

В. ЛИСЕНКО,<sup>1</sup> В. ЛОЗОВСЬКИЙ,<sup>1,2</sup> М. СПІВАК<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Інститут фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова НАН України  
(Просп. Науки, 45, Київ 03028)

<sup>2</sup>Інститут високих технологій Київського національного університету ім. Т. Шевченка  
(Вул. Володимирська, 64, Київ, 01601)

<sup>3</sup>Інститут вірусології та імунології ім. Д. Заболотного НАН України  
(Вул. Заболотного, 154, Київ 13143)

УДК 535.8; 537.2; 539.6;  
578

## НАНОФІЗИКА ТА АНТИВІРУСНА ТЕРАПІЯ<sup>1</sup>

*Запропоновано новий механізм взаємодії вірусів з наночастинками, що ґрунтується на притаманному тільки нанооб'єктам ефекті підсилення локального поля, який може проявлятися у системі наночастинка-вірус. Основною ідеєю запропонованого механізму є розгляд дії завжди притаманного будь-якій фізичній системі поля вакуумних флуктуацій. Цей механізм є універсальним. Він не залежить від деталей структури наночастинки та вірусу, що підтверджують численні експерименти, проведені як авторами роботи, так і іншими науковими групами. Обговорено також новий метод очищення біорідин від нанооб'єктів – наночастинок та вірусів. Метод ґрунтується на вибірковій взаємодії нанооб'єктів з наноструктурованою поверхнею, вздовж якої поширюється поверхневий плазмон-поляритон, або з системою нанониток, що знаходяться в умовах збудження на них локального плазмон-поляритона. На основі запропонованого методу послаблення вірусної активності під дією суспензії наночастинок, розроблено і експериментально перевірено новий ефективний спосіб отримання людського лейкоцитарного інтерферону.*

*Ключові слова:* плазмон-поляритон, система наночастинка-вірус

### 1. Вступ

Сучасна наука про життя стає все більше і більше міждисциплінарною [1–7], і вже не викликає подиву стаття в медичному журналі, присвячена фізичним чи хімічним аспектам проблеми діагностики та лікування хвороб [8], чи стаття в фізичному журналі, присвячена електропровідності ДНК [1, 5] чи фізичним аспектам вірусології [6, 7]. В наш час медицина все частіше звертається до застосування фізичних методів у діагностиці і лікуванні хвороб. Наприклад, відомий ефект поверхневого плазмон-поляритонного резонансу [9–11] з успіхом використовується для діагностики деяких хвороб [12, 13], а дія слабого електромагнітного випромінювання радіочастотного діапазону вже десятки років використовується як один з методів лікування великої кількості хвороб.

Останнім часом з розвитком нанотехнологій зростає зацікавленість медицини і біології в застосу-

ванні наносистем – наночастинок, наноструктурованих поверхонь і т. д. – в медико-біологічних дослідженнях та клінічній практиці. Наприклад, наночастинки використовуються як для діагностики різноманітних хвороб [14–16], вивченні біофізичних процесів у живих організмах [3, 17–19], так і для розвитку нових методів лікування [20–23].

В біомедичних дослідженнях широко застосовуються функціоналізовані напівпровідникові квантові точки як біосенсори, коли напівпровідникова люмінесценція використовується для виявлення локалізації квантових точок у біомедичних структурах [24]. Зокрема, для таких цілей застосовуються функціоналізовані напівпровідникові квантові точки CdS та CdSe/ZnS, поверхня яких покривається пептидами, що побудовані з визначених послідовностей амінокислот [25]. Таким чином, з'являється можливість точно визначати в яких місцях медикобіологічних об'єктів будуть локалізу-

<sup>1</sup> Робота друкується як дискусійна.

ватись наночастинки-маркери. Функціоналізовані квантові точки використовуються для вивчення проходження нервових імпульсів у системі нейронів [17] та як один з методів цілеспрямованої доставки ліків наноконтейнерами.

Як наноконтейнери використовують і твердотільні (переважно металічні) наночастинки, поверхню яких модифіковано з метою приєднання до неї фіксованих доз лікарських засобів [26], і супрамолекулярні структури [27], що геометрично мають порожнини, і вуглецеві нанотрубки та різноманітні фулерени [28]. Всі ці методи передбачають попередню обробку поверхні наночастинок відповідними молекулярними препаратами. Але з протистих фізичних міркувань випливає, що сама наявність наночастинок поблизу мембран клітин, оболонки бактерій та вірусів може приводити до впливів, що сильно змінюють їхні властивості. Зокрема, наявність наночастинок поблизу вірусів може призводити до сильної зміни їх інфекційної активності.

Останніми роками в науковій літературі з'явилися повідомлення про антивірусну дію препаратів наночастинок, що попередньо не були модифіковані специфічними сполуками, які блокують активність вірусів. Наприклад, повідомлялось [29] про антивірусну активність наночастинок діоксиду титану з розмірами  $\sim 4-5$  нм проти вірусу грипу H3N2, суспензію яких додавали у суспензію вірусів. Електронна мікроскопія показала, що вже за 15 хвилин наночастинки налипають на зовнішню оболонку вірусу і викликають її локальні руйнування, що, в свою чергу, призводило до втрати вірусами інфекційної активності.

В роботі [30] повідомлялось про антивірусну активність наночастинок йодиду міді (CuI) досить великих розмірів ( $\sim 160$  нм) проти вірусу грипу типу А (H1N1). Автори роботи стверджують, що антивірусна активність таких частинок пов'язана з генерацією наночастинок гідроксильних радикалів, що блокують акцептори N-ацетилцистеїну. Це, на їх думку, і призводить до зниження інфекційної активності вірусів. Такі повідомлення про антивірусні властивості різноманітних наночастинок наводять на думку про наявність деякого універсального механізму взаємодії між наночастинами та вірусами, що призводить до блокування вірусної активності.

Оскільки антивірусна активність спостерігається для великої різноманітності наночастинок, можна припустити, що в основі такого механі-

зму лежить деякий фізичний механізм, не пов'язаний з хімічною взаємодією. Такий механізм може ґрунтуватися на польовій взаємодії між наночастинами – вірусами та наночастинами. В пропонуваній нами роботі саме і аналізуються методи антивірусної терапії, що ґрунтуються на використанні польових взаємодій наночастинок з вірусами. При цьому запропоновані механізми взаємодії наночастинок та вірусів є універсальними і не вимагають попередньої функціоналізації наночастинок.

## 2. Вірусологія та фізика

Віруси є найменшими інфекційними агентами, що можуть відтворюватися лише всередині живої клітини [32–34]. Зіткнення з вірусами в нашому повсякденному житті відбувається на кожному кроці і часто, завдяки їхній ролі як інфекційних агентів, ці зіткнення завершуються драматично — ми отримуємо неприємності у вигляді захворювань. І зусилля вірусології, як і науки про життя в широкому розумінні, великою мірою направлені на пошуки знешкодження активності вірусів — підвищення імунітету, розвитку нових методів антивірусної терапії. Однак у наш час віруси все більше і більше розглядаються у більш позитивній ролі, як-от нанокаркаси та нанореактори для транспорту та каталізу; в контексті генної терапії вони використовуються як організатори доставки генів, як протибактеріальні засоби (так звані фаги, що інфікують бактерії). В цьому сенсі вивчення фізичних властивостей вірусів, як утворень, що займають проміжну позицію між живими та неживими об'єктами стає актуальною науковою проблемою, розв'язок якої в перспективі може пролити світло на запитання, а що ж таке є життя. Як перший крок у вивченні фізичних властивостей вірусів є дослідження їхніх структурних та механічних особливостей [34], здатність до самоорганізації та ін. Існує велике різноманіття вірусів, що розрізняються способами інфікування, спеціалізацією клітин та органів, що інфікуються, та пов'язаних з цим їхньою геометричною формою (див., наприклад, рис. 5–10 у [31]). Але можна визначити спільну для всіх рису — всі віруси мають в своєму складі білкову оболонку, в багатьох випадках близьку до сферичної форми, всередині якої міститься вірусна нуклеїнова кислота. Така універсальність вірусних структур дає змогу для вивчення їхніх електродинамічних власти-

востей використовувати прості моделі однорідних наночастинок визначеної форми, або частинок з оболонкою.

У цьому контексті важливим є візуалізація вірусів та віральних структур. Оскільки характерні розміри вірусів варіюються від декількох десятків до декількох сотен нанометрів, основним методом мікроскопії вірусів є електронна мікроскопія [35]. Однак електронна мікроскопія характеризується досить високоенергетичним впливом на об'єкт дослідження і може призводити до руйнування вірусних частинок. Таким чином, постає питання про застосування менш руйнівних методів візуалізації. До таких методів, зокрема, можуть відноситись оптичні методи.

Останніми роками розвиток оптики ближнього поля [36, 37] привів до виникнення особливої типу мікроскопії – скануючої мікроскопії ближнього поля [39–41], що ґрунтується на методі розсіяння еванесцентних хвиль і є субхвильовою. Субхвильова оптична мікроскопія з роздільною здатністю порядку десятків нанометрів може розвиватись і на основі розсіяння поверхневих хвиль, що є еванесцентними за своєю суттю. Зокрема, на цій ідеї ґрунтується метод візуалізації наночастинок, що знаходяться поблизу поверхні, вздовж якої поширюється поверхневий плазмон-поляритон [41, 42]. Так, у роботі [42] повідомляється про безмаркерний метод візуалізації, та вимірювання розмірів та маси одиничних вірусних частинок в розчині шляхом мікроскопії, що ґрунтується на ефекті поверхневого плазмон-поляритонного резонансу. В роботі [43] запропоновано просту модель, що дозволяє аналізувати результати експериментів по візуалізації вірусних частинок шляхом розсіяння поверхневих плазмон-поляритонів. У роботі, зокрема, продемонстровано, що на відміну від моделі Мі, яка передбачає залежність інтенсивності зображення наночастинок від її розміру як  $\sim r^6$ , інтенсивність зображення може бути пропорційною першому ступеню розміру частинки, що спостерігалось в експериментах (див., наприклад, [41]). Таким чином, фізичні методи все активніше використовуються в вірусології. З цієї точки зору, пам'ятаючи, що основна задача науки про віруси все ж таки полягає в пошуку оптимальних методів впливу на їх інфекційні властивості з метою створення ефективних лікувальних засобів, треба розглянути особливості взаємодії між вірусами та наночастинками.

### 3. Взаємодія між вірусами та наночастинками

Розміри вірусів становлять від 10 до 500 нм, наприклад, характерні розміри аденовірусів становлять 70–90 нм, розмір ВІЛ становить 100 нм, характерні розміри вірусів простого герпесу 170 нм, а вірусів грипу – до 200 нм. Це означає, що віруси є майже ідеальними об'єктами нанофізики.

Крім того, оскільки вірусні частинки утворені з досить стабільної протеїнової оболонки, всередині якої розташовується носії вірусного геному – вірусна ДНК або РНК, можна сподіватись на досить значні поляризованості (лінійні та нелінійні) вірусу як цілого. Це означає, зокрема, що віруси можуть розглядатись як об'єкти фізики ближнього поля [44]. Якщо поблизу вірусу буде розташовуватись наночастинка з розмірами порядку/меншими за лінійні розміри вірусу, то між вірусом та частинкою може виникнути взаємодія, зумовлена флуктуаційними полями (аналог сил Ван-дер-Ваальса). При цьому, взаємодія вірусу з наночастиною може бути резонансною, тобто може спостерігатись так званий конфігураційний резонанс [46–48], що загалом призведе до аномально ефективного поглинання системою “вірус–наночастинка” енергії зовнішнього випромінювання.

Як можна сподіватись, таке поглинання призведе до незворотних перетворень в системі. Наприклад, можуть зруйнуватись слабкі хімічні зв'язки, що є складовою утворення рецепторів на віральній капсиді. Можуть відбуватись термічні uszkodження вірусу, оскільки система вірус–наночастинка, поглинаючи енергію зовнішнього випромінювання, буде сильно нагріватись. Тобто, опромінення системи зовнішнім світлом може призводити до втрати вірусом своєї інфекційної активності. Але може відбуватись інший механізм знешкодження інфекційної активності вірусу, що зумовлений дією поля вакуумних флуктуацій в системі вірус–наночастинка. Для того щоб краще це зрозуміти, розглянемо систему вірус–наночастинка, показану на рис. 1.

Як показано в роботі [48], взаємодія між наночастинками, що характеризуються достатньо великими значеннями нелінійної поляризованості може приводити до формування потенціалу, що на великих відстанях має характер притягання, а на відстанях порядку розмірів частинок – відштовхування з утворенням достатньо глибокої потенціальної ями (рис. 1). Потенціал має достатньо складний вигляд, але залежність такого потенціалу від

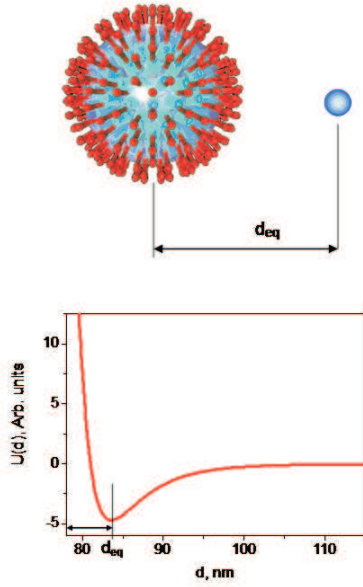


Рис. 1. Схема системи вірус-наночастинка

відстані між частинками можна достатньо просто записати у вигляді

$$U(d) = \sum_{n=2,3} \left[ \frac{A_n}{d^{6n}} - \frac{B_n}{d^{3n}} \right], \quad (1)$$

де  $A_n$  та  $B_n$  – коефіцієнти, які залежать від розмірів, форми та матеріалу частинок.

Причиною формування такого потенціалу є флуктуації електричного поля. Дійсно, в роботі [48] було записано вільну енергію системи частинок з використанням концепції ефективної сприйнятливості і знайдено основний стан, що відповідає виникненню деякого дипольного моменту на обох частинках. Нелінійна взаємодія цих дипольних моментів і призвела до утворення потенціалу (1). Графічно такий потенціал показано на рис. 1.

Характерною особливістю такого потенціалу є те, що його мінімум формується на відстанях порядку розміру частинок. Тобто, у випадку системи вірус-наночастинка, де наночастинка має радіус декілька нанометрів, а вірус – порядку десятків нанометрів, стабільний стан системи утворюється, коли наночастинка розташовується на відстані від вірусної оболонки  $\sim 10$  нм.

Розглянемо систему вірус-наночастинка, коли відстань між частинками становить величину порядку розмірів частинок. Нехай на наночастинку у системі діє флуктуація електричного поля

$E_i^{(0)}(\mathbf{R}_n)$ . Тоді на частинці буде індукуватись дипольний момент:

$$P_i^{(n)}(\mathbf{R}_n) = X_{ij}^{(n)}(\mathbf{R}_n) E_j^{(0)}(\mathbf{R}_n), \quad (2)$$

де  $X_{ij}^{(n)}(\mathbf{R}_n)$  – ефективна сприйнятливість частинки, тобто її електричний відгук на зовнішнє поле [47]. Ця сприйнятливість може бути обчисленою в методі псевдовакуумної функції Гріна [49] і, таким чином, будуть враховані ефекти ближнього поля в системі. Завдяки виникненню дипольного моменту на частинці, на вірусі буде індукуватись електричне поле:

$$E_i^{(v)}(\mathbf{R}_v) = - \int_{V_n} d\mathbf{R}'_n G_{ij}(\mathbf{R}_v, \mathbf{R}'_n) \times X_{ji}^{(n)}(\mathbf{R}'_n) E_j^{(0)}(\mathbf{R}'_n), \quad (3)$$

де  $G_{ij}(\mathbf{R}_v, \mathbf{R}'_n)$  – електродинамічна функція Гріна середовища, куди поміщено систему (наприклад, міжклітинна рідина), а інтегрування ведеться по об'єму наночастинки.

З іншого боку, флуктуація електричного поля  $E_i^{(0)}(\mathbf{R}_v)$  діє і на вірусну частинку. Як результат на вірусі буде індуковано дипольний момент:

$$P_i^{(v)}(\mathbf{R}_v) = X_{ij}^{(v)}(\mathbf{R}_v) E_j^{(0)}(\mathbf{R}_v), \quad (4)$$

де  $X_{ij}^{(v)}(\mathbf{R}_v)$  – ефективна сприйнятливість вірусної частинки.

Для оцінки енергії зовнішнього (відносно системи) флуктуаційного поля, що може поглинути вірусна частинка, запишемо

$$Q = - \frac{i\omega}{4} \frac{1}{V_v} \int_{V_v} d\mathbf{R}'_v \{ P_i^{(v)}(\mathbf{R}'_v), [E_i^{(v)}(\mathbf{R}'_v)]^* - [P_i^{(v)}(\mathbf{R}'_v)]^* E_i^{(v)}(\mathbf{R}'_v) \}, \quad (5)$$

де інтегрування проводиться по об'єму вірусної частинки.

Підстановка у цю формулу виразів (2) та (3) та статистичне усереднення дає

$$Q = \int_{-\infty}^{\infty} \frac{d\omega}{2\pi} \frac{\hbar \Omega_{kl}^{(v)}(\mathbf{R}_v)}{1 - \exp(-\hbar\omega/kT)} \langle E_k^{(0)}(\mathbf{R}_n) E_l^{(0)}(\mathbf{R}_v) \rangle_{\omega}, \quad (6)$$

де

$$\Omega_{kl}^{(v)} = - \frac{i\omega}{4} \frac{1}{V_v} \int_{V_v} d\mathbf{R}'_v \times$$

$$\times \left\{ X_{il}^{(v)}(\mathbf{R}'_v) \left[ \int_{V_n} d\mathbf{R}'_n G_{ij}(\mathbf{R}'_v, \mathbf{R}'_n) X_{jk}^{(n)}(\mathbf{R}'_n) \right]^* - \left[ X_{il}^{(v)}(\mathbf{R}'_v) \right]^* \int_{V_n} d\mathbf{R}'_n G_{ij}(\mathbf{R}'_v, \mathbf{R}'_n) X_{jk}^{(n)}(\mathbf{R}'_n) \right\}. \quad (7)$$

Записуючи формулу (6), ми взяли до уваги, що флуктуаційні поля є дійсними. Корелятор флуктуаційного поля  $\langle E_k^{(0)}(\mathbf{R}_n) E_l^{(0)}(\mathbf{R}_v) \rangle_\omega$  може бути вираженим через функцію Гріна середовища  $G_{ij}(\mathbf{R}_v, \mathbf{R}'_n)$  [50], [51], де розташовано систему:

$$\langle E_i^{(0)}(\mathbf{R}_n) E_j^{(0)}(\mathbf{R}_v) \rangle_\omega = -\frac{\omega^2}{c^2} \text{Im} G_{ij}(\mathbf{R}_v, \mathbf{R}'_n) \text{sign } \omega, \quad (8)$$

де  $\text{sign } \omega = -1$ , якщо  $\omega < 0$ ,  $\text{sign } \omega = 1$ , якщо  $\omega > 0$ , та  $\text{sign } \omega = 0$ , якщо  $\omega = 0$ .

В ближньопольовому наближенні (коли нехтуються процеси запізнення):

$$\langle E_i^{(0)}(\mathbf{R}_n) E_j^{(0)}(\mathbf{R}_v) \rangle_\omega = -\frac{\hbar\omega^2}{c^2} T_{ij}(\mathbf{R}_v - \mathbf{R}_n), \quad (9)$$

$$\omega \ll c/|\mathbf{R}_v - \mathbf{R}_n|,$$

де

$$T_{ij}(\mathbf{R}_v - \mathbf{R}_n) = \frac{3n_i n_j - \delta_{ij}}{|\mathbf{R}_v - \mathbf{R}_n|^3}, \quad (10)$$

$$n = (\mathbf{R}_v - \mathbf{R}_n)/|\mathbf{R}_v - \mathbf{R}_n|.$$

Енергія  $Q$  (див. (5)) може бути достатньою для пошкодження або руйнування молекул-рецепторів на поверхні вірусної оболонки, що різко зменшить патогенність вірусу. Оцінки енергії  $Q$  для вірусної частинки розміром  $\sim 100$  нм та наночастинки розміром  $\sim 10$  нм дають величину від 0,1 до декількох кТ. Це дає надію, що енергії вистачить на знешкодження вірусної активності [52].

Обговоримо більш детально шляхи, за якими може суттєво зменшуватись інфекційна активність вірусу за механізмом, розглянутим вище. Очевидно існують два принципово різні напрямки знешкодження вірусної активності за розглянутим механізмом.

1. Перший не припускає проникнення вірусної частинки всередину живої клітини і може зводитись до такого:

а) завдяки достатньо стабільному утворенню вірус-наночастинка можна вважати, що така система має геометричні характеристики, відмінні

від характеристик вірусу, а оскільки проникність вірусу через клітинну мембрану сильно визначається геометричним фактором, вірус з приєднаною наночастинкою (приєднаними наночастинками) в основному втрачає можливість проникнення всередину клітини і тим самим зменшується його інфекційна активність;

б) як зазначалось вище, завдяки дії локального поля (див. (3)) на рецептори, що знаходяться на поверхні вірусу, молекулярні групи на рецепторах можуть модифікуватись аж до їхнього руйнування. Дійсно, завдяки тому, що тензор ефективної сприйнятливості за умов резонансу (коли його полюсна частина є аномально малою) може набувати досить великих значень, це згідно з формулою (3) приведе до помітного підсилення локального поля на вірусній частинці. Оскільки рецептори вірусу взаємодіють з відповідними утвореннями на клітинній оболонці за принципом комплементарності (взаємодія типу ключ-замок), то будь-яке ушкодження рецептора призводить до унеможливлення проникнення вірусу всередину клітини.

2. Другий шлях знешкодження інфекційної активності вірусу припускає, що частині вірусів і після обробки їх наночастинками вдається проникнути всередину клітини і тим самим інфікувати її. Такий шлях можливий з декількох причин. По-перше, не поблизу всіх вірусів, що проникли в організм (наприклад, на слизову оболонку дихальних шляхів), можуть локалізуватись наночастинки. По-друге, завдяки статистичній природі флуктуаційних взаємодій не на кожній системі вірус-наночастинка може формуватись достатньо сильне локальне поле. Таким чином, вірус, що проник всередину клітини, може розпочати процес самовідтворення завдяки взаємодії вірусної ДНК (РНК) з клітинними органелами.

а) У випадку, якщо вірус попадає всередину клітини без наночастинки, запускаються процеси реплікації вірусної ДНК (РНК) і формування всередині клітини нових вірусів, що виходять через мембрану клітини і можуть інфікувати інші клітини. Але майже всі нові віруси, що виходять з інфікованої клітини, зустрінуться з достатньою кількістю наночастинок і зменшення їхньої активності може відбуватись згідно з механізмами 1, а, б;

б) у випадку, якщо всередину клітини проникає вірус з локалізованою на ньому наночастинкою (наночастинками), дія локального поля (яке має флуктуаційне походження) на систему вірус-

наночастинка знову може реалізуватись за механізмами 1, а, б;

в) існує також можливість блокування наночастинками процесів реплікації вірусної ДНК (РНК) всередині клітини.

Таким чином, можна сподіватись, що взаємодія між наночастинкою та вірусом призведе до сильного зменшення вірусної активності і тим самим може бути використаною у клінічній практиці.

#### 4. Експериментальні дослідження антивірусної дії препаратів наночастинок

Дія наночастинок на віруси вивчалась експериментально на прикладах взаємодії наночастинок  $\text{CeO}_2$  діаметром 2–3 нм та наночастинок золота діаметром від 7 до 70 нм, модифікованих цитрином (для запобігання їхній коагуляції) з вірусами простого герпесу (HIV) та грипу (H1N1). Для визначення мінімальної активної концентрації (МАК) препарату, що являв собою розчин наночастинок  $\text{CeO}_2$  діаметром 2–3 нм тест-вірус у дозі 100ТЦД<sub>50</sub>/0,1 мл (50% – на тканина цитопатична доза) проти вірусу простого герпесу вносили у культуру клітин RK13 і інкубували протягом 1 год за температури 37 °С. Після адсорбції вірусу на клітинах його видаляли і клітини відмивали живильним середовищем, після чого у підтримуюче середовище (RPMI-1640 + 2% фетальної сироватки) вносили препарат  $\text{CeO}_2$  у розведеннях від 1:20 до 1:1280.

Відсутність цитопатогенної дії (ЦПД) вірусу за наявності його в контрольному зразку, а також різниця інфекційного титру в досліді порівняно з контролем вірусу простого герпесу, дозволили виявити МАК препарату. Результати цих дослідів подано в табл. 1.

Таблиця 1. МАК наночастинок  $\text{CeO}_2$  по відношенню до вірусу простого герпесу

Концентрація $\text{CeO}_2$ препарату (мкг/мл)	Титр вірусу, log ID <sub>50</sub>	Інгібуюча активність, log ID <sub>50</sub>
1:20	2,0	4,0
1:40	4,0	2,0
1:80	4,0	2,0
1:160	5,0	1,0
1:320	5,0	1,0
1:640	5,0	1,0
1:1280	5,0	1,0
control	6,0	–

Як відомо, відповідно до методичних рекомендацій [53], речовину або препарат вважають виявляючими антивірусну активність при зниженні рівня репродукції вірусу на 2,0 log ID<sub>50</sub> і більше. Отже, за достатньо великих концентрацій наночастинок у препараті (що відповідає розведенню менше за 1:80) препарат можна вважати активним відносно вірусу простого герпесу.

Аналогічні дослідження проводились для визначення МАК препарату проти вірусу грипу А/ФМ/1/47 (H1N1). Для цього тест-вірус у дозі 100 ТЦД<sub>50</sub>/0,1 мл вносили у культуру клітин MDCK та інкубували протягом 1 год за температури 37 °С. Після адсорбції вірусу його видаляли, і клітини відмивали живильним середовищем 199, після чого у підтримуюче середовище (RPMI-1640 + 2% фетальної сироватки) вносили препарат  $\text{CeO}_2$  у розведеннях від 1:20 до 1:1280.

Відсутність цитопатогенної дії у досліджених культурах, за наявності його у контролях по відношенню до вірусу грипу А/ФМ/1/47 (H1N1) та різниця інфекційних титрів вірусу грипу більше, ніж на 2log ID<sub>50</sub>, дозволило виявити МАК препарату, що як і у попередньому випадку відповідає розведенню 1:80 (див. табл. 2).

Таким чином, було продемонстровано ефективну антивірусну дію наночастинок  $\text{CeO}_2$  проти вірусів принципово різних типів – вірусу простого герпесу та вірусу грипу.

Як згадувалось вище, однією з характерних рис механізму антивірусної дії препаратів наночастинок є ефект підсилення локального поля. Цей ефект, як відомо [55–57] проявляється найбільш дієво для частинок невеликого розміру. Для визначення залежності МАК препарату Au від розмірів наночастинок було проведено визначення МАК

Таблиця 2. МАК наночастинок  $\text{CeO}_2$  по відношенню до вірусу грипу

Концентрація $\text{CeO}_2$ препарату (мкг/мл)	Титр вірусу, log ID <sub>50</sub>	Інгібуюча активність, log ID <sub>50</sub>
1:20	2,0	4,0
1:40	2,0	4,0
1:80	2,0	4,0
1:160	6,0	0
1:320	6,0	0
1:640	6,0	0
1:1280	6,0	0
control	6,0	–

препарату (розчини наночастинок Au з діаметрами від 7 до 70 нм) проти вірусу грипу A/FM/1/47 (H1N1). Для цього як і в попередніх випадках тест-вірус у дозі 100 ТЦД<sub>50</sub>/0,1 мл вносили у культуру клітин MDCK та інкубували протягом 1 год за температури 37 °С. Після адсорбції вірусу його видаляли, і клітини відмивали живильним середовищем 199, після чого у підтримуюче середовище (RPMI1640 + 2% фетальної сироватки) вносили препарат Au у розведеннях від 1:20 до 1:1280. Було отримано, що для частинок невеликого розміру (діаметром до 30 нм) препарати демонструють відсутність цитопатогенної дії у досліджених культурах. При цьому для частинок діаметром 7–10 нм МАК відповідає розведенню 1:80 (табл. 3). Збільшення діаметра частинок до 20 нм приводить до збільшення МАК (відповідає розведенню 1:40). Подальше збільшення розмірів частинок призводило до втрати препаратом антивірусної активності.

Результати цих експериментів, що виконувались *in vitro*, було підсилено вивченням дії наночастинкових препаратів *in vivo* – на живих організмах. А саме, попередньо заражені вірусом простого герпесу миші отримували лікування за допомогою препарату CeO<sub>2</sub> у розведеннях від 1:20 до 1:80. Дія препарату ставала помітною вже через декілька годин після обробки, що підтвердило високу ефективність запропонованого методу.

Експерименти, проведені в нашій науковій групі, та аналіз результатів, отриманих багатьма іншими науковими групами, показали, що схожу картину пригнічення вірусної активності спостерігали для різних типів та розмірів наночастинок. Від металічних – Ag, Au, – до наночастинок діелектриків – CeO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub>, що діяли на різні віруси – як ДНК, так і РНК-містки. Ці результати дозволяють зробити припущення, що у всіх зазначених випадках діє однаковий (універсальний) механізм пригнічення вірусної активності. На нашу думку, на роль такого механізму може претендувати той, що запропонований нами в розділі 3.

### 5. Взаємодія між вірусами та наноструктурованою поверхнею, вздовж якої поширюється поверхневий плазмон-поляритон

Розглянута вище методика антивірусної терапії, що ґрунтується на ефекті підсилення локального поля за взаємодії між вірусом та наночастинкою має суттєвий недолік, пов'язаний з не до кінця ви-

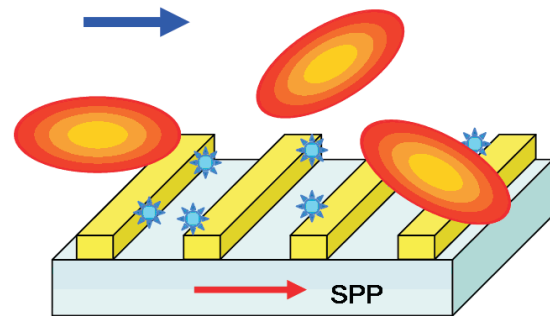


Рис. 2. Схема експерименту по взаємодії вірусів з наноструктурованою поверхнею

вченою дією наночастинок на живий організм [57]. Крім того, завдяки великим розмірам наночастинок (відносно більшості органічних молекул), проблема виведення наночастинок з організму набуває великої ваги. Це означає, що запропонована вище методика або може бути використаною тільки для лікування шкірних хвороб, або потребує додаткового очищення організму від наночастинок. Більше того, розробка методики очищення біологічних рідин від нанооб'єктів, таких як віруси, є актуальною і з точки зору самостійного методу антивірусної терапії. В цьому розділі роботи ми і обговоримо можливість розробки такої методики очищення біологічних рідин від нанооб'єктів, що ґрунтується на ефекті взаємодії наночастинок з наноструктурованою поверхнею, вздовж якої поширюється поверхневий плазмон-поляритон [58].

Розглянемо наноструктуровану поверхню, що складається з наносмужок, розташованих на пло-

Таблиця 3. МАК наночастинок золота різного розміру по відношенню до вірусу грипу H1N1

Концентрація Au препарату (мкг/мл)	Титр вірусу, log ID <sub>50</sub>	Інгібуюча активність, log ID <sub>50</sub>
Наночастинки діаметром 7–10 нм		
1:20	2,0	4,0
1:40	4,0	4,0
1:80	4,0	4,0
1:160	5,0	1,0
Наночастинки діаметром ~20 нм		
1:20	2,0	2,0
1:40	4,0	2,0
1:80	4,0	–
control	6,0	–

ській металічній поверхні. Лінійні розміри наносмужок, нехай, становлять  $\sim 10$  нм, а відстань між ними  $\sim 100$  нм. Таким чином, якщо під такою поверхнею буде поширюватись поверхневий плазмон-поляритон, то вона буде відігравати роль квазіодновимірного фотонного кристала. При цьому, як показують попередні дослідження, поблизу ребер наносмужок локальне поле може досягати досить великих значень [59, 60]. Якщо припустити, що над такою поверхнею протікає біологічна рідина, наприклад, кров, яка складається з достатньо великих (порядку декількох мікрон) органел і розчинених наночастинок (вірусів, розміри яких менші за період структури, або наночастинок, що використовувались для антивірусної терапії), то завдяки своїм невеликим розмірам нанооб'єкти будуть ефективно взаємодіяти з областями поверхні з розмірами порядку розмірів поверхневих наноструктур, що характеризуються великими значеннями локального поля, тобто адсорбуватись на ній (рис. 2).

В той самий час великі органели, що взаємодіють з поверхнею набагато слабкіше, можуть змиватись потоком рідини. Як показано в роботі [61], електродинамічні властивості наноструктурованої поверхні з регулярним розташуванням наносмужок можна описувати за допомогою функції Гріна:

$$I_{lk}(\mathbf{k}, z, z', \omega) = L_{lj}(\mathbf{k}, \mathbf{k} \pm \mathbf{G}, z, \omega) \times G_{jk}^{(0)}(\mathbf{k}, d, z', \omega), \quad (11)$$

де  $G_{jk}^{(0)}(\mathbf{k}, d, z', \omega)$  – електродинамічна функція Гріна верхнього середовища (біологічної рідини),  $L_{lj}(\mathbf{k}, \mathbf{k} \pm \mathbf{G}, z, \omega)$  – фактор локального поля [49]. Фактор локального поля у наближенні двох брегівських площин має загальний вигляд

$$L_{lj}(\mathbf{k}, \mathbf{k} \pm \mathbf{G}, z, \omega) = \Omega_{lj}^{-1}(\mathbf{k}, \mathbf{k} \pm \mathbf{G}, z, \omega), \quad (12)$$

де  $\mathbf{G}$  – найменший вектор оберненої ґратки одновимірного фотонного кристала. Тензор  $\Omega_{lj}(\mathbf{k}, \mathbf{k} \pm \mathbf{G}, z, \omega)$  може бути просто обчислений. Його компоненти виражаються через ефективну сприйнятливість одниничної наносмужки на поверхні, яка описується за допомогою електродинамічної функції Гріна  $G_{ij}(\mathbf{k}, z, z', \omega)$ .

Оскільки функція Гріна  $G_{ij}(\mathbf{k}, z, z', \omega)$  описує електродинамічні властивості підкладки без наносмужок, для оцінок можна використати функцію

Гріна двох напівпросторів з плоскою межею поділу [62, 63].

Припустимо тепер, що на поверхню адсорбується наночастинка, розміри якої є співрозмірними або меншими за період регулярної структури на поверхні. Як показано у роботах [51, 52], у випадку адсорбції квазіточкової частинки потенціал взаємодії між частинкою та поверхнею (його аттрактивна частина) визначається через ефективну сприйнятливість  $\chi_{ij}^{(p)}(\omega)$  та електродинамічну функцію Гріна поверхні  $I_{ji}(\mathbf{k}, l, l, \omega)$ :

$$U(l) = -\frac{\hbar}{4\pi^2} \int_0^\infty \text{Im} \left[ \chi_{ij}^{(p)}(\omega) \times \int I_{ji}(\mathbf{k}, l, l, \omega) d\mathbf{k} \right] \coth \frac{\hbar\omega}{2kT} d\omega. \quad (13)$$

Тут через  $l$  позначена відстань від наночастинки до поверхні. З формули (13), зокрема, можна побачити, що величина потенціалу тим більша, чим більшою є величина  $\text{Im}[\chi_{ij}^{(p)}(\omega) \int I_{ji}(\mathbf{k}, l, l, \omega) d\mathbf{k}]$ . Оскільки функція Гріна  $I_{ji}(\mathbf{k}, l, l, \omega)$  у своїй структурі має обернену матрицю  $\Omega_{lj}^{-1}(\mathbf{k}, \mathbf{k} \pm \mathbf{G}, z, \omega)$  (див. формулу (12)), то її знаменник має вигляд детермінанта цієї матриці. З іншого боку, як відомо [64], занулення реальної частини полюсної частини функції Гріна визначає закон дисперсії поверхневого плазмон-поляритона в наноструктурованій підкладці:

$$\text{Re} [\det \Omega_{ji}(\mathbf{k}, \mathbf{k} + \mathbf{G}, z, \omega)] = 0. \quad (14)$$

Тобто, найбільше значення потенціалу адсорбції (13) реалізується у випадку, коли у підкладці збуджується поверхневий плазмон-поляритон. Крім того, еванесцентне поле поверхневого плазмон-поляритона є сильно неоднорідним, де великі його значення спостерігаються поблизу граней наносмужок. Це означає, що можна вважати, що наночастинки, чий розмір є порядку розмірів доменів великих значень локального поля поверхневого плазмон-поляритона, будуть ефективно адсорбуватись на поверхню саме в цих областях. Таким чином, простий аналіз формули (13) дає можливість запропонувати новий метод антивірусної терапії, та метод очищення біологічних рідин від наночастинок, що полягає у вибірковій адсорбції наночастинок, розміри яких, з одного боку, є меншими за період наноструктури на поверхні, а, з іншого боку – становлять порядок розмірів областей сильного еванесцентного поля.



Як видно з формули (13), величину взаємодії наночастинки з поверхнею визначає також ефективна сприйнятливості наночастинки  $\chi_{ij}^{(p)}(\omega)$ . Оскільки лінійний відгук на зовнішнє поле крім всього формується і взаємодією частинки з оточенням [47], то ефективна сприйнятливості також залежить від структури поверхні, поблизу якої локалізована частинка. Це означає, що вибір геометрії наноструктур на поверхні може приводити до підвищення значень  $\chi_{ij}^{(p)}(\omega)$ , що автоматично означає підсилення взаємодії частинка–поверхня. Таким чином, адекватні моделі обчислення ефективної сприйнятливості можуть крім розуміння деталей взаємодії дати цілком конкретні рекомендації до приготування поверхонь, що ефективно адсорбують конкретну наночастинку.

З фізичної точки зору визначення ефективної сприйнятливості частинки також передбачає урахування взаємодії між частинкою та поверхнею. Дійсно, оскільки фізичний зміст ефективної сприйнятливості – лінійний відгук частинки на зовнішнє відносно неї поле [47], то визначення  $\chi_{ij}^{(p)}(\omega)$  повинно відбуватись з урахуванням як ефектів самодії через оточуюче середовище, так і ефектів самодії через взаємодію частинки з поверхнею (див. рис. 3). В нульовому наближенні ефективну сприйнятливості можна обчислити вважаючи, що частинка взаємодіє з плоскою ідеальною поверхнею. При цьому можна знехтувати неоднорідністю розподілу локального поля всередині частинки. Така модель широко використовується при обчисленні розсіяння поверхневої хвилі наночастинками, що мають форму еліпсоїда обертання [65]. У рамках цієї моделі обчислення ефективної сприйнятливості наночастинок  $\chi_{ij}^{(p)}(\omega)$  можуть крім розуміння деталей взаємодії дати цілком конкретні рекомендації до приготування поверхонь, що ефективно адсорбують конкретну наночастинку. Зрозуміло, що така модель обчислення ефективної сприйнятливості окремої наночастинки є обмеженою. Вона не враховує неоднорідність поля всередині частинки і, головне, не враховує просторову структуру підкладки. Ці обмеження можна частково зняти, використавши для визначення підхід, запропонований в роботі [47], де для ефективної сприйнятливості отримано вираз:

$$\chi_{ij}^{(p)}(\mathbf{R}, \omega) = \chi(\omega) \left[ \delta_{ji} + k_0^2 \int_{V_p} I_{ji}(\mathbf{R}, \mathbf{R}', \omega) \chi(\omega) d\mathbf{R}' \right]^{-1}. \quad (15)$$

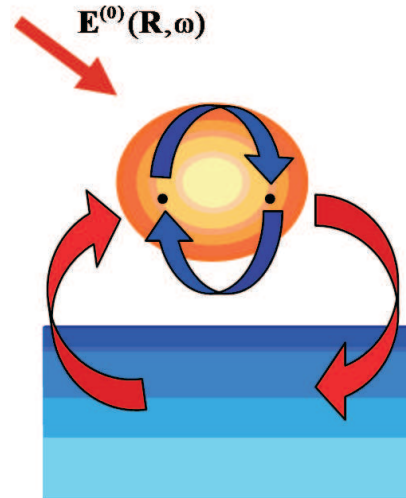


Рис. 3. До визначення ефективної сприйнятливості частинки

Навіть побіжний аналіз формули (15) показує, що запропонована модель враховує як неоднорідність локального поля в наночастинці, так і наявність наноструктури на поверхні. Але обчислення ефективної сприйнятливості у моделі (15) є досить складною справою, що, в першу чергу, пов'язано з обчисленням інтеграла у точках, де  $\mathbf{R}$  та  $\mathbf{R}'$  збігаються. Як відомо [66], існують регулярні методи обчислення таких інтегралів, тому обчислення ефективної сприйнятливості (15) не є проблемою.

З іншого боку, таке обчислення може дати важливу інформацію про структуру поверхні, яку треба приготувати для конкретних типів наночастинок.

Треба зауважити, що до цього часу немає задовільної теорії адсорбції неточкових об'єктів на поверхню твердого тіла. Це означає, що використання формули (13) для оцінки енергії зв'язку частинки з поверхнею і тим самим оцінки ефективності запропонованого в цьому розділі методу є єдино можливим на сьогоднішній день. Але ми сподіваємось, що підхід, розвинутий авторами для знаходження потенціалу взаємодії частинки, що нелінійно поляризується [48] може бути використаним також і для побудови теорії адсорбції неточкових об'єктів на поверхню твердого тіла.

Запропонований метод очищення біологічних рідин тим не менш має суттєвий недолік. Справа в тому, що як показують численні результати, отримані в попередніх експериментах, що проводились в нашій групі, в наноструктурованих страйпл-структурах ефект підсилення локального

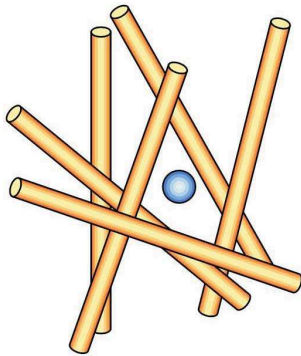


Рис. 4. Схема експерименту по взаємодії наночастинки з системою нанониток

поля може сильно екрануватись безпосередньо біля поверхні. Але в цьому випадку завдяки ефекту, що є аналогом ефекту Талбота [67] в оптиці, на досить великих відстанях від поверхні можуть формуватись регулярні структури сильного поля, де, як ми бачили з формул (13) та (1), можуть формуватись мінімуми потенціалу взаємодії наночастинки (або мезочастинки – органел) з полем. У результаті ці частинки (від яких треба очистити рідину) збираються в областях сильного поля, і до тих пір, поки на поверхні збуджується поверхневий плазмон-поляритон, лишаються сконцентрованими в цих областях. Далі можна вимкнути прокачку речовини через систему, вимкнути лазер, що збуджує поверхневий плазмон-поляритон і злити сильно забруднений наночастинками залишок рідини. Після цього цикл очищення можна повторювати потрібну кількість разів.

## 6. Очищення біологічних рідин, на основі локального плазмонного резонансу

Додатково до запропонованого вище методу очищення біологічних рідин (наприклад, крові або плазми крові), що ґрунтується на ефекті підсилення локального поля поблизу нанонеоднорідностей на поверхні металу, коли під його поверхнею поширюється поверхневий плазмон-поляритон, можна запропонувати ідею методу очищення біорідин на основі ефекту локалізованого плазмонного резонансу в наносистемах.

Розглянемо систему, що складається з нанониток, середня відстань між якими достатня для майже вільного проходження через систему органел крові (або плазми), тобто середня відстань між якими становить порядку декількох мікрон (див. рис. 4). Так само як і в попередньому випадку, можемо написати атрактивну частину потенціалу

взаємодії між наночастинкою та окремою нанониткою системи у вигляді

$$U(l) = -\frac{\hbar}{4\pi^2} \int_0^\infty \text{Im} \left[ \int_{V_n} d\mathbf{R} \int_{V_p} d\mathbf{R}' \times \right. \\ \left. \times X_{ij}^{(n-p)}(\mathbf{R}', \omega) I_{ji}(\mathbf{R}, \mathbf{R}', \omega) \right] \coth \frac{\hbar\omega}{2kT} d\omega, \quad (16)$$

де  $l$  – відстань між наночастинкою та нанониткою, ( $l = |R_p - R_n|$ , де  $R_p$  – положення центра наночастинки, а  $R_n$  – координата найближчої до наночастинки точки на осі нанонитки),  $I_{ji}(\mathbf{R}, \mathbf{R}', \omega)$  – електродинамічна функція Гріна системи нанониток, що може бути обчисленою, наприклад, в методі псевдовакуумної функції Гріна. Інтегрування проводиться по об'єму нанонитки ( $V_n$ ) та наночастинки ( $V_p$ ). Ефективна сприйнятливість наночастинки  $X_{ij}^{(n-p)}(\mathbf{R}', \omega)$  може бути обчисленою одним з методів, що обговорювались вище. Як і в попередньому випадку можемо стверджувати, що оскільки полюсна частина функції Гріна  $I_{ji}(\mathbf{R}, \mathbf{R}', \omega)$  описує плазмонні резонанси в системі нанониток (ці резонанси, очевидно, є локалізованими плазмонами), то можна створити такі умови (підбравши, наприклад, потрібні параметри зовнішнього випромінювання), коли ця полюсна частина буде мінімальною. Це означає, що можна контрольовано підсилити потенціал взаємодії між частинкою та нанониткою до потрібної величини. А оскільки така взаємодія для наночастинки буде суттєво вищою, ніж для мезочастинки, для якої локальні поля від багатьох нанониток будуть екранувати одне одного, то виникає ідея контрольованої адсорбції наночастинки в системі нанониток. Ця контрольована адсорбція і може бути використана для очищення біорідини від наночастинки.

## 7. Підвищення ефективності синтезу людського інтерферону за дії препаратів наночастинок

Як відомо, на вторгнення чужерідних агентів, таких як, наприклад, віруси або ракові білки, клітинами організмів більшості хребтових виділяється спеціальний білок – інтерферон. Завдяки наявності в організмі інтерферонів його клітини стають несприйнятливими по відношенню до цих агентів. Таким чином, продукування клітинами інтерферонів на наявність ворожих агентів можна вважати реакцією, аналогічну реакції на вакцинацію.

Таблиця 4. Титри інтерферону за додавання ВХН та наночастинок  $\text{CeO}_2$ 

№ п/п	Препарат	Титр інтерферону, МО/мл					
		Серія дослідів					
		1	2	3	4	5	6
1	Рівень інтерферону у вихідній суспензії лейкоцитів	100	100	0	0	100	0
2	Рівень інтерферону після додавання тільки суспензії $\text{CeO}_2$	100	100	0	0	100	0
3	Рівень інтерферону після додавання тільки суспензії ВХН	800	800	800	1600	1600	400
4	Наночастинок $\text{CeO}_2$ вносили одночасно з ВХН	1600	1600	1600	3200	3200	800
5	Наночастинок $\text{CeO}_2$ вносили через 2 години після ВХН	1600	3200	6400	12800	12800	800
6	Наночастинок $\text{CeO}_2$ вносили через 4 години після ВХН	3200	6400	6400	12800	12800	1600

Для продукування інтерферонів у сучасній фармацевтиці існує велика кількість способів (див., наприклад, [68–71]). Одним з методів отримання людського лейкоцитарного інтерферону є метод, згідно з яким вірус-індуктор виготовляють шляхом культивування штаму “Н” вірусу хвороби Ньюкасла (ВХН) у 9–10 денних курячих ембріонах. Інфікуюча доза вірусу, що становить 104 ЦПД 50/мл (цитоплазматична доза вірусу, яка викликає пошкодження або загибель 50% інфікованої культури), вводиться в алантоїсну порожнину ембріона шприцом з дотримання умов стерильності. Потім ембріони інкубують протягом 48 годин за температури  $37 \pm 0,5$  °С. Після інкубування ембріони охолоджують за температури 4 °С і відкачують алантоїсну рідину, яка використовується як вірус-індуктор інтерферону. Лейкоцити суспендують у живильному середовищі за температури  $37 \pm 0,5$  °С, додають вірус-індуктор та інкубують за температури  $30 \pm 0,5$  °С. Після цього відділяють вірус-індуктор, а до осаду лейкоцитів додають живильне середовище і суспензію витримують при  $37 \pm 0,5$  °С протягом 18–20 годин. Синтезований таким чином і накопичений у живильному середовищі інтерферон має противірусну активність 800–1000 МО (міжнародних одиниць) в 1 мл препарату.

Цей спосіб отримання інтерферону можна суттєво покращити, якщо для індукції використовувати алантоїсний ВХН, попередньо очищений та концентрований методом ультрафільтрації на мембранах з розміром пор 0,1–0,45 мкм. Противірусна активність отриманого у такий спосіб інтерферону становить 8000–10000 МО/мл.

Як видно, ці способи отримання інтерферону є досить складними технологічно і, крім того, зниження цитоплазматичної дії вірусу-індуктора та

підвищення виходу інтерферону досягається через досить складну та витратну послідовність технологічних операцій.

Пам'ятаючи, що наночастинок завдяки взаємодії з вірусами через флуктуації вакуумних полів можуть утворювати з вірусами стійкі системи, завдяки чому інфекційна активність вірусів може сильно пригнічуватись, можна запропонувати на цій основі новий метод синтезу інтерферону. Таким чином, новий метод, який характеризувався би підвищенням виходу інтерферону за спрощеною процедурою за зниження цитопатичної дії вірусу-індуктора після початку продукції інтерферону міг би складатися з таких технологічних етапів:

- виділення людських лейкоцитів та їх суспендування у живильному середовищі;
- індукція алантоїсним вірусом хвороби Ньюкасла;
- інактивація вірусу-індуктора;
- додавання через деякий час ( $\sim 2$ –4 години) після введення у суспензію лейкоцитів розчину алантоїсного вірусу хвороби Ньюкасла наночастинок речовини з числа тих, що мають мінімальний токсичний вплив на клітини живого організму.

Як виявилось, цей спосіб дозволяє отримати інтерферон зі стабільним значенням титру противірусної активності 11000–14000 МО/мл та знизити відсоток загибелі клітин, що продукують інтерферон, до 25%.

Експериментально цей спосіб було перевірено шляхом визначення здатності наночастинок діоксиду церію впливати на продукцію інтерферону *in vitro* в культурі периферичної крові донорів. А саме: до 3 млн лейкоцитів крові додавали еталонний індуктор інтерферону – ВХН – та інкубували за 37 °С протягом 24 годин. Тобто, біосинтез інтер-

ферону проходив одночасно з індукцією без зміни живильного середовища.

Через 24 години надосадову рідину збирали, доводили її рН до 2,0 та залишали при 4 °С протягом 48 годин. Потім рН рідини відновлювали до 7,2 та визначали рівень інтерферону за стандартним методом пригнічення цитопатичної дії вірусу-індикатора (вірус везикулярного стоматиту, штабм Індіана) у перещеплюваній культурі М19 або L41, в культуральному середовищі RPMI-1640 з 10% фетальної сироватки (Sigma), як описано в роботі [72]. Для цього культуру клітин обробляли відповідними розведеннями ІФН-вмісної рідини у 96-лункових планшетах (Costar, USA). Через 18 годин інкубації при температурі 37 °С в присутності 5% CO<sub>2</sub> культурну рідину видаляли, клітини одноразово промивали розчином Хенкса, та заражали вірусом везикулярного стоматиту (штабм Індіана, ВВС) з множинністю інфекції 100 ЦПД 50/мл. Після інкубації при 37 °С клітини відмивали розчином Хенкса і додавали свіже живильне середовище. Результати визначали через 24–48 годин, коли в контрольному дослідженні з внесеним ВХН відбувалася повна дегенерація клітин, при незмінному моношарі в контрольних лунках культури клітин. За титр інтерферону приймали число, зворотне розведенню препарату, за якого культура клітин в 50% лунок була повністю захищена від патогенної дії індикаторного вірусу.

Під час вивчення впливу нанокристалічного діоксиду церію використовували наночастинки CeO<sub>2</sub> розміром 2–3 нм з вихідною концентрацією 0,1 моль/літр. При цьому слід зауважити, що умови дослідження з застосуванням наночастинок CeO<sub>2</sub> були такими: перша група – наночастинки CeO<sub>2</sub> вносили одночасно з ВХН; друга група – наночастинки CeO<sub>2</sub> вносили через 2 та 4 години після внесення вірусу-індуктора ВХН. Було проведено 6 серій дослідів. Одержані результати наведено у табл. 4.

З табл. 4 видно, що коли суспензію наночастинок додавати через 2 або 4 години після інфікування лейкоцитарної суспензії вірусом хвороби Ньюкасла, максимальний титр інтерферону сягав 12800 МО/мл, що у 8 разів вище, ніж у контрольному дослідженні без додавання наночастинок (1600 МО/мл), та у 4 рази (3200 МО/мл) вище, ніж у випадку додавання суспензії наночастинок одночасно з інфікуванням лейкоцитів ВХН. При цьому рівень інтерферону (800–1600 МО/мл) після додавання тільки суспензії ВХН

відповідає рівню інтерферону, отриманого стандартним способом [68]. Внесення наночастинок CeO<sub>2</sub> одночасно з ВХН подвоює вихід інтерферону, а внесення наночастинок після 2-х або 4-х годин після внесення ВХН дає вихід інтерферону у 4 або у 8 разів вищий, ніж за стандартним способом.

Таким чином, наші експерименти підтвердили ідею збільшення ефективності продукування інтерферону за використання суспензії наночастинок шляхом послідовного додавання у суспензію лейкоцитів по чергово спочатку суспензії вірусу, а потім з затримкою 2–4 години – суспензії наночастинок.

## 8. Висновки

В цьому невеликому огляді ми сподівались познайомити широку наукову громадськість України з роботами по використанню ідей та останніх розробок фізики наносистем в антивірусній терапії, що розгорнуті в Інституті фізики напівпровідників ім. В. Лашкарьова НАН України, Інституті мікробіології і вірусології ім. Д. Заболотного НАН України, та Інституті високих технологій Київського національного університету ім. Т. Шевченка [49, 53, 59, 77].

Основна ідея роботи полягає у використанні притаманного тільки нанооб'єктам ефекту підсилення локального поля, що може проявлятися у системі наночастинка–вірус. При цьому автори вперше запропонували для описання впливу на вірус з боку наночастинок механізм, що ґрунтується не на дії зовнішнього випромінювання, яке направляється на систему, а на дії завжди притаманного будь-якій фізичній системі поля вакуумних флуктуацій. Запропонований механізм є універсальним. Він не залежить від деталей структури наночастинок та вірусу, що підтверджують численні експерименти, проведені як авторами роботи, так і іншими науковими групами (див., наприклад, посилання [29, 30]) для вірусів різної природи і будови. Запропонована ідея розвинута також для використання наноструктурованої поверхні, вздовж якої поширюється поверхневий плазмон-поляритон або системи нанониток у стані збудження локального плазмон-поляритона для очищення біологічних рідин від вірусів та наночастинок. Крім того, було виявлено, що обробка суспензією наночастинок (шляхом послідовного додавання у суспензію лейкоцитів по чергово спочатку суспензії вірусу, а потім з затримкою 2–4 години – суспензії

наночастинок) суспензії лейкоцитів істотно збільшує ефективність продукування клітинами інтерферону.

Необхідно зауважити також, що системи, які розглядаються в роботі, є колоїдними розчинами. Як відомо [73, 74], в таких системах спостерігається ефект підвищення  $\zeta$ -потенціалу. Характерні розміри локалізації  $\zeta$ -потенціалу поблизу поверхні наночастинок обмежені дебаєвською довжиною екранування і становлять  $\sim 1$  нм. Характерні розміри частинок системи, що розглядаються в цій роботі, становлять порядку 10–100 нм. Тобто, вплив  $\zeta$ -потенціалу на електродинамічні властивості системи є малим. В основному цей вплив зводиться до наявності у наночастинок оболонки, що утворюється подвійним шаром іонів поблизу поверхні частинок. Це означає, що для врахування впливу  $\zeta$ -потенціалу треба розглядати частинки як такі, що мають оболонку. Наявність оболонки у частинок, зокрема, може призвести до зміни величини ефективної сприйнятливості. Тобто, обчислення ефективної сприйнятливості частинок треба проводити з урахуванням наявності у них тонкої оболонки [75, 76].

Автори виражають щире подяку своїм колегам та співробітникам, що брали участь в різних етапах цієї роботи та підготовки статті – Н. Жолобак, В. П'ятниць, О. Радченку, Л. Рибалко, В. Стерлігову та О. Щербакову.

1. H.-W. Fink and Ch. Schönberger, *Nature* **398**, 407 (1999).
2. D. Porath, A. Bezryadin, S. de Vries, and C. Dekker, *Nature* **403**, 635 (2000).
3. O.V. Salata, *J. Nanobiotechnol.* **2**, 3 (2004).
4. H.-E. Schaefer, *Nanoscience. The Science of the Small in Physics, Engineering, Chemistry, Biology and Medicine* (Springer, Berlin, 2010).
5. Yu.A. Berlin, A.L. Burin, and M.A. Ratner, *Superlattices Microstruct.* **28**, 241 (2000).
6. S. Brasselet, *Adv. Opt. Photon.* **3**, 205 (2011).
7. J.P. Jagtap, T.H. Jadhav, and D. Utpal, *Scient. J. Crop. Sci.* **1**, 9 (2012).
8. T.A. Delchar, *Physics in Medical Diagnostics* (Springer, Berlin, 1997).
9. *Поверхностные поляритоны*, под ред. В.М. Аграновича и Д.Л. Милса (Наука, Москва, 1985), 525 с.
10. J. Davies, *Nanobiology* **3**, 5 (1994).
11. J. Homola, *Anal. Bioanal. Chem.* **377**, 528 (2003).
12. N.F. Starodub, T.L. Dibrova, Yu.M. Shyrshov, and K.V. Kostyukevich, *Ukr. Biokim. Zh.* **71**, 33 (1999).
13. *Optical Sensors. Industrial Environmental and Diagnostic Applications*, edited by R. Narayanaswamy and O.S. Wolfbeis (Springer, Berlin, 2004).
14. B. Della Ventura, L. Schiavo, C. Altucci, R. Esposito, and R. Velotta, *Biomed. Opt. Express* **2**, 3223 (2011).
15. C. Chen, J. Peng, H. Xia, Q. Wu, L. Zeng, H. Xu, H. Tang, Z. Zhang, X. Zhu, D. Pang, and Y. Li, *Nanotechnology* **21**, 095101 (2010).
16. C.-C. Youa, A. Chomposora, and V.M. Rotello, *Nano Today* **2**, 34 (2007).
17. G.A. Silva, *Nature Reviews Neuroscience* **7**, 65 (2006).
18. D.A. Giljohann, D.S. Seferos, W.L. Daniel, M.D. Massich, P.C. Patel, and C.A. Mirkin, *Angew. Chem.* **49**, 3280 (2010).
19. *Nanoparticles in Biology and Medicine*, edited by M. Soloviev (Humana Press, New York, 2012).
20. L. Zhang, F.X. Gu, J.M. Chan, A.Z. Wang, R.S. Langer, and O.C. Farokhzad, *Clin. Pharmacol. Ther.* **83**, 761 (2008).
21. M. Singh, S. Singh, S. Prasad, and I.S. Gamhir, *Digest J. Nanomater. Biostruct.* **3**, 115 (2008).
22. J.M. Provenzale and G.A. Silva, *Am. J. Neuroradiol.* **30**, 1293 (2009).
23. A.Z. Wang, F. Gu, L. Zhang, J.M. Chan, A. Radovich-Moreno, M.R. Shaikh, and O.C. Farokhzad, *Expert Opin. Biol. Ther.* **8**, 1063 (2008).
24. I.L. Medintz, H.T. Uyeda, E.R. Goldman, and H. Mattoussi, *Nature Mater.* **4**, 435 (2005).
25. B.H. Bairamov, V.V. Toporov, F.B. Bayramov, M. Petukhov, E. Glazunov, A.B. Shchegolev, Y. Li, D. Ramadurai, P. Shi, M. Dutta, M.A. Stroschio, and G. Irmer, *Mol. J. Phys. Sci.* **5**, 320 (2006).
26. W.H. De Jong and P.J.A. Borm, *Int. J. Nanomed.* **3**, 133 (2008).
27. J. Li, X. Ni, and K.W. Leong, *J. Biomed. Mater. Res. A* **65**, 196 (2003).
28. A. Blanco, K. Kostarelos, and M. Prato, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **9**, 674 (2005).
29. N.A. Mazurkova, Y.E. Spitsyna, N.V. Shikina, Z.R. Ismagilov, S.N. Zagrebel'nyi, and E.I. Ryabchikova, *Russ. Nanotekhnol.* **5**, 417 (2010).
30. Y. Fujimori, T. Sato, T. Hayata, T. Nagao, M. Nakayama, T. Nakayama, R. Sugamata, and K. Suzuki, *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 951 (2012).
31. І.О. Шмараків, М.М. Марченко, М.Я. Співак, *Основи вірусології* (Чернівецький національний університет, Чернівці, 2011), 319 с.
32. E.V. Koonin, T.G. Senkevich, and V.V. Dolja, *Biol. Direct.* **1**, 29 (2006).
33. S.J. Flint, I.W. Enquist, R.M. Krug, V.R. Racaniello, and A.M. Skalka, *Principles of Virology. Molecular biology, Pathogenetics, and Control* (ASM Press, Washington, DC, 1999).

34. W.H. Roos, R. Bruinsma, and G.J.L. Wuite, *Nature Phys.* **6**, 733 (2010).
35. P. Wild, *Meth. Cell Biol.* **88**, 497 (2008).
36. Ch. Girard and A. Dereux, *Rep. Prog. Phys.* **59**, 657 (1999).
37. A. Lewis, H. Taha, A. Strinkovski, A. Manevich, A. Khatchatourians, R. Dekhter, and E. Ammanann, *Nature Biotech.* **21**, 1378 (2003).
38. E. Betzig, A. Lewis, A. Harootunian, M. Isaacson, and E. Krarschmer, *Biophys. J.* **49**, 269 (1986).
39. B. Hecht, B. Sick, U.P. Wild, V. Deckert, R. Zenobi, O.J.F. Martin, and D.W. Pohl, *J. Chem. Phys.* **112**, 7761 (2000).
40. V.Z. Lozovski, J. Beermann, and S.I. Bozhevolnyi, *Phys. Rev. B* **75**, 045438 (2007).
41. A. Zybin, Y.A. Kuritsyn, E.L. Gurevich, V.V. Temchura, K. Überla, and K. Niemax, *Plasmonics* **5**, 31 (2010).
42. S. Wang, X. Shan, U. Patel, X. Huang, J. Lu, J. Li, and N. Tao, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **107**, 16028 (2010).
43. V. Lozovski, *J. Comput. Theor. Nanosci.* **9**, 859 (2012).
44. Ch. Girard, Ch. Joachim, and S. Gauthier, *Rep. Prog. Phys.* **63**, 893 (2000).
45. M. Xiao, S. Bozhevolnyi, and O. Keller, *Appl. Phys. A* **62**, 115 (1996).
46. C.-Z. Wu, X.-B. Mao, Z.-F. Xu, and H.-N. Ye, *Optoelectr. Lett.* **3**, 289 (2007).
47. V. Lozovski, *J. Comput. Theor. Nanosci.* **7**, 2077 (2010).
48. V. Lozovski and V. Piatnytsia, in *Proceedings of the International Conference of Young Scientists on Modern Problems of Theoretical Physocs* (Bogolubov Inst. Theor. Phys. of the NAS of Ukraine, Kyiv, 2011), p. 30.
49. O. Keller, *Phys. Rep.* **268**, 85 (1996).
50. Ю.С. Бараш, В.Л. Гинзбург, *УФН* **143**, 345 (1984).
51. Ю.С. Бараш, *Силы Ван-дер-Ваальса* (Наука, Москва, 1988).
52. V. Lozovski, V. Lysenko, V. Pyatnitsia, M. Spivak, *Semicond. Phys. Quant. Electr. Optoelectr.* **14**, 489 (2011).
53. *Доклінічні дослідження лікарських засобів. Методичні рекомендації*. За редакцією О.В. Стефанова (Міністерство охорони здоров'я України. Державний фармакологічний центр. Київ, 2001).
54. A. Bouhelier, *Microsc. Res. Techn.* **69**, 563 (2006).
55. A.V. Goncharenkoa, H.-Ch. Changa, and J.-K. Wang, *Ultramicroscopy* **107**, 151 (2007).
56. B.M. Ross and L.P. Lee, *Nanotechnology* **19**, 2752001 (2008).
57. S. Lanone, F. Rogerieux, J. Geys, A. Dupont, E. Mailhot-Marechal, J. Boczkowski, G. Lacroix, and P. Hoet, *Part. Fibre Toxicol.* **6**, 14 (2009).
58. V. Lozovski, V. Lysenko, M. Spivak, and V. Sterligov, *Semicond. Phys. Quant. Electr. Optoelectr.* **15**, 80 (2012).
59. V.A. Sterligov, Y. Men, and P.M. Lytvyn, *Opt. Express* **18**, 43 (2010).
60. T.A. Leskova, A.A. Maradudin, and W. Zierau, *Opt. Commun.* **249**, 23 (2005).
61. V. Lozovski, S. Schrader, and A. Tsykhonya, *Opt. Commun.* **282**, 3257 (2009).
62. A.A. Maradudin and D.L. Mills, *Phys. Rev. B* **11**, 1392 (1975).
63. J.M. Elson and R.H. Ritchie, *Phys. Status Solidi B* **62**, 461 (1974).
64. А.А. Абрикосов, Л.П. Горьков, И.Е. Дзялошинский, *Методы квантовой теории поля в статистической физике* (Госиздат физ-мат. лит., Москва, 1962).
65. S. Bozhevolnyi and A. Evlyukhin, *Surf. Sci.* **590**, 173 (2005).
66. A.D. Jaghjaian, *Proc. IEEE* **68**, 248 (1980).
67. M.V. Berry and S. Klein, *J. Mod. Opt.* **43**, 2139 (1996).
68. *Регламент производства человеческого лейкоцитарного интерферона № 302-82*, 1982.
69. Патент РФ "Способ получения человеческого лейкоцитарного интерферона" № 2080873, приоритет 27.12.1993.
70. Патент РФ "Способ получения человеческого лейкоцитарного интерферона" № 2066188, приоритет от 13.04.1993.
71. Патент РФ "Способ получения человеческого лейкоцитарного интерферона" № 2140284, приоритет от 06.07.1998.
72. Н.Я. Співак, Л.Н. Лазаренко, О.Н. Михайленко, *Интерферон в системе мононуклеарных фагоцитов* (Фитосоциоцентр, Киев, 2002), 166 с.
73. B.J. Marquis, Z. Liu, K.L. Braun, and C.L. Haynes, *Analyst* **136**, 3478 (2011).
74. B.J. Kirby and E.F. Hasselbrink, in *Electrophoresis in Practice, Electrophoresis, Zeta Potential of Microfluidic Substrates: 1. Theory, Experimental Techniques, and Effects on Separations* (Wiley, Weinheim, 2004), Vol. 25, p. 187.
75. Y. Kim, R.C. Jonson, J. Li, J.T. Hupp, and G.C. Schatz, *Chem. Phys. Lett.* **352**, 421 (2002).
76. P.K. Jain, K. S.Lee, I.H. El-Sayed, and M.A. El-Sayed, *J. Phys. Chem. B* **110**, 7238 (2006).
77. V. Lozovski, V. Lysenko, V. Piatnytsia, O. Scherbakov, N. Zholobak, and M. Spivak, *J. Bionanosci.* **6**, 109 (2012).

Одержано 05.11.12

*В. Лысенко, В. Лозовский, М. Спивак*

## НАНОФИЗИКА И АНТИВИРУСНАЯ ТЕРАПИЯ

### Резюме

Предложен новый механизм взаимодействия вирусов с наночастицами, основанный на присутствии только нанобъектам эффекте усиления локального поля, которое может проявляться в системе наночастица–вирус. Основной идеей предложенного механизма является рассмотрение действия всегда присутствующего любой физической системе поля вакуумных флуктуаций. Этот механизм является универсальным. Он не зависит от деталей структуры наночастицы и вируса, что подтверждают многочисленные эксперименты, проведенные как авторами работы, так и другими научными группами. Обсужден также новый метод очистки биожидкостей от нанобъектов – наночастиц и вирусов. Метод основан на выборочном взаимодействии нанобъектов с наноструктурированной поверхностью, вдоль которой распространяется поверхностный плазмон-поляритон, или системой нанонитей, находящихся в условиях возбуждения на них локального плазмон-поляритона. На основе предложенного метода ослабления вирусной активности под действием суспензии наночастиц, разработан и экспериментально проверен новый эффективный

способ получения человеческого лейкоцитарного интерферона.

*V. Lysenko, V. Lozovski, M. Spivak*

## NANOPHYSICS AND ANTIVIRAL THERAPY

### Summary

A new mechanism of interaction between viruses and nanoparticles is proposed. The mechanism is based on the local-field enhancement effect inherent only in nano-objects and can manifest itself in nanoparticle–virus systems. The basic idea consists in vacuum fluctuations that are always present in any physical system. This mechanism is universal and does not depend on the details of nanoparticle and virus structures, which was confirmed by numerous experiments carried out by us and in other scientific groups. A new method of purification of biofluids from nano-objects such as nanoparticles and viruses is also discussed. The method is based on a selective interaction between nano-objects and either a nanostructured surface, along which a surface plasmon-polariton propagates, or a system of nanothreads, on which a local plasmon-polariton is excited. On the basis of the method proposed for weakening the virus activity due to the action of a suspension of nanoparticles, a new effective way for the production of human leukocytic interferon has been developed and verified experimentally.