

**РОЗРОБКА НОВОГО МЕТОДУ ДІАГНОСТИКИ
ТОКСОПЛАЗМОЗУ НА ОСНОВІ ФОТОЛЮМІНЕСЦЕНЦІЇ
НАНОЧАСТИНОК ОКСИДУ ЦИНКУ**

М. В. ГАЛАТ, кандидат ветеринарних наук, доцент,

Н. Ф. ШПИРКА, молодший науковий співробітник

М. В. ТАРАН, аспірант*

О. Ю. ПАРЕНЮК, кандидат біологічних наук, старший науковий
співробітник,

К. Є. ШАВАНОВА, кандидат біологічних наук, старший науковий
співробітник

Національний університет біоресурсів і природокористування України

E-mail: galat_mv@nubip.edu.ua

***Анотація.** *Toxoplasma gondii* – збудник поширеної протозойної хвороби різних видів тварин і людини. Важливою є вчасна і точна діагностика даної хвороби. З цією метою було розроблено і випробувано новий метод діагностики токсоплазмозу на основі фотолюмінесценції наночастинок оксиду цинку. Для цього використовували волоконно-оптичний спектрометр, за допомогою якого реєстрували спектри фотолюмінесценції біомолекул токсоплазм на поверхні оксиду цинку, а також метод скануючої електронної мікроскопії для вивчення мікроструктури нанородів.*

У результаті проведених досліджень було встановлено, що комплекси імунних біосенсорів на основі оксиду цинку мають достатню специфічність реакції, враховуючи водночас значне зниження сигналу за внесення специфічної сироватки у розведенні 1 : 5. Зниження інтенсивності фотолюмінесценції свідчить про утворення біокомплексу на поверхні нанородів оксиду цинку за принципом «ключ-замок» і супроводжується модифікацією структури попередньо адсорбованих молекул антитіл.

Даний метод має високу швидкість детектування і порівняно невисоку складність у застосуванні. Подальше вивчення й удосконалення методів діагностики токсоплазмозу з використанням імунних біосенсорів дасть можливість здешевити процес діагностики хвороби і пришвидшити його.

***Ключові слова:** токсоплазмоз, *Toxoplasma gondii*, діагностика, оптичний біосенсор, оксид цинку, фотолюмінесценція*

* Науковий керівник – доктор біологічних наук, професор М. Ф. Стародуб

Актуальність Токсоплазмоз – одна із найбільш поширених на земній кулі хвороб тварин та людини. Нині вона зареєстрована у країнах Європи, Азії, Африки, Північної і Латинської Америки [2, с. 1257-1278]. Хворіють на токсоплазмоз як свійські, так і дикі хребетні тварини. У зв'язку з цим особливо необхідними нині є точні і надійні методи діагностики даної хвороби.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. До загальноновживаних методів діагностики за токсоплазмозу належать реакція зв'язування комплементу, реакція тривалого зв'язування комплементу, реакція флуоресціюючих антитіл, реакція непрямой імунофлуоресценції, реакція аглютинації, реакція непрямой гемаглютинації, реакція латексаглютинації, реакція ензимомічених антитіл, ферментний імуносорбентний метод, метод із використанням полімеразної ланцюгової реакції. Однак ці методи є довготривалими, високовартісними, досить складними, вимагають високої професійної підготовки виконавців і спеціального обладнання та реагентів.

Таким чином, розробка нового методу діагностики цієї протозойної хвороби з використанням оптичних біосенсорів на основі ефектів фотолюмінесценції (ФЛ) і наноструктур оксидів металів дасть змогу експресно, високочутливо та селективно, у польових умовах і в режимі реального часу здійснювати скринінгові та верифікаційні дослідження з діагностики захворювань і простежити особливості їх розвитку у межах популяції [3, с. 481-486; 5, с. 8354-8360; 6, с. 396-399; 10, с. 701-709].

За останні роки значно зріс інтерес у вивченні та отриманні ФЛ наноматеріалів, одним з яких є оксид цинку (ZnO). Цей матеріал має властивості, що є необхідними для проведення біоаналітичних вимірювань: нетоксичний, хімічностабільний, електрохімічноактивний, а також здатний до випромінювання у видимому і УФ-діапазоні [1, с. 378-385]. Оксид цинку інтенсивно досліджувався протягом декількох десятиліть, але останнім часом значні розробки здійснюються в області отримання його наноструктур і вивченні їхніх властивостей [4, с. 2643-2647]. Наноструктури ZnO мають ряд специфічних властивостей, що робить їх привабливими для використання під

час проведення біоаналітичних вимірювань і конструюванні біосенсорів. За рахунок унікального поєднання люмінесцентних, напівпровідникових і п'єзоелектричних властивостей ZnO може використовуватися для створення сенсорів, що базуються на різних принципах реєстрації сигналу [11, с. 254-278]. Іншим важливим чинником використання ZnO є відносна простота отримання різноманітних наноструктур, як на підкладках, так і у вигляді нанокристалів та колоїдних розчинів [7, с. 212-216].

Мета дослідження – випробувати новий метод діагностики токсоплазмозу тварин із використанням оксиду цинку.

Матеріали і методи дослідження. Дослідження було проведено протягом 2016 року на базі кафедри паразитології та тропічної ветеринарії Національного університету біоресурсів і природокористування України (м. Київ, Україна) та Інституту ядерної фізики і спектродіагностики Латвійського університету (м. Рига, Латвія).

Під час виконання досліджень використовували волоконно-оптичний спектрометр (OceanOptics HR2000) з діапазоном світіння 360-420 нм для реєстрації спектрів фотолюмінесценції біомолекул токсоплазм на поверхні ZnO, метод скануючої електронної мікроскопії (SEM) для вивчення мікроструктури нанородів.

Отримання і характеристика нанородів ZnO. Спочатку нанороди ZnO розчиняли у бутанолі (концентрація 1 мг / мл) і розбивали ультразвуком протягом 20 хв, далі по 20 мкл отриманого розчину наносили на окремі скляні підкладки. Зразки сушили за температури 21-22 °C і відпалювали у муфельній печі за 360 °C протягом трьох годин. Імобілізація біомолекул збудника токсоплазмозу *Toxoplasma gondii* на поверхні наноструктури ZnO проводили таким способом: розчин 20 мкг/мл із вмістом токсоплазм адсорбували 20 хв на поверхні з ZnO, а потім промивали у фосфатному буфері (рН 7,4) і сушили за температури 18 °C, після чого проводили вимірювання спектрів ФЛ. Наступним етапом було нанесення бичачого сироваткового альбуміну (БСА) протягом 20 хв для запобігання неспецифічній адсорбції біомолекул на поверхні ZnO.

Після промивання буфером БСА і сушіння наностержнів ZnO, наносили специфічні і неспецифічні антитіла у різних розведеннях 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1 для встановлення і реєстрації найбільш оптимальної взаємодії біомолекул, тобто, чутливості біосенсора. Спектри ФЛ реєстрували після кожної іммобілізації біомолекул на поверхні ZnO [8,9].

На наступному етапі використовували сироватки крові великої рогатої худоби і овець, які були вже охарактеризовані як позитивні і негативні на наявність антитіл до збудника *Toxoplasma gondii* за методом імуноферментного аналізу з використанням тест-системи «ВектоТоксо-антитіла» (виробник – ЗАТ «Вектор-бест», Російська Федерація).

Результати дослідження та їх обговорення. На першому етапі наших досліджень було охарактеризовано за допомогою методу СЕМ морфологію поверхні наночастинок оксиду цинку. На рисунку 1 видно, що плівка (поверхня сукупності наночастинок оксиду цинку) щільно складена зі субмікронного розміру агрегатів ZnO. Нанороди ZnO мають гексагональну видовжену форму. Середні розміри наностержнів, охарактеризовані під час дослідження скануючим електронним мікроскопом, мали розміри 460 ± 30 нм у довжину і 100 ± 10 нм у діаметрі.

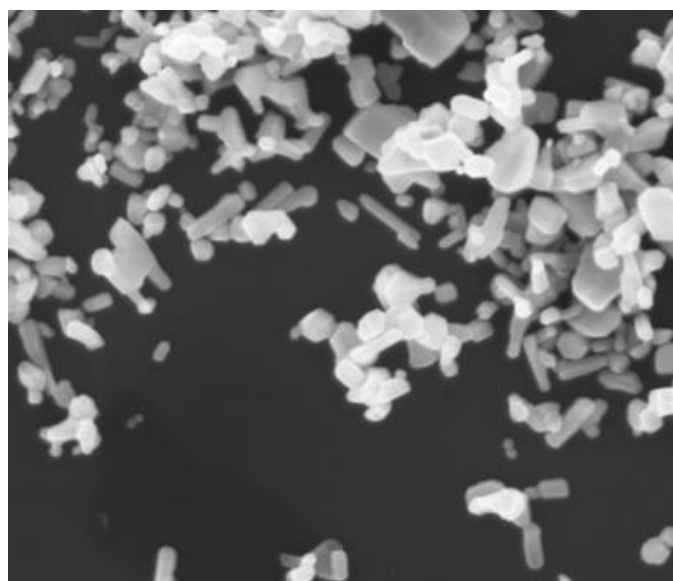


Рис. 1 СЕМ нанородів оксиду цинку

Для контролю адсорбції протеїнів на поверхні ZnO ми використовували метод фотолюмінесценції. Пластинка оксиду цинку, яка використовувалася для адсорбції біомолекул, мала максимальний показник фотолюмінесценції 977,92 ум.од. Після адсорбції антигену *T. gondii* на поверхні оксиду металу спостерігалось зростання інтенсивності на 12 % (рис. 2). Процес іммобілізації було продовжено адсорбцією бичачого сироваткового альбуміну (БСА) для блокування вільних місць на поверхні оксиду цинку, після якої спостерігалось зростання ФЛ порівняно з шарами ZnO-Ag на 9 %.

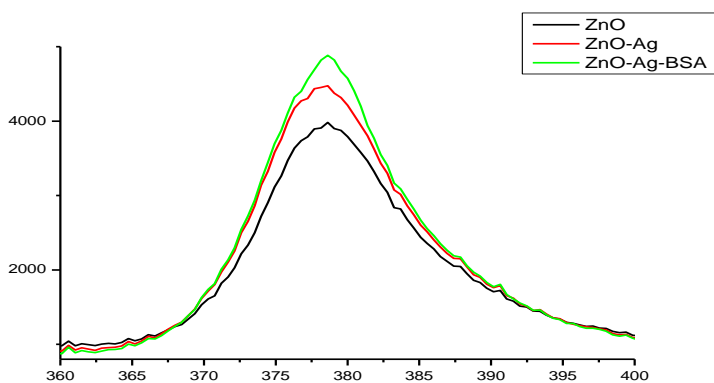


Рис 2. Спектри фотолюмінесценції ZnO після адсорбції на поверхні біоселективного шару ZnO-Ag-BSA

Наступним етапом роботи було тестування спектрів ФЛ модифікованої поверхні ZnO біокомплексом ZnO-Ag-BSA-специфічні Ab (рис. 3) і ZnO-Ag-BSA-не специфічні Ab (рис. 4). На нашу думку, що також підтверджується літературними даними [9], адсорбція БСА призвела до збільшення інтенсивності ФЛ. Варто зазначити, що відповідно до процедури модифікація по БСА була взята як кінцева стадія з утворенням біоселективного шару біосенсора. У ході подальшого обговорення сигнал ФЛ, який був зареєстрований БСА-модифікованими електродами, буде інтерпретуватися як фоновий сигнал і від нього буде відраховуватися реакція іммобілізації антитіл токсоплазм. Після нанесення на біоселективну поверхню специфічних антитіл у п'ятьох різних розведеннях, а саме 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, спостерігали спадання ФЛ (рис. 3).

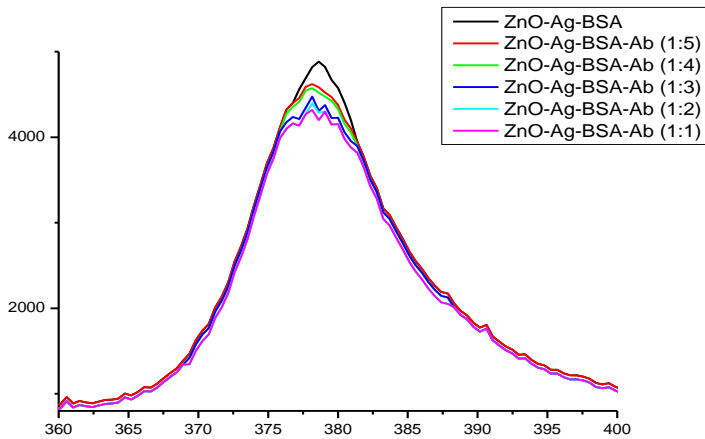


Рис. 3 Спектри фотолюмінесценції ZnO після адсорбції на поверхні комплексу ZnO-AgBSA-специфічні Ab

Якщо ж на поверхню іммобілізували неспецифічні антитіла, спостерігалось незначне зростання фотолюмінесценції порівняно з біоселективним шаром ZnO-Ag-BSA (рис. 4).

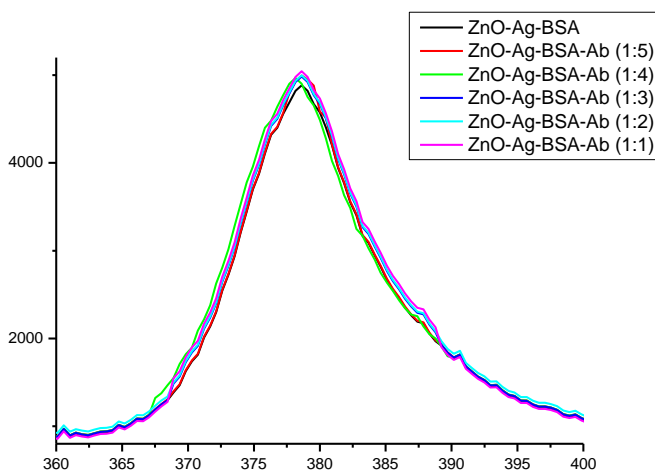


Рис. 4 Спектри фотолюмінесценції ZnO після адсорбції на поверхні комплексу ZnO-AgBSA-неспецифічні Ab

Отже, розробка сучасних ефективних методів діагностики протозойних хвороб різних видів тварин є одним із завдань сучасної ветеринарної медицини. Біосенсори, що мають високу селективність реакції із специфічними антитілами збудників хвороб, таких як, наприклад, *Toxoplasma gondii*, можуть суттєво

допомогти у пришвидшенні діагностики хвороби і більш точному визначенні її збудника. Запропоновані нами комплекси імунних біосенсорів на основі оксиду цинку мають достатню специфічність реакції, високу швидкість детектування і порівняно невисоку складність у разі застосування. Отже, можуть суттєво пришвидшити і здешевити процес діагностики хвороби, адже відомо, що вчасно поставлений діагноз і подальше лікування або ж профілактика сприятимуть попередженню передачі збудників цих хвороб людині.

Висновки і перспективи подальших досліджень. Комплекси імунних біосенсорів на основі оксиду цинку мають достатню специфічність реакції, враховуючи значне зниження сигналу у разі внесення специфічної сироватки з розведенням 1 : 5. Зниження інтенсивності ФЛ свідчить про утворення біокомплексу на поверхні ZnO нанородів за принципом «ключ-замок» і супроводжується модифікацією структури попередньо адсорбованих молекул Аб.

Також можна зробити висновки про високу швидкість детектування і порівняно невисоку складність під час застосування. Таким чином, подальше вивчення і удосконалення методів діагностики токсоплазмозу з використанням імунних біосенсорів дасть можливість здешевити процес діагностики хвороби і пришвидшити його.

Список літератури

1. Ahn, K.Y. A sensitive diagnostic assay of rheumatoid arthritis using three-dimensional ZnO nanorod structure / K.Y. Ahn, K. Kwon, et al. // *Biosensors & Bioelectronics*. — 2011. — V. 28, No. 1. — P. 378–385.
2. Dubey, J. P. Toxoplasma gondii infection in humans and animals in the United States / J.P. Dubey, J.L. Jones // *Internal Journal of Parasitology*, 2008, № 38, pp. 1257–1278.
3. Jiang, S. A novel immunosensor for detecting Toxoplasma gondii-specific IgM based on goldmag nanoparticles and graphene sheets / S. Jiang, E. Hua, M. Liang, B. Liu, G. Xie // *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, 2013, №101, pp. 481–486.
4. Khranovskyy, V. Luminescence anisotropy of ZnOmicrorods / V. Khranovskyy, V. Lazorenko, G. Lashkarev, R. Yakimova // *Journal of Luminescence*. Volume 132, Issue 10, October 2012, Pages 2643–2647.
5. Luo, Y. Dual-aptamer-based biosensing of toxoplasma antibody / Y. Luo, X. Liu, T. Jiang, P. Liao, W. Fu // *Anal Chem.*, 2013, №85(17), pp. 8354–8360.

6. Meng, K. Development of colloidal gold-based immunochromatographic assay for rapid detection of *Mycoplasma suis* in porcine plasma / K. Meng, W. Sun, P. Zhao, L. Zhang, D. Cai, Z. Cheng, H. Guo, J. Liu, D. Yang, S. Wang, T. Chai // *BiosensBioelectron*, 2014, №55, pp. 396–399.
7. Mihailova, V. Synthesis of ZnO nanoneedles by thermal oxidation of Zn thin films / V. Mihailova, E. Gerbreder, E. Tamanis, E. Sledevskis, R. Viter, P. Sarajevs // *Journal of Non-Crystalline Solids*, 377, (2013) 212-216.
8. Starodub N.F. Biosensors for the Control of Biochemical Parameters in the Diagnostics of Diseases. Book of series in sensors, Portable Biosensing of Food Toxicants and Environmental Pollutants / N.F. Starodub. – CRC Press, Taylor&Francis Croup Boca Raton London, New York, 2013, pp. 743-775.
9. Viter, R. Application of Room Temperature Photoluminescence From ZnO Nano-rods for Salmonella Detection / R. Viter, V. Khranovskyy, N. Starodub, et. al // *IEEE Sensors Journal*, 14(6) (2014) 2028-2034.
10. Wang, H. A piezoelectric immunoagglutination assay for *Toxoplasma gondii* antibodies using gold nanoparticles / H. Wang, C. Lei, J. Li, Z. Wu, G. Shen, R. Yu // *BiosensBioelectron*, 2014, №19(7), pp. 701–709.
11. Yakimova R. ZnO materials and surface tailoring for biosensing / R. Yakimova, L. Selegard, et al. // *Frontiers in bioscience (Elite edition)*. — 2012. — V. 4. — P. 254–278.

References

1. Ahn, K.Y., Kwon, K., et al. (2011). A sensitive diagnostic assay of rheumatoid arthritis using three-dimensional ZnO nanorod structure // *Biosensors & Bioelectronics*, 28 (1), 378–385.
2. Dubey J. P., Jones J. L. (2008). *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. *Internal Journal of Parasitology*, 38, 1257–1278.
3. Jiang S., Hua E., Liang M., Liu B., Xie G. (2013) A novel immunosensor for detecting *Toxoplasma gondii*-specific IgM based on gold nanoparticles and graphene sheets. *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, 101, 481–486.
4. Khranovskyy V, Lazorenko V, Lashkarev G, Yakimova R. (2012) Luminescence anisotropy of ZnO microrods. *Journal of Luminescence*, 132 (10), 2643–2647.
5. Luo Y., Liu X., Jiang T., Liao P., Fu W. (2013) Dual-aptamer-based biosensing of *Toxoplasma* antibody. *Anal Chem.*, 85(17), 8354–8360.
6. Meng K., Sun W., Zhao P., Zhang L., Cai D., Cheng Z., Guo H., Liu J., Yang D., Wang S., Chai T. (2014) Development of colloidal gold-based immunochromatographic assay for rapid detection of *Mycoplasma suis* in porcine plasma. *BiosensBioelectron*, 55, 396–399.
7. Mihailova, V. Gerbreder, E. Tamanis, E. Sledevskis, R. Viter, P. Sarajevs (2013). Synthesis of ZnO nanoneedles by thermal oxidation of Zn thin films, *Journal of Non-Crystalline Solids*, 377, 212-216.
8. Starodub N.F. (2013) Biosensors for the Control of Biochemical Parameters in the Diagnostics of Diseases. Book of series in sensors, Portable Biosensing of Food Toxicants and Environmental Pollutants, CRC Press, Taylor&Francis Croup Boca Raton London, New York, 743-775.

9. Viter R., V. Khranovsky, N. Starodub, et. al. (2014). Application of Room Temperature Photoluminescence From ZnO Nano-rods for Salmonella Detection, IEEE Sensors Journal, 14(6), 2028-2034.
10. Wang H., Lei C., Li J., Wu Z., Shen G., Yu R. (2014) A piezoelectric immunoagglutination assay for Toxoplasma gondii antibodies using gold nanoparticles. Biosens Bioelectron, 19(7), 701–709.
11. Yakimova R., Selegard L., et al. (2012) ZnO materials and surface tailoring for biosensing. Frontiers in bioscience (Elite edition), 4, 254–278.

РАЗРАБОТКА НОВОГО МЕТОДА ДИАГНОСТИКИ ТОКСОПЛАЗМОЗА НА ОСНОВЕ ФОТОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ЦИНКА

**М. В. Галат, Н. Ф. Шпырка, М. В. Таран, Е. Ю. Паренюк,
Е. Е. Шаванова**

***Аннотация.** Toxoplasma gondii – возбудитель распространенной протозойной болезни разных видов животных и человека, поэтому важна своевременная и точная диагностика данной болезни. С этой целью был разработан и испытан новый метод диагностики токсоплазмоза на основе фотолюминесценции наночастиц оксида цинка. Для этого использовали волоконно-оптический спектрометр, с помощью которого регистрировали спектры фотолюминесценции биомолекул токсоплазм на поверхности ZnO, а также метод сканирующей электронной микроскопии для изучения микроструктуры нанородов.*

В результате проведенных исследований было установлено, что комплексы иммунных биосенсоров на основе оксида цинка обладают достаточной специфичностью реакции, учитывая при этом значительное снижение сигнала при внесении специфической сыворотки в разведении 1:5. Снижение интенсивности фотолюминесценции свидетельствует об образовании биокомплекса на поверхности нанородов оксида цинка по принципу «ключ-замок» и сопровождается модификацией структуры предварительно адсорбированных молекул антител.

Это означает, что данный метод имеет высокую скорость детектирования и сравнительно невысокую сложность в применении. Дальнейшее изучение и совершенствование методов диагностики токсоплазмоза с использованием иммунных биосенсоров позволит удешевить процесс диагностики болезни и ускорить его.

***Ключевые слова:** токсоплазмоз, Toxoplasma gondii, диагностика, оптический биосенсор, оксид цинка, фотолюминесценция*

DEVELOPMENT OF A NEW METHOD OF DIAGNOSTICS OF TOXOPLASMOSIS BASED ON PHOTOLUMINESCENCE OF ZINC OXIDE NANOPARTICLES

M. Galat, N. Shpyrka, M. Taran, O. Pareniuk, K. Shavanova

Abstract. *Toxoplasma gondii* is a common agent of protozoan disease of different kinds of animals and humans. That is why timely and accurate diagnosis of the disease is important. That is why a new method for the diagnosis of toxoplasmosis based on photoluminescence of nanoparticles of zinc oxide was developed and tested. A Photoluminescence spectrum of *Toxoplasma* biomolecules on the surface of ZnO was recorded through fiber-optic spectrometer, and the method of scanning electron microscopy was used to study the nanorods microstructure.

As a result of studies it was revealed that immune complexes biosensor based on zinc oxide have sufficient specificity reaction taking into account the significant reduction of signal when making specific serums with the dilution of 1: 5. Reduction of the photoluminescence intensity indicates the formation of nanorods biocomplexes on the surface of zinc oxide on a "key-lock" principle which is accompanied by a modification of the pre-adsorbed antibody molecules structure.

Based on the obtained results, it is possible to state that described method has high detection rate and relatively low complexity of the application. Further study and improvement of methods of diagnosis of toxoplasmosis using immune biosensor will enable cheaper diagnosis of the disease process and accelerate it.

Keywords: *toxoplasmosis, Toxoplasma gondii, diagnostics, optical biosensor, zinc oxide, photoluminescence*