

*В. Т. Иванова¹, М. В. Иванова¹, Е. И. Бурцева¹, Е. О. Гарина¹, С. В. Трушак ова¹, Е. С. Шевченко¹,
А. А. Маныкин¹, А. А. Исакова², А. П. Корженевский³, Б. В. Спицын²*

Взаимодействие вирусов гриппа А и В с сорбентами на основе наноалмазов

¹ФГБУ НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского Минздравсоцразвития России, Москва; ²Институт физической химии и электрохимии им. А. Н. Фрумкина РАН, Москва; ³НП ЗАО «Синта», Минск, Республика Беларусь

Приведены данные о сорбции вирусов гриппа А(Н1N1), А(Н1N1)ν, А(Н3N2), В и κДНК вирусов гриппа А(Н1N1)ν и В на наноалмазы, шихту. Сорбция вирусов из различных растворов происходила при 4–37°С в течение 20 мин. Интенсивность сорбции зависела от концентрации сорбента в растворе и его структуры, не зависела от антигенной формулы вирусов и температуры. Сорбирующая способность шихты в отношении вирусов гриппа А и В выше, чем наноалмазов. Установлено, что белки невирусной природы (бычий сывороточный альбумин и антитела к вирусам гриппа) также связываются обоими сорбентами. Десорбция вирусов в физиологический раствор при 4 и 22°С не происходила в течение 48 ч.

Ключевые слова: *вирусы гриппа А и В, κДНК, сорбенты, наноалмазы, шихта*

Interaction of influenza A and B viruses with nanodiamond-based sorbents

*V. T. Ivanova¹, M. V. Ivanova¹, E. I. Burtseva¹, E. O. Garina¹, S. V. Trushakova¹, E. S. Shevchenko¹,
A. A. Manykin¹, A. A. Isakova², A. P. Korzhenevsky³, B. V. Spitsyn²*

¹D. I. Ivanovsky Research Institute of Virology, Ministry of Health and Social Development of Russia, Moscow; ²A. N. Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow; ³ZAO Sintez Research Enterprise, Minsk, Republic of Belarus

The paper presents data on the sorption of influenza A(H1N1), A(H1N1)ν, A(H3N2) viruses, cDNA of A(H1N1)ν and B viruses on nanodiamonds and furnace charge. The sorption of viruses occurred in different solutions at 4–37° C during 10–20 min. The rate of sorption varied with the concentration of a sorbent in the solution and its structure, but did not with the antigenic formula of viruses or temperature. The sorption capacity of furnace charge towards influenza A and B viruses was higher than that of nanodiamonds. Nonviral proteins (bovine serum albumin and influenza virus antibodies) were found to be bound by both sorbents. Viral desorption did not take place in physiological solution at 4 and 22° C for 48 hours.

Key words: *influenza A and B viruses, cDNA, sorbents, nanodiamonds, furnace charge*

В борьбе с вирусными инфекциями важное место занимает разработка профилактических мер для создания препятствий к их распространению. Для вирусов гриппа птиц, энтеровирусов, вируса гепатита А и др. водный путь передачи является одним из основных. Создание материалов, имеющих различную природу и обладающих сорбционными по отношению к вирусам свойствами, предполагает этап изучения их взаимодействия с патогенными микроорганизмами. Данная работа входит в серию работ по исследованию взаимодействия с вирусами современных углеродсодержащих наноматериалов. Ранее нами было показано, что модифицированный графит, углеродные нанотрубки взаимодействуют с вирусами гриппа А (с гемагглютинидами Н1, Н3, Н5, Н7) и В, полиомиелита, бактериофагами и способны удалять их из раствора [2, 3]. Данная работа посвящена исследованию взаимодействия вирусов гриппа А и В с материалами, содержащими наноалмазы.

Материалы и методы

Вирусы: пандемические штаммы вирусов гриппа А/IV-Moscow/01/09 (H1N1)sw1,

А/Калифорния/4/09, антигенно родственные вирусу гриппа свиней [5]; эталонные штаммы А/Новая Каледония/20/99 (H1N1), А/Перт/06/09 (H3N2); В/Сычуань/379/99, В/Флорида/04/06 эволюционной линии В/Ямагата/16/88; эпидемические штаммы В/Москва/03/10, В/Москва/06/11 эволюционной линии В/Виктория/2/87.

Вирусы получены из коллекции вирусов Центра экологии и эпидемиологии гриппа (ЦЭЭГ), лабораторий НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского. Культивирование вирусов гриппа проводили на 10–11-дневных развивающихся куриных эмбрионах (КЭ) и культуре клеток MDCK. Гемагглютинирующую активность вирусов определяли в реакции гемагглютинации (РГА) по общепринятой методике, рекомендованной ВОЗ, с использованием 0,75% взвеси эритроцитов группы крови человека 0(I). Для определения инфекционного титра использовали заражение КЭ 10-кратными разведениями вирусосодержащей жидкости.

Титр вирусспецифических антител в растворах определяли в реакции торможения гемагглютинации

Контактная информация:

Иванова Валерия Тимофеевна, д-р биол. наук, вед. науч. сотр.; e-mail:valivanova1946@mail.ru

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

Сорбент	Вирус	Антигенная формула	Титр вируса, ГА-ед.		Система культивирования/степень очистки/десорбция, время, Т-титр, ГА-ед.
			до сорбции ГА	после сорбции ГА	
Наноалмаз	А/Новая Каледония/20/99	А (Н1N1)	128 000	256	КЭ/очищ., конц.
	А/Перт/16/09	А (Н3N2)	128 000	16	КЭ/конц.
	В/Сычуань/379/99	Линия В/Ямагата	128	< 2	КЭ/очищ., конц.
	В/Флорида/04/06	Линия В/Ямагата	128	2	КЭ/конц./десорбция, 48 ч, Т ≤ 2
	А/Калифорния/4/09	А (Н1N1)v	32	2	КЭ/аллантаоисный/десорбция, 48 ч, Т ≤ 1
	В/Флорида/04/06	Линия В/Ямагата	32	8	КЭ/аллантаоисный
	В/Москва/03/2010	Линия В/Виктория	128	< 2	МДСК
Наноалмаз Т	А/Перт/06/09	А (Н3N2)	128 000	8	КЭ/конц.
	В/Флорида/04/06	Линия В/Ямагата	128	2	КЭ/конц./десорбция, 48 ч, Т < 2
	В/Москва/03/2010	Линия В/Виктория	128	< 2	МДСК
Шихта	А/Новая Каледония/20/99	А (Н1N1)	2000	2	КЭ/очищ., конц.
	В/Флорида/04/06	Линия В/Ямагата	2000	16	КЭ/конц.
	А/Перт/16/09	А (Н3N2)	64	2	КЭ/аллантаоисный
	В/Флорида/04/06	Линия В/Ямагата	128	32	КЭ/аллантаоисный
	В/Москва/06/11	Линия В/Виктория	64	< 2	МДСК

Примечание. Очищ. – очищенный в градиенте сахарозы препарат вируса; конц. – концентрированный препарат вируса, полученный при ультрацентрифугировании при 25 000 об/мин.

(РТГА). В работе использовали иммунные крысиные сыворотки к эталонным штаммам вирусов А и В, приготовленные в ЦЭЭГ.

Ампликоны – фрагменты кДНК генов современных штаммов вирусов гриппа А и В – получены в полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием диагностических тест-систем “ДНК-технология”: “Пан Н1N1”, “Influenza A virus”, “Influenza B virus”. Электрофорез фрагментов кДНК выполняли в 2% агарозном геле в течение 1,5 ч при напряжении 80 В, в качестве положительного контроля использовали контрольные образцы, входящие в тест-системы. Гели фотографировали и анализировали на трансиллюминаторе с ультрафиолетовым светом с длиной волны $\lambda = 254$ нм.

Использованы следующие сорбенты в виде порошков: наноалмазы Т, прошедшие термообработку при 490°C, наноалмазы без термообработки, шихта – первичный продукт детонационного синтеза наноструктурных алмазов.

Сорбцию вирусов проводили из физиологического раствора (ФР), водопроводной автоклавированной воды, аллантаоисной жидкости КЭ, питательной среды Игла для культуры клеток МДСК по методу, описанному в работе [2]. Токсичность сорбентов, разведенных в ФР, исследовали на культуре клеток МДСК в микропланшете. В первую лунку вносили взвесь сорбента $V = 20$ мкл. Начальная концентрация сорбента в первой лунке составляла 1 мг/мл. Далее полученную суспензию разводили 1/10 и выдерживали в термостате (37°C, 18 ч). Клеточный монослой анализировали методом световой микроскопии. Электронно-микроскопические исследования выполняли на препаратах, обработанных с помощью 2% водного раствора уранилацетата.

Результаты и обсуждение

Наноалмазы, или ультрадисперсные алмазы, можно рассматривать как специфические нанокластеры углерода, входящие в обширное и приобретающее все большую популярность семейство нанокластеров углерода, состоящее из фуллеренов, нанотрубок, графена, наногрифта. Наноалмазы образуются в течение 0,3 мкс при детонации взрывчатых веществ тротила и гексогена при высоком давлении 16–23 ГПа и температуре (Т) около 3000 К. При этом, кроме наноалмазов, образуется алмазная шихта, содержащая наряду с алмазной фазой неалмазные углероды и примеси метана [4, 7].

Выбор вирусов гриппа в качестве биологических объектов исследования обусловлен широким распространением этих вирусов в природе, поражением людей, птиц и животных, водным путем передачи инфекции в случае вирусов гриппа птиц и, возможно, пандемического штамма А(Н1N1)v, интродукцией вирусов гриппа птиц в человеческую популяцию. В таблице представлены результаты взаимодействия с наноалмазами и шихтой вирусов гриппа А(Н1N1), А(Н3N2) и В эволюционных линий В/Виктория- и В/Ямагата-подобных. Как видно из представленных данных, при сорбции на наноалмазы падение гемагглютинирующих (ГА) титров в случае концентрированных вирусов достигало 4000 раз и зависело от начального титра вируса. Различия в сорбционных свойствах обоих образцов наноалмазов не выявлены, т. е. термообработка наноалмазов при 450°C не оказывала влияния на их сорбционные свойства. ФР или автоклавированная вода, в которых присутствовали вирусы, также не оказывали влияние на сорбцию (см. таблицу). Падения ГА-титров вирусов в вирусосодер-

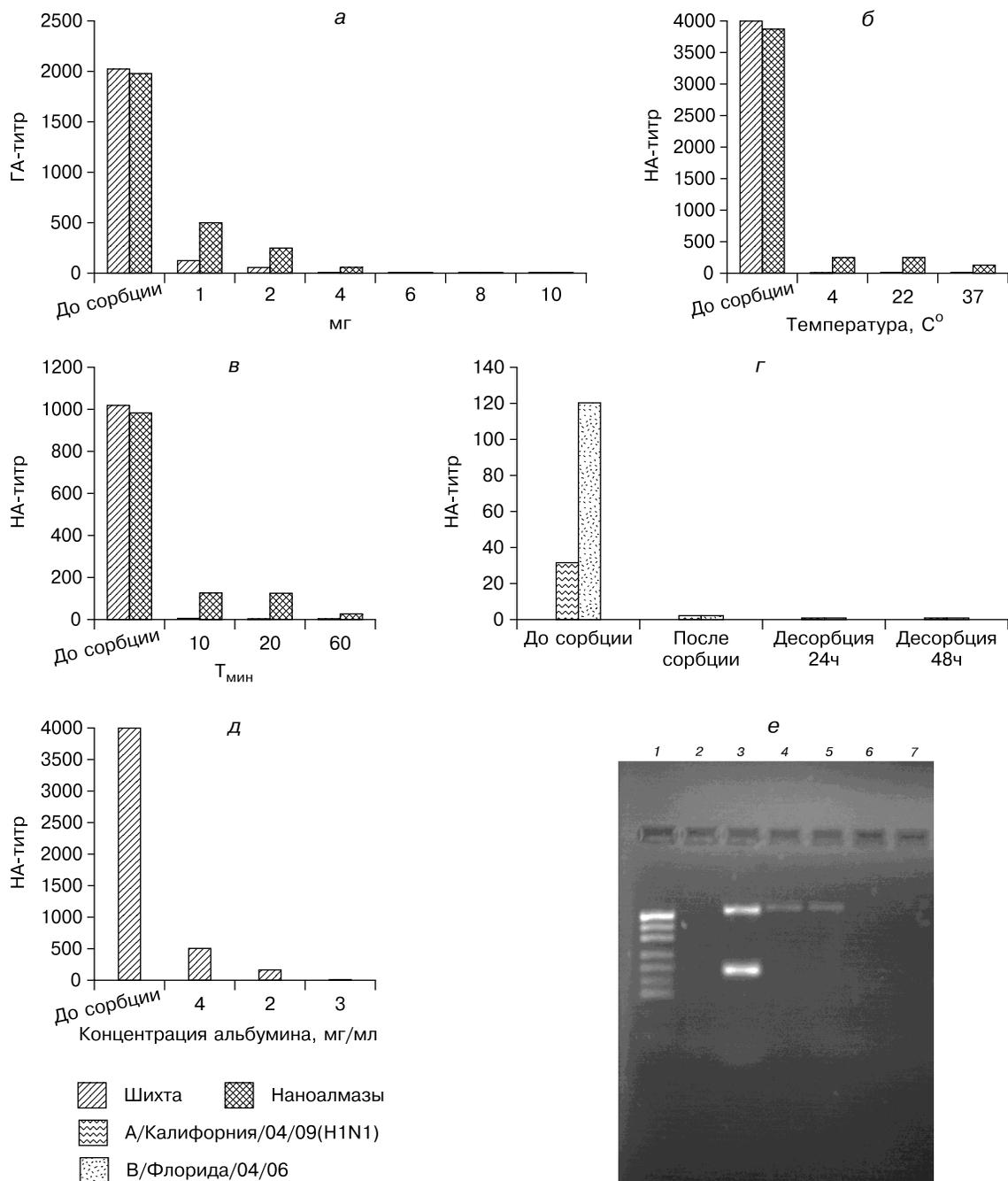


Рис. 1. Сорбция вирусов гриппа А и В и кДНК на наноалмазы и шихту в зависимости от массы сорбентов (а), температуры среды (б), времени контакта вируса с сорбентами (в), концентрации альбумина (д); сорбция и десорбция вирусов в ФР (г); сорбция кДНК (е): дорожки 1 – плазмида РUC 19 (маркер размера фрагментов ДНК), 3 – кДНК до сорбции, 4, 5 – кДНК после сорбции на наноалмазах, 6, 7 – на шихту.

жащей аллантаиной жидкости, разведенной ФР, варьировали от 2 до 8 раз.

Далее проведено исследование зависимости сорбции концентрированных вирусов гриппа А/Перт/16/09 (H3N2) от следующих параметров эксперимента – массы сорбента, времени контакта с сорбентом $T_{мин}$ и температурного режима. Исследование влияния массы (m) сорбентов (шихты и наноалмазов) на эффективности сорбции проводили в диапазоне m от 1 до 10 мг при других постоянных параметрах: времени контакта вируса с сорбентами $T_{мин} = 20$ мин и температуре 22°C (рис. 1, а). Начальные ГА-титры были одинаковы для всех растворов, в которые вносили сорбенты. Исследования показали, что титр вирусов < 2 Га-единиц регистрировали для 4 мг шихты, полное уда-

ление вирусов наноалмазами наступало при их массе 10 мг, т. е. активность шихты превышала активность алмазов при прочих равных условиях в 2,5 раза. Существенные различия поверхностных свойств могут быть обусловлены как различием в величинах удельной поверхности, так и природой этих материалов. Удельная поверхность (S) шихты составляет 450 м²/г, что существенно больше, чем $S = 300$ м²/г для наноалмазов. Кроме того, шихта имеет и некоторые отличия в свойствах поверхностных углеродов. В шихте содержится больше аморфного углерода. При исследовании влияния температуры окружающей среды на взаимодействие вирусов с сорбентами было установлено, что в выбранном диапазоне температур от 4 до 37°C сорбция вирусов практически одинакова

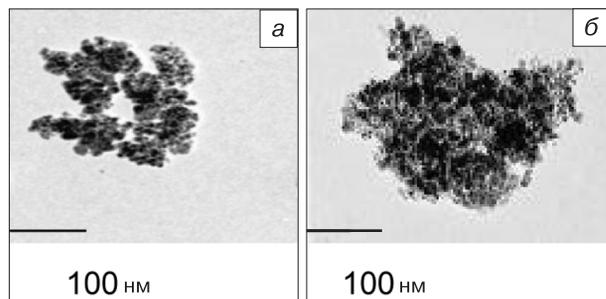


Рис. 2. Электронная микроскопия кластеров нанодiamondов (а), шихты (б).

(рис. 1, б). Результаты исследования влияния времени контакта вирусов с выбранными сорбентами показали, что в случае шихты этот процесс происходит наиболее активно в первые 10 мин контакта, в случае нанодiamondов – от 10 до 20 мин, далее он замедляется (рис. 1, в). Поэтому все исследования проводили при контакте вируса с сорбентами в течение 20 мин. Падение ГА-титра в растворе сопровождалось снижением инфекционного титра. В случае шихты уменьшение составляло 4,5 lg ЭИД₅₀.

Чтобы определить, насколько прочно удерживаются вирусы в составе иммуносорбента (вирус + нанодiamondы), мы провели исследования по десорбции адсорбированных концентрированных вирусов А/Перт/16/09 и аллантаисных вирусов А/Калифорния/04/09 при стандартных условиях. Результаты показали, что десорбция 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 ч не превышал 2 ГА-единиц (рис. 1, г). Далее было проведено изучение сорбции белков невирусной природы: сывороточных белков-иммуноглобулинов и бычьего сывороточного альбумина, которые активно используются в иммунологических исследованиях (рис. 1, д). При исследовании сорбции иммунной сыворотки, содержащей антитела к вирусу гриппа В/Флорида/04/06, на нанодiamondы, титр сыворотки падал с 1280 до < 40 после контактов с нанодiamondами, прошедшими термообработку, и был равен 40 в случае нанодiamondов без обработки. Эти результаты свидетельствуют о том, что оба типа алмазов способны сорбировать вирусспецифические антигриппозные антитела из иммунной сыворотки, разведенной в ФР. Исследования сорбции альбумина и его способности конкурировать за места связывания на сорбенте проводили по следующей схеме. Первый этап включал сорбцию препаратов альбумина в концентрации 1, 2, 4 мг/мл на шихту. Затем комплекс шихта + альбумин массой 2 мг добавляли в растворы, содержащие равное количество вируса, далее выполняли анализ по стандартному методу. Как видно из полученных данных, альбумин в концентрациях 2–4 мг/мл конкурировал с вирусом за места связывания на сорбенте. При концентрации альбумина 1 мг/мл он не мешал связыванию сорбента с вирусами, что приводило к снижению ГА-титра с 4000 до 4 ГА-единиц, т. е. в 1000 раз. Таким образом, показано, что белки невирусной природы – антитела-иммуноглобулины G и бычий сывороточный альбумин – способны взаимодействовать с сорбентами, содержащими нанодiamondы.

Следующим этапом работы были исследования возможности сорбции нуклеиновых кислот на выбранных сорбентах. Ампликоны – фрагменты кДНК вирусов гриппа А (H1N1)_{sw} и вирусов гриппа В – активно взаимодействовали с сорбентами. Двунитчатые фрагменты кДНК размером 190 пар нуклеотидов (п. н.) удалялись из раствора полностью нанодiamondами и шихтой. Если размеры фрагментов кДНК превышали 560 п. н., в случае шихты наблюдалось полное удаление из растворов, а в случае нанодiamondов – частичное (рис. 1, е). Следует отметить, что ранее факт избирательной способности нанодiamondов взаимодействовать с молекулами ДНК описан в работе [10], в которой установлена сорбция линейных молекул ДНК нанодiamondами и ее отсутствие при взаимодействии с кольцевыми молекулами. Нами показано, что в случае двунитчатых молекул ДНК размер линейных фрагментов также важен для сорбции нанодiamondами и не столь критичен для шихты в выбранном диапазоне длин ДНК от 190 до 560 п. н.

Электронно-микроскопические исследования препаратов сорбентов показали, что в суспензиях нанодiamondы и шихта собираются в агрегаты – кластеры различной формы и размеров. Зернистость поверхности более выражена у нанодiamondных кластеров (рис. 2, а, б).

Для практического применения в биологии и медицине важен вопрос, насколько токсичны выбранные материалы. Проведенные нами исследования взвеси нанодiamondов и шихты в концентрациях от 1 до 10⁻⁴ мг/мл на лунку микропланшета с культурой клеток MDCK показали, что в этом диапазоне концентраций сорбентов деформация клеточного монослоя не происходила. Следует отметить, что в исследованиях, ранее проведенных отечественными и зарубежными учеными, отмечено отсутствие токсичности нанодiamondов для клеток и животных [1, 6, 11]. Первые опыты, проведенные нами с шихтой, свидетельствуют об отсутствии у нее токсичных свойств для выбранных клеток, однако для окончательного решения этого вопроса требуются исследования на других типах клеток, а также на лабораторных животных.

Рассматривая в историческом аспекте исследование нанодiamondов, нужно отметить, что после их открытия более 40 лет первый этап был посвящен изучению их физико-химических свойств [4, 7]. В практике нанодiamondы стали компонентами сорбентов смазок, полировочных композитов. В последние годы в мире начали активно проводиться исследования взаимодействия нанодiamondов с биологическими объектами [1, 9–11]. Способность к сорбции нанодiamondами белковых молекул, ферментов с сохранением их каталитической функции является основанием для создания диагностических тест-систем. Важным фактором для использования нанодiamondов в медицине является отсутствие у них токсичных свойств для животных, что позволяет также рассматривать нанодiamondы в качестве носителей для адресной доставки лекарств к раковым клеткам [8, 11]. Отдельным направлением исследования является изучение взаимодействия сорбентов с микроорганизмами. Этому вопросу посвящено лишь ограниченное число публикаций. Установлена способность нанодiamondов

мазов сорбировать клетки *E. coli* [9]. В доступной литературе мы не встретили работ, посвященных взаимодействию наноалмазов с вирусами. Информация о взаимодействии шихты с биологическими объектами также отсутствовала. Полученные в работе приоритетные данные свидетельствуют о том, что наноалмазы, шихта могут взаимодействовать с оболочечными вирусами, представителями которых являются вирусы гриппа. Природа этих взаимодействий обусловлена строением поверхностного слоя наноалмазов и шихты. Эти материалы имеют разную степень чистоты и содержат на поверхности, кроме атомов углерода, различные функциональные группы, включающие атомы кислорода, азота, серы, водорода [4, 7, 11]. Именно они образуют связи с функциональными группами вирионных белков, в случае гриппа, по-видимому, – с аминокислотными группами гемагглютинина. Полученные нами результаты согласуются с физико-химическими свойствами наноалмазов и шихты. Их удельная сорбционная поверхность составляет от 300 до 450 м²/г. Это в 5–6 раз больше, чем для углеродных нанотрубок ($S = 60\text{--}80$ м²/г), которые не имеют примесей на поверхности. Максимальное падение ГА-титров в растворах для концентрированных вирусов гриппа в случае сорбентов, содержащих наноалмазы, достигало 4000 раз и превышало этот максимальный показатель для углеродных трубок, составлявший от 64 до 126 раз [3].

Таким образом, полученные данные расширяют аспекты применения наноалмазных материалов в биологии и медицине. В частности наряду с установленными ранее адсорбционными свойствами углеродсодержащих материалов (графита и углеродных нанотрубок) в отношении вирусов наноалмазы и шихта могут быть использованы в качестве фильтров для деконтаминации растворов от микрорганов.

Работа и публикация научной статьи была поддержана кооперативным соглашением, грант № 1U51|P000527-01 CDC&P, Атланта, США, и грантом Президента РФ МК 882.2011.3.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бондарь В. С., Пузырь А. П., Пуртов К. В. и др. Наноалмазы с оригинальными свойствами: применение в биологии и медицине // Международный форум по нанотехнологиям. – М., 2008. – Т. 2. – С. 90–91.
2. Иванова В. Т., Курочкина Я. Е., Буравцев В. Н. и др. Изучение взаимодействия вирусов гриппа А и В с углеродсодержащим сорбентом // Вопр. вирусол. – 2008. – № 2. – С. 40–43.
3. Иванова В. Т., Курочкина Я. Е., Иванов В. Ф. и др. Сорбция вирусов из растворов на полианилин, углеродные нанотрубки и наноккомпозиты на их основе // Вопр. вирусол. – 2011. – № 4. – С. 19–23.
4. Кулакова Т. М. Химия поверхности наноалмазов // Физика твердого тела. – 2004. – Т. 46, № 4. – С. 621–628.
5. Львов В. К., Бурцева Е. И., Прилипов А. Г. и др. Изоляция 24.05.2009 и депонирование в Государственную коллекцию вирусов (ГКВ 2452 от 24.05.2009) первого штамма A/IV-Moscow/01/2009 (H1N1)sw1, подобного свиному вирусу A(H1N1) от первого выявленного 21.05.2009 больного в Москве // Вопр. вирусол. – 2009. – Т. 54, № 5. – С. 10–14.
6. Пузырь А. П., Бондарь В. С., Селимханова З. Ю. и др. Результаты исследования возможности применения детонационных наноалмазов в качестве сорбента // Сиб. мед. обозр. – 2004. – Т. 2, № 3. – С. 25–28.
7. Спицын Б. В., Алексеенко А. Е., Галушко Т. Б. Функционализация наночастиц детонационного алмаза // Современные проблемы физической химии наноматериалов. – М., 2008. – С. 178–185.
8. Adnan A., Lam R., Chen H. et al. Nanodia atomistic simulation and measurement of pH dependent cancer therapeutic interactions with nanodiamond carrier // Mol. Pharm. – 2011. – Vol. 8, N 2. – P. 368–374.
9. Liu Y. L., Sun K. W. Protein functionalized nanodiamond arrays // Nanoscale Res. Lett. – 2010. – Vol. 5, N 6. – P. 1045–1050.
10. Purov 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. – Vol. 19. – P. 1–3.
11. Schrand A. M., Hens S. A. C., Shenderova O. A. Nanodiamond particles: Properties and perspectives for bioapplications // Crit. Rev. Solid State Material Sci. – 2009. – Vol. 34, N 1–2. – P. 18–19.

Поступила 29. 09.11