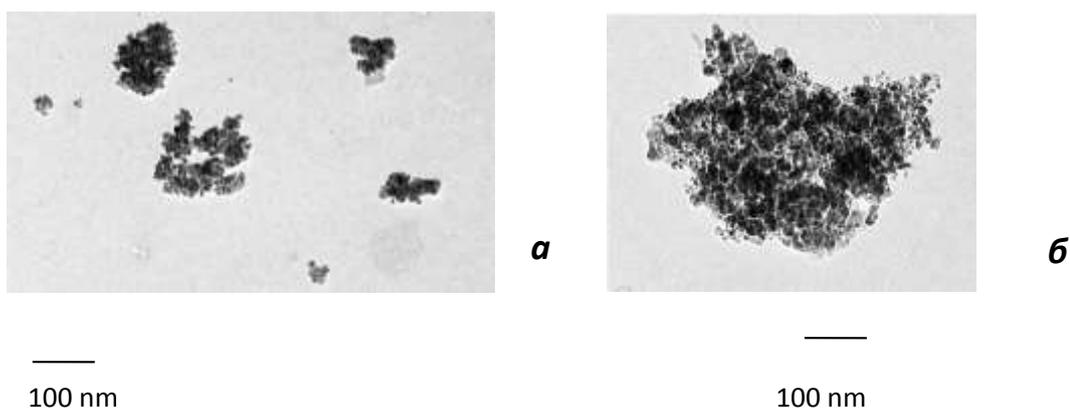


Рис.9. Электронная микроскопия кластеров наноалмазов а), шихты б)

Наноалмазы и шихта кроме углерода на поверхности имеют атомы N, O, S, H, которые очень важны для образования связей с биологическими объектами, например с белками и ферментами (таблица 6).

Таблица 6

Элементный состав наноалмазов и шихты

Элемент	Наноалмазы		Шихта	
	% атомные	%	%	% массовые
C	91,7954	89,1718	93,5983	90,6255
N	2,0570	2,3310	1,3851	1,5644
O	5,6998	7,3763	3,8191	4,9263
Na	0,1095	0,2037	0,1419	0,2631
Al	0,0712	0,1554	0,6012	1,3071
Si	0,0982	0,2228	0,1067	0,2414
S	0,0314	0,0814	0,0309	0,0800
Cl	0,0190	0,0544	0,0669	0,1912
K	0,0298	0,0941	0,0429	0,1354
Ca	0,0119	0,0386	0,0589	0,1904
Fe	0,0223	89,1718	0,0391	0,1759

Обычно после синтеза шихты и получения из нее ДНА, образцы отправляют на элементный анализ, поскольку элементный анализ разных партий шихты и ДНА. Состав шихты не полностью идентичен, поскольку определяется образованием шихты в результате взрыва, что касается ДНА, то его структура зависит как от способа получения его из шихты, так и от изменений, возникающих во время модификаций. Изменения регистрируются как небольшие колебания в % составе атомов примесей. Поэтому шихту и ДНА, используемые для исследования, передали для определения элементного состава в Институт неорганической химии РАН. Результаты анализа представлены в табл.1. Видно, что наибольший процент в наших образцах составлял углерод -89%, меньшей от 2 до 7% азот и кислород (N и O). Кроме того, на поверхности присутствуют такие атомы как Na, K, Al, Cl, Ca, Fe, которые составляют от 0,02 до 1% . При сопоставлении элементного состава шихты и наноалмаза видно, что содержание всех элементов в шихте, начиная с Na и далее вниз по таблице до Fe включительно, в большинстве случаев выше вплоть до 10 раз, чем у наноалмаза.

2.2. Взаимодействия вирусов гриппа и фрагментов ДНК с наноалмазными материалами и их модификациями

Метод сорбции вирусов на наноразмерные материалы был разработан ранее (Иванова В.Т, и др. 2008). Поскольку метод был основополагающий для этой работы блок схема этого метода представлена в главе 1 стр. 54 .Сорбция вирусов изучалась в зависимости от природы сорбентов, антигенной структуры вирусов гриппа А и В, а также от различных условий эксперимента. В таблице 7 представлены результаты взаимодействия с наноалмазами и шихтой вирусов гриппа А(H1N1), А(H3N2) и В двух эволюционных линий. Как видно из представленных данных, при сорбции на наноалмазы падение гемагглютинирующих титров в случае концентрированных вирусов достигало 4000 раз и зависело от начального титра вируса. Исследования сорбции различных штаммов вирусов гриппа А и В на выбранных сорбентах показали, что они с изменяемой эффективностью способны сорбировать вирусы из растворов, независимо от антигенной структуры поверхностных белков. Не было выявлено различий в сорбционных свойствах обоих образцов наноалмазов, (ДНАТ- прогретых при 450°C и ДНА-без прогрева. Оба образца ДНА оказались способны сорбировать вирусы из растворов, независимо от антигенной структуры поверхностных белков вирусов гриппа. Это говорит о том, что термообработка наноалмазов при 450°C не оказывала влияния на его сорбционные свойства. Растворы (ФР, аллантоисная жидкость КЭ, разведенная в ФР или среда Игла МЕМ, разведенная в ФР), в которых присутствовали вирусы, также не оказывали влияния на сорбцию (таблица 7).

Таблица 7

Взаимодействие вирусов А и В с наноалмазами и шихтой при 22 °С

	Сорбент	Вирус	Антигенная формула	Титр вируса ГАЕ		Система культивирования/ Степень очистки/ Десорбция, КЭ/ очищ, конц
				До сорбции	после сорбции	
1	Нано-алмаз	А/Новая Каледония/20/99	А (Н1N1)	128000	256	КЭ/ очищ, конц
2		А/Перт /16/09	А(Н3N2)	128000	16	КЭ/ конц
3		В/Сичуань/379/99	Линия В/Ямагата	128	< 2	КЭ/ очищ, конц
3		В/Флорида/04/06	Линия В/Ямагата	128	2	КЭ/ конц / Десорб.48ч, Т=<2
4		А/Калифорния/04/09	А(Н1N1) _v	32	2	КЭ/ Аллантаоис/ Десорб. 48ч, Т ≤1
5		В/Флорида/04/06	Линия В/Ямагата	32	8	КЭ/Аллантаоис
6	Нано-алмаз Т	В/Москва/03/2010	Линия В/Виктория	128	<2	МДСК
7		А/Перт /16/09	А(Н3N2)	128000	8	КЭ/ конц
8		В/Флорида/04/	Линия В/Ямагата	128	2	КЭ/ конц / Десорб.48ч, Т <2
9	Шихта	В/Москва/03/2010	Линия В/Виктория	128	<2	МДСК
10		А/Новая Каледония/20/99	А(Н1N1)	2000	2	КЭ/ очищ, конц
11		В/Флорида/04/06	Линия В/Ямагата	2000	16	КЭ/ конц
12		А/Перт/06/09	А(Н3N2)	64	2	КЭ/ Аллантаоис.
13		В/Флорида/04/06	Линия В/Ямагата	128	32	КЭ/ Аллантаоис.
14		В/Москва/6/11	Линия В/Виктория	64	<2	МДСК

Падения ГА титров вирусов из вирусосодержащей аллантаической жидкости, разведенной ФР, варьировало от 8 до 2 раз .

2.3 Взаимодействие вирусов гриппа с ДНА содержащими материалами в зависимости от различных параметров

Далее проведено исследование зависимости сорбции концентрированных вирусов гриппа штамм А/Перт/06/09 (H3N2) от следующих параметров эксперимента - массы сорбента, времени контакта с сорбентом и температурных режимов. Исследование влияния массы (m) сорбента на эффективность сорбции проводили в диапазоне массы от 1 до 10 мг, соответственно концентрации сорбентов варьировали от 5 до 50 мг/мл при других постоянных параметрах: времени контакта вируса с сорбентом $T_{\text{мин}} = 20$ мин. и температуре 22°C. Результаты представлены на рис.10. Начальные ГА титры вирусов были одинаковы для растворов, содержащих сорбенты. Исследование показали, что титр вирусов <2 ГАЕ регистрируется для 4 мг шихты, то есть сорбционная емкость в этом опыте составляла 500 ГАЕ/мг. Полное удаление вирусов наноалмазами наступает при их массе равной 10 мг, сорбционная емкость в этом опыте составляла 200 ГАЕ/мг. То есть активность шихты превышала активность алмазов при прочих равных условиях в 2.5 раза. Существенные отличия поверхностных свойств могут быть обусловлены различием в величинах поверхности, так и природой этих материалов. Удельная поверхность шихты, составляет 450 м²/г, что существенно выше для НА, которая примерно 300 м²/г. Кроме того шихта имеет и некоторые отличия в свойствах поверхностных углеродов. В шихте содержится больше аморфного углерода. При исследовании влияния температуры на взаимодействие вирусов с сорбентами было установлено, что в выбранном диапазоне температур от 4 до 37°C сорбция вирусов практически одинакова (рис.11).

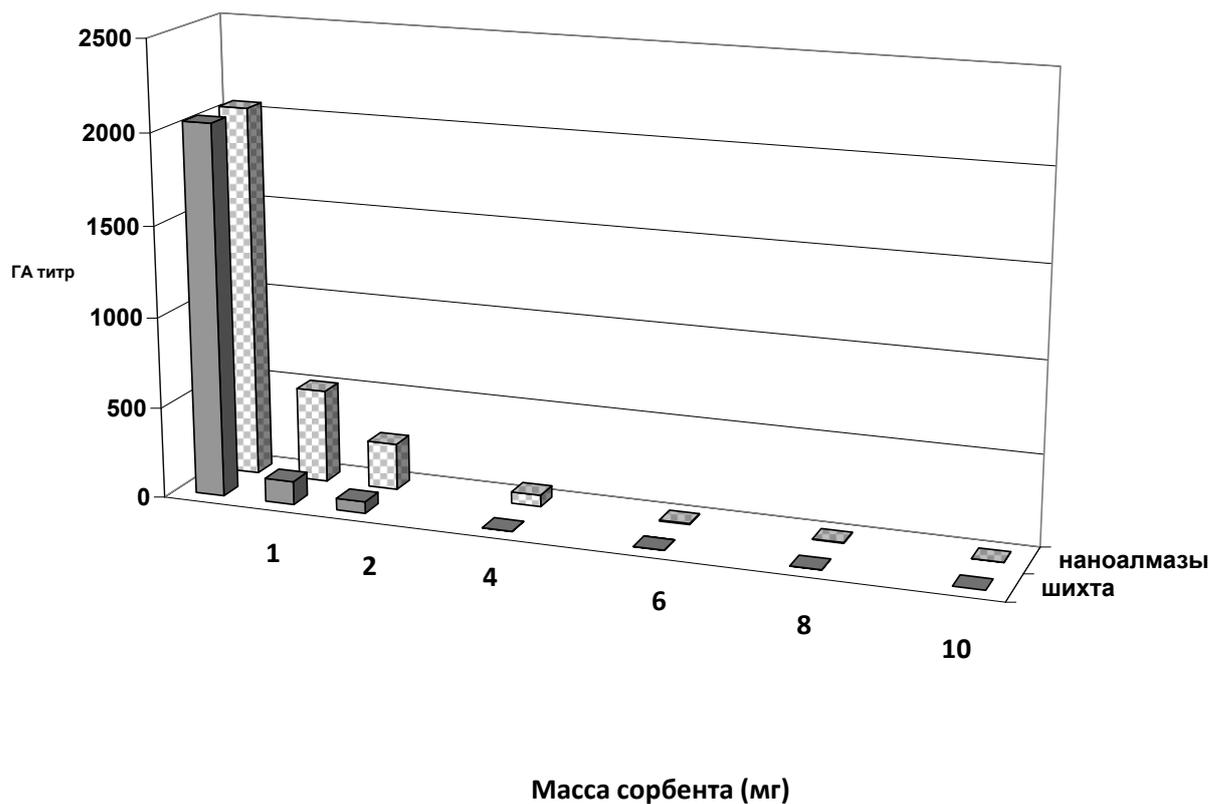


Рис.10. Зависимость сорбции концентрированного вируса гриппа А/Перт/06/09 (H3N2) от массы сорбентов:

По оси ординат ГА титр вируса в растворе, по оси абсцисс масса сорбента в объеме 200 мкл ФР.

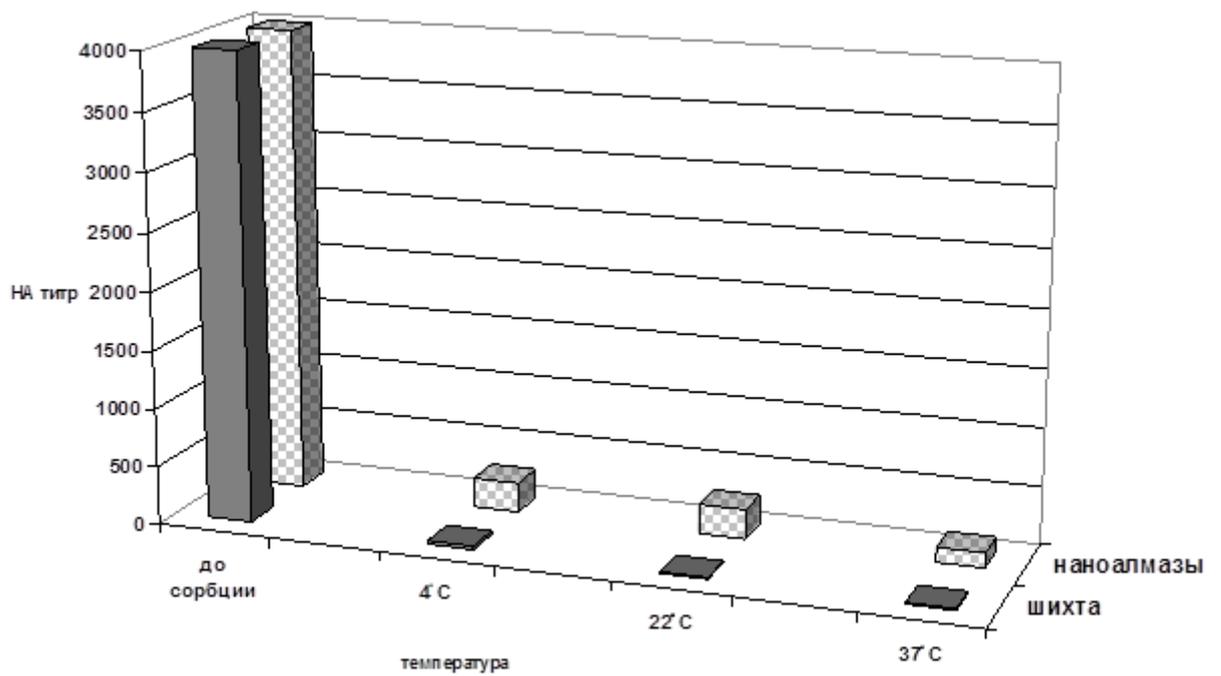


Рис.11. Зависимость сорбции концентрированного вирусов гриппа А/Перт/06/09 (H3N2) от температуры среды:

По оси ординат ГА титр вируса в растворе, по оси абсцисс температура среды.

Результаты исследования влияния времени контакта вирусов с выбранными сорбентами на ее эффективность показали, что в случае шихты этот процесс происходит наиболее активно в первые 10 мин контакта вирусов с шихтой, с ДНА за 20 мин (рис.12).

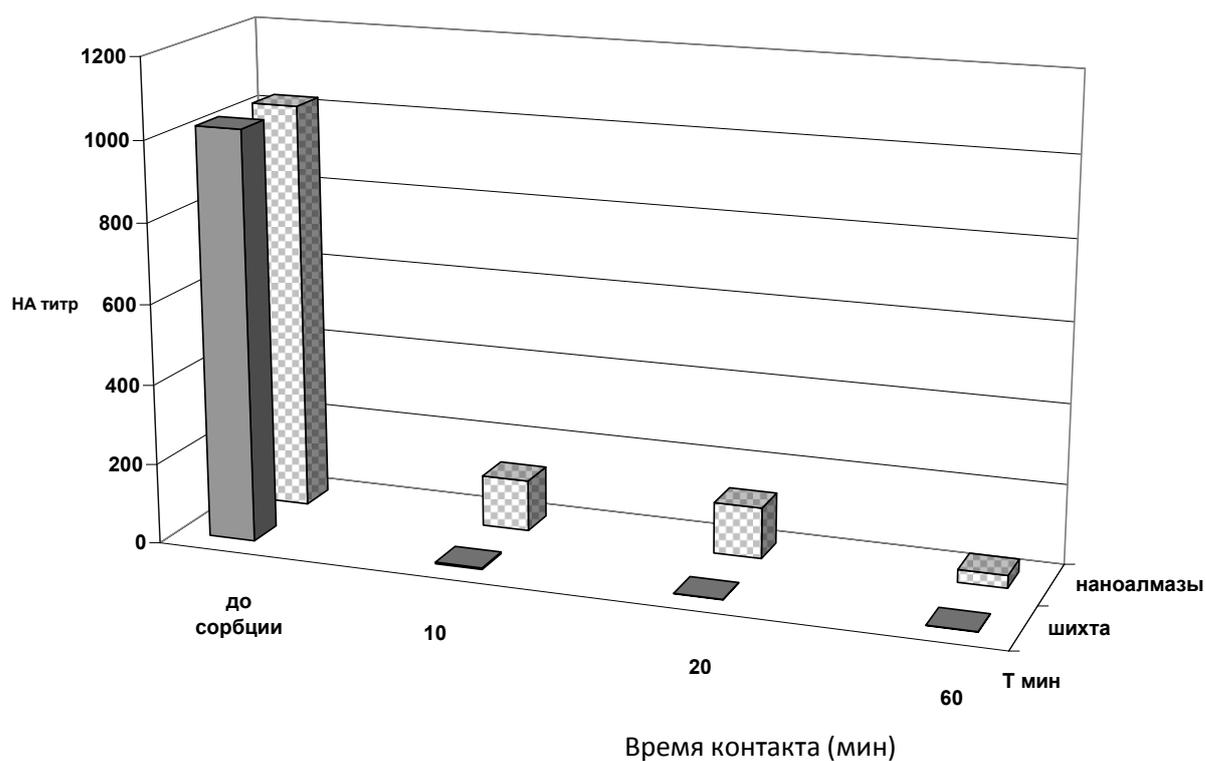


Рис.12. Зависимость сорбции вирусов гриппа от времени контакта концентрированного вируса гриппа А/Перт/06/09 с сорбентами:

По оси ординат ГА титр вируса в растворе, по оси абсцисс время контакта сорбента с вирусом.

Для определения насколько прочно удерживаются вирусы в составе иммуносорбента (вирус + наноалмазы), мы провели исследования по десорбции адсорбированных и концентрированных вирусов А/Перт/06/09, В/Флорида/04/06 и аллантаисных вирусов А/Калифорния/04/09 при стандартных условиях. После сорбции, которую проводили при контакте вируса с сорбентами в течение 20 мин, исследовали десорбцию вирусов в ФР V=200 мкл в течение 24 и 72 часов при 4°С и 22° С. При десорбции шейкер не использовали. Результаты, представленные в табл. 8 и рис. 13, показали, что десорбции в ФР при 22° и 4°С или не происходит, или крайне слабо выражена. Титр вируса в растворе после контакта иммуносорбента с ФР в течение 24-48 часов не превышал 2ГАЕ (рис.13). Таблица 8

Сорбция и десорбция вируса гриппа В/Флорида/04/06 с 2 образцов ДНА

N	Сорбент	Вирус	Растворитель	ГА титр до сорбции	ГА титр после сорбции	ГА титр Десорбция в V=300 мкл, ФР,		Масса сорбента
						24ч	Следующие 48ч	
1	ДНА	В/Флорида/04/06 конц	ФР	128	2	<2	<2	4 мг
2	ДНА Т				2-4	2	<2	5 мг

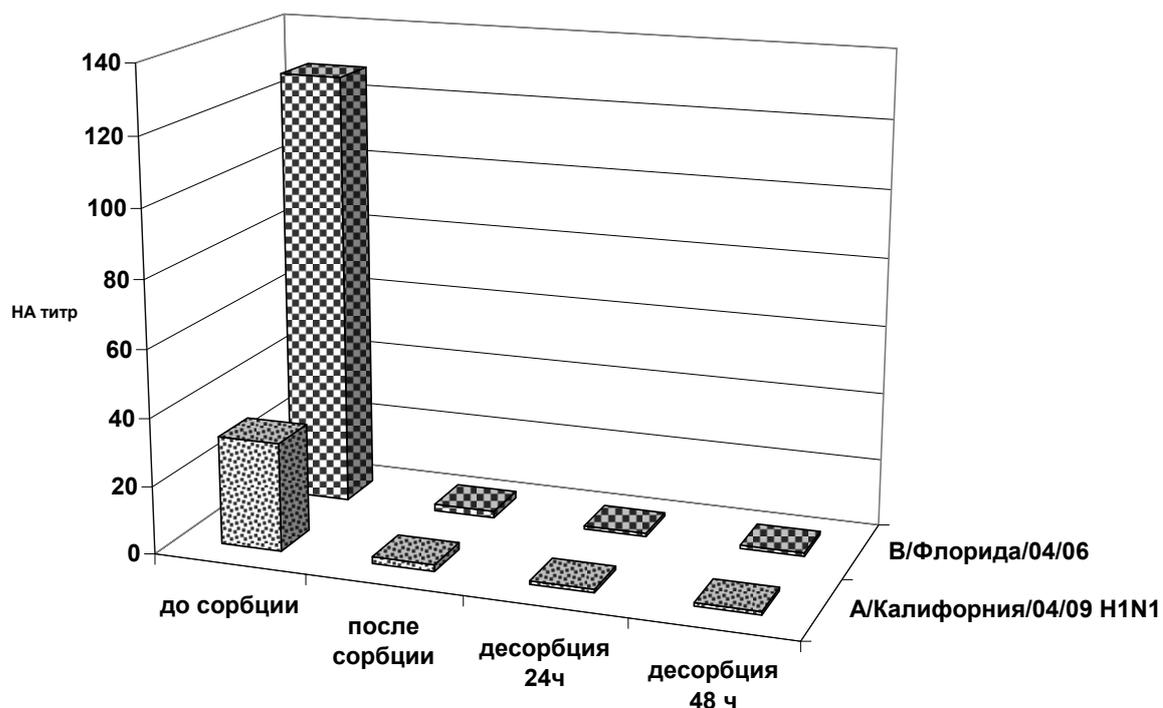


Рис.13. Сорбция и десорбция концентрированных В/Флорида/04/06 и аллантаоисных А/Калифорния/04/09 вирусов гриппа на ДНА:

По оси ординат ГА титр вируса в растворе, по оси абсцисс - стадии взаимодействия вирусов с сорбентами.

Для ответа на вопрос сопровождается ли падение ГА титра падением инфекционного титра были проведены исследования по определению инфекционного титра до и после взаимодействия с сорбентами в куриных эмбрионах (таблица 9). При проведении эксперимента были выбраны следующие параметры опыта: объем разведенного вируса А/Перт/06/09 (H3N2) $V = 200$ мкл, навеска сорбента составляла 4 и 6 мг, шаг разведения 1:10, разведения вируса в ФР для заражения КЭ составляло от 10^{-1} - 10^{-8} до сорбции и 10^{-1} - 10^{-4} после сорбции. На каждое разведение для заражения брали по 2 эмбриона. В первоначальном этапе эксперимента определяли ГА титр до и после сорбции. Установлено, что после контакта с сорбентом титр вирусосодержащей жидкости упал с 32000ГАЕ до <2 ГАЕ. Этот результат говорил об активной сорбции вируса.

Определение вируса в РГА в аллантаоисной жидкости КЭ показало, что после заражения КЭ различными разведениями вируса от 10^{-4} до 10^{-8} инфекционный титр начального

вирусного раствора (до сорбции) составил $4,5 \lg \text{ЭИД}_{50}$. После сорбции и последующего заражения КЭ он не регистрировался уже начиная с разведения 10^{-1} . Этот эксперимент показал, что падение ГА титра при контакте шихты с концентрированным вирусом (концентрация суспензии 20 мг/мл и 30 мг/мл) сопровождалось снижением инфекционного титра не мене чем на $4.5 \lg \text{ЭИД}_{50}$.

2.4. Взаимодействие вирусов гриппа и фрагментов ДНК с модифицированными наноалмазами

Следующим этапом работы было исследование взаимодействия модифицированных наноалмазов с вирусами гриппа. Модифицирование ДНА проводили используя различные методы, описанные в главе 1. стр.51.

В результате модифицирования ДНА изменялась структура поверхности ДНА: появлялись дополнительные атомы, например, хлор, водород, или функциональные группы NH_2 , OH . Кроме того, в результате химических реакций могут появиться изменения в свойствах углерода в составе ДНА у графитизированных при разных температурах ДНА. В таблице 10 приведен неполный элементный состав хлорированных ДНА. Видно, что процент хлора в хлорированных ДНА увеличен по сравнению с не модифицированными ДНА с 0 до 6,84 %.

Таблица 10

Элементный состав ДНА до модификации и хлорированных ДНА

Элемент	ДНА	ДНА хлор
С масс%	83.75	84.94
N масс%	2.09	2.34
H масс%	0	0
Cl масс%	0	6.84
O* масс%	~ 14	~7

O* суммарный состав других элементов, входящих в ДНА и ДНАхлор

Результаты взаимодействия модифицированных ДНА с вирусами гриппа представлены в таблице 11. Из приведенных данных следует, что наименее активно сорбция шла на представителей ДНА_{жидфаз}, поступивших из фирмы “Sigma”.

Таблица 11

Взаимодействие шихты, наноалмазов и их модификаций с вирусами гриппа А и В.

N	Сорбент	Вирус/антигенная формула/очистка	ГА титр до сорбции	ГА титр после сорбции
1	Шихта	А/Висконсин /67/05 (H3N2), очищенный, в ФР	2000-4000	2-4
		В/Флорида/04/06, концентр. в PBS,	128	2
		А/Южная Каролина/02/2010 (H1N1)pdm09, концентрированный в ФР	128-256	4
4	ДНА _{газфаз}	А/Висконсин /67/05 (H3N2), очищенный, концентрированный в ФР	512-1000	32-64
5	ДНА _{жидфаз}	А/Южная Каролина/02/2010 (H1N1)pdm09, концентрированный в ФР	1000	256
			1000	128
			1000	256
			64	32
		512	512	
		А/Перт/06/09 (H3N2), концентрированный в ФР	4000	256
6	ДНА _{граф}	В/Флорида/04/06, концентрированный в ФР	128	32
		А/Перт/06/09 (H3N2), концентрированный в ФР	4000	128
7	ДНА _{амин}	А/Висконсин/67/05 (H3N2), очищенный, концентрированный в ФР	2000	8
		В/Флорида/04/06, концентрированный в PBS	128	16
		А/Южная Каролина/02/2010 (H1N1)pdm09, концентрированный в ФР	128-256	32
		А/Перт/06/09 (H3N2), концентрированный в ФР	4000	4
8	ДНА _{хл}	В/Флорида/04/06, концентрированный в ФР	128	32
		А/Висконсин/67/05 (H3N2), очищенный, концентрированный в ФР	2000	4

Хлорированные, аминированные и графитизированные ДНА лучше сорбируют вирусы гриппа из раствора, чем ДНА, полученные жидкофазным методом. При этом следует отметить, что небольшие изменения некоторых параметров реакций, например, при аминировании могут оказать влияние на структуру поверхности ДНА, что приведет к увеличению адсорбции вирусов. Согласно полученным данным падение ГА титров после сорбции вируса А/Виктория/361/09 (H3N2) на ДНАмин (титр до сорбции 512ГАЕ, после сорбции <2 ГАЕ) сопровождалось падением инфекционного титра с 7.5lgЭИД₅₀ до 1.5lgЭИД₅₀ на куриных эмбрионах.

Аналогичный эффект – падение инфекционного титра -мы наблюдали при использовании культуры клеток ткани MDCK. Условия опыта были следующие: концентрированный вирус А/Виктория/361/11 (H3N2) титр ГА до сорбции 512-1000ГАЕ, после сорбции на шихту – <2 ГАЕ, на ДНА_{амин} <2 ГАЕ, ДНА_{жидфаз} 8ГАЕ. Параметры эксперимента: V=200 мкл раствора конц вируса в ФР, масса сорбента = 4 мг, T=23°C. Результаты полученные в ходе эксперимента свидетельствуют о том, что падение инфекционного титра при сорбции концентрированного и разведенного в ФР вируса гриппа А(H3N2)на шихту составило Δ5 lg ТЦИД₅₀, для ДНА_{амин} Δ 4,26 lg ТЦИД₅₀, ДНА_{жидфаз} -Δ2 lg ТЦИД₅₀ (табл. 12)

Таблица 12

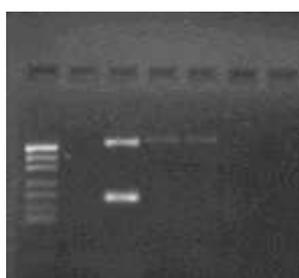
Падение инфекционного титра концентрированных вирусов гриппа А(H3N2) после сорбции на ДНА и ПАНИ содержащие сорбенты

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
MDCK	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 (H3N2)

Следующим этапом работы было исследования возможности сорбции фрагментов нуклеиновых кислот на выбранные сорбенты. Для исследования взаимодействия сорбентов с нуклеиновыми кислотами были выбраны фрагменты ДНК вирусов -ампликоны, полученные в полимеразной реакции. Использовали образцы фрагментов ДНК в объеме 10 мкл. Результаты исследования показали, что фрагменты ДНК полученные в результате амплификации фрагментов РНК вируса гриппа А(H1N1)pdm09 и вирусов гриппа В по разному взаимодействовали с ДНА содержащими сорбентами разной структуры и модификации (рис.14а). Двунитчатые фрагменты ДНК размером 190 пар нуклеотидов (п.н.) удалялись из раствора полностью наноалмазами и шихтой. Если фрагменты ДНК превышали >560 п.н., то в случае шихты их удаление из растворов наблюдалось полностью, в случае наноалмазов частично .

На рис.14б. приведены результаты сорбции фрагментов ДНК на модифицированные наноалмазы. Из представленных данных следует, что фрагменты ДНК адсорбируются при графитизации 600, 800, 1000 °С и не адсорбируются на ДНА_{амин} и ДНА_{хл}.



а

1 2 3 4 5 6 7



б

8 9 10 11 12 13 14

Рис. 14. Исследование сорбции фрагментов ДНК вирусов гриппа А и В на наноалмазные материалы (шихту, ДНА и их модификации) с помощью электрофореза в 2% агарозе:

рис.14 а, фрагменты кДНК вируса гриппа В Дорожки: 1 - маркер молекулярного размера – плазида PUC19, 3 - ДНК до сорбции;4,5 - ДНК после сорбции на ДНА_{газфаз} 6,7 - ДНК после сорбции на шихту.рис.14 б. Фрагменты ДНК вируса гриппа А ; дорожки: 8 – маркер молекулярного размера – плазида PUC19, 9 - ДНК до сорбции, 10 - ДНК после сорбции на ДНА_{граф} 600⁰С,11 - кДНК после сорбции на ДНА_{граф} 800⁰С,12 - ДНК после сорбции на ДНА_{граф} 1000⁰С, 13 - ДНК после сорбции на ДНА_{амин} ,14 - ДНК после сорбции на ДНА_{хл}

2.5. ИК-спектры ДНА с разной сорбционной активностью по отношению к вирусам гриппа

Анализ результатов исследования взаимодействия ДНА с вирусами гриппа выявил, что ДНА, полученные газофазным методом, лучше взаимодействуют с вирусами гриппа, чем ДНА, полученные жидкофазным методом. Это заставило нас сравнить структуру поверхности этих ДНА. Для этого был использован метод ИК- спектроскопии, который регистрирует колебания как отдельных молекул, так и молекул в составе разных функциональных групп.

Спектрограммы активно сорбирующих вирусы ДНАгаз фаз и слабо сорбирующие вирусы ДНАжидк фаз представлены на рис.15.

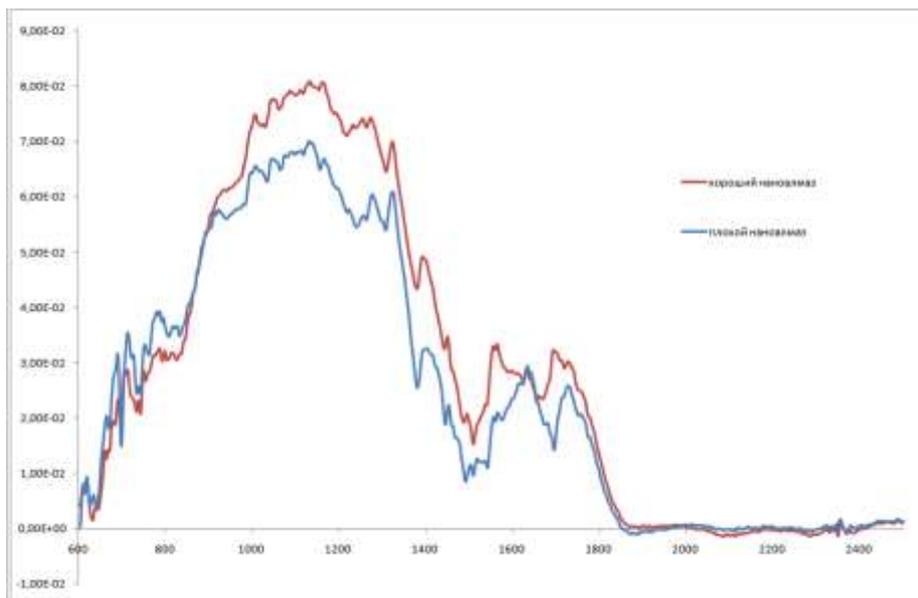


Рис.15. Инфракрасные- спектры ДНА жидкофаз и ДНА газфаз сорбентов

Видно, что спектрограммы имеют отличия в структуре в области 1550 -1800 см-1, 1300 см-1, область 900, 800 см-1.

Таким образом, отличия в поверхностной структуре полученных разным способом ДНА отражают отличия в их спектрограммах и свидетельствуют о качественном или количественном изменении функциональных групп на поверхности ДНА, которые взаимодействуют с вирусами гриппа.

2.6. Взаимодействие вирусов с ДНА материалами, покрытыми ПАНИ

Этот раздел главы посвящен изучению адсорбционных свойств композитов – комплексов ДНА или шихты, покрытых полианилином (ПАНИ). Для получения таких композитов в пробирку с ДНА добавляли анилин и проводили реакцию полимеризации анилина в присутствии окислителя. Выбор ПАНИ обусловлен его хорошими адсорбционными свойствами относительно вирусов. Этот факт был установлен ранее (Иванова В.Т. и др., 2009). Электронно-микроскопическое исследование ДНА и комплексов ДНА без покрытия и с покрытием ПАНИ представлено на рис.16.

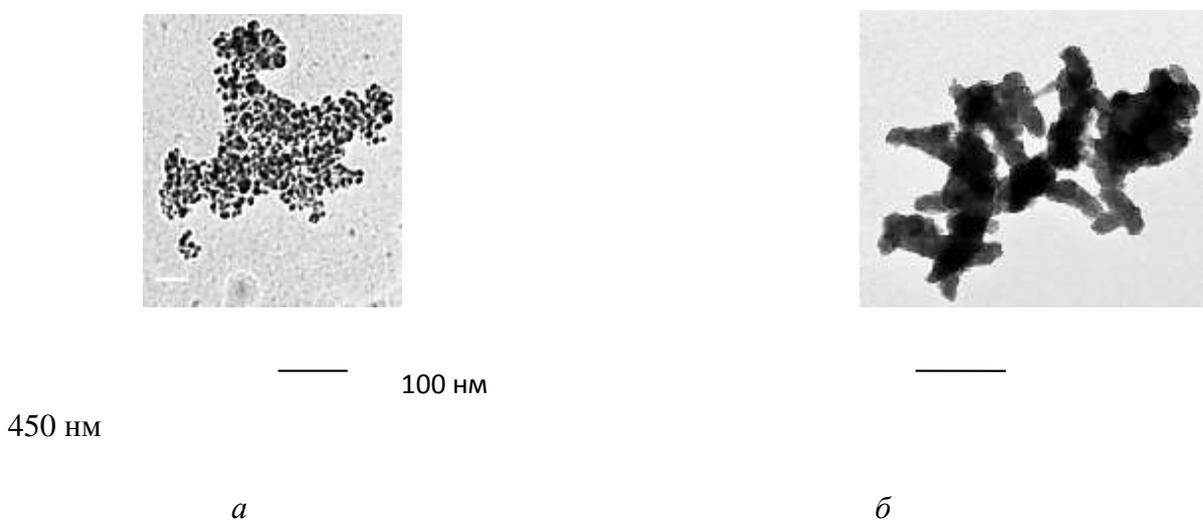


Рис.16. ЭМ-фотографии кластеров ДНА (*a*), и композита ДНА с ПАНИ (*б*)

Из представленных данных видно, что композит (ДНА + ПАНИ) представляет собой бесформенную структуру с гладкой поверхностью в отличие от зернистой структуры ДНА и шихты.

Результаты исследования сорбции вирусов гриппа на композиты ДНА+ПАНИ и шихта+ ПАНИ представлены в таблице 13. Для сравнения в работе кроме ДНА была также исследована сорбция на ДНА и шихту как без термической обработки, так и прошедшие термообработку при 450° С. В таблице присутствуют также данные по десорбции в ФР для некоторых сорбентов. Как видно из этих данных, композиты ДНА ПАНИ и шихта ПАНИ способны сорбировать вирусы из раствора. Падение ГА титров составляло от 8 и до 1000 раз. Эти данные свидетельствуют о том, что часть функциональных групп полианилина взаимодействовала с функциональными группами ДНА, а другая часть вступила во взаимодействие с функциональными группами вирусных белков. Результаты исследования вариантов ДНА, предварительно прогретых при 450⁰С, а затем соединенных с полимером выявило тот факт, что температурная обработка ДНА в композитах ДНА+ПАНИ не влияет на сорбцию вирусов гриппа.

Таблица 13.

Взаимодействие вирусов с различными композитами наноалмазов с полианилином и наноалмазов, прогретых при температуре 450⁰С и без температурной обработки ДНА.

Сорбент	Вирус	Тип вируса/ аллантаоисный, концентрированный	ГА титр раствора до	ГА титр раствора после	ГА титр раствора после
ДНА	А/Новая Каледония 20/99	А(Н1N1) Концент.	128000	256	нс *
ДНА Т	В/Флорида / 04/06	В концент.	128	2	<2
ДНА Т+ ПАНИ	В/Флорида / 04/06	Линия В/Ямагата Аллан.	256	<2	нс
ДНА Т+ ПАНИ	В/Сичуань/379/99 очищ, конц	Линия В/Ямагата очищ, концент.	64	8	Десорб.48ч Т ≤1
ДНА Т+ ПАНИ	А/Калифорния/4/09	А(Н1N1)pdm09 Аллантаоис	32	4	нс
ДНАТ+ ПАНИ	А/Новая Каледония 20/99	А(Н1N1) Концент.	8000	8	2
Шихта	А/Новая Каледония 20/99	А(Н1N1) Концент.	2000	<2	нс
Шихта	А/Перт/06/09	А(Н3N2) концентрир	2000	<2	нс
Шихта	В/Флорида/ 04/06	В Концент.	2000	16	нс
Шихта + ПАНИ	А/Новая Каледония 20/99	А(Н1N1) Концент.	8000	8	2
Шихта	А/Утка /Приморье/2621/01 Х PR/8 /34	А(Н5N2) Аллантаоисный.	64	<2	нс
Шихта	А/Утка /Приморье/2621/01 Х PR/8 /34	А(Н5N1) Аллантаоисный.	32	<2	< нс

2.7. Сравнительное исследование углеродных нанотрубок и полимерных композитов, содержащих наночастицы Ag, и без Ag, в качестве сорбентов вирусов гриппа А и В

Сорбенты, используемые в этом разделе главы 2, отличаются составом и определенной формой. В их число входит инертный углеродный материал в форме углеродных нанотрубок (УНТ) фирмы “ТАУНИТ”, композиты полианилина (ПАНИ), имеющие также форму трубок и композиты ПАНИ в форме гранул. Часть композитов ПАНИ были модифицированы наночастицами серебра (ПАНИ-Ag). Выбор ПАНИ обусловлен тем фактом, что представитель класса электропроводящих полимеров - ПАНИ способен адсорбировать вирусы гриппа из водной среды (Иванова В.Т. и др.2008). Включение в состав композитов частиц Ag, обусловлено их антибактериальными и антигрибковыми свойствами. Все сорбенты состояли из наночастиц близких размеров. Представляло интерес выяснить влияние Ag, на сорбционную способность ПАНИ, а также сопоставить свойства композитов ПАНИ с сорбционной активностью УНТ, имеющих аналогичную форму частиц, что и нанотрубки ПАНИ, но другую химическую природу. Их получение представлено в главе гл.1 стр. 52. В работе исследовались следующие биологические объекты: эталонные штаммы вирусов гриппа человека и птиц, фрагменты нуклеиновых кислот- ампликоны – фрагменты кДНК генов современных штаммов вирусов гриппа А и В.

Для определения размеров, форм и структуры использованных сорбентов вначале были проведены их исследования методами электронной микроскопии. На рисунке 17 приведены электронные фотографии используемых в работе сорбентов. Углеродные нанотрубки (УНТ) имеют диаметр 50-100 нм и длину несколько микрон. По данным производителя удельная площадь поверхности материала составляет 300- 600 м²/г. Материал пористый и поверхность частиц хорошо доступна для реагентов (Рис. 17а). Нанотрубки ПАНИ представляют собой частицы несколько большего диаметра 100-200 нм, чем у УНТ и длинной несколько микрон (рис. 17б). Видно, что поверхность ПАНИ более шероховата, нежели поверхность УНТ, помимо этого, в отличие от гидрофобного углерода, ПАНИ – гидрофильный материал, который хорошо смачивается водой, что может улучшать контакт сорбента с биологическим материалом.

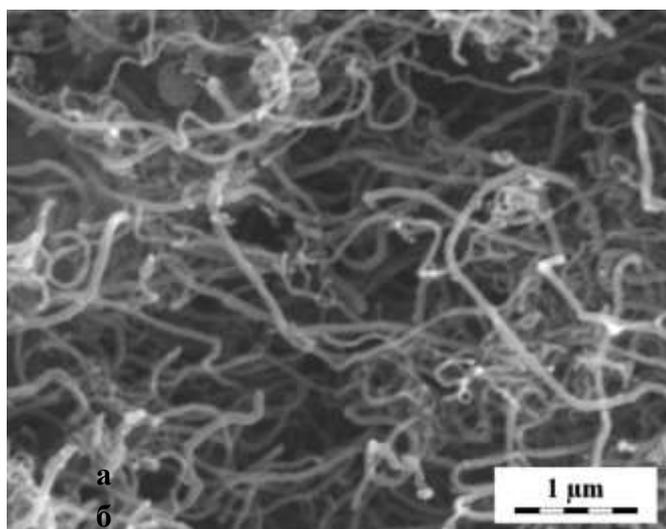
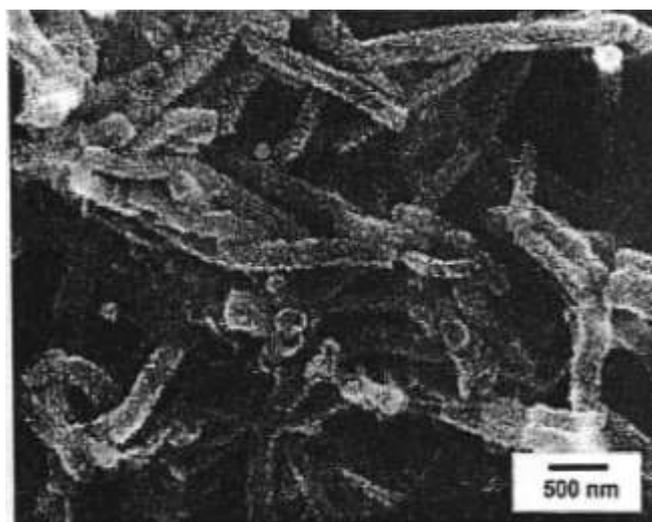
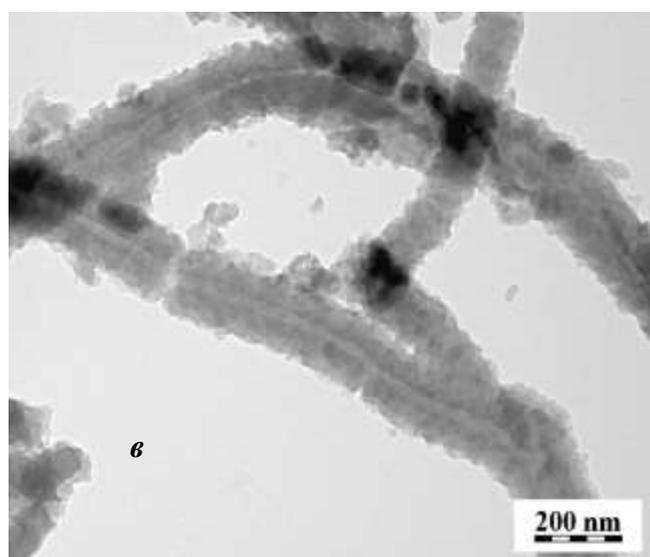
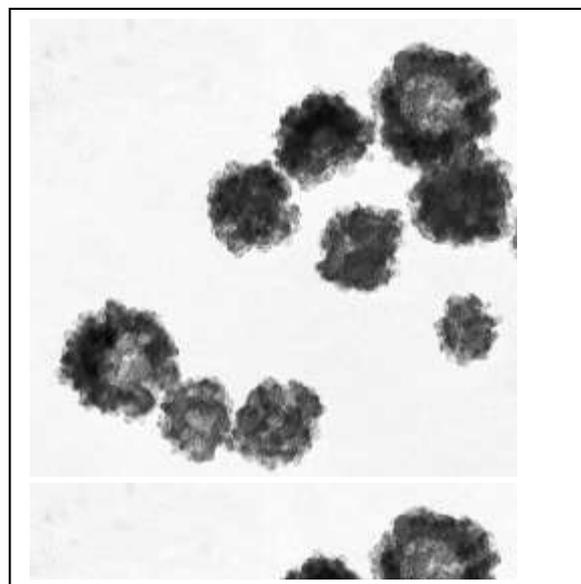
***а******б******в******г***

Рис. 17. Электронная микроскопия сорбентов: УНТ(*а*), нанотрубки ПАНИ- (*б*), нанотрубки ПАНИ Ag 30% (*в*), гранулы ПАНИ Ag 70% (*г*).

При взаимодействии восстановленной формы ПАНИ с AgNO_3 ион серебра Ag^+ восстанавливается до металлического состояния. Поскольку восстановление идет на поверхности ПАНИ частицы металла стабилизируются полимерной матрицей от дальнейшего интенсивного слипания, что позволяет получать частицы нано и субмикронных размеров. На фотографиях просвечивающей электронной микроскопии металл обнаруживается в виде темных точек и пятен. Пятна представляют собой более крупные агломераты частиц серебра, размеры которых составляют сотни нанометров. ПАНИ гранулярной структуры с частицами диаметром 100-150 нм представлен на рис. 9г. В композите, с частицами ПАНИ в виде гранул ПАНИ-Ag (70%) заметно больше, чем в ПАНИ-Ag (30%) и оно обнаруживается в виде сферических частиц на поверхности полимерных гранул. Во всех случаях частицы металла локализируются на поверхности ПАНИ, находясь в контакте с электропроводящим полимером.

В таблице 14 представлены результаты сорбции различных типов вирусов четырьмя видами сорбентов. Были использованы как очищенные вирусы, так и аллантаисные вирусы без очистки, содержащие большое количество аллантаисных белков в растворе. Показателем сорбционной активности сорбента служил остаточный ГА титр вируса в растворе после контакта с сорбентом. Он уменьшался от 4 до 512 раз в зависимости от пары сорбент-вирус, начального титра и степени очистки вируса. Сорбция не зависела от антигенных свойств вирусов гриппа. Введение серебра в частицы ПАНИ приводило к увеличению их сорбционной активности.

Для всех видов сорбентов проведено исследование сорбции вирусов гриппа в зависимости от разных условий эксперимента: массы сорбента, температуры сорбции, возможность десорбции вирусов. Результаты эксперимента представлены на диаграммах (рис. 10-13.) диапазоне $+4^\circ\text{C}$ - $+36^\circ\text{C}$, времени контакта сорбента с вирусом.

Адсорбция вирусов гриппа на полимерные и углеродные нанотрубки

N	Сорбент	Вирус	Титр вируса ГАЕ в растворе		
			До сорбции	После сорбции	после десорбции
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 концентрированный	128	8	-
4	ПАНИ нанотрубки Ag 30%		128	8	-
5	ПАНИ нанотрубки	А/Приморье/2621/01 (H5N2) Аллантоисный 1:2	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	-
9	ПАНИ нанотрубки		256	<2	-
10	ПАНИ гранулы Ag 70%		256	<2	-
11	УНТ Тамбов		256	<2	-
12	УНТ Тамбов	В/Малазия/2506/04 очищенный	4096	128	-
13	УНТ Тамбов	А/Москва/01/2009 А(H1N1)sw	64	16	-
14	УНТ Тамбов	А/Виктория/361/11 (H3N2) аллантоисный	512	256	-
15	ПАНИ нанотрубки		512	128-256	-
16	ПАНИ трубки Ag 30%		512	8	-
17	ПАНИ гранулы Ag 70%		512	128-256	-

Обозначение - - не исследовали, масса сорбентов 4 мг

Результаты исследования выявили влияние массы взятого сорбента при использовании УНТ и ПАНИ-Ag 70%. Так использование концентрации УНТ 1 мг/мл УНТ приводило лишь к двукратному снижению начального титра ГАЕ, а с увеличением концентрации УНТ до 4 мг/мл, титр опускался в 6 раз. В случае ПАНИ титр снижался в 6 раз уже при концентрации 1 мг/мл сорбента, а для нанотрубок ПАНИ-Ag30% в этих условиях имела место практически полная сорбция вируса. Далее наблюдалась независимость титра от увеличения содержания сорбента.

Для всех сорбентов не выявлено различий в сорбции вирусов при разных температурах +4, 22, 34°C (рис. 19).

Как показали исследования (рис.20), сорбция вирусов наиболее активна в первые 15 мин контакта с сорбентом. Здесь наблюдалось наибольшее падение титра вируса в растворе (примерно в 8 раз), далее в течение 60 мин процесс шел не столь активно и титр снижался еще в 2 раза. Отдельный вопрос представляет собой десорбция вирусов с сорбентов. Исследование показывает, что, она слаба или вообще отсутствует. (Рис. 21).

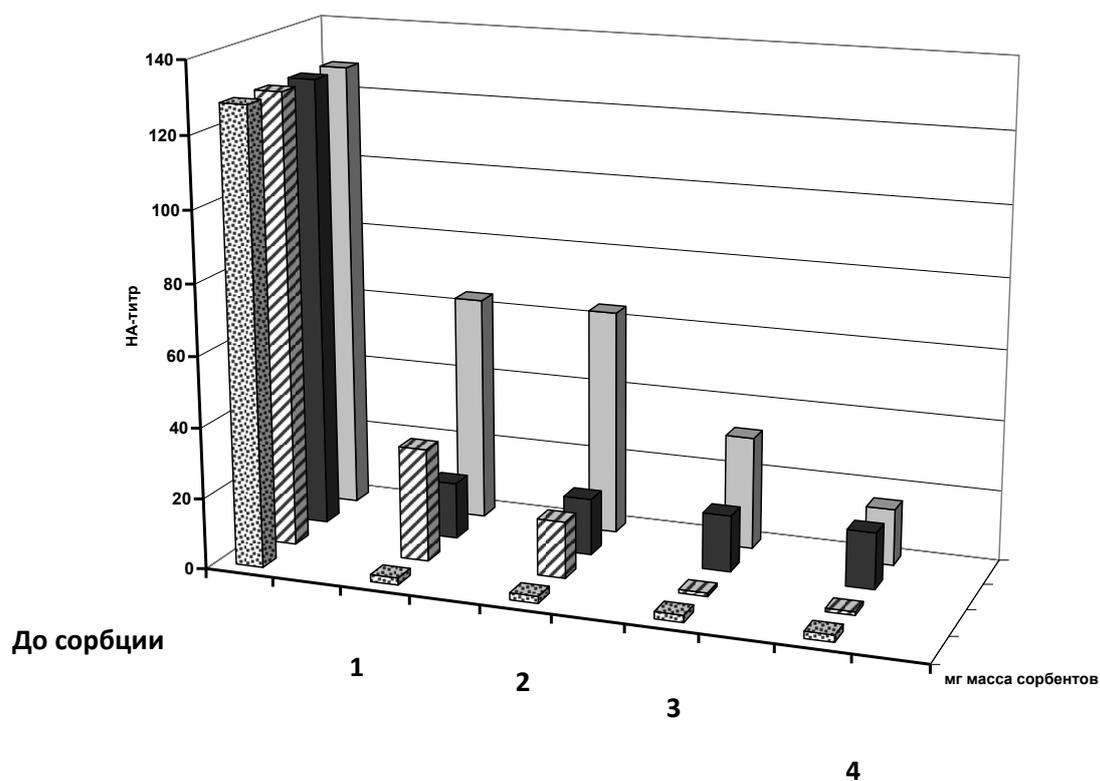
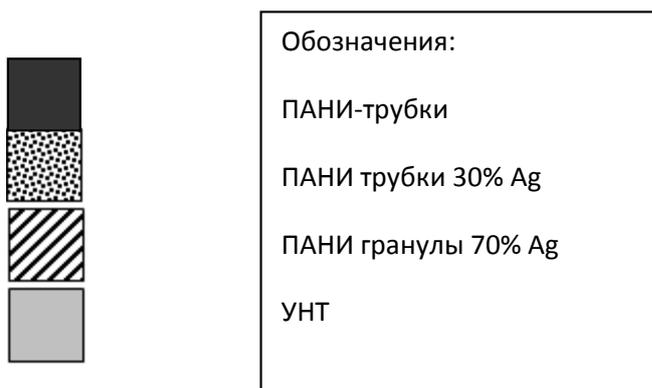


Рис.18. Сорбция вирусов гриппа А/Виктория /361/11 (H3N2) сорбенты в зависимости от массы сорбентов: объем раствора V= 200 мкл



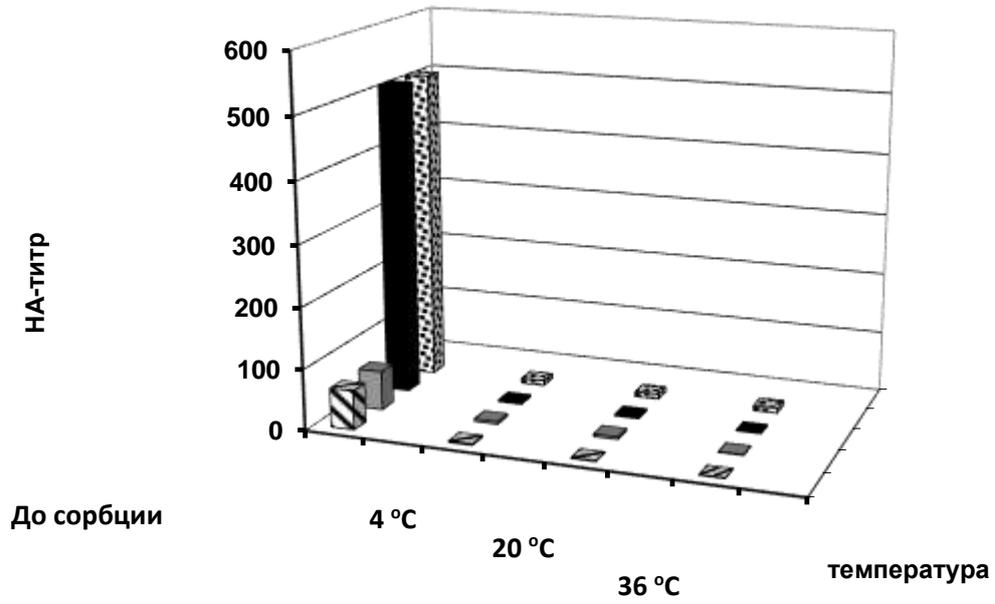
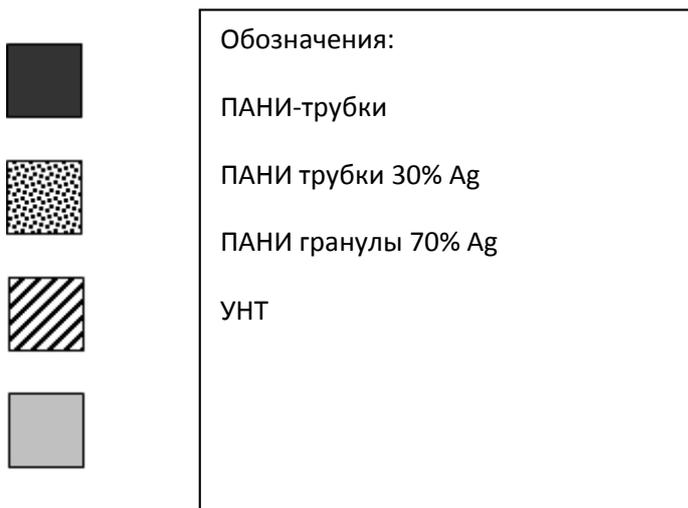


Рис.19. Сорбция очищенного, концентрированного вируса гриппа А/Висконсин 67/05 (H3N2) на сорбенты в зависимости от температуры среды



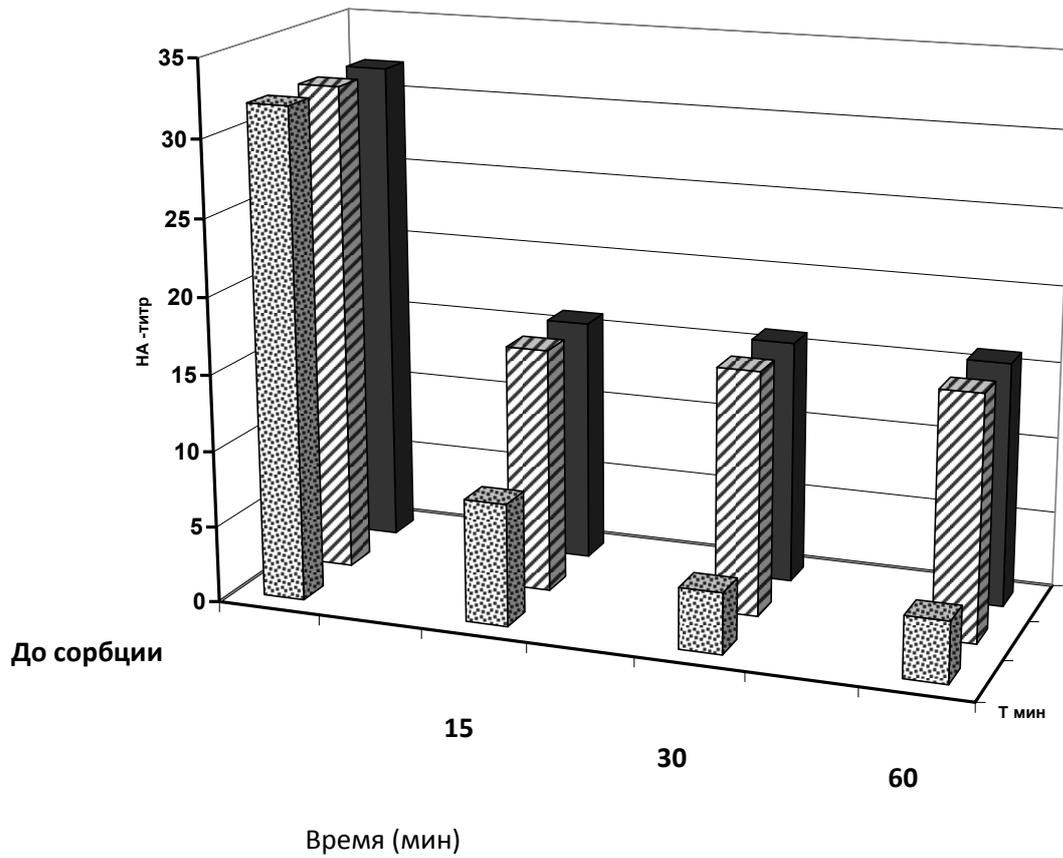
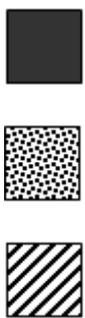


Рис. 20. Сорбция аллantoического вируса гриппа А/Виктория/361/11 на сорбенты в зависимости от времени контакта вируса с сорбентами



Обозначения:

ПANI-нанотрубки

ПANI нанотрубки Ag 30%

ПANI гранулы Ag 70%

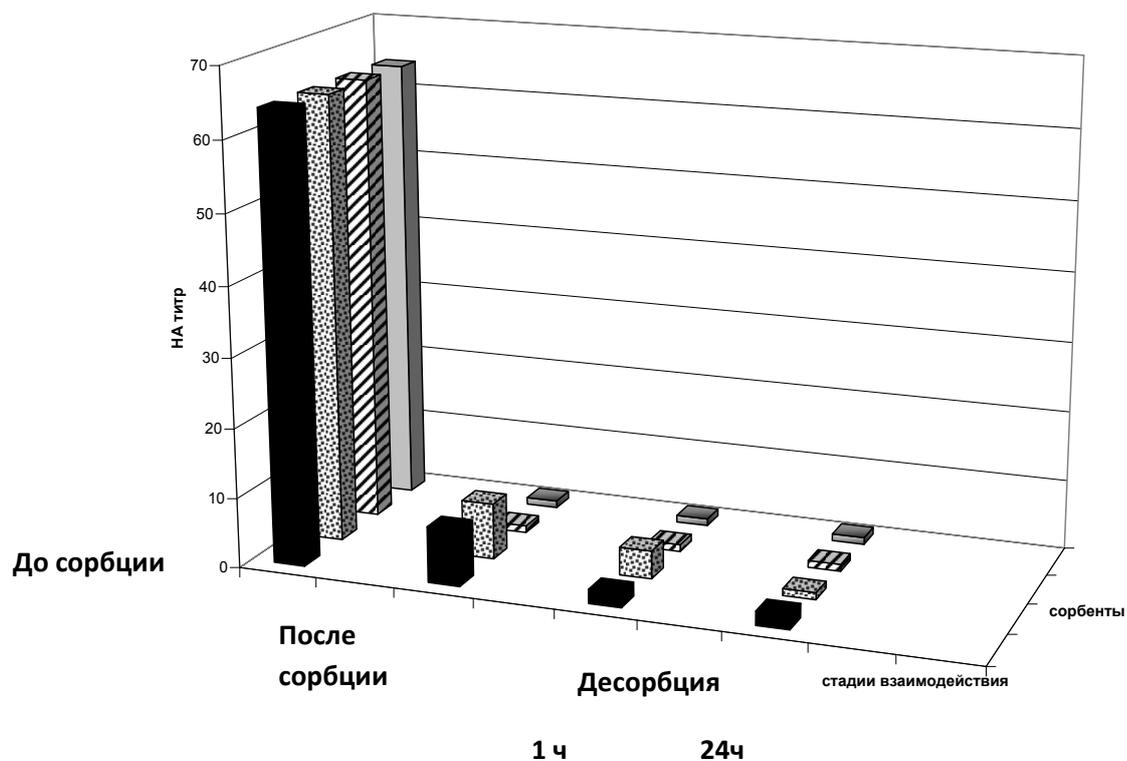


Рис. 21. Сорбция и десорбция концентрированного вируса гриппа А/Виктория/361/11 (H3N2) с УНТ, ПАНИ нанотрубок, композитов ПАНИ нанотрубок Ag 30% и ПАНИ гранул Ag 70%



Обозначения:

ПАНИ-трубки

ПАНИ трубки 30% Ag

ПАНИ гранулы 70% Ag

УНТ

Далее была проведена сорбция концентрированного вируса А/ Виктория/361/11 (H3N2) на ПАНИ нанотрубки Ag 30%. ГА титр вируса в растворе до сорбции был 4096 ГАЕ, после сорбции =8ГАЕ. Далее следовало заражение КЭ , по 4 эмбриона на каждое разведение вирусосодержащей жидкости до и после сорбции на ПАНИ нанотрубки Ag 30%. Инфекционный титр вирусосодержащей жидкости до сорбции равен 6,5 lg ЭИД₅₀. После сорбции на ПАНИ нанотрубки с Ag 30 % всеми разведениями от 10⁻¹ до 10⁻⁷ не выявило вируса гриппа в реакции РГА ни в одном из разведений. Таким образом, падение инфекционного титра после сорбции вируса гриппа А/Виктория/361/11 составило 6,5 lg ЭИД₅₀. Осадок (иммуносорбент) комплекс ПАНИ нанотрубки с Ag 30 % с вирусом был исследован на инфекционную активность. Для этого его ресуспензировали ФР и заразили в аллантаисную полость двух куриных эмбрионов. После вскрытия куриных эмбрионов и исследования аллантаисной жидкости на наличие вируса вирус был обнаружен в РГА с титром 128 ГАЕ в обоих эмбрионах. Эти данные указывают на сохранение инфекционной активности вируса гриппа в составе иммуносорбента.

Следующий этап был посвящен изучению сорбции фрагментов ДНК , полученных в результате ПЦР. На рис 22 представлены результаты электрофореза до и после сорбции образцов фрагментов ДНК на сорбенты.

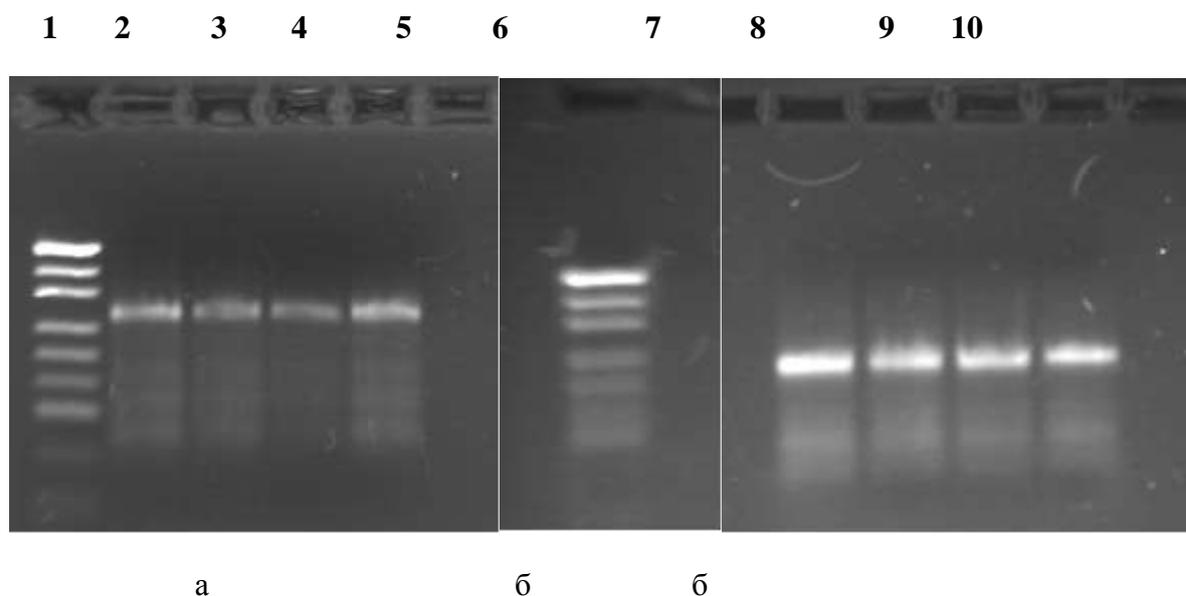


Рис. 22. Электрофорез фрагментов ДНК эпидемических штаммов вирусов гриппа Аи В сезона 2011-12 на ПАНИ трубки и композиты с ПАНИ с Ag

Дорожки: плазида 1,6; ДНК до сорбции- 2,7; ДНК после сорбц. на ПАНИ база -3,8; ДНК после сорбц. ПАНИ трубки 30% Ag - 4,9; ДНК после сорбц. ПАНИ гран. с Ag 70%.

Сопоставлены результаты до и после сорбции фрагментов ДНК на все ПАНИ сорбенты. В случае ПАНИ трубок падение содержания фрагментов ДНК в растворе достигало 8%. Наибольшей сорбционной способностью до 44% обладали нанотрубки ПАНИ-Ag 30%. С повышением концентрации Ag в гранулах до 70% наблюдалось уменьшение связывания ДНА до 5%. Возможно это объясняется разным содержанием во фрагментах ДНК гуанина и аденина.

Резюме к главе 2

В главе 2 приведены данные по сорбции вирусов гриппа A(H1N1), A(H1N1)pdm09, A(H3N2), B и фрагментов ДНК (полученных в результате амплификации РНК вирусов гриппа A(H1N1)pdm09 и B) на различные сорбенты (наноалмазные материалы, углеродные нанотрубки и полимерные сорбенты содержащие полианилин). Исследовали возможное влияние разных факторов: антигенных свойств поверхностных белков вирусов гриппа, массы сорбента, времени контакта вирус-сорбент, температуры раствора на сорбционные взаимодействия. Установлено, что вирусы гриппа сорбируются из раствора на выбранные сорбенты. Наиболее активная адсорбция происходит в первые 10 – 15 мин. контакта сорбента с вирусом. Интенсивность сорбции зависела от концентрации сорбента в растворе и его структуры, не зависела от антигенной формулы вирусов и от температуры. Сорбция вирусов из различных растворов происходила при температуре в диапазоне 4-37 °С в течение 20 мин. Десорбцию вирусов в физиологический раствор при 4 и 22 °С не регистрировали в течении 48 часов.

Результаты по сорбции вирусов гриппа А и В на наноалмазы, их модификации и шихту показали отсутствие влияния предварительной температурной обработки ДНА на сорбцию вирусов гриппа. Выявлено взаимодействие вирусов гриппа с различными вариантами модифицированных наноалмазов и с композитами наноалмазов с полианилином.

Результаты исследования выявили возможность сорбции вирусов гриппа на углеродные нанотрубки, ПАНИ нанотрубки и композитов ПАНИ нанотрубок с Ag 30 % и ПАНИ гранул с Ag 70%. Установлено, что присутствие Ag в ПАНИ композитах усиливает их адсорбционные свойства относительно аллантаического вируса и фрагментов ДНК.

Глава 3. Деконтаминация водных растворов, инфицированных вирусом полиомиелита, с помощью современных углеродсодержащих материалов и полимерных композитов

Следующий этап исследования посвящен взаимодействию сорбентов с другими вирусами, имеющих отличия в структуре белков. В качестве такого вируса был выбран безоболочечный вирус - вакцинный штамм полиомиелита типа1 Сэбина. Основанием для его использования в качестве референс-вируса является его высокая устойчивость к физико-химическим воздействиям. Работа посвящена исследованию взаимодействия этого вируса с современными углеродсодержащими наноалмазными материалами и полианилиновыми композитами с различным процентным содержанием серебра Ag и без него.

Интенсивность сорбции определяли по подавлению инфекционной активности после контакта с сорбентами. Количество вируса определяли методом титрования в культуре клеток Vero микроскопически по развитию вирусиндуцированного ЦПД. В качестве параметра измерения выбрана 50 % тканевая цитопатическая инфекционная доза - IgТЦИД₅₀.

В данной главе изучали следующие группы сорбентов: 1) многостенные углеродные нанотрубки (УНТ); 2) наноалмазсодержащие материалы: шихта, детонационные наноалмазы (ДНА), полученные в результате очистки шихты в парах азотной кислоты при температуре до 300°C, графитизированные наноалмазы (ДНА_{граф}), хлорированные наноалмазы (ДНА_{хл}), детонационные аминированные (ДНА_{амин}); 3) полимер содержащие материалы- нанотрубки ПАНИ, композиционный сорбент ПАНИ нанотрубки +Ag, ПАНИ гранулярной морфологии с частицами Ag.

Адсорбцию вирусов проводили из вирусосодержащей культуральной среды Игла МЕМ, использованной для репродукции вируса. Вирусная суспензия в виде вирусосодержащей культуральной среды Игла МЕМ смешивалась с сорбентом в соотношении 4-5 мг сорбента (в сухом виде) и 200 мкл вирусной суспензии с титром вируса 3,5-4 IgТЦИД₅₀ и подвергалась встряхиванию на шейкере при температуре 22 °С в течение 20 минут. Комплекс сорбент-вирус осаждали центрифугированием при 3000 об/мин в течение 5 минут. Об интенсивности сорбций вирусов на сорбенты судили как по подавлению инфекционной активности после контакта с сорбентами, так и по инфекционности

комплекса вирус-сорбент. Наличие инфекционного вируса определяли методом титрования в чувствительных культурах фибробластов почек зеленой мартышки Vero измеряемого в $IgTЦИД_{50}$ (50% тканевая цитопатическая инфекционная доза).

В таблице 15 представлены результаты исследования сорбции вирусов полиомиелита на материалы, имеющие различную природу. Как видно из представленных данных, углеродсодержащие материалы – углеродные трубки и наноалмазные материалы адсорбируют вирус. Наибольшее снижение инфекционной активности составила 2.5-3 $IgTЦИД_{50}$ для шихты и графитизированных наноалмазов, несколько меньше 2 $IgTЦИД_{50}$ для всех других модифицированных ДНА. Наряду с указанными видами химического модифицирования проводилось изменение природы поверхности ДНА - её частичной графитизацией нагревом при температуре не менее 800 °С в токе аргона ВЧ в течение 1 ч. Поэтому представляло интерес исследовать ДНА с различным модифицированием поверхности, с целью отбора материалов, наиболее способных к адсорбции из водных растворов биологических объектов. Как показали наши исследования, все материалы были способны сорбировать вирус полиомиелита, однако степень сорбции зависела от структуры поверхности ДНА. Отдельно стоит вопрос об активности вируса после соединения с ДНА. Обнаружение инфекционного вируса в комплексе сорбент +вирус в титре от 3.2 до 4.5 $IgTЦИД_{50}$ говорит о том, что вирус соединяется с ДНА, но не инактивируется. Для ответа на вопрос насколько активно соединение, мы провели ресуспендирование комплекса в физиологическом растворе (ФР). Эксперименты проводили с двумя комплексами (вирус полиомиелита + наноалмазные сорбенты -ДНА и ДНА_{граф}). Комплексы ресуспендировали с ФР ставили на контакт при T=22°C и повторно осаждали центрифугированием. Анализ надосадка показал отсутствие инфекционного вируса в случае исследования как с обычным ДНА, так и ДНА_{граф}. Результаты показывают, что комплекс (вирус + ДНА сорбент) слабо диссоциирует в ФР при ресуспендировании при T=22°C. Инфекционность иммуносорбентов проверяли при внесении суспензии их в объеме V=20 мкл в лунки микропанели, содержащие клетки Vero. Установлено, что иммуносорбент с ДНА обладал инфекционной активностью, которая уменьшалась при ресуспендировании комплекса (таблица 16). Сопоставляя полученные с ДНА с результатами с данными представленными в гл.2, по взаимодействию модифицированных наноалмазов с вирусами гриппа можно сказать, что на сорбцию как оболочечных, так и безоболочечных вирусов влиял от характер модификации.

Следующими объектами исследования были нанотрубки ПАНИ, содержащие и не содержащие Ag. Сорбенты были в сухом виде. Эксперимент проводили по схеме,

приведенной выше для ДНА материалов. Как видно из представленных данных, эти материалы так же сорбировали вирус полиомиелита из раствора. Падение титра наблюдалось с начального $4,5 \lg \text{TЦИД}_{50}$ до $3,5 \lg \text{TЦИД}_{50}$ в случае нанотрубки ПАНИ (небольшое падение титров) и до $2,5 \lg \text{TЦИД}_{50}$ в случаи композитов Пани трубок с Ag. Это указывает на увеличение адсорбционной способности полианилиновых композитов относительно вируса полиомиелита при добавлении в ПАНИ трубок Ag .

При сравнении всех выбранных в данной работе сорбентов наиболее активные и практически одинаковыми являются ДНА, графитизированные при $T = 900$ и 1000°C хлорированные и композиты - нанотрубки ПАНИ с Ag 30% и 70%. Таким образом сорбенты, относящиеся к обоим типам, содержащие наноалмазы или полимер ПАНИ, могут взаимодействовать с вирусом полиомиелита. Иммуносорбенты, содержащие как ПАНИ, так и ДНА, обладали инфекционной активностью от $2,5 \lg \text{TЦИД}_{50}$ до $4 \lg \text{TЦИД}_{50}$. Согласно литературным данным разрушение вирусов полиомиелита в растворах зависит от вида и концентрации ДЭЗ средств и приводит к уменьшению инфекционного титра вирусов в растворе.

Полученные в работе данные, свидетельствуют о том, что наноалмазы разной модификации, шихта, а также комплексы ПАНИ с серебром могут взаимодействовать с безоболочечными вирусами. Это расширяет аспекты применения данных сорбентов в биологии и медицины.

Таблица 15

Инфекционная активность вируса полиомиелита до и после взаимодействия с сорбентами

Вид материалов	№	Сорбент	Титр вируса, 0,2мл,lg ТЦИД ₅₀ до сорбции	Титр вируса полиомиелита, lg ТЦИД ₅₀ после сорбции	
				Надосадок	Иммуносорбент, после осаждения V= 3000 об/мин
Углерод содержащие материалы	1	Шихта	4,5	2,0	3,5
	2	ДНА базовый (не модифицированный)	3,5	2,5	3,2
	3	ДНА графитизированный при T= 800 ⁰⁰ С в Ag	3,5	2,5	2,5
	4	ДНА графитизированный при T= 900 °С в Ag	3,5	1,5	2,7
	5	ДНА графитизированный 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 хлорированный очищенный	3,5	1,5	2,5
	8	Углеродные нанотрубки	4,5	3,0	2,5
Полианилиновые композиты	9	Нанотрубки ПАНИ	4,5	3,5	4,0
	10	нанотрубки ПАНИ + Ag,30%	4,5	2,5	3,5
	11	глобулы ПАНИ + Ag,70%	4,5	2,5	3,0

Примечание масса сорбента=5 мг

Таблица 16

Определение инфекционного титра полиовируса в комплексе после ресуспендирования и повторного центрифугирования

№	Исследуемые фракции	Титр вируса, 0,2мл, lg ТЦИД ₅₀	
		ДНА графитизированный при T= 1000 ⁰ С	ДНА базовый (не модифицированный)
1	Исходный вирус	3,5	
2	Надосадок 1 (10 000об/мин)	1,0	1,0
3	Комплекс 1(осадок)	1,0	3,0
4	Ресуспендирование осадка 1	1,0	1,5
	Надосадок 2 (10 000об/мин)		
5	Комплекс 2 (осадок 2)	1,0	2,5

Резюме к главе 3

Показано, что углеродсодержащие материалы (детонационная шихта, модифицированные детонационные наноалмазы, углеродные нанотрубки), композиты - полианилиновые нанотрубки, содержащие Ag) способны сорбировать из среды Игла вирус полиомиелита при T = 22 ° C в течение 20 мин. Снижение тканевой цитопатической инфекционной дозы варьировало от 2 до 2.5 lg ТЦИД₅₀ . Диссоциация иммуносорбентов на вирусы и сорбенты в ФР не наблюдалась. Образованные иммунные комплексы обладали инфекционной активностью в культуре клеток Vero.

Глава 4. Изучение взаимодействия альбумина и иммуноглобулинов с ДНА содержащими материалами и композитами полианилина с Ag и без Ag

Для исследования сорбции белков не вирусной природы на исследуемые наноматериалы были взяты бычий сывороточный альбумин, который активно используется в иммунологических реакциях, и иммуноглобулины, входящие в состав иммунных сывороток животных. Для исследования сорбции бычьего сывороточного альбумина использовали два метода: электрофорез белков в ПААГе и конкурентный метод сорбции. Для оценки сорбции иммуноглобулинов из сывороток- метод РТГА.

4.1.Изучение сорбции альбумина и иммуноглобулинов на ДНА сорбенты

Альбумин $C=1$ мг/мл сорбировали на шихту и на ДНА. Для оценки интенсивности сорбции методом электрофореза белковых проб в ПААГе на лунки фокусирующего геля наносили последовательно: альбумин $C=1$ мг/мл; образцы, содержащие альбумин с концентрацией 0,5 и 0,25 мг/мл в качестве маркеров концентрации белка; надсадок, содержащий не адсорбированный на шихту альбумин; надсадок, содержащий не адсорбированный на ДНА альбумин. Результат электрофореза представлен на рис. 23. В результате сравнения толщины белка в маркировочных пробах альбумина с концентрацией 1-0.25 мг/мл (дорожки1-4) и изученных образцов после сорбции получилось, что на шихту белок садится полностью - белок не регистрируется в полосе геля (дорожка 4); в надсадке после сорбции на ДНА регистрируется альбумин в концентрации примерно 0.3 мг/мл (дорожка 5), то есть адсорбировалось примерно 70%.

Далее были проведены исследования сорбции альбумина и способности его конкурировать с вирусом за места связывания на сорбенте. Эксперимент проводили по следующей схеме. Первый этап включал сорбцию препаратов альбумина с концентрацией $C = 1, 2, 4$ мг/мл на шихту (сухой порошок), помещенную в 3 флакона по 2 мг. Затем комплекс шихта +альбумин добавляли в растворы, содержащие равное количество вируса, далее по стандартному методу. Как видно из полученных данных, альбумин в концентрации $C = 2-4$ мг/мл конкурировал с вирусом за места связывания на шихте (рис.24). При концентрации альбумина 1мг/мл он не мешал связыванию сорбента с вирусами, что приводило к снижению ГА титра вируса в растворе с 4096 до 4ГАЕ, то есть в 1000 раз.



1	2	3	4	5
---	---	---	---	---

Рис.23. Электрофорез различных концентраций бычьего сывороточного альбумина до и после сорбции на шихту и ДНА.

Дорожки:1. альбумин $C=1\text{мг/мл}$ до сорбции, 2. альбумин $C= 0,5 \text{ мг/мл}$ маркер концентрации белка, 3. альбумин $C= 0.25\text{мг/мл}$ маркер концентрации белка,4. альбумин $C=1\text{мг/мл}$ после сорбции на шихту, 5. альбумин $C=1\text{мг/мл}$ после сорбции на ДНА жидкфаз

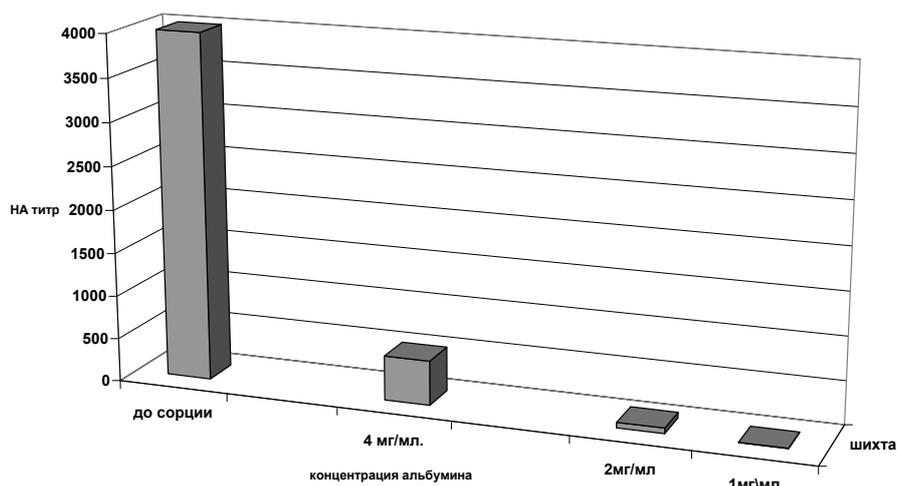


Рис. 24. Сорбция концентрированного вируса гриппа А/Перт/06/09 (H3N2) на шихту в зависимости от присутствия в растворе разной концентрации альбумина:

По оси ординат ГА титр вируса гриппа, по оси абсцисс концентрация альбумина

Таким образом, с помощью электрофореза в ПААГе и конкурентном методе сорбции с вирусом показано, что белок не вирусной природы - бычий сывороточный альбумин способен взаимодействовать с сорбентами, содержащими ДНА материалы.

На следующем этапе изучения были взяты сывороточные белки - иммуноглобулины. Для этого в крысиную сыворотку, приготовленную к вирусу гриппа В/Флорида/04/06, обработанную РДЭ, затем разведенную в 20 раз ФР, V= 200мкл добавляли 4 мг ДНА или ДНА Т, затем проводили сорбцию антител при комнатной температуре. После сорбции взвесь центрифугировали и в надосадке определяли титр сыворотки после сорбции в РТГА. В качестве контроля использовали разведенную в 20 раз ФР иммунную сыворотку, которую использовали до сорбции. Сравнительные исследования титров антител иммунной сыворотки, после контакта с двумя вариантами наноалмазов ДНА и ДНА Т (прошедшими термообработку) показал, титр исходной сыворотки к штамму В/Флорида 04/06 падал с 1280 до < 40 после контактов с ДНА Т, и был равен 40 в случае ДНА без обработки. Результаты, представленные в таблице 17 свидетельствуют, что оба образца алмазов в количестве 4 мг способны сорбировать вирусспецифические антигриппозные антитела из иммунной сыворотки разведенной в ФР.

Таблица 17

Взаимодействие вируса В/Флорида/04/06 с антителами из сыворотки к вирусу гриппа В/Флорида/04/06 до и после контакта антител с сорбентами ДНА и ДНА Т (РТГА)

N	Сорбент	Титр сыворотки		Объем сыворотки, разведенной 1/20	растворитель	Масса сорбента
		До сорбции	после сорбции			
1	ДНА Т	1280	<40	200мкл	ФР	4 мг
2	ДНА		40	200мкл	ФР	4 мг

4.2 Изучение сорбции альбумина на УНТ и ПАНИ композиты

Следующий этап исследования был посвящен взаимодействию альбумина с сорбентами. Результаты анализа взаимодействия альбумина с концентрацией $C=1$ мг/мл с ПАНИ нанотрубками представлен на рис.25.

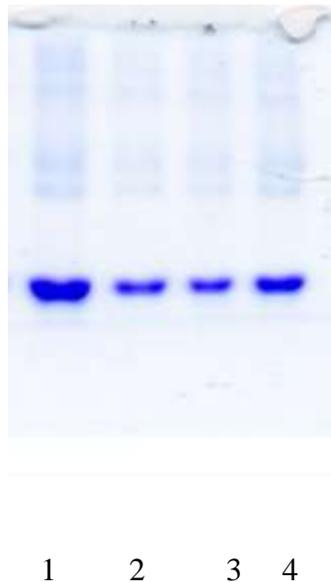


Рис.25 . Электрофорез альбумина до и после сорбции на нанотрубки ПАНИ

Дорожки: 1-альбумин $C=1$ мг/мл до сорбции, 2- альбумин в надосадке после сорбции на ПАНИ нанотрубы, 3 -альбумин $C= 0.25$ мг/мл маркер, 4 -альбумин $C=0,5$ мг/мл маркер молекулярного веса.

В лунки фокусирующего полиакриамидного геля последовательно вносили: альбумин с концентрацией $C=1$ мг/мл до сорбции, надосадык- альбумин после сорбции на ПАНИ нанотрубы, маркеры- образцы, содержащие альбумин с концентрацией 0,25 и 0,5 мг/мл. Параметры электрофореза: образец в объеме $V=25$ мкл, время электрофореза $t=2,5$ ч., ток $J=25-30$ мА. В результате сравнения ширины маркировочных проб альбумина в геле с концентрацией 1-0.25 мг/мл (дорожки 1-3,4) и изученного образца получилось, что в надосадыке после контакта с сорбентом остался альбумин с концентрацией 0,25 мг/мл (дорожка 2); то есть адсорбировалось на ПАНИ трубках примерно 75% (рис.25).

Для определения возможности взаимодействия сорбентов с альбумином по конкурентной схеме были взяты нанотрубки ПАНИ, нанотрубки ПАНИ-Ag 30%, гранулы ПАНИ- Ag 70% и УНТ. В эксперименте сорбенты предварительно помещали в отдельные флаконы, содержащие препараты альбумина с концентрацией от 1 до 4 мг/мл. После чего проводился эксперимент по сорбции его на сорбенты, затем добавляли вирусы гриппа $V=200$ мкл; после контакта при $t=22^{\circ}\text{C}$ и осаждения, определяли ГА титры в надосадыке. Как показали исследования, наибольшая сорбционная активность- падение ГА активности наблюдалась в случае ПАНИ Ag 30%, меньше у ПАНИ-Ag70% . активная сорбция для ПАНИ трубок наблюдалась только, когда концентрация альбумина сократилась до 1 мг/мл. До этой сорбентов все функциональные места для связывания были блокированы альбумином. Ситуация была иная с УНТ, на которые вирус сорбировался неактивно в независимости от концентрации альбумина в диапазоне 1-4 мг/мл.

По степени активности исследуемые сорбенты могут быть расположены в следующем порядке: ПАНИ-Ag 30%, > ПАНИ-Ag70%) ~ ПАНИ > УНТ. Наибольшей активностью обладал ПАНИ-Ag 30%.

4.3 Изучение сорбции антител на иммуносорбенты (комплексы вируса с сорбентами)

В главе 2 стр. 60 прямыми опытами показана возможность сорбция вирусов на ПАНИ сорбенты. Образованные иммуносорбенты исследовались нами на способность связываться с антителами. Для этого вначале вирус иммобилизовали на сорбент, затем по аналогии с иммуноферментным методом, в пробирку с иммуносорбентами добавили 1 % раствор альбумина для забивки свободных мест, после контакта иммуноглобулины помещали в раствор гомологичной сыворотки к А/ Виктория /361/11, разведенной 1:10 в ФР.

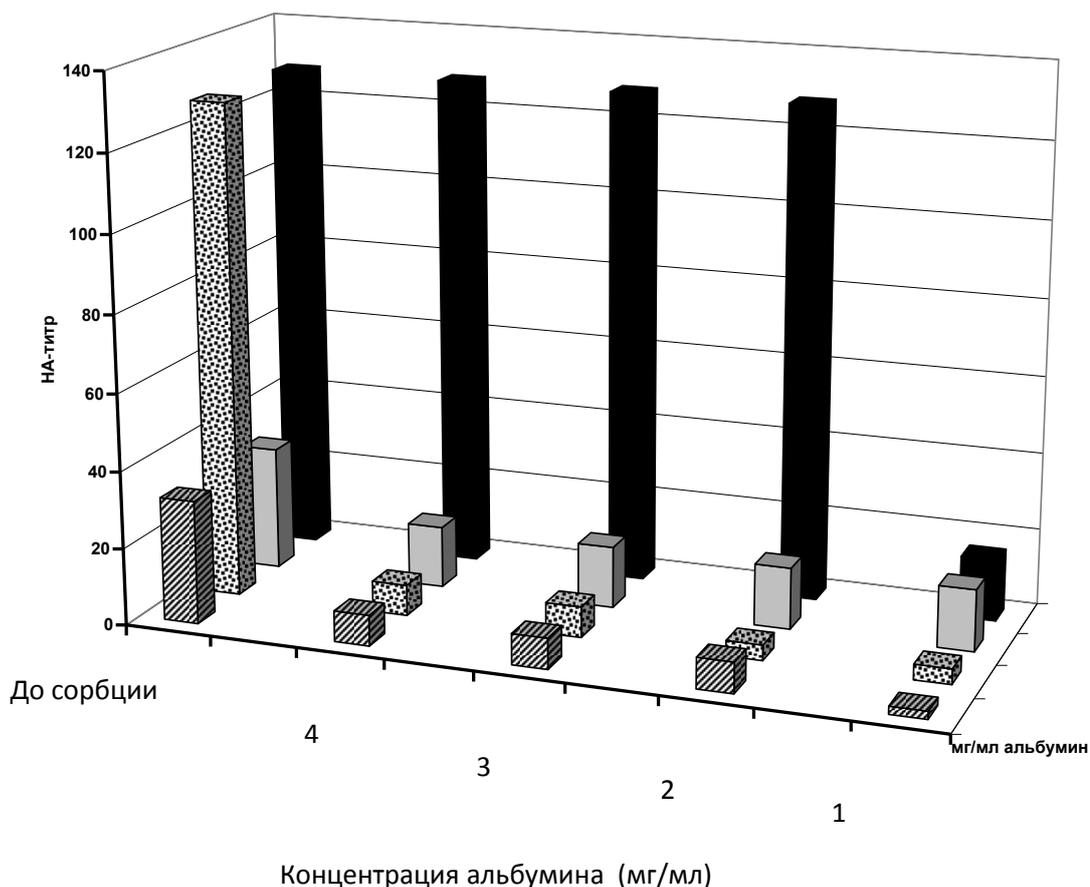


Рис. 26. Сорбция концентрированного вируса гриппа А/Виктория/ 361/11 (H3N2) на сорбенты в зависимости от концентрации альбумина:

По оси ординат- ГА титр вируса гриппа, по оси абсцисс концентрация альбумина.

нанотрубки ПАНИ,
 нанотрубки ПАНИ Ag 30%,
 гранулы ПАНИ Ag70%
 УНТ

После контакта компонентов в течение 1 часа при $T=22^{\circ}\text{C}$, иммуносорбент с адсорбированными антителами осаждали из раствора методом центрифугирования при 20000 об/мин в течении 10 мин. Раствор иммунной сыворотки до сорбции и надосадочная жидкость после центрифугирования исследовали на наличие антител в РТГА с гомологичным вирусом. Результаты показали, что достоверное уменьшение титра сыворотки в 4 раза, наблюдалось только для гранул ПАНИ-Ag 70%. Не зависимо от температуры и времени контакта. Это можно объяснить более низкой сорбционной способностью нанотрубок ПАНИ и УНТ в сравнении с композитами ПАНИ- гранулами, содержащими Ag 70 % (таблица 18)

Таблица 18

Сорбция антител из иммунных сывороток к вирусу гриппа А/ Виктория /361/11 (H3N2) с использованием иммуносорбентов (комплексов сорбентов с вирусами гриппа)

№	Иммуносорбент	Сыворотка, обработанная РДЕ	Титр сыворотки		Контакт	Масса сорбента	T° С
			до сорбции	после сорбции			
1	УНТ+ Конц вирус+альбумин	Сыворотка к А/ Виктория /361/11 (H3N2)	640	320	40 мин	4 мг	22
2	Нанотрубки ПАНИ + Конц вирус+альбумин		640	320	40 мин	4 мг	22
3	Нанотрубки ПАНИ Ag 30%+ Конц вирус+альбумин		640	320	40 мин	4 мг	22
4	Нанотрубки ПАНИ Ag 30%+Конц вирус+ альбумин		640	320	21 час	4 мг	4
4	Гранулы ПАНИ 70%Ag+ Конц вирус+альбумин Конц вирус+альбумин		640	160	40 мин	4 мг	22

Резюме к главе 4

В главе 4 представлены результаты по изучению взаимодействия и влияния сорбентов: ДНА содержащих материалов, УНТ и композитов ПАНИ, на бычий сывороточный альбумин и иммуноглобулины иммунных сывороток.

Установлено, что ДНА материалы способны взаимодействовать с альбумином, в зависимости от сорбента эффективность сорбции варьировала от 100% в случае шихты до 70% в случае ДНА. Альбумин в концентрациях C=2- 4 мг/ мл конкурировал с вирусом за места связывания на сорбенте. ДНА способны взаимодействовать с вирус-специфическими антителами из иммунных крысиных сывороток. Титр иммунной сыворотки к вирусу гриппа В/Флорида 04/06 в РТГА после контакта с сорбентом ДНА падал с 1280 до < 40 .

Установлено, что УНТ, ПАНИ нанотрубки, ПАНИ нанотрубки с Ag 30% и ПАНИ гранулы ПАНИ с Ag 70% с способны взаимодействовать с альбумином, но активность сорбции зависела от сорбента. В случае УНТ, вирус и альбумин в пределах концентрации 1-4 мг/мл одинаково взаимодействовал с сорбентом, то есть конкуренция с альбумином имела место, что могло свидетельствовать о избирательном числе мест связывания на сорбенте в отношении альбумина и вируса. Предпочтение альбумину наблюдалось в случае

нанотрубок ПАНИ, вирусы сорбировались из растворов при концентрации альбумина $C \leq 1$ мг/мл. Наибольшей активностью обладали нанотрубки с Ag с 30% и гранулы ПАНИ с Ag 70% . Эти данные говорят об увеличении адсорбционной активности сорбентов при добавлении к ним Ag.

Исследования показали, приготовленные иммуносорбенты по-разному взаимодействуют с антителами. Достоверное уменьшение титра сыворотки (в 4 раза) после контакта с данными сорбентами, наблюдалось только для гранул ПАНИ-Ag 70% с вирусами.

Таким образом, показано, что взаимодействие сорбентов с альбумином и иммуноглобулинами зависит от природы сорбентов.

Глава 5 . Исследование влияния сорбентов на биологические объекты в опытах *in vivo* и *in vitro*

В данной главе представлены результаты исследования влияния выбранных сорбентов в опытах *in vitro* и *in vivo* на клетки МДСК и на гемопоэз лабораторных животных (белых крыс) .

5.1.Влияние сорбентов на клетки МДСК и репродукцию вирусов гриппа

Выбор клеток МДСК обусловлен следующими обстоятельствами: эти клетки являются клетками млекопитающих (клетки почки собаки), на них активно выделяют и культивируют эпидемические штаммы вирусов гриппа, особенно А(Н3N2) и В. Была поставлена задача оценить влияние сорбентов на сохранение жизнеспособности, а также изучить влияние сорбентов на сохранение способности клеток МДСК к репродукции в них вируса гриппа. Для этого сорбенты были ресуспендированы в ФР с начальной концентрация 10 мг/мл. Суспензию сорбентов в объеме 20мкл, вносили в лунки микропланшет, содержащие клетки МДСК в среде V= 180 мкл/лунку, Следовательно в первой лунке С сорбента составила 1мг/мл, далее проводили разведение среды с сорбентами 1/10 в лунках и планшет помещали в термостат при 37°C на 48 часов. После этого состояние клеточного монослоя оценивали визуально, с помощью светового микроскопа. Как показали исследования, внесение в среду детонационных наноалмазных материалов, ПАНИ нанотрубок , ПАНИ нанотрубок с 30 % и 70% содержанием серебра , а также композитов ДНА материалов с основанием полианилина (ПАНИ) не влияло на состояние клеточного монослоя при концентрации сорбентов 1 мг/мл и менее.

Что касается УНТ при концентрации сорбента С=1мг/мл монослой был разрушен. При более низких концентрациях УНТ ($C \leq 0.1$ мг/мл) слой был частично разрушен и только при концентрациях меньше $C=0.001$ мг/мл УНТ не оказывали воздействия на монослой. Это говорит о большей токсичности УНТ по сравнению с другими сорбентами.

Для ответа на вопрос, сохраняют ли клетки MDCK, после предварительного контакта с сорбентами, способность к репродукции вируса гриппа был введен дополнительный этап. Исследовали следующие сорбенты: шихта, ДНА амин, ПАНИ трубки 30%Ag в исходной концентрации 10 мг/мл. Сорбенты вносили в разведениях: от 10^{-1} до 10^{-8} , что соответствовало диапазону конечных концентраций сорбентов в лунках от 1 мг/мл до $1 \cdot 10^{-7}$ мг/мл. После контакта с клетками в течении 24 часов суспензии сорбентов сливали и в лунки панелей вносили вирус А/Москва/212/2014 (H3N2) (начальный титр 64 ГАЕ) в двух разведениях: 10^{-1} и 10^{-2} . После контакта с клетками в течение 48 часов наблюдали цитопатическое действие (ЦПД) и определяли ГА активности культуральной жидкости из каждой лунки. Результаты исследований показали, что в лунках, предварительно обработанных суспензией шихты с концентрацией от 1 мг/мл до 0,01 мг/мл ЦПД наблюдали у 50%-75 % клеток. В лунках, обработанных суспензией шихты в концентрации 0,001 мг/мл ЦПД наблюдали у 100 % клеток. Для ДНА – в лунках, предварительно обработанных суспензией ДНА с концентрацией от 1 мг/мл до ЦПД наблюдали у 75 % клеток. В лунках, обработанных суспензией ДНА в концентрации 0,1 мг/мл ЦПД наблюдали у 100 % клеток. В случае ПАНИ нанотрубок с 30 %Ag ЦПД не наблюдался при концентрации сорбента 1 мг /мл, но наблюдался при концентрации с 10^{-1} мг/мл (75% клеток). В контрольных лунках, не контактировавших с сорбентом, наблюдался 100 % ЦПД. Определение вируса гриппа на наличие в РГА показало, что он регистрировался во всех лунках, кроме предварительно обработанных ПАНИ с 30% Ag в концентрации 1 мг/мл. Результаты были подтверждены в РГА. Таким образом, показано, что клетки MDCK, содержащие наночастицы, были способны репродуцировать вирусы гриппа А.

Второй аналогичный опыт проводился с этими же сорбентами, но с использованием вируса гриппа В/Москва/3/2014 (начальный титр 128 ГАЕ). В лунках, предварительно обработанных суспензией шихты с концентрацией от 0,1 и 0,01 мг/мл ЦПД наблюдали у 50%-75 % клеток. В лунках, обработанных суспензией шихты в концентрации 0,001 мг/мл ЦПД наблюдали у 100 % клеток. Для ДНА – в лунках, предварительно обработанных суспензией ДНА с концентрацией от 0,1 мг/мл до ЦПД наблюдали у 75 % клеток. В лунках, обработанных суспензией ДНА в концентрации 0,01 мг/мл ЦПД наблюдали у 100 % клеток. В случае ПАНИ нанотрубок с 30 %Ag при концентрации суспензии сорбента 1 мг /мл ЦПД наблюдался у 50% клеток, при концентрации с 0,1 мг/мл у 100% клеток. Результаты были подтверждены в РГА. В контрольных лунках, не контактировавших с сорбентом, наблюдался 100 % ЦПД/ Таким образом, клетки, содержащие наночастицы, также были способны репродуцировать вирусы гриппа В.

Оба опыта проводились с двумя разведениями вируса (10^{-1} и 10^{-2}) и с тремя повторами для каждого разведения и каждого сорбента. Сводные результаты экспериментов представлены в табл 19

Таблица 19

Влияние сорбентов на способность культуры клеток МДСК к репродукции вируса гриппа

вирус	А/Москва/212/2014 (H3N2)				В/Москва/3/2014			
	шихта	ДНА _{амин}	ПАНИ+ 30% Ag	Контр.	шихта	ДНА _{амин}	ПАНИ+ 30% Ag	контр.
1,0	50-75%*	75%	abs	100%	abs	abs	50%	100%
$1 \cdot 10^{-1}$	75%	100%	75%	100%	50-75%	75%	100%	100%
$1 \cdot 10^{-2}$	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
$1 \cdot 10^{-3}$	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
$1 \cdot 10^{-4}$	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
$1 \cdot 10^{-5}$	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
$1 \cdot 10^{-6}$	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

*процент погибших клеток вследствие цитопатического действия вируса гриппа, оценка проводилась с помощью светового микроскопа

Следующий этап работы по изучению цитотоксического эффекта проводили с помощью классического метода МТТ. Исследования проводились на клетках Vero с сорбентами: ДНА синт., ДНА_{амин}, ДНА_{хлор} и ДНА_{граф}. Каждый образец исследовался три раза. Средние арифметические показания оптической плотности растворов и средне квадратичные отклонения представлены в табл.20. Оптическая плотность растворов в контроле, где исследовались клетки без внесения сорбентов составляла 0.75 ± 0.02 . Как показали исследования не было выявлено уменьшения оптической плотности материала по сравнению с контрольным образцом, при концентрации сорбента от 10^{-1} до 10^{-2} мг/мл, который интерпретируется как цитотоксический эффект при использовании этого метода и объясняется гибелью или потерей активности митохондрий. В нашем случае наблюдалось увеличение оптической плотности раствора, которое может быть объяснено разными причинами: потерей активности митохондрий, возможно из-за супрессии механизма их деятельности под влиянием исследуемых наночастиц или от других факторов. Во всяком случае, полученные данные свидетельствуют о том, что в классическом варианте метод

МТТ не может быть применен для определения цитотоксического эффекта данных сорбентов. Требуется проведение дальнейших исследований взаимодействия наночастиц с клетками для ответа на вопросы каковы механизмы взаимодействия и какими будут последствия в клетках после проникновения в них наночастиц.

Таблица 20

Метод МТТ. Оптическая плотность растворов клеток Vero при длине волны $\lambda = 630$ нм после добавления сорбентов.

С* мг/мл	ДНА _{жид фаз}	ДНА _{амин}	Шихта	ДНА _{хлор}	ПАНИ трубки Ag30%	ДНА _{граф 900с}
10 ⁻¹	1.22±0.03	1.26±0.03	1.49±0.02	1.12±0.02	0.83±0.02	1.01±0.03
10 ⁻²	1.07±0.01	0.99±0.02	1.01±0.02	0.85±0.02	0.51±0.02	0.73±0.01
10 ⁻³	0.78±0.02	0.76±0.01	0.96±0.01	0.71±0.02	0.39±0.01	0.55±0.03
10 ⁻⁴	0.66±0.02	0.70±0.01	0.72±0.01	0.36±0.01	0.49±0.01	0.57±0.02

Примечание: С* - концентрация сорбентов в лунке. В опыте начальная концентрация сорбентов составляла 1 мг/мл, концентрация сорбентов в лунках варьировала от 10⁻¹ до 10⁻⁴ мг/мл. Средняя арифметическая оптическая плотность в контроле составляла $I = 0.75 \pm 0.02$.

5.2 Влияние ПАНИ - нанотрубок на гемопоэз животных

Изучение токсичности нанопрепаратов *in vivo* представляет собой важную, но в то же время очень непростую и объемную задачу. В нашей работе мы не ставили целью проведение подробного исследования по оценке влияния используемых сорбентов на гемопоэз лабораторных крыс, поэтому приведенные ниже результаты следует рассматривать как первый предварительный этап работы в этом направлении. Для его проведения были взяты лабораторные белые крысы, которых разделили на 2 группы по 2 животных в каждой группе. Животным первой группы вводили внутрибрюшинно в виде суспензии нанотрубки ПАНИ в ФР, животным второй группы нанотрубки ПАНИ с Ag30% в ФР, одному животному (контроль) был введен физраствор и трем животным аллантаоисный вирус, вакцинный штамм А(Н3N2). Однократно вводимая доза сорбентов содержала 3 мг сорбента в 1,2 мл ФР на 1 животное. Препараты вводили внутрибрюшинно, 3-хкратно через 14 дней, затем следовал замер веса животного и взятие крови. Полученные

результаты по замеру веса животных после введения препаратов представлены в таблице 21.

Таблица 21

Определение веса крыс после введения им сорбентов, ФР, аллантаисного вируса гриппа А(Н3N2).

№ крысы	Препарат	Число крыс	Вес крыс перед вскрытием	Средний вес (г)
1 2	ПАНИ нанотрубки	2	290 345	317±28
3 4	ПАНИ нанотрубки Ag 30%,	2	335 313	325±11
5	ФР, контроль	1	321	321
7 8 9	Аллантаисный вирус А/Minnesota /11/ 2010х 203 (Н3N2) контроль	3	343 321 322	328±9.3

Примечание: Расчет среднего веса проводился по формуле $A+B=C$, где А и В вес каждой крысы $|A-C| + |B-C| = d$; $d:2=e$; Среднее вес крысы $C:2±e$. В пробирки добавляли антикоагулянт –ЭДТА-порошок

Вес крыс до начала опыта составлял $138±5$ г. Введение препаратов ПАНИ с и без Ag не повлияло на вес животных. Он колебался в пределах от 317 до 328 грамм .

Что касается формулы крови крыс, получивших препарат ПАНИ нанотрубки (без серебра), то в ней были зафиксированы изменения по сравнению с контролем (табл 22). Процентное содержание моноцитов было в выше 4 раза, эозинофилов –выше в 2 раза чем у контрольных крыс. В формуле крови 2-ой группы крыс, которым вводили препарат полианилина с 30% содержанием серебра, также имеются отклонения : 2-х кратное уменьшение лейкоцитов, 7-ми кратное увеличение моноцитов, 2-х кратное увеличение эозинофилов по сравнению с контролем. Формула крови крыс, иммунизированных аллантаисным вакцинным штаммом А(Н3N2) выявила также изменения от контроля. Обнаружено в 2 раза больше лейкоцитов и моноцитов по сравнению с контролем. Показателем проявления токсичности препаратов является изменение таких клеток крови, как моноциты (увеличение), и появление зернистости нейтрофилов. В нашем случае мы наблюдалось только увеличение моноцитов.

Таблица 22.

Формулы крови крыс, иммунизированных комплексами ПАНИ нанотрубок без и с Ag 30%.

Препарат	Нанотрубки ПАНИ			Нанотрубки ПАНИ с Ag 30%			ФР контроль	Вирус аллантоисный А(Н3N2) контроль				
	1	2	среднее значе-е	3	4	среднее значе-е		5	7	8	9	Среднее значе-е
№ крысы												
Лейкоциты 10 ⁹ /л	8	7.2	7.6	4.8	3.5	4.2	8.5	18	19	12	16.3	
Лимфоциты %	68	67	67.5	51	50	50.5	73	75	72	73	73.3	
Нейтрофилы %	22	24	23	39	36	37.5	21	20	23	21	21	
Моноциты %	4	5	4.5	6	8	7	1	2	2	3	2.3	
Эозинофилы %	3	2	2.5	2	2	2	0	1	1	1	1	
Т-лимфоциты %	62	56	59	52	48	50	64	46	50	66	54	
В-лимфоциты %	9	11	10	8	9	8.5	11	14	15	12	13.6	
CD4 %	52	45	48.5	39	36	37.5	55	28	31	44	34	
CD8 %	10	11	10.5	13	12	12.5	12	18	19	12	16.3	
Фагоцитарные нейтрофилы %	48	41	44.5	59	58	58.5	40	45	44	42	42.6	
Эритроциты%	8	8.1	8.15	9.2	9.3	9.25	8	8.5	9	7.9	8.4	

5.3. Влияние введения животным комплексов ДНА+ вирус гриппа

В данном разделе работы представлены результаты исследования влияние введения животным (крысам) ДНА содержащих иммуносорбентов на индукцию антител и формулу крови. Целью данного этапа работы было выяснение возможности индукции антител при иммунизации животных (3 крыс) иммуносорбентом - комплексом ДНА + концентрированный вирус А/Южная Каролина/02/2010 (H1N1)pdm09. В каждую крысу вводили 1.20 мл ФР, содержащего 2 мг иммуносорбента. В качестве контроля были взяты сыворотки от 3-х крыс, после иммунизация аллантоисным вирусом гриппа А/Южная Каролина/02/2010 (H1N1)pdm09, от 3-х крыс, иммунизированных аллантоисным вирусом В/Бангладеш/3333/07 и не иммунных животных. После забора крови сыворотки исследовали на наличие антител в РТГА. Результаты исследования представлены в табл.23.

Выявление антител в сыворотках крыс, иммунизированных иммуносорбентом (комплексом ДНА с вирусами гриппа А (H1N1)pdm09) и аллантаисным вирусами гриппа А(H1N1)pdm09 и В.

Вирусы гриппа	Титры иммунных сывороток (РТГА)								
	Иммунизация комплексами ДНА+ вирус гриппа А/Южная Каролина/02/2010 (H1N1)pdm 09			Контроль-иммунизация аллантаисным вирусом гриппа А/Южная Каролина/02/2010 (H1N1)pdm 09			Контроль-иммунизация аллантаисным вирусом В В/Бангладеш/3333/07		
	1	2	3	4,5,6			7,8,9		
А/Южная Каролина/02/2010 (H1N1)pdm09	80	80	80	640	640	640	<20	<20	<20
В/Бангладеш/3333/07	<20	<20	<20	<20	<20	<20	5120	5120	5120

Примечание: 1, 2, 3 – образцы сывороток, полученные от 3-х крыс, иммунизированных иммуносорбентом; 4, 5, 6 - образцы сывороток, полученные от 3-х крыс, иммунизированных вирусом гриппа А/Южная Каролина/02/2010 (H1N1)pdm09; 7, 8, 9 - образцы сывороток, полученные от крыс, иммунизированных вирусом гриппа В/Бангладеш/3333/07.

Результаты исследования показали, что у всех 3-х крыс, иммунизированных иммуносорбентом регистрировали вирусспецифические антитела в титре 80. При иммунизации крыс аллантаисным вирусом гриппа А/Южная Каролина/02/2010 (H1N1)pdm09 титры сывороток были 640. При иммунизации аллантаисным вирусом гриппа В/Бангладеш/3333/07 титры сывороток составляли 5120. Взаимодействие антител, полученных к иммуносорбенту, содержавшему вирус А(H1N1)pdm09, с вирусом В/Бангладеш/3333/07 не наблюдали.

Иммунизация животных ДНА-комплексами вирусами гриппа дала возможность исследовать в крови животных не только наличие вирусспецифических иммуноглобулинов, но и рассмотреть влияние комплексов на формирование других клеток или белков крови. Исследовали кровь крыс из следующих 3-х групп. 1 группа содержала образцы сывороток крыс, иммунизированных иммуносорбентом, содержащим ДНА и вирус А /Южная Каролина/02/2010 (H1N1)pdm09; 2 группа - образцы сывороток, полученные от 3-х крыс,

иммунизированных вирусом гриппа А/Южная Каролина/02/2010 (H1N1)pdm09; 3 группа - образцы крови неиммунных животных.

Оценка влияния комплекса ДНА +вирус на гемопоэз включала расчет наблюдения 200 клеток. Результаты определения формулы крови иммунизированных животных по сравнению с формулой крови не иммунизированных животных приведены в таблице 24.

Таблица 24

Формулы крови крыс, иммунизированных комплексами ДНА+ вирус гриппа А/Южная Каролина/02/2010 (H1N1)pdm09, аллантаисным вирусом А/Южная Каролина/02/2010 (H1N1)pdm09 и неиммунизированных крыс

Клетки/ Антиген	Иммуносорбент: А(H1N1)pdm09 +ДНА	Антиген А(H1N1)pdm09	Контроль- не иммунные крысы
Лейкоциты 10 ⁹ /л	10,0 ±1.2	18	9.0±1,2
Лимфоциты %	68,8±0,7	76	74.0±8,7
Нейтрофилы %	24,8±1,1	19	23.0±4,2
Моноциты %	6,0±0,8	3	2.0±0, 5
Эозинофилы %	2,0±1,3	1	1.0, ±0,1
Т-лимфоциты %	58,7±1,2	51	62.0±9,5
В-лимфоциты %	12,7±1,3	14	10.0±1,3
CD4 %	45,7±4,4	33	50.0±8,7
CD8 %	13,0±0,8	18	12.0±3,6
Фагоцитарные нейтрофилы %	44,3±1,3	36	38/0±9,1
Эритроциты %	7,4±1,1	9.2	8.4±0.9
Ig G g/l	9,0±0,8	12	8.0±1,1

Из представленных данных видно, что состав крови практически одинаков, за исключением концентраций моноцитов. Их содержание в крови крыс, которым были введены сорбенты, предварительно ресуспензированные в ФР, было в два раза выше, чем в крови неиммунизированных животных. Как известно моноциты – это вид лимфоцитов, индукция которых увеличивается при введении в организм млекопитающих чужеродных белков или других биологических объектов.

Резюме к главе 5

В главе 5 рассмотрено влияние различных сорбентов на клетки MDCK, Vero и на гемопоэз животных (лабораторных крыс). Результаты по изучению взаимодействия и влияния сорбентов (УНТ, нанотрубки ПАНИ, композиты ПАНИ, нанотрубки ПАНИ с Ag 30% и гранулы ПАНИ с Ag 70%) на биологические объекты *in vitro* показали, что при концентрации сорбентов $\leq 0,1$ мг/мл не выявлено нарушения клеточного монослоя клеток MDCK для всех изученных сорбентов кроме УНТ. Для УНТ отсутствие влияния на монослой наблюдали при концентрации сорбента ≤ 0.01 мг/мл. Также было показано что культура клеток тканей МДСК сохраняет способность репродуцировать вирусы гриппа А и В после предварительного контакта с шихтой и ДНА_{амин} и с ПАНИ нанотрубками (при концентрации суспензии сорбента 0,1 мг/мл и менее). Результаты *in vivo* свидетельствуют о том , что во-первых, введение в организм животного препаратов нанотрубок ПАНИ с Ag приводит к некоторым изменениям формулы крови (главным образом наблюдалось увеличение концентрации моноцитов). При этом не регистрировалось изменений в весе животных, которым ввели сорбент, по сравнению с контрольными животными, получившими ФР; во-вторых, что иммуносорбент - комплекс ДНА + концентрированный вирус гриппа А(Н1N1)pdm09, способен индуцировать в организме животных (крыс) вирусспецифические антитела к вирусу гриппа А(Н1N1)pdm09; в-третьих, что введение в организм животного (крысы) иммуносорбентов - комплексов ДНА + вирус гриппа А (Н1N1)pdm09 вызывает изменения в формуле крови – увеличение моноцитов в два раза по сравнению с числом моноцитов у неиммунизированного животного.

ОБСУЖДЕНИЕ

Обзор литературных данных показывает, что в основном изучение взаимодействия наноразмерных материалов имеет место с биологическими объектами такого рода как химические соединения, белки или бактерии, наиболее часто с *E. coli*, реже грибы и органические молекулы [92,173]. И значительно реже объектами изучения в этом направлении становились вирусы.

Данная работа является продолжением серии работ, направленных на изучение взаимодействия современных наноразмерных материалов с вирусами, а также другими биологическими объектами, такими как белки, фрагменты нуклеиновых кислот и антибиотики. В качестве основной биологической модели в данном исследовании использованы вирусы гриппа. Особенностью вируса гриппа является изменчивость его генома и соответственно вирусных белков. Наибольшие изменения происходят в наружной оболочке вирионов – гемагглютанине и нейраминидазе. Именно это обуславливает появление и одновременную циркуляцию вирусов гриппа с разной антигенной формулой поверхностных белков. Отличие в структуре гемагглютанина побудило нас проводить исследование с эталонными и эпидемическими штаммами, циркулировавшими в последние десятилетия [6,43,166]. Это представители вирусов гриппа А(Н1N1) – эталонный штамм А/Новая Каледония/20/99, пандемические штаммы А(Н1N1) pdm 09, эталоны вирусов гриппа А(Н3N2) –А/Висконсин/67/05, А/Перт/16/09 и А/Виктория /361/11. Кроме того, были исследованы вирусы гриппа В двух эволюционных линий В/Ямагата/16/88 и В/Виктория/2/87 подобных. Интродукция в человеческую популяцию вирусов гриппа птиц с гемагглютинином А/Н5 обусловила их включение в список исследуемых вирусов. Особенность вирусов гриппа птиц распространяться через водную среду была дополнительным аргументом в пользу их исследования. Таким образом, выбор в качестве биологической модели вируса гриппа позволял проводить исследования с вирусами с различной структурой поверхностных белков.

Выбор в качестве второй биологической модели полиовируса обусловлен тем, что он является референс вирусом, который используют при оценки эффективности дез. средств [53]. Кроме того, вирус распространяется через воду, имеет эпидемическую значимость, особенность физико-химических свойств (устойчивостью к внешним воздействиям), и существенные структурные отличия от вируса гриппа. Этими отличиями являются: 1) меньшие размеры вириона (25-30 нм) 2) отсутствие наружной гликопротеиновой оболочки

Ранее в лаборатории этиологии и эпидемиологии гриппа был разработан метод изучения взаимодействия вирусов и других биологических объектов с наноразмерными материалами

[28]. Изучение сорбционных свойств современных наноматериалов, отбор наиболее перспективных по ряду характеристик – необходимый этап работы для получения сорбентов для антивирусных фильтров. В качестве таких материалов ранее были выбраны две группы потенциальных сорбентов: углерод-содержащие материалы (модифицированный с помощью термообработки графит, углеродные нанотрубки) и полианилин, полученный с помощью низкомолекулярных и полимерных кислот. [28, 29]. В результате проведенных исследований была установлена способность вышеперечисленных материалов сорбировать из водных растворов вирусы гриппа, бактериофаги и белки невирусного происхождения (альбумин, иммуноглобулины).

В данной работе в продолжение исследования сорбционных свойств углеродных материалов выбраны и изучены сорбционные свойства материалов, содержащих в своем составе наноалмазы, полученные в результате детонационного синтеза, их модификаций различными методами, приведшими к изменению структуры их поверхности. Работу с наноалмазными материалами проводили при участии сотрудников Института электрохимии и физической химии РАН д.х.н. Спицыным Б.В., Исаковой А.В. Сравнительный анализ результатов, полученных ранее, и в настоящей работе показал, что во всех случаях - модифицированного графита, углеродных нанотрубок, наноалмазных материалов вирусы гриппа сорбировались из вирусосодержащих жидкостей: аллантоисной жидкости КЭ, разведенной ФР среды Игла независимо от антигенной структуры поверхностных белков. Падение ГА титра вирусосодержащей жидкости для модифицированного графита варьировало от 4 до 64 раз в зависимости от начальной концентрации вирусов для УНТ от 8 до 128 раз [37]. В настоящей работе с УНТ исследованы другие штаммы вирусов гриппа и возможные влияния на сорбцию других факторов (время сорбции, концентрация сорбента, содержание в растворе альбумина), в отличие от материалов, представленных в статье Ивановой В.Т и др. [30]. Падение ГА титра вирусосодержащей жидкости для наноалмазных материалов варьировало от 4 до 500 раз. Однако это величина возрастала в случае свежесывленного вируса до 4000 раз. Следует отметить, начальный титр вируса, его состояние (аллантоисный, концентрированный или очищенный препарат, структура ДНА материала) является существенным фактором для активного взаимодействия вируса с ДНА сорбентом.

При исследовании влияния температуры среды в диапазоне от 4-х до 36 °С установлено, что как в случае модифицированного графита, так и при использовании УНТ и наноалмазных материалов эффективность сорбции не зависела существенно от температуры. При исследовании зависимости сорбции от времени контакта вирус – сорбент установлено, что наибольшее падение титра вируса регистрировали в первые 15 минут

контакта. Уменьшение времени контакта при использовании данного метода не позволяет получать надежные результаты, поскольку каждая стадия исследования использованным методом занимает определенный временной интервал. Более точное установление времени контакта вируса с сорбентом скорее всего потребует использовать другие более быстрые методы исследования (например, поверхностный плазмонный резонанс (ППР), который определяет взаимодействие компонентов в секундном диапазоне. Однако, для исследования методом ППР сорбенты должны быть приготовлены в виде пленок [33].

Исследования уровня падения ГА титров в зависимости от массы сорбента показало, что сорбция не зависит от массы в диапазоне от 1 до 10 мг. При сравнении сорбционных свойств нанодиазмов, полученных разными методами, в том числе модификацией установлено, что наибольшей адсорбционной способностью обладает шихта, наименьшей – нанодиазмы, полученные из шихты жидкофазным методом. При модификации поверхности ДНА (графитизации, хлорировании и аминировании) адсорбционная способность возрастает. Это приводит к уменьшению титра вируса в надосадке в 500 и более раз и сопровождается уменьшением инфекционного титра на 4 lgЭИД₅₀. Аналогичные результаты, а именно, наибольшая сорбционная способность обнаружена у шихты в случае исследования фрагментов кДНК по сравнению с нанодиазмами, которые сорбировали фрагменты кДНК, содержащие не более 560 п.н.

Следует отметить, что, ранее, факт избирательной способности нанодиазмов взаимодействовать с молекулами ДНК описан в работе [152], где установлена сорбция линейных молекул ДНК нанодиазмами и ее отсутствие при взаимодействии с кольцевыми молекулами.

Нами показано, что нанодиазмы способны сорбировать белки невирусного происхождения, например, бычий сывороточный альбумин. При этом он конкурирует за участки связывания с вирусами гриппа. Сорбция бычьего альбумина ДНА – материалами, указывает на то, что и другие белки способны взаимодействовать с нанодиазмами. Такими белками могут быть белки аллантоисной жидкости куриного эмбриона. Это объясняет полученные нами результаты: меньшее падение ГА-титров (от 2 до 8) в случае аллантоисных вирусов и более высокие значения до 500 раз и выше в случае очищенных или концентрированных вирусов гриппа. По данным литературы известно, что ДНА способны сорбировать ферменты с сохранением их ферментативной активности. Этот факт может быть использован в терапии при доставке лекарств и ферментов к пораженным клеткам организма. Нанодиазмы, соединенные в кластеры размером до 100 нм, способны сорбировать лекарства и транспортировать их к раковым клеткам [86]. Кроме того, было

установлено, что наноалмазы способны сорбировать белок лизоцим, который при этом сохраняет антибактериальную активность, например, по отношению к *E. coli* [146].

Следует отметить, что механизм связывания вирусных и других белков с ДНА отличен от взаимодействия аналогичных объектов с модифицированным графитом. В случае ДНА большую роль играют донорно-акцепторные взаимодействия и водородные связи с участие водорода, кислорода, азота, серы в составе определенных функциональных групп на поверхности ДНА с соответствующими химическими группами на поверхности различных белков [161]. Наличие этих элементов на поверхности ДНА приводит к образованию функциональных групп - метиленовых, метильных, кислородсодержащих - гидроксильных, карбонильных, альдегидных, карбоксильных, эфирных и ангидридных, сера - и азотсодержащих - сульфогрупп, нитрогрупп, аминных, амидных и многие другие [38, 39]. Для модифицированного графита характерно многоуровневая пористая структура, обеспечивающая взаимодействие также агентами небольших размеров по мере углубления внутрь углеродного материала. Так, в случае сложно организованных биологических объектов, таких как Т четного ДНК содержащего бактериофага Т4D, размер которого в длину составляет 200 нм, адсорбция на модифицированном графите происходит в примерно в 10 раз меньше по сравнению с непористыми сорбентами углеродного содержания - УНТ [30, 37]

В литературе не было обнаружено работ по связыванию вирусов на ДНА. Исключение составляют работы японских исследователей, которые изучали сорбцию вирусов ВИЧ на наноалмазы для приготовления вакцины против ВИЧ [111]. Однако, связь вирусов с наноалмазами в этой работе осуществлялась не непосредственно, а через конковалин А, который предварительно был соединен с наноалмазами. Конковалин А обладает сродством к маннозе, находящейся в структуре поверхностного белка gp 120 вируса ВИЧ. С помощью gp 120 вирусы присоединяются к рецепторам, находящимся на внешней поверхности клеток иммунной системы [165]. Также для соединения нуклеиновых кислот с ДНА были синтезированы мостиковые соединения, осуществляющие связь между молекулой нуклеиновой кислоты и ДНА.

Результаты взаимодействия вируса гриппа с ДНА материалами, в основном, оценивались в РГА по изменению ГА титра раствора после добавления в него сорбентов. На примере шихты и модифицированного ДНА_{амин} нами было показано, что падение ГА титра сопровождалось также падением инфекционного титра: в случае ДНА_{амин} при исследовании на КЭ он составлял 5 lgЭИД₅₀, в клетках MDCK - 4.26 lgТЦИД₅₀. Следует отметить, что выявленная большая активность шихты может быть обусловлена большей, чем у наноалмазов, удельной поверхностью, которая составляет для шихты 450 и 300 м²/г

у ДНА. Однако, модифицирование наноалмазов может увеличить их адсорбционную способность и таким образом скомпенсировать разницу в удельной поверхности.

Следующим вирусным объектом был вирус полиомиелита вакцинный штамм Сэбина тип 1. Так как этот вирус имеет существенные структурные отличия по строению, отсутствию поверхностных белков, определение эффективности сорбции по ГА активности невозможно. Оценку эффективности сорбции проводили по разнице инфекционных титров до и после сорбции, которые определялись по цитотоксическим дозам. Как показали исследования нескольких представителей ДНА материалов, наиболее активным сорбентом была шихта – падение составляло $2.5 \lg \text{ТЦИД}_{50}$. Для графитизированного и хлорированных ДНА изменение $2.0 \lg \text{ТЦИД}_{50}$. Что касается иммуносорбента - комплекса вирусов с ДНК материалами, то они обладали инфекционной активностью равной $1,0 \lg \text{ТЦИД}_{50}$. Эти данные указывают на то, что вирус полиомиелита имеет меньшее сродство к ДНА материалам, чем вирус гриппа, что может быть объяснено сложно организованной структурой, наличием разных функциональных групп у поверхностных белков вирусов гриппа. Наличие у иммуносорбентов, содержащих как вирус гриппа, так и вирус полиомиелита, инфекционной активности, указывает на необходимость проведения их дезактивации при промышленном использовании материалов ДНА. Дезактивация может быть проведена с помощью прогрева при температурах больше 50°C , обработке их ультрафиолетом или дез. средствами.

Исследования взаимодействия вируса с УНТ показало, что падение ГА активности вируса гриппа составляло от 32 до 128 раз в случае очищенных вирусов и в 4 раза в случае аллантоисных, неочищенных вирусов.

Исследования взаимодействия вируса полиомиелита с углеродными нанотрубками выявило следующее: 1) падение инфекционного титра после контакта с сорбентом составляло $1.5 \lg \text{ТЦИД}_{50}$, 2) иммуносорбент обладал инфекционной активностью, его титр составлял $3.5 \lg \text{ТЦИД}_{50}$.

Ранее было показано, что модифицированный графит обладает способностью взаимодействовать с вирусом полиомиелита, падение инфекционной активности составляла не менее чем $4 \lg \text{ТЦИД}_{50}$ [30]. При сравнении этих результатов с данными по взаимодействию с углеродсодержащим сорбентов с вирусами полиомиелита, полученных в настоящем исследовании, можно сделать следующий вывод, что наиболее активным является модифицированный графит, менее активными - ДНА содержащие материалы, в том числе и графитизированные ДНА. Еще меньшая активность была выявлена по отношению к вирусу полиомиелита у углеродных нанотрубок. При этом, как в случае ДНА

содержащих материалов, так и для УНТ, образованные во время сорбции иммуносорбенты обладали инфекционной активностью относительно вируса полиомиелита в клетках Vero.

По-видимому, для сорбции на углеродные сорбенты большое значение имеет наличие заряженных групп на поверхности биологического материала. На менее сложной по сравнению с вирусами биологической структуре – антибиотиках (блеомицетине, грамицидине S, полимиксине В, тейкопланине А2,) показано, что они по разному сорбируются из водной фазы на УНТ, полная сорбция имеет место за 10 -18 час. Гидрофобные антибиотики - блеомицетин и тейкопланин более полно сорбируются на УНТ, чем гидрофильные, положительно заряженные: грамицидин S и тейкопланин [125, 123].

Отдельный вопрос связан с десорбцией биологических объектов с углерод содержащих сорбентов. Десорбция адсорбированных вирусов гриппа с ДНА материалов в ФР не была обнаружена. Аналогичные данные были получены при исследовании десорбции вирусов с модифицированного графита [30]. При исследовании биологических объектов другой природы - антибиотиков установлено, что степень десорбции антибиотиков, сорбированных на УНТ, существенно зависит от соотношения полярных и гидрофобных свойств молекулы антибиотика. Показано, что гидрофобные антибиотики(этамицин, гризеоовиридин и пенициллин G) не десорбируются с УНТ, что важно для очистки растворов и направленной доставки препаратов в очаг заболевания [70, 123, 125]. Для модифицированного графита обнаружено, что десорбция в специальные растворители антибиотиков, зависит от соотношения полярных и гидрофобных групп на их поверхности [69].

Из рассмотренных выше сорбентов только углеродные нанотрубки имели палочкообразную структуру. Следует отметить, что в настоящее время в разных лабораториях разработаны достаточное количество наноразмерных частиц различной структуры (органической и не органической природы) и формы. Они могут быть представлены в виде шариков, дендритных структур, палочек, одно- и многостенных трубок и т.д. Разнообразие форм мы встретили во второй группе сорбентов, в которую входили полимерсодержащие композиты. Представленные в данной работе сорбенты были приготовлены ст. научным сотрудником кхн Сапуриной И.Ю. Института высокомолекулярных соединений РАН, Санкт -Петербург. Эти сорбенты в отличие от сорбентов первой группы были структурированы. Все они содержали полианилин и представляли собой полианилиновые нанотрубки, содержащие или не содержащие 30%Ag по весу, также гранулы, в состав которых входили наночастицы 70 %Ag . Выбор полианилина в качестве основного материала был обусловлен следующим

обстоятельством. Ранее нами было показано, что основание полианилина, полученное как простым методом, так и методом матричного синтеза с использованием высокомолекулярной кислоты (ПАМПСК), способно адсорбировать вирусы гриппа и полиомиелита из водной среды [22]. Анализ данных, полученных в настоящей работе, показал, что выбранные композиты полианилина также способны сорбировать вирусы гриппа и полиомиелита из водных сред. При этом адсорбционная активность данных сорбентов не зависела от антигенной структуры поверхностных белков вируса гриппа. Как и в случае ДНА содержащих сорбентов наибольшую активность сорбции наблюдали в первые пятнадцать минут контакта вируса с сорбентом. Однако, полученные ранее методом плазмонного резонанса данные по сорбции вируса на полианилиновых пленках, указывают на то, что адсорбционный процесс, скорее всего, происходит в первые минуты контакта [73]. Адсорбционная способность у выбранных композитов не зависела от температуры среды в диапазоне от 4 до 36 °С. Это свидетельствует о том, что сорбционный процесс происходит, в основном, по сходному сценарию в обоих случаях. Сравнение сорбционной активности основания полианилина и ПАНИ нанотрубок показало относительно вирусов гриппа следующее: для основания полианилина и очищенного вируса гриппа от 8 до 256 раз; для композитов полианилина с высокомолекулярными кислотами ПАМПСК падение ГА активности вируса гриппа составляло от 4 до 32 раз [29].

Для ПАНИ нанотрубок падение ГА активности и очищенного вируса гриппа достигало 500 -1000 раз, для аллантаоисного вируса только в 2раза. Это говорит о том, что белки аллантаоисной жидкости более активны в конкуренции с вирусами за места сорбции на поверхности трубок. Картина сорбции на ПАНИ нанотрубок изменяется, при включении серебра в его структуру. Наличие 30%Ag в состав ПАНИ нанотрубок приводит к увеличению сорбции для аллантаоисного вируса в 16 раз как для вирусов гриппа А(Н3N2), так и для А(Н5N2). Падение ГА активности сопровождалось и падением инфекционного титра, оно составляло 5,5 lgЭИД₅₀ для этого сорбента и вируса гриппа А(Н3N2).

При исследовании адсорбционной активности относительно вируса полиомиелита, также установлено, что наличие Ag в составе ПАНИ нанотрубок увеличивает их адсорбционную активность. В случае ПАНИ нанотрубок падение инфекционного титра = 1 lgТЦИД в случае ПАНИ нанотрубок с 30%Ag и гранул ПАНИ с 70%Ag падение составляло 2 lgТЦИД, такое же падение было и у модифицированных ДНА.

Образующиеся с ПАНИ сорбентами связи с вирионными белками можно разделить на 2 вида. На поверхности полианилина и его производных имеются кислотные остатки (сульфо-, карбокси-, amino и хинон-иминные группы [22]). Поэтому сами молекулы ПАНИ способны образовывать кислотно-основные, ионные, донорно-акцепторные, водородные

связи с аминокислотными группами гемагглютинаина, или поверхностного белка вириона вируса полиомиелита. В составе композитов ПАНИ -Ag присутствуют ионы и частицы Ag, которые взаимодействуют, по-видимому, с тиоловыми (S-H) группами вирусных белков, как это было ранее установлено с белками бактерий (Толгская и др., 1984; Бочкарев и др., 1984).

По-видимому, отсутствие этих функциональных групп на поверхности углеродных трубок и объясняет их меньшую сорбционную способность в отношении вирусов.

Исследование сорбции фрагментов ДНК, полученных в результате амплификации РНК вирусов гриппа А и В на комплексы ПАНИ методом электрофореза наглядно показало, что введение Ag в нанотрубки повышает также сорбцию фрагментов ДНК. Сопоставляются результаты до и после сорбции фрагментов ДНК всеми типами сорбентов. Установлено, что наибольшей сорбционной способностью к ДНК вирусов гриппа А и В обладает нанотрубка ПАНИ-30%Ag. Наблюдается уменьшение связывания фрагментов ДНК с повышением концентрации Ag до 70%. Возможно это объясняется разным количеством во фрагментах ДНК гуанина и аденина. Как показали спектроскопические исследования [88], в водных растворах с pH 7.1-6.6 при постоянной концентрации ДНК или РНК при различных концентрациях Ag формирует комплексы с ДНК путем связывания катиона с гуанином (при низкой концентрации) и с аденином (при более высоких концентрациях), но не с боковыми фосфатными группами. Как видно из цитируемой работы и других публикаций, сам по себе факт соединения ДНК с серебром был известен ранее. Установлено, что связанные с ДНК ионы Ag блокируют транскрипцию в клетке, а связанные с компонентами поверхности клетки прерывают дыхание бактерий (Trevors J.T., 1987). Полученные нами данные показывают, что ионы Ag в составе ПАНИ нанотрубок также действуют на ДНК. Возможно, этим объясняется увеличение сорбции аллантаоисного вируса. Дело в том, что в аллантаоисной жидкости зараженного КЭ присутствуют не только цельные вирионы, но неполные или деформированные, в которых РНК не полностью закрыта поверхностной оболочкой вириона.

Суммируя результаты можно сделать вывод, что в исследованиях активности взаимодействия вирусов гриппа А и В сорбентами, содержащими ПАНИ композит ПАНИ-Ag 30% лидирует. Он демонстрирует более полное извлечение не только вирусов из аллантаоисной жидкости КЭ, разведенной ФР, но и сорбцию ДНК из растворов. Введение 30% массы наночастиц серебра улучшило характеристики ПАНИ-труб. В тоже время, повышение массовой доли серебра в композите до 70% отрицательно сказалось на сорбционных характеристиках материала. Таким образом, можно говорить о синергетическом эффекте двух материалов ПАНИ и Ag. Однако, в настоящее время не

представляется возможным обсуждать сорбционный механизм композита ПАНИ-30%Ag, поскольку, по-видимому он достаточно сложен. Увеличение абсорбционной активности сорбентов, содержащих Ag, возможно, объясняется физико-химическими свойствами в частности работой выхода электрона Ag равного 4 электрон-вольта. Эта величина является средней величиной по отношению к работе выхода электрона близко расположенных функциональных групп различных биологических объектов и ПАНИ. Это позволяет взаимодействовать соседним донорным и акцепторным группам друг с другом, что приводит к усилению их взаимодействия и соответственно адсорбции биологических объектов.

Использование нанотрубок ПАНИ – 30%Ag открывает возможность создания универсальных фильтров для очистки воды от бактерий, грибковых инфекций и вирусов. Продемонстрированная нами ранее сорбционная способность ПАНИ по отношению к вирусам гриппа А и В усиливается в присутствии серебра. Одновременно наличие наночастиц серебра в материале фильтра обеспечит противогрибковый и бактерицидный эффекты.

Недавние исследования подтверждают противовирусную активность наночастиц серебра. Показана сорбция наночастиц Ag на вирус HIV-1, которая приводила к утрате вирусом способности связываться с клеткой-рецептором [105]. Наблюдалось ингибирующее действие наночастиц Ag по отношению к клеткам организма (Hut/CCR5), инфицированным вирусом HIV-1. Композиты серебра с соединениями, содержащие тиоловые группы, оказывают влияние на активность цитомегаловирусов в клетках HELA[143].

В данной работе кроме изучения взаимодействия наноматериалов с вирусами гриппа и полиомиелита, были проведены опыты по выявлению возможных токсических воздействий на биологические объекты. Еще с исторических времен углерод - содержащие материалы рассматриваются как инертные с минимальной реактивностью для клеток тела [110]. Однако наноразмерные формы углерода имеют свои особенности. Изучение токсичности сорбентов проводили на двух объектах: культуре клеток MDCK *in vitro* и на лабораторных животных *in vivo*.

В случае УНТ при $C=1$ мг/мл отсутствовал монослой; при концентрации сорбентов $C=0.1$ мг/мл слой был рваный и только при $C = .001$ мг/мл УНТ не оказывали воздействия на монослой. Следует отметить, что эти данные получены для клеток MDCK, и носят предварительный характер. Для полной характеристики токсичности УНТ необходимо проведение аналогичных исследований на разных клетках, так как чувствительность клеток не одинакова как к вирусам, так и к химическим препаратам. Проведенные нами

исследования взвеси наноалмазов и шихты с концентрациями от 1 до 10^{-4} мг/мл на лунку микропланшета с культурой клеток MDCK показали, что в этом диапазоне концентраций сорбентов деформации клеточного монослоя не наблюдалось. Исследования *in vitro* на разных клетках показали, что наноалмазы более толерантны к клеткам, чем многие другие углерод - содержащие материалы такие как нанотрубки и фуллерены (Schrand A.M. et al., 2009). Сравнительное исследование токсичности выбранных ПАНИ материалов для клеток MDCK показало, что ПАНИ нанотрубки с концентрацией сорбента ≤ 1 мг/мл не оказывали воздействие на состояние монослоя. Проведенные нами исследования комплексов наноалмазов, покрытых ПАНИ, с вирусами гриппа показали их хорошую адсорбционную способность. Интересно отметить, что опубликованная нами статья с этими результатами в США, совпала по времени с публикацией статьи [178], в которой показано, что комплекс ПАНИ-ДНА при их концентрации ниже 1 мг/мл нетоксичны. Они не оказывают влияния на морфологию почек эмбриона человека ХЕК и на рост бактерий *E-coli* на этих клетках. Исследование взаимодействия наносорбентов с клетками MDCK свидетельствует о том, что клетки сохраняют свою способность к репродукции вирусов при концентрации сорбентов меньше или равно 10^{-1} мг/мл и менее. Возможно, этому способствует выявленная нами инфекционная активность комплексов (сорбент + вирус). Использование классического метода МТТ для определения токсического эффекта сорбентов Vero привело к регистрации увеличения оптической плотности формазана. Реактив МТТ – тиазолий синий тетразолий бромид превращается в окрашенные тёмно-синие кристаллы формазана под действием дегидрогеназы митохондрий. Этот процесс происходит только в метаболически активных клетках. При нарушении метаболизма клеток под действием разных агентов интенсивность окраски падает [12]. В нашем случае мы фиксировали увеличение оптической плотности формазана. Одно из возможных объяснений – усиление активности клеток, возможно и другие трактовки результатов. Полученные нами данные с помощью разных методов подтверждают выводы [103], свидетельствующие о сложности задачи – изучения взаимодействия сорбентов с клетками. На этот процесс влияют различные факторы, в том числе и разные методы исследования. Требуется проведение дальнейших исследований взаимодействия наночастиц с клетками для ответа на вопросы: каковы механизмы взаимодействия и какими будут последствия для клеток и их жизнедеятельности после проникновения в них наночастиц.

Для оценки влияния на биологические объекты *in vivo* были выбраны лабораторные крысы. Обычно мы использовали этих животных для получения диагностических сывороток. Крысы были иммунизированы комплексами с гриппом А/Южная Каролина/02/2010 (H1N1) pdm09. Животное получало за инъекцию 3 мг иммуносорбента.

Иммунограмма из исследованных крыс показала, что после иммунизации концентрация моноцитов увеличивается в 2 раза в сыворотке крови, в то время как другие параметры крови остались в пределах нормального диапазона.

В ранее проведенных исследованиях отечественными и зарубежными учеными отмечено отсутствие значительной токсичности наноалмазов для клеток и животных . [59] При пероральном введении мышам (весом 20-25г) поступало 1.5 г. частиц, отмечено увеличение в 2.5-2.7 содержание общих лейкоцитов. Другие животные (крысы) выдерживали 5-кратную инъекцию раствора ДНА с концентрацией 5.0 мас.%. Только после 6 инъекций фиксировались нарушения двигательной активности и нарушения дыхания). У мышей 5-кратная инъекция раствора ДНА 0.1 % в вес в воде и глюкозе, объемом 1.0-1.5 мл вызвало гибель 50% животных в обоих случаях и наблюдалось изменение внутренних органов: увеличение размеров печени, селезенки и сердца. Таким образом, исследования влияния ДНА-содержащих материалов на жизнеспособность животных (белых мышей и белых крыс), количество лейкоцитов в их крови, размеров органов после перорального введения или инъекций выявило, что эти показатели зависят от количества, частоты и способа введения ДНА-содержащих проб [59].

Первые опыты, проведенные нами с ПАНИ материалами, свидетельствует об отсутствии у них токсичных свойств для выбранных клеток. Однако для окончательного решения этого вопроса требуется проведения исследования на других типах клеток, а также на животных. Поэтому следующий этап заключался в определении токсичности препаратов для организмов (*in vivo*) - изучение влияния препаратов на клетки крови животного. Эксперимент показал, формула крови у крыс, получивших препарат ПАНИ (без Ag), имеет изменения по сравнению с формулой крови контрольных животных. Процентное содержание моноцитов в 4 раза выше, эозинофилов – в 2 раза. В формуле крове 2-ой группы крыс, которым вводили препарат нанотрубки полианилина с 30% содержанием Ag, также имеются отклонения в наличие 2-х кратного уменьшения лейкоцитов, 7 кратного увеличения моноцитов, 2-х кратного увеличения эозинофилов по сравнению с контролем. В формуле крови крыс, иммунизированных аллантаисным вакцинным штаммом А/Н3N2 выявили изменения при сопоставлении с формулой крови контрольных животных. Обнаружено в 2 раза больше лейкоцитов и моноцитов по сравнению с контролем. Введение препаратов не повлияло на вес животных. Показателем проявления токсичности препаратов является изменение таких клеток крови, как моноциты (увеличение), и появление зернистости нейтрофилов. В нашем случае мы наблюдали только увеличение моноцитов.

Нанотрубки полианилина, синтезированы недавно [183]. В последние годы синтезированы композиты ПАНИ с серебром [171]. Поэтому сравнить наши данные по токсическим свойствам с литературными данными не представляется возможным. Что касается влияния отдельно полианилина и серебра на биологические системы, то можно сказать следующее. При обычном синтезе ПАНИ образуются как нетоксические молекулы ПАНИ, так и токсические примеси, которые могут быть удалены при промывании полианилина водой и органическими растворителями. При проведении матричного синтеза на полимерной кислоте (например, ПАМПСК), на которой синтезируется полианилин из анилина, токсические вещества практически не образуются [22, 138]. О токсичности серебра написано большое количество статей и обзоров. В России первые работы на эту тему были опубликованы в начале 20-го века [62].

Введение разными способами серебра в организм приводит к следующему: при втирании и подкожном введении Ag фиксируется кожей и клетчаткой, при внутривенном введении серебро быстро удаляется из организма. При больших дозах серебра возникает риск заболевания аргирией. Однако, за 100 лет клинических исследований не было зарегистрировано ни одного смертного случая, обусловленного действием Ag и его соединений [22, 138]. Серебро в ионной растворимой форме токсично для водных организмов, в то же время для млекопитающих токсичность серебра низкая. При этом нет данных о мутагенной или канцерогенной активности соединений серебра [114, 154, 115, 127].

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, содержащими 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 литературы

1. Андреев С.М., Бабахин А.А. Анализ иммунологической активности фуллерена // Международный форум по нанотехнологиям- 08. Москва.- 2008.-С. 300
2. Атлас клеток крови и костного мозга под редакцией Г.И.Козинца // - М. "Триада-Х". - 1998.- С.160
3. Беляев А.Л., Слепушкин А.Н., Полиомиелит и др. энтеровирусные инфекции //Рэт-инфо.- 2004.-№1.- С.32-34
4. Бондарь В.С, Пузырь А.П., Пуртов К.В. и др. Наноалмазы с оригинальными свойствами: применение в биологии и медицине // Международный форум по нанотехнологиям - 08, Москва.-2008.-Т.2.- С. 90-91
5. Буравцев В.Н. Сорбент на основе ультрадисперсного графита для дезинтоксикации и стерилизации жидких или газообразных сред и способ его получения // Патент РФ № 2327517.- 2008
6. Бурцева Е.И. Пандемический потенциал вируса гриппа А // Эпидемиология и гигиена. Медицинский алфавит. - 2013-Т.24, №4.- С.14-18
7. Бурцева Е.И., Иванова В.Т., Беляев А.Л., Шевченко Е.С., Оскерко Т.А., Феодоритова Е.Л., Колобухина Л.В., Прилипов А.Г., Щелканов М.Ю., Львов Д.К. Вклад НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского в надзор за циркуляцией вирусов гриппа при эпидемиях и пандемии 2009г. в России Вестник Российской АМН №5 2011 ,С. 24-28
8. Витязь П.А. Наноматериалы и нанотехнологии: достижения и проблемы, Наноструктурные материалы.- 2008.-С. 9-10
9. Верещагин А.Л. Детонационные наноалмазы. Барнаул.- 2001.- С.176
10. Вредные вещества в промышленности //Справочник для химиков, инженеров и врачей. Изд.7,Т.3, Неорганические и элементоорганические соединения, Л., Изд. «Химия».- 1976.- С. 608
11. Гурвич А.Е. Использование целлюлозных матриц в иммунохимии // в кн. Иммуносорбенты и их использование в биотехнологии.-1987.-С.5-22
12. Е.О. Данченко. Оценка токсичности фармацевтических субстанций с использованием клеточных культур. Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2012.- N 2.- С.2231

13. Дерябин П.Г., Бутенко А.М., Бурцева Е.И. Реакция гемагглютинации и реакция торможения гемагглютинации // Сб. Медицинская вирусология, под ред. Д.К. Львова. - 2008.- С.312-317
14. Долматов В.Ю. Ультрадисперсные алмазы детонационного синтеза: свойства и применение // Успехи химии. -2001. -Т. 70, № 7.-С. 687
15. Дроздов С.Г., Иванова О.Е. Полиомиелит//Вопр. вирусол.- 2012, Приложение 1, -С. 76-90
16. Дьячков П.Н.// в кн. Углеродные нанотрубки: строение, свойства, применение. -М. - 2008. С. 5-121
17. Ефременко В.И., Львов Д.К., Дерябин П.Г. и др. Экспериментальные данные по выявлению вирусов гриппа птиц с помощью магнитных иммуносорбентов // Вопр. вирусол. 2008; 3 с.43-45
18. Жданов В.М., Гайдамович С.Я. Вирусология, 1996
19. Железнова Н.В., Катушкина Н.В., Коликов В.М., Молодкин В.М. Особенности очистки и концентрирования различных штаммов вирусов гриппа на силикатных пористых сорбентах// в кн. Эпидемиология, диагностика и профилактика кишечных, респираторных и природноочаговых инфекций.Л.-1975.-С.108-109
20. Закстельская Л.Я., Шендерович С.Ф. Использование иммуносорбента для удаления противогриппозных тел из диагностических сывороток// Лабораторное дело.- 1979. -№12.- С. 748-749
21. Злобин В.И., Полиомиелит. //Сб. Медицинская вирусология, под ред. Д.К. Львова, 2008.- С. 357-361
22. Иванов В.Ф., Структура и свойства полианилина и интерполимерных комплексов на его основе: диссертация доктор хим. наук: 02.00.04 / Иванов Виктор Федорович.- М., 2007
23. Иванов В.Ф., Иванова В.Т., Курочкина Я.Е., Грибкова О.Л., и др. Полианилин в качестве сорбентов для удаления вирусов, белков невирусной природы и матрицы для получения иммуносорбента для выделения противовирусных антител // Патент РФ № 2372951. 01.08.2007

24. Иванов В.Ф., Иванова В.Т., Томилин М.Г., Ракутина Р.О., Исакова А.А., Яблоков М.Ю. Оптический метод диагностики вирусов гриппа на основе нематических жидких кристаллов // Оптический журнал. -2006.-Т. 73,№ 8. - С.90-92
25. Иванов В.Ф., В.Т. Иванова, Томилин М.Г.,Ракутина Р.О., Яблоков, М.Ю. Способ определения вирусов гриппа // Патент РФ № 2290444. -2006
26. Иванова В.Т., Курочкина Я.Е., Баратова Л.А., Тимофеева А.В., Буравцев В.Н., Николаев А.В. Способ получения иммуносорбента для связывания вирусспецифических антител // Патент РФ № 2329505 14.02.2007
27. Иванова В.Т., Курочкина Я.Е., Иванов В.Ф, и др. Сорбция вирусов из растворов на полианилин, углеродные нанотрубки и нанокompозиты на их основе // Вопр. вирусологии.- 2011; №4.-С.19-23
28. Иванова В.Т., Курочкина Я.Е., Буравцев В.Н.,и др. Изучение взаимодействия вирусов гриппа А и В с углеродсодержащим сорбентом // Вопр. вирусологии.- 2008.- №2 .-С. 40-43
29. Иванова В.Т., Иванов В.Ф., Курочкина Я.Е., Грибкова О.Л, Ильина М.В., Манькин А.А. Взаимодействие вирусов гриппа А и В с наноразмерными комплексами полианилина // Вопр. вирусологии.- 2009.- № 3. -С. 21- 26
30. Иванова В.Т., Курочкина Я.Е., Иванов В.Ф., Ильина М.В., Трушакова С.В., и др. Сорбция вирусов из растворов на полианилин, углеродные нанотрубки и нанокompозиты на их основе// Вопр. вирусологии.-2011.- №4 .-С.19-23
31. Исаева Е.И, Игнатъева Т.В. Ровнова З.И., Иммунологическое изучение антигенных детерминант в изолированном гемагглютинине вируса гриппа А(Н1N1) // Вопр. вирусологии .- 1986.- N 3.-С. 263-287
32. Исакова А.А., Иванов В.Ф, Иванова В.Т. и др., Многофункциональные пленки наноструктурированных комплексов полианилина для детекции вирусов гриппа // Rusnanotech. Nanotechnology. International Forum. Moscow. 1-3 November 2010.P
33. Исакова А.А., Райтман О.А, Иванова В.Т., Иванов В.Ф. Устройство для детекции биологических объектов с помощью поверхностного плазмонного резонанса // Патент РФ № 118441 31.03.2011 на полезную модель
34. Катруха Г.С., Тимофеева А.В., Буравцев В.Н., Толстых И.В., Баратова Л.А. Изучение сорбции антибиотиков-гликопептидов на ультрадисперсном графите УДУС // IV

- Московский международный конгресс Биотехнология: состояние и перспективы.-2009. - Т.1.-С.146
35. Колобухина Л.В., Львов Д.К., Бурцева Е.И. Грипп //сб. Медицинская вирусология под ред. Д.К. Львова.- М.- 2008.- С. 383-391
36. Курочкина Я.Е., Тимофеева А.В. Деконтаминация воды и растворов, загрязненных патогенными вирусами, с помощью сорбентов, приготовленных с использованием нанотехнологий // XVI Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов- 2009", Москва, 14-17 апреля 2009 г.- С.18-19
37. Курочкина Я.Е. Взаимодействие вирусов с микро- и наноразмерными сорбентами различной природы: Диссертация кандидата биологических наук: 03.02.02 / Курочкина Янина Евгеньевна.- М. – 2010
38. Кулакова И.И.(а) Модифицирование детонационного наноалмаза: влияние на физико-химические свойства // Ж. Рос. хим.об-ва им. Д.И. Менделеева.- 2004.- Т. XLV111, № 5.-С. 97-106
39. Кулакова И.И.(б) Химия поверхности наноалмазов // Физика твердого тела- 2004- Т. 46, вып.4.- С. 621-628
40. Киселев О.И., Львов Д.К. На пути предсказательного конструирования пандемических вирусов гриппа типа А. //Вопр. вирусол. Приложение №1, -2012.- С. 137- 147
41. Лашкевич В.А. История создания в 1959 г. живой вакцины из аттенуированных штаммов А. Сэбина и идея искоренения полиомиелита //Вопр. вирусол.-2012, Т.58, №1. -С. 4-10
42. Лозинский В.И., Зубов А.Л. Устройство для формирования сферических гранул материала на основе водных систем //патент РФ № 2036095, 1992 , Бюлл. изобрет.-1995.- №15.-С.31
43. Львов Д.К., Бурцева Е.И., Прилипов А.Г., Штамм вируса гриппа А/IV-Moscow/01/2009 (H1N1)sw1 для разработки средств и методов биологической защиты//, патент РФ № 2412244 от 30 июня 2009г.
44. Львов Д.К. Экология вирусов //Медицинская вирусология , издат. МИА, М.-2008.- С.101-118

45. Львов Д.К. На пути предсказательного конструирования пандемических вирусов гриппа типа // Вопр. вирусол. Приложение №1, -2012.- С. 137- 147
46. Львов Д.К., Бурцева Е.И., Щелканов М.Ю. и др. Особенности социркуляции вирусов гриппа в постпандемический период, 2010-2011 гг. по итогам деятельности Центра экологии и эпидемиологии гриппа ФГУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского Минздравсоцразвития России // Вопр. вирусол. 2012.- Т. 57, № 1,-С. 20-28
47. МУ. 3.5.2431-08 /Методические указания по изучению и оценке вирулицидной активности дезинфицирующих средств . М.- 2010.-С. 39
48. МУЗ.3.2.1758-03 / Метод определения показателей качества иммунобиологических препаратов для профилактики и диагностики гриппа. М.- 2005
49. Мукомолов С.Л., Плотникова В.А., Жебрун А.Б. и др. Иммуносорбент для обнаружения антител к ядерному белку вируса гепатита с в сыворотке крови // Патент РФ № 2138286. от 27.09.1999
50. Нанотехнологии .под ред. Третьякова Ю.Д. Физматлит. М.- 2008.- С. 7
51. Новиков А. В., Бубляев Р. А., Краснов Н. В., Козьмин Ю. П, Кураева Т. Е., Миргородская О. А. Изучение конкурентного взаимодействия ионов серебра с цистеинсодержащими пептидами и серосодержащими аминокислотами с помощью ESI-MS // Научное приборостроение .- 2007.-Т. 17, №4.-С. 29–36
52. Носик Д.Н., Носик Н.Н., Лялина И.К., Калнина Л.Б., Кондрашина Н.Г., Раснецов Л.Д., Антиретровирусный препарат и антигерпетический препарат на основе фуллерена // Роснанотех.-2008.- С.326
53. Носик Н.Н., Носик Д.Н., Дерябин П.Г., Желтухин С.Л. Вопросы безопасности и вирулицидные свойства дезинфицирующих средств // Дезинфекционное дело.- 2006.- №3. –С.33-36
54. Носик Н.Н., Носик Д.Н. Вирусные инфекции и дезинфекции// РЭТ-инфо.- 2006.-№ 3.-С. 13-16
55. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование. изд Наука.М. -1981

56. Падюков Л.Н. Бобкова М. Р. Способ получения иммуносорбента для диагностики вирусного гепатита С // Патент РФ 2095815.от 10.11.1997
57. Полянская Н.Ю. Жебрун А.Б. Иммунохимический анализ процесса очистки вируса гриппа методами гельфильтрации и ультрафильтрации // Тр.НИИЭМ им. Пастера-1982. Т.58.- С. 64-69
58. Плиева Ф.М., Исаева Е.И. Лозинский В.И. Применение криогелей поливинилового спирта в биотехнологии.V1. Биоафинные сорбенты на основе сверхмакропористого носителя для работы с вирусными частицами // Биотехнология . -1998.- №5.- С.32-37
59. Пузырь А.П., Бондарь В.С., Селимханова З.Ю. и др. Результаты исследования возможности применения детонационных наноалмазов в качестве сорбента // Сибирское медицинское обозрение.-2004.-Т.2-3.- С.25-28
60. Рамбиди НГ, Березкин А.В. Физические и химические основы нанотехнологии . ФИЗМАТЛИТ. М.-2009
61. Ровнова З.И. Получение специфических противогриппозных сывороток //Вопр. вирусологии .-1959- №4.- С.465-470
62. Родзевич П.К., О влиянии растворимого металлического серебра на кровь., диссертация доктор мед. наук .-СПБ- 1903
63. Рыбинская Л.Н., Мельник А.В., Митченко В.П. К вопросу о механизме сорбции вирусов гриппа на анионообменных смолах. Микробиол. журнал.- 1982- Т.44, №3.-С.41-46
64. Сакович Г.В., Жарков, А.С., Петров, Е.А., Детонационные наноалмазы. Синтез. Свойства, Применение // Наука и Технологии в Промышленности.- 2011.-№ 4.- С.52-61
65. Сапурина И.Ю, Стейскал Я. Влияние рН на курс окислительной полимеризации анилина, морфологию и свойства продуктов // Успехи химии.- 2010.-Т. 79,№12.-С. 1-22
66. Сапурина И.Ю., Компан М.Е., Забродский А.Г., Стейскал Я., Трхова М. Наноконпозиты со смешанной электронной и протонной проводимостью для применения в электрокатализе // Электрохимия. -2007.- № 5, С. 554-562
67. Сидоренко В.Г, Коваленко Б.М, Тульский В.Ф., Мерициди И.А. Применение сорбента СТРГ для очистки водной поверхности от разливов нефти, нефтепродуктов, жиров и

различных водонерастворимых органических соединений //Нефтепромышленное дело. ВНИИОЭНГ.-2002.- №12

68. Сосенкова Л. С., Егорова Е. М., Подчерняева Р. Я., Суетина И. А. Наночастицы серебра, стабилизированные крахмалом: синтез и взаимодействие с клетками *in vitro*//Нанотехнологии и охрана здоровья.- 2013 .- №1. - С. 10-16

69. Тимофеева А.В., Ильина М.В., Иванова В.Т., Сапурина И.Ю., Баратова Л.А., Катруха Г.С. Исследование процессов сорбции и десорбции антибиотиков разных групп на многослойных углеродных нанотрубках типа «Таунит». Materiály IX mezinárodní vědecko - praktická konference «Moderní vymoženosti vědy – 2013». - Díl 65.Chemie a chemická technologie: Praha. Publishing House«Education and Science» s.r.o - 104 //Материалы IX Международная научно – практическая конференция Современные достижения науки 2013 , 27-января – 5 февраля 2013 Прага

70. Тимофеева А.В., Буравцев В.Н, Галатенко О.А., Толстых И.В., Терехова Л.П., Николаев А.В., Баратова Л.А., Катруха Г.С. Изучение сорбции антибиотиков-гликопептидов на ультрадисперсном углеродном сорбенте //Биотехнология.-2010.-№2.-С.70-80

71. Толгская М.С. Чумаков А.А., Аргироз / Большая медицинская энциклопедия. Под редакцией Петровского Б.В. ,3-е изд. М. Советская энциклопедия -1984.-Т.2.-С.142-143

72. Трэмблен М. Э. Фиштер С. Г., Коллиас Д. Йо. Способ удаления патогенов нано размера из жидкостей /Патент РФ 2237022. 27.09.2004

73. Трушакова С.В., Мониторинг циркуляции вирусов гриппа в регионах России в 2006 - 2010 гг: Диссертации кандидата биол. наук: 03.02.02 / Трушакова Светлана Викторовна.- М.– 2010

74. Физический энциклопедический словарь (ФЭС) / Советская энциклопедия. - М.- 1983.- С. 393.(а); С. 226-227(в)

75. Филатов С.А., Долгих М.Н., Кучинский Г.С., Ахремкова Г.С., Гункевич А.В., Жданок Е.В. Сорбционные свойства активированных углеродных наноматериалов // Наноструктурные материалы.-2008.-С.705-706

76. Хилеман М.Р. Комментарий о гриппе А(Н1N1) 1977-1978 годов. Молекулярная биология вируса гриппа // Сб. Инст. вирусологии. АМН СССР. М.- 1979.-С.6-7

77. Химическая энциклопедия. Советская энциклопедия . М. 1988- Т.1.-С. 77

78. Чубарова Н.И., Клейменова С.В., Никоноров И.Ю., Розаева Н.Р., Бичурина М.А. Способ получения инактивированной гриппозной вакцины// патент РФ 2082431 от 27.06.1997
79. Шляхто Е.В., Нанотехнологии в биологии и медицине//Международный форум по нанотехнологиям.- 2008.-С.306
80. Шорникова О.Н., Коган Б.В., Сорокина Н.Е., Авдеев В.В. Пенографит-высокоэффективный сорбент //Международный форум по нанотехнологиям. М. - 2008.- С.581
81. Щелканов М.Ю., Прилипов А.Г., Львов Д.К., и др. Динамика вирулентности штаммов высоковирулентного вируса гриппа А/Н5N1 генотипа 2.2, изолированных на территории России в 2005-2007 гг.// Вопр. вирусол.- 2009.-Т.54, № 2.- С.8-17
82. Щелканов М.Ю, Львов Д.К. Новый субтип вируса гриппа А от летучих мышей и новые задачи эколога – вирусологического мониторинга // Вопр. вирусол. -2012.- Приложение 1. -С.159-168
83. Щербаков Ф.Б. и др. Препараты серебра: вчера, сегодня и завтра //Фармацевтический журнал.- 2006. -№5.-С. 45-57
84. Энциклопедический словарь медицинских терминов. М.-1982.- Т.1. -С.409.
85. Эльпинер Л.И. Шафиров Ю.Б. ,Чайкина И.Я., Назин И.Г. /Труды научн. конф НИИ гигиены водного Транспорта Мин ЗдравоохранСССР.-1972 ,вып 2.-С. 150-153
86. Adnan A., Lam R., Chen H et al. Nanodia Atomistic Simulation and Measurement of pH Dependent Cancer Therapeutic Interactions with Nanodiamond Carrier // Molecular Pharmaceutics .- 2011- V. 8.№ 2. - P. 368-374
87. Andrewes C.H., Laidlaw P,P, Smith W., The susceptability of mice to the viruses of human and swine influenza // Lancet. -1934ii, - P. 859-862
88. Arakava H. Neault J.F.Tajmir-Riahi H.A. Complex with DNA and PNA studied by fourier transform infared spectroscopy and capillary electroforesis // Biophysical Jurnal.-2001.-V. 81.- P. 1580-1587
89. Asghari1 F., Jahanshahi1 M., Ghoreyshi A.A., Rad A. S . Fabrication and evaluation of nickel-agarose nanoporous adsorbents for nanobioseparation purification: The influences of preparation

- agitating speed on the adsorbent hydrodynamic behaviour // Colloids and Nanomedicine conference, 15-17 July 2012- P. 2.101
90. Arslan D. et al. Distant mimivirus relative with a larger genome highlights the fundamental features of Megaviridae // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.-2011.-T. 108. -P. 17486–17491.- DOI:10.1073/pnas.1110889108
91. Baughman R.H., Cui C., Zakhidov A.A., Iqbal Z., Barisci J. N., Spinks G. M., Wallace G.G., Mazzoldi A., De Rossi D., Rinzler A.G., Jaschinski O., Roth S., Kertesz M. Carbon Nanotube Actuators // Science. 1999.- V.-284. -№ 5418.- P. 1340-1344
92. Behera B. , Sagiri S.S ., Pal K., Srivastava A., Formation and evaluation of antimicrobial organogels using sorbitan ester and sunflower oil // Colloids and Nanomedicine conference, 15-17 July- 2012.- P.271
93. Blakey, K.J. Thurecht, P.M. Fredericks, Constructs for optical biomedical imaging agents : Controlling the optical properties of polymer stabilized gold nanoparticle aggregates // Colloids and Nanomedicine conference, 15-17 July 2012. - P. 2116
94. Bidez R., Li S., MacDiarmid A.G. et al. // Biomater. Sci. Polymer. Edn. 2006.-V.17. N. 1-2.- P.212
95. Bodian D, Morgan J., Hove H. Differentiation of types of polyomyelitis viruses: the grouping of fourteen strains into three basic immunological types // Am. J. Hyg.- 1949- V. 49.-P. 234-245
96. Bruno D.W., Poppe T.T. A color atlas of Salmonid Diseases // Academic press, 1996
97. Chandra S., Singh R. , H. Singh, A.K. Narula, S. Broor Conducting polymer membrane and a process for the preparation of the same membrane // Патент США 6156202, заявка от 1999-03-3
98. Chen W. et al. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death.// Nature Med., 2001.-№ 7.- P. 1306-1312
99. Clark K.J, Sarr A.B et al. In vitro studies on the use of clay, clay minerals and charcoal to adsorb bovine rotavirus and bovine coronavirus // Vet. Microbiol. 1998.- V. 63 .-№2-4.- P. 137-146

100. Davies H.W., Appleyard G., Cunningham P. et al. The use of continuous cell line for the isolation of influenza virus // Bull. WHO. -1978.- V.56.- P. 5519-5524
101. Davies R.L., Etris S.F. Development and function of silver in water-purification and disease-control // Catalysis Today. -1997.- V.36. -P. 107-114
102. Dawood F.S., Finelli L., Shaw M.W., Lindstorm S. et al. Emergence of a novel Swine-Origin Influenza A(H1N1) virus in humans // New England Journal of Medicin.- 2009.- P. 1-10
103. De Stefano D., Carnuccio R., Maiuri M. // Nanomaterials toxicity and cell death modalities // Journal of Drug Delivery. Hindai publishing corporation. -2012- V. 2012. Article ID 167896-P.1-14.doi: 10/1155/2012/167896
104. Enders J.F., Weller T.H., Robbins F.C. Cultivation of the Lansing strain of poliomyelitis virus in cultures of human embryonic tissues // Science.- 1949.-№ 108.- P.85-87
105. Elechiguera J. L., Burt J.L, Morones J.R, et al, Interaction of silver nanoparticles with HIV-1 // Nanotechnology. -2005. -V. 3. -P.1-10
106. Fatexa S. , Pinheiro P. C. A., Silver and poly(tert-butyl)acrylate nanocomposite for biodetection by SERS // Colloids and Nanomedicine conference, 15-17 July- 2012.- P. 1. 59
107. Fede C., Fortunati I., Weber V. et al., , Tracking uptake and toxicity of nanoparticles in human endothelial cells in stationary and flow conditions // Colloids and Nanomedicine conference, 15-17 July- 2012.- P. 58
108. Frensis T.Jr. A new type of virus from epidemic influenza // Science.- 1940.-V.92.- P.405-406
109. Francis, T., Jr. & Moore, A. E. A study of the neurotropic tendency in strains of the virus of epidemic influenza // JExp Med. -1940.-V. 72.-P. 717-728 .
110. Freitas R.J. Nanomedicine Volume IIA// Biocompatibility, Landes Bioscience: Georgetown, TX.- 2003
111. Fujimura T., Akashi M. et al. Carrier of a diamond fine particle for immobilizing virus // US Patent 7,491,554 February 17.-2009
112. Gaikwad, S.C. A.P. Ingle1 A.P., Gade A.K, Duran N., P. Marcato , Rai1 M.K. Mycosynthesized silver nanoparticles as a novel antimicrobials against human pathogens // Colloids and Nanomedicine conference, 15-17 July- 2012.- P3.116

113. Goldstein I.J., Poretz R.D., Isolation, physicochemical characterization, and carbohydrate-binding specificity of lectins. In Goldstein IJ, Liener IE, Sharon N. The Lectins Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine // San Diego: Academic.- 1986 - P. 233–247. ISBN 0-12-449945-7
114. Gorsuch J. W., Klaine S. J. Toxicity and fate of silver in the environment// Environmental Toxicology and Chemistry April -1998. - V.17,N 4. -P. 539-649. 2 NOV 2009 DOI: 10.1002/etc.5620170403
115. Guggenbichler, J.P., M.Boswald, S. Lugauer, and T. Krall. A new technology of microdispersed silver in polyurethane induces antimicrobial activity in central venous catheters // Infection.- 1999.- V.27, Supp.1.-P.16-23
116. Herodotus / Book 1, Para. 188 Translated by A.D. Gogley, Harvard University Press, Cambridge.- 1946
117. Hinshaw V. S., Webster R.G., The natural history of influenza viruses // In Beare A.S. (ed.) Basic and Applied Influenza Research. CRC Press, Boca Raton.- 1982
118. Hinshaw V. S., Webster R.G., Turner B., Zwank P.J Water –born transmission of influenza A viruses// Intervirology .- 1979.-V.11.- P. 66-68
119. <http://www.who.int/wer/2013/wer8842.pdf>
120. http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/Influenza_Summary_IRA_HA_interface_15Feb13.pdf
121. http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/EN_GIP_20131008CumulativeNumberH5N1cases.pdf
122. http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/en/index.html
123. Ivanova V.T., Katrukha G.S., Timofeeva A.V., Ilyna M.V., Ivanov V.F., Kurochkina Y.E., Baratova L.F., Sapurina I.Yu., Ivanov V.F. Sorption of influenza viruses and antibiotics from the solutions on carbon nanotubes and nanocomposites contained polyaniline //-2011.- J. Phys.: Conf. Ser. 2011.-291 012004124. Ivanova V. T., Sapurina I. Yu., Ivanov V. F., et al. // Rusnanoforum, Moscow, 6-8 October 2009 .- P. 274
125. Il'ina M. V., Timofeeva A. V, Ivanova V. T., Burtseva E. I. Baratova L. A., Sapurina I. Yu., Katrukha G. S. Investigations into the processes of sorption and desorption of polypeptide

- antibiotics on Taunit multiwalled carbon nanotubes // ISSN 0003_6838, Applied Biochemistry and Microbiology.- 2012.- V. 48, №.8.- P. 43–48
126. Influenza // Weekly Epidemiol. Rec. -2003.-N.16.- V. 78.- P. 136
127. Johnston H.J., Hutchion G., Christensen F.M. et al. // A review of the in vivo and in vitro toxicity of silve and gold particulates: Particle attributes and biological mechanism responsible for the observed toxicity // Critical Reviews in Toxicology, -2010.- V.40- № 4.- P. 328-346
128. Kamikawa T.L., Mikolajczyk M.G., Kennedy .et al . Nanoparticle-based biosensor for the detection of emerging pandemic influenza strains// Biosens Bioelectron.- 2010.V. 26 №4.- P. 1346-1352
129. Kawaoka Y., Krauss S., Webster R.G. Avian to human transmissi-on of the PB1 gene of influenza A virus in the 1957 and 1968 pandemics. //J. Virol. -1989. -V.63.- P. 4603-4608
130. Krang D., Lee S., Nanoscale toxicity and conformational change of protein activation // Colloids and Nanomedicine conference, 15-17 July, 2012.- P. 2.50
131. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins of the head of bacteriophage T4 // Nature.- 1970.-V.227. P. 680-685
132. Lamb R.A., Zebedee L.S., Richardson C.D. Influenza virus protein in an integral membrane protein expressed on the infected cell surface // Cell. -1989.-V.40.-P.627-633
133. La Scola B., Audic S., Robert C., Jungang L., de Lamballerie X., Drancourt M., Birtles R., Claverie J. M., Raoult D. A giant virus in amoebae // Science. -2003. - B. 5615.- T. 299. -P. 2033. PMID 12663918
134. Liangliang Ji. , Chen Wei, et al // Langmuir. -2009. -V. 25,№19.- P. 11608-11613
135. Liu S. W. Origin and diversity of novel avian influenza A/ H7N9 viruses causing human infection: phylogenetic, structural, and coalescent analyses // Lancet.-2013 : [http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(13\)60938-1/fulltext](http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(13)60938-1/fulltext)
136. Liu Y. L. and Sun K. W.. Protein Functionalized Nanodiamond Arrays // Nanoscale Res Lett. - 2010 June,-V.5,№6- P. 1045–1050.
137. Long R.Q., Yang R.T .Carbon nanotubes as sorbent for dioxin removal //Am.Chem.Soc. - 2001- V.123 -P. 2058

138. Mac-Diarmid A. and A.J, Epstein // J. Chem. Soc. Faraday Trans.- 1989.- V. 88. -P.317
139. Marwijk.J., Sello N.T., Whiteley . The effect of silver nanoparticles on superoxide dismutase activity of plasmodium falciparum// Colloids and Nanomedicine conference, 15-17 July- 2012.- P. 1.46
140. McKeon K.D., Lewis A., Freeman J. W. Electrospun Poly(D,L-lactide) and Polyaniline Scaffold Characterization, // Wiley InterScience. -2009.- www.interscience.wiley.com
141. Misra S.K. , Kondain P., Bhattacharya, Rao C.N.R. Graphene as nanocarrier for tamoxifen induces apoptosis in transformed cancer cell lines of different origins// Colloids and Nanomedicine conference, 15-17 July- 2012.- P. 1.11
142. Moghtader F., Turk M., Saluti M., Piskin E. Antibacterial properties and cytotoxicity of nonwoven dressing loaded with silver nanoparticles //Colloids and Nanomedicine conference, 15-17 July- 2012.- P 1. 32
143. Oda M., Itoh H. et al. Antibacterial, antifungal and antiviral agent// US patent 5,792,793, - 1998
144. Osterhaus A., Openshaw P., Monto A. Influenza A(H1N1) pandemic: the right steps were taken. Science-based arguments to support this statement //ESWI.-2010.-P.1-16
145. Pedahzur R., Shuval H.I., Ulitzur S. Silver and hydrogen peroxide as a potential drinking water disinfectants : their bactericidal effect and possible modes of action// Water Science and Technology.- 1997.- V.35.-P. 87-93
146. Perevedentseva E., Cheng C.Y., Chung P.H., Tu J.S., et al. The interaction of the protein lysozyme with bacteria E.coli observed using nanodiamond labelling // Nanotechnology.- 2007. V.18.- 315102
147. Peiris M., Yam W.C., Chan K.H. et al. Influenza A(H9N2): aspects of laboratory diagnosis // J.Clin.Microbiol.-1999.-V.37.-P. 3426-3427
148. Pinto R.G, Almeida A.,Fernandes S. C.M., Freire C.S.R., Pascoal Neto C., Nanocomposites of pullulan and colloidal silver: Film formation and antifungal activity //Colloids and Nanomedicine conference, 15-17 July- 2012.- P.62
149. Pliny the Edller, Natural History// Libri XXXIII, translated by H. Rackman, Volume IX, Harvard University Press, Cambridge.- 1952

150. Porter A.G., Smith J.C., Emtage J.S. The sequence of influenza virus RNA segment 8 indicates that the coding regions for the NS1 and NS2 protein overlap //PNAS USA.-1980.-V.77.-P. 5074-5078
151. Prodan. A.M., Ciobanu C.S., Iconaru S.L.et al. // Antibacterial activity of silver doped hydroxyapatite nanoparticles. Colloids and Nanomedicine conference, 15-17 July 2012. -P.2.47
152. Purtov K.V., Duratova L. P. Puzyr A.P., Bondar V.S. The interaction of liner and ring form of DNA molecules with nanodiamonds synthesized by detonation // Nanotechnology.- 2008.-V.19.-P.1-3.- 325101
153. Rachmawati H. Reni R., Manuel D.B. Development of intraoral recombinant hepatitis B surface antigen (HBs-Ag)- loaded self-assembly nanoemulsion // Colloids and Nanomedicine conference, 15-17 July- 2012.- P 1.91
154. Ratte H.T., Bioaccumulation and toxicity of silver compounds: A review.// Enviromental Toxocology and Chemistry.- 1999.-V. 18,№ 1. -P.89-108
155. Rohm C., Zhou N., Suss J., Mackenzie J., Webster R. Characterization of novel influenza hemagglutinin H15, criteria for determination of influenza A subtypes. //Virology.-1996.-V.217.-P. 508-516
156. Pedahzur R., Shuval H.I., Ulitzur S.// Silver and hydrogen peroxide as a potential drinking water disinfectants : their bactericidal effect and possible modes of action// Water Science and. Technology. -1997.-V. 35.-P. 87-93
157. Reed, L.J.; Muench, H. A simple method of estimating fifty percent endpoints// The American Journal of Hygiene.- 1938.- V.27.- P. 493–497
158. Sabin A.B., Boulgar L.R. History of Sabin attenuated polyovirus oral live vaccine straines // J. Biol. Stand. 1973.-V. 1.-P. 115-118
159. Salk J.E., Bennet B.L., Lewis L.J. et. al. Studies in human subjects on active immunization against poliomyelitis // J. A. M. A., 1953. V.151.-P.1081-1098
160. Satio T., Lim W., Suzuki T. et al. // Characterization of a human H9N2 influenza virus isolated in Hong Kong // Vaccine.-2002.-V.20.-P. 125-133

161. Schrand A.M., Hens S.A.C., Shenderova O.A. Nanodiamond particles: Properties and perspectives for bioapplications // *Critical reviews in Solid state and material sciences*.-2009.- P.19-74
162. Sapurina I.Yu. M.E. Kompan, A. G. Zabrodskii, J. Stejskal, and M. Trchova. Nanocomposites with Mixed Electronic and Protonic Conduction for Electrocatalysis // *Russian Journal of Electrochemistry*.-2007.-V. 43.-№5.- P.528-536
163. Schulze I.T. Effect of glycosylation of influenza virus hemagglutinin // *J. of Infection Disiases*.-1997.- V.176.-P.24-28
164. Shope R.E. Swine influenza .111. Filtration experiments and aetiology // *J Exp. Med.* -1931.- V. 54.- P.373-385
165. Sirois S, Touaibia M. Glycosylation of HIV-1 gp120 V3 loop: towards the rational design of a synthetic carbohydrate vaccine// *Curr. Med. Chem.* 2007 .V. 14,№30.- P. 3232-3242
166. Sominina A., Burtseva E., Eropkin M. , et al. Influenza surveillance in Russia based on epidemiological and laboratory data for the period from 2005 to 2012. // *American Journal of Infectious Diseases*.-2013.-V. 9, №3.-P. 77-93
167. Spitsyn B.V., Denisov S.A., Skorik N.A. et al. The physical–chemical study of detonationnanodiamond application in adsorption and chromatography// *Diam. Rel. Mat.* -2010.- V.19.-P. 123-127
168. Spitsyn B. V., Davidson J. L. et al. In road to modification of detonation nanodiamond // *Diamond and Related Materials*.- 2006.-V. 15.-P. 298
169. Stallknect D.A., Kearney M.T., Shane S.M. //Effect of pH, temperature and salinity on persistence of avian influenza viruses in water. *Avian Dis.*- 1990, 34. P. 412-418
170. Stallknect D.A., Shane S.M. , Kearney M.T., Zwank P.J. // Persistence of avian influenza viruses in water// *Avian Dis.*-1990 .V.34.- P.406-411
171. Stejskal J. Prokeš J. Sapurina I. The reduction of silver ions with polyaniline: The effect of the type of polyaniline and the mole ratio of the reagents // *Materials Letters*.-2009.- V.63.- P. 709–711
172. Stoskopf M.K. / *Fish Medicine*, W.B. Saunders Co.- 1993

173. Talom R. Mayap, Boudon J., Denat F., Bernhard C., Mirjolet C., Millot N. et al . Functionalized titanate nanotubes as a potential versatile platform for theranostic // Colloids and Nanomedicine conference, 15-17 July- 2012 .-P1.115
174. Taylor R.M. A further note on 1233 (‘ influenza C’) //Archiv gesamte Virusforschung .- 1951,-V. 4, -P. 485-500
175. Tokumaru T., Shimizu Y., Fox C. L. Antiviral activities of silver sulfadiazine and ocular infection// Research Communications in Chemical Patology and Pharmacology May.- 1984.- V.8,№1.- P. 151-158
176. Tong S., Li Y. et al. A distinct lineage of influenza A virus from bats //PNAS.- 2012.- V.109,№11.-P. 4269-4274; doi:10.1073/pnas.1116200109
177. Van Etten J.L., Meints R.H. Giant viruses infecting algae// Annu. Rev. Microbiol. -1999.- V.53. -P.447- 494. Review. PMID 10547698 Open Access version
178. Villalba P., Ram M.K., Gomez H., Bhethanabolta V., Helms M.H., Kumar Am., Kumar Ash. Cellular and vitro toxicity of nanodiamond-polyaniline composites in mammalian and bacterial cell // Materials Science and Engenieerings C. 32. - 2012.- P.594 – 598
179. Ward C.W., Dopheide T.A. Primary structure of the Hong Kong H3 hemagglutinin // Brit. Med. Bull.-1979.-V.35, №1.- P.51-56
180. Webster R., Guan Y., Peiris M., Chen H. A/H5N1 Influenza continues to circulate and change.//Microbe.- 2006.-V1,№ 12.- P. 559-565
181. Webster R.G., Kawaoka Y. Influenza -an emerging and re-emerging disease// Seminar in Virology.- 1994.-V.5.- P.103-111
182. Websler R., Laver W. In: The influenza viruses and influenza. //N. Y.: Academic Press.- 1975.- P. 270—314
183. Wei Z. X., Zhang Z. M, Wan M. X. Formation mechanism of self-assembled polyaniline micro nanotube // Langmuir.- 2002.-V. 18.-P.917–921
184. WER. Influenza. 2002.-v.77.-№49.-p.417; №46.-p.381-384; №10.-p.77-80.
185. WER. Influenza. 2006.-v.78.-№10.-p.129-136; №11.-p.169 –180, p.181-188.
186. WER. Influenza. 2007.-v.79.-№8.-p.77- 83; №9.-p.85-92; №10.-p.93-100.

187. WER., Influenza. 2009.-v.84, 47.-p. 485–492.
188. Wilson I.A., Skehel J.J., Wiley D.C. Structure of hemagglutinin membran glycoprotein of influenza virus at 3A resolution //Nature.-London. -1981.- V.289.- P.365-373
189. Wong S.S., Yuen K.Y. Avian Influenza virus infection in humans // Chest.- 2006.- V.129.- P. 156-168

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 нанодIAMAZOV / 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., Спицин 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. wwwcolloidsanomedicine.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