

УДК _____
№ держреєстрації _____
Інв. № _____

Міністерство освіти і науки України
Сумський державний університет (СумДУ)
40017, м.Суми, вул. Римського-Корсакова, 2; тел. (0542)330172,
факс (0542)334049, E-mail: kanc@sumdu.edu.ua

ПОГОДЖЕНО

ЗАТВЕРДЖУЮ

Заступник Міністра з питань
європейської інтеграції

Ректор СумДУ

_____ Олексій
ШКУРАТОВ

_____ Василь КАРПУША

«__» _____ 2022 р.

«__» _____ 2022 р.

ЗВІТ

ПРО НАУКОВО-ДОСЛІДНУ РОБОТУ
за договором М/23-2022 від 23.05.2022 р.
«Розробка наноструктурованих оптичних сенсорних систем для виявлення
K. pneumoniae»
(остаточний)

Науковий керівник НДР

_____ Вікторія ГОЛУБНИЧА

Термін виконання: 23.05.2022 р.-31.12.2022 р.

2022

Рукопис закінчено 08.12. 2022 р.

Результати роботи розглянуто Вченою Радою Сумського державного університету,

протокол від 9 грудня 2022 року №

СПИСОК АВТОРІВ

Доцент кафедри громадського здоров'я, кандидат медичних наук	08.12.2022	В.М. Голубнича (Вступ, Розділ 1, 2, Висновки)
Старший науковий співробітник Центру колективного користування наукового обладнання ННМІ «Центр біомедичних досліджень», кандидат медичних наук	08.12.2022	В.В.Корнієнко (Розділ 2, 3.1)
Молодший науковий співробітник ЦККНО ННМІ «Центр біомедичних досліджень», кандидат фізико-математичних наук	08.12.2022	Р.В. Вітер Розділ 2, 3.1)
Науковий співробітник ЦККНО ННМІ «Центр біомедичних досліджень», аспірант	08.12.2022	Є.В. Гусак (Розділ 2.2)

РЕФЕРАТ

Звіт про НДР: 60 с., 2 табл., 23 рис., 76 джерел.

БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ, *K. PNEUMONIAE*, ZnO, ОПТИЧНІ СЕНСОРИ

Об'єкт дослідження – імуно-фото-хімічні реакції за участі нанокompatитних систем, іммобілізованих на поверхні скла.

Мета роботи – створення фотолюмінісцентної платформи, на основі ZnO-полідопамін, ZnO-поліанілін та ZnO-Au наноструктур, яка дозволить виявляти *K. pneumoniae* в дослідних зразках біологічного походження.

У ході виконання проекту авторами було сформовано теоретичні та методологічні засади та вдосконалена методика створення біоселективних шарів на основі композитів ZnO. Синтезовано та охарактеризовані структура, оптичні та електронні властивості наноструктур ZnO методами SEM, EDX, FTIR, Рамановська спектроскопія та оптичними методами. Розроблено методику формування біоселективного шару на поверхні наноструктур ZnO. Сформовано біоселективний шар на поверхні наноструктур ZnO в межах ковалентного зв'язування специфічних антитіл та охарактеризовано структуру, оптичні та електронні властивості наноструктур ZnO після їх біофункціоналізації методами SEM та оптичними методами. Проведено оцінку ефективності депозиції компонентів біоселективного шару із використанням специфічних імунологічних реакцій. Створено експериментальну камеру для дослідження оптичних властивостей композитів на основі ZnO методом фотолюмінісцентної спектроскопії та застосовано розроблений зразок камери для дослідження матеріалів, які містять антигени *K.pneumoniae*. Проведено вимірювання інтенсивності фотолюмінісценції та здійснено інтерпретацію вихідного сигналу

вимірювального перетворювача, що підтвердило можливість визначення *K.pneumoniae* в досліджуваному зразку в кількості що перевищує 10^3 КУО/мл.

Проведено ідентифікацію та серотипування штамів *K. pneumoniae*, виділених від пацієнтів і носіїв, і відібрано найбільш поширені антигенні типи мікроорганізмів. У цьому дослідженні визначено чутливість мікроорганізмів до одинадцяти антибіотиків. Виявлено високий рівень мультирезистентності серед штамів *K. pneumoniae*. НЧ Ag мають потужний антибактеріальний та антибіоплівковий потенціал проти мультирезистентних *K. pneumoniae*.

ЗМІСТ

С.

Вступ.....	5
1 Огляд літератури.....	8
1.1 Епідеміологічне значення <i>K. pneumoniae</i> , як збудника інфекційних захворювань та представника нормальної мікробіоти, та її біологічні властивості	10
1.2 Оптичні біосенсори та їх використання для ідентифікації мікроорганізмів	12
2 Матеріали та методи дослідження.....	13
2.1 Матеріали	18
2.2 Вивчення поширеності та біологічних властивостей клінічних ізолятів <i>K. pneumoniae</i>	18
2.3 Синтез та характеристика морфологічної структури, оптичних та електронних властивостей наноструктур ZnO.....	21
2.4 Аналіз структурної та поверхневої характеристики ZnONRs.....	23
2.5 Дослідження оптичних властивостей наноструктур ZnONRs–PDA після нанесення антитіл, BSA, антигенів	23
3 Результати дослідження та їх обговорення.....	25
3.1 Поширеність та біологічні властивості клінічних ізолятів <i>K. pneumoniae</i>	25
3.2 Морфологічна характеристика, оптичні та електронні властивості наноструктур ZnO модифікованих PDA.....	29
3.3 Характеристика взаємодії поверхневих та специфічних білків стандартними методами (реакція імунофлюоресценції)	46
3.4 Дослідження реакції біосенсора на білки-мішені методом фотолюмінесценції в проточній камері	48
Висновки.....	52
Практичні рекомендації.....	53
Перелік джерел посилання.....	54

ВСТУП

У багатьох дослідженнях зазначається, що резистентність до протимікробних препаратів має комплексний вплив на пацієнтів, охорону здоров'я та економіку в усьому світі. Патогени ESKAPE викликають занепокоєння через їхню стійкість до антимікробної терапії, збільшення тривалості лікування та фінансовий тягар для населення. *K.pneumoniae* є одним з найважливіших видів серед грамнегативних мікробів цієї групи, який часто асоціюють із внутрішньолікарняними інфекціями, серед яких зустрічається весь спектр патології від запалення сечостатевого шляхів до бактеріємії. Протягом кількох останніх десятиліть відмічається зростання кількості штамів *K. pneumoniae* з множинною лікарською стійкістю, які мають ознаки госпітальних. Тому дуже актуальними є питання дослідження поширеності антибіотикорезистентних штамів *K. pneumoniae* в популяції та встановлення їх чутливості до антибіотиків.

Виявлення *K. pneumoniae* у досліджуваному матеріалі може бути здійснено з використанням класичного бактеріологічного методу, або із використанням генетично-молекулярного дослідження. Однак дані підходи мають низку недоліків - тривалість, дороговартісність та необхідність наявності висококваліфікованих спеціалістів та техніки, що певним чином обмежує їх застосування.

Тому останнім часом дуже актуальним завданням є розробка нового, технологічного рішення для детекції *K. pneumoniae*. Одним із ефективних розв'язань даної проблеми може бути пристрій на основі біосенсорної технології, зокрема імуносенсорів. Перевагами імуносенсорів є використання простого обладнання, висока чутливість і вибірковість, а також сумісність з мініатюрними та портативними системами.

Оксид цинку (ZnO) є важливим широкозонним напівпровідниковим матеріалом, що широко застосовується в сучасному світі та медицині.

Розробка нано-пристроїв на основі його унікальних фізичних властивостей є ефективним вирішенням багатьох питань біомедичного спрямування. Наноструктурований ZnO володіє не тільки високою площею поверхні, але й хорошою біосумісністю, хімічною стабільністю, нетоксичністю, і в той же час він має біоміметичні та високоелектронні комунікаційні функції, які є важливими при створенні біосенсорів. Поверхня наноматеріалів ZnO має хімічну функціональність, необхідну для ковалентної дериватизації, що дозволяє зв'язувати специфічні біомолекули і підвищити специфічність біомолекулярна взаємодія.

При цьому відкритими залишаються питання розробки ефективної біосенсорної платформи із цих наноматеріалів на основі ZnO для виявлення *K. pneumoniae*.

Метою проекту було сформувати оптичну біосенсорну платформу на основі нанокompatитів ZnO для виявлення *K. pneumoniae* у різних дослідних матеріалах.

Виконання проекту передбачало вирішення наступних завдань:

- Синтезувати та охарактеризувати структуру, оптичні та електронні властивості наноструктур ZnO та ZnO-PDA методами FTIR, Raman, SEM та оптичними методами

- Провести ідентифікацію та серотипування штамів *K. pneumoniae*, виділених із різних джерел (пацієнтів, харчових продуктів, носіїв), і відібрати найбільш поширені антигенні типи

- Проаналізувати специфічність взаємодії між антитілами до *K. pneumoniae* та антигенами *K. pneumoniae* стандартними методами (культурним, ІФА та ін.)

- Сформувати біоселективний шар на поверхні наноструктур ZnO та ZnO-PDA в межах ковалентного зв'язування специфічних антитіл

- Охарактеризувати структуру, оптичні та електронні властивості наноструктур ZnO та ZnO-PDA після їх біофункціоналізації методами FTIR, Raman, SEM та оптичними методами.

Виконання досліджень дозволило отримати *нові наукові результати*, зокрема сформувані теоретичні та методологічні засади та вдосконалити методику створення біоселективних шарів на основі композитів ZnO. Синтезовано та охарактеризовані структура, оптичні та електронні властивості наноструктур ZnO та ZnO-PDA методами SEM, EDX, FTIR, Рамановська спектроскопія та оптичними методами. Сформовано біоселективний шар на поверхні наноструктур ZnO та ZnO-PDA в межах ковалентного зв'язування специфічних антитіл та охарактеризовано структуру, оптичні та електронні властивості наноструктур після їх біофункціоналізації методами SEM та оптичними методами. Встановлено наявність взаємодії між біоселективним шаром на поверхні наноструктур ZnO та міченими FITC антитілами в концентраціях 5-100 мкг/мл. Виявлено, що реакція біосенсора на білки-мішені в проточній камері є нелінійною та супроводжувалась зменшенням рівня імунофлюоресценції при зростанні концентрації антигенів. Доведено, композити НЧ ZnO з PDA можуть бути використаними для розробки електрохімічних оптичних біосенсорів для детекції *K. pneumoniae*. Межа виявлення *K. pneumoniae* при застосуванні електрохімічних оптичних біосенсорів становить $10^3 - 10^8$ КУО/мл.

Проведено ідентифікацію та серотипування штамів *K. pneumoniae*, виділених від пацієнтів і носіїв, і відібрано найбільш поширені антигенні типи мікроорганізмів. У цьому дослідженні визначено чутливість мікроорганізмів до одинадцяти антибіотиків. Виявлено високий рівень мультирезистентності серед штамів *K. pneumoniae*. Досліджено ефективність НЧ Ag антибактеріальної та антибіоплівкової дії кий потенціал проти мультирезистентних *K. pneumoniae*. Таким чином, наші результати підкреслюють, що НЧ Ag мають багатообіцяючі антимикробні та антибіоплівкові властивості проти мультирезистентних клінічних штамів *K. pneumoniae*.

Практичне значення проведених досліджень.

Практична цінність отриманих результатів полягає у тому, що отримані результати можуть бути використані для формування біоселективних шарів у оптичних біосенсорах для детекції мікроорганізмів, що є актуальним для біомедичної галузі, сільського господарства, харчової промисловості. Досліджено частоту виділення різних серотипів *K.pneumoniae* в матеріалі від хворих та носіїв, та оцінено їх чутливість до основних груп антибіотиків, як маркерів нозокоміальних штамів.

1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Епідеміологічне значення *K. pneumoniae*, як збудника інфекційних захворювань та представника нормальної мікробіоти, та її біологічні властивості

Інфекційні патогени залишаються домінуючими чинниками захворюваності та смертності у всьому світі. Особливе місце серед відомих патогенів посідають представники групи ESKAPE, які викликають особливе занепокоєння [1]. Одним із представників даної групи є бактерії родини клебсієла. *Klebsiella pneumoniae* набуває все більшого медичного значення серед *Enterobacteria spp.* [2], як вид відповідальний за виникнення різних інфекційних патологій. Цей мікроорганізм часто виявляють у харчових продуктах, стічних водах, ґрунті, рослинах та шлунково-кишковому тракті тварин [3]. Він посідає друге місце після кишкової палички, у якості збудника лікарняних інфекцій [4]. Патоген є відповідальним за значну кількість захворювань людини, починаючи від ранових інфекцій і закінчуючи септицемією. У Сполучених Штатах *K. pneumoniae* є найбільш частим чинником інфекційно-обумовлених ускладнень, які виникають у лікарняних умовах, та викликає до 8% усіх внутрішньолікарняних інфекцій [5]. За даними дослідників [6] *K.pneumoniae* викликає госпітальні інфекції у 23,5%-55,7% випадків. Смертність від бактеріємії, асоційованої з *K.pneumoniae*, коливається від 20% до 70% випадків, залежно від типу лікування та тяжкості захворювання [7]. Відмічається, що інфекції, викликані *K. pneumoniae*, пов'язані з високим рівнем стійкості до антибіотиків [8]. Причетність *K. pneumoniae* до внутрішньолікарняних інфекцій зазначається у декількох дослідженнях [9], а наявність певних серотипів пов'язують із більшою патогенністю. Нераціональне застосування антибіотиків сприяє формуванню у мікроорганізмів стійкості до них та призводить до зростання кількості

госпітальних інфекцій, збільшення смертності та фінансового навантаження на систему охорони здоров'я [10].

Згідно з результатами, наведеними у дослідженні [11], встановлено, що ізоляти з MDR серотипом пов'язані з вищою смертністю. Деякі штами *K.pneumoniae* мають виражену капсулу, описану як тип K, яка забезпечує мукоїдний фенотип ізоляту, і є важливим фактором вірулентності [12]. Розрізняють 79 капсульних серотипів бактерії [13, 14], серед яких серотипи K1 і K2 пов'язані з бактеріємією та високим рівнем смертності. Гени, пов'язані з капсулами, є основною причиною патогенності у ізолятів *K. pneumoniae*. Фактори вірулентності, такі як wabG (відповідальний за біосинтез основного ліпополісахариду), uge (наявність уридин дифосфат галактуронат 4-епімерази) і usfM (структура зовнішніх мембранних ліпопротеїнів) беруть участь у виробництві капсул і сприяють інфікуванню шляхом стійкості до фагоцитозу [15]. Плазмідний ген gmpA (регулятор мукоїдного фенотипу A) забезпечує гіпермукозозний фенотип *K. pneumoniae* за рахунок посиленого утворення капсульного полісахариду [16]. Ген вірулентності wsaG також відповідає за синтез капсули у *K. pneumoniae* та її здатність ухилятися від фагоцитозу макрофагами [17]. Відомо, що бактерії зазнають чисельних модифікацій, залежно від географічного регіону та по відношенню до часу, а тому дослідження біологічних особливостей клінічних штамів, поширеності серед них капсульних типів, і наявності будь-якої кореляції між наявністю капсульних серотипів та стійкістю до антибіотиків є важливими у профілактиці захворюваності та ускладнень пов'язаних із *K.pneumoniae*.

Однак, не зважаючи на важливість *K. pneumoniae*, як внутрішньолікарняного збудника, дані про її поширення та чутливість до антимікробних засобів обмежені [18]. Цей патоген також відомий, як збудник з високою здатністю до утворення біоплівки та наявністю різних факторів вірулентності [19]. Інфекції, викликані бактеріями, що утворюють біоплівку, важко лікувати; тому вчасне виявлення патогену та пошук нових антимікробних засобів з антибіоплівковою активністю є актуальною темою

для громадського здоров'я. Вчасне виявлення та ідентифікація клебсієл дозволить знизити кількість інфікованих та попередити у них виникнення ускладнень, спричинених цим патогеном.

1.2 Оптичні біосенсори та їх використання для ідентифікації мікроорганізмів

Точне та швидке виявлення небезпечних молекул, мікроорганізмів, забруднюючих речовин і токсинів є топ питанням серед наявних глобальних проблем. Існуючі підходи до виявлення бактерій – культуральний метод та генетично-молекулярна діагностика є загально визнаними та широкоживаними, але вимагають вартісного обладнання та спеціально підготовленого персоналу, що збільшує витрати на діагностику [20, 21] і унеможлиблює вчасне виявлення та ідентифікацію патогену. Очевидно, що існує потреба у надійному, економічно вигідному, швидкому методі ідентифікації збудника, який дозволить виявляти *K. pneumoniae* у різних зразках.

Для того, щоб спростити проведення аналізу та знизити витрати, у практиці широко застосовуються різні сенсори. Останніми роками особливу увагу багатьох дослідників привернули до себе біосенсори, особливо в галузі охорони здоров'я [22]. Вони відрізняються швидким часом відгуку, є ультра чутливими при виявленні біомолекул, існує можливість їх мініатюризації для портативного застосування, вони потребують мінімальної обробки зразків порівняно зі звичайними аналітичними процедурами [23]. Основним принципом, який лежить в основі пристроїв біосенсору, є перетворення процесу виявлення біомішені в аналітичний сигнал для подальшого аналізу. Залежно від ситуації об'єктом аналізу можуть бути бактеріальні метаболіти або малі молекули [24], бактеріальні лізати, наприклад, білки [25] і нуклеїнові кислоти [26], спори бактерій [27], цілі бактерії [28], і навіть біоплівки [29]. Селективність найчастіше досягається за допомогою елементів розпізнавання,

таких як антитіла, ферменти та афінні реагенти. Через притаманну їм простоту афінні реагенти, включаючи антитіла [30], аптамери [31], сидерофори [32], бактеріофаги [33], антимікробні засоби [34], і лектини [35], можуть використовуватися під час проведення діагностики. Серед перерахованих агентів найчастіше використовується розпізнавання на рівні комплексу антитіло–антиген, через його високу афінність (привабливі значення K_d) і специфічність. Утворені комплекси антиген-антитіло виявляють із використанням електрохімічного, оптичного, п'єзоелектричного, поверхневого плазмонного резонанса [36] та інших методів, які зазвичай використовуються для реєстрації сигналів.

Однак при подальшому їх практичному застосуванні виникає ціла низка питань, які потребують вирішення. Серед них - необхідність швидкого отримання кількісної інформації про бактерії з високою ефективністю виявлення, чутливістю та специфічністю, діючи в межах розумного бюджету та оптимально використання допоміжних інструментів, такі як багатовимірні статистика. З аналітичної точки зору, отримання точних і чутливих показань є функцією як посилення сигналу, так і зменшення фону, що, у свою чергу, залежить від підходу, який використовується для ідентифікації та кількісного визначення бактерій [37].

Зважаючи на це пошуку в даному напрямку проводяться різними дослідниками, так Т. Tominaga [38] було розроблено методику виявлення *Klebsiella* за допомогою швидких тестів (LFTS). Незважаючи на те, що дане дослідження проводиться протягом 15 хв та не потребує спеціального обладнання, однак воно не дозволяло визначити кількість мікроорганізмів у зразку, а технологічні хиби можуть знизити точність випробування.

Досягнення надійної селективності є набагато складнішим завданням; тому для вирішення цього завдання розробляються нові та/або хімічно передові матеріали [39]. В даний час найчастіше використовуються каталітичні та афінні біосенсори для визначення біологічно активних сполук, які присутні в біологічних зразки [40]. Серед різних типів біосенсорних

перетворювачів виділяють оптичні компактні, портативні та високоточні пристрої. Наразі оптичні перетворювачі успішно використовуються для детекції поверхневого-плазмонного резонансу, поверхнево-розширеної Раманівській спектроскопії (SERS), відбиття та фотолюмінесценція (ФЛ) [41]. Серед оптичних перетворювачів біосенсори на основі ФЛ вважається одним із найперспективніших підходів, однак залишається невирішеними питання стабільності, ефективності та екологічності цих перетворювачів [42]. Зміна сигналу ФЛ (наприклад, відносна інтенсивність ФЛ, форма кривої ФЛ) напівпровідників, функція концентрації аналіту, можуть бути використані, як індикатор для виявлення цільових молекул зондів. ФЛ напівпровідників дуже чутлива до невеликих змін їх поверхні (наприклад, поглинання молекул на поверхні), що дозволяє розрізняти зміни концентрації аналіту [43]. Одна з можливих оптичних конфігурацій, яка використовується в конструкції біосенсорів (імуносенсорів), які призначені для визначення специфічної взаємодії антигену та антитіла, є використання явища повного внутрішнього відбиття [44]. Це робить можливим моніторинг іммобілізації біомолекул на поверхнях та їх специфічної взаємодії з біомолекулами в непрозорих середовищах [45]. Застосування скляної призми у якості оптичного елемента для отримання внутрішнього відбиття забезпечує можливість для вивчення модифікації поверхні або взаємодії антиген-антитіло [46].

Завдяки останнім технологічним досягненням існує значна зацікавленість до застосування тонких плівок на основі оксиду цинку (ZnO). Тонкі плівки та наноламінати на основі ZnO можна наносити різними методами [47]. Вони є біосумісними, нетоксичними та хімічно стабільними [48]. Висока ізоелектрична точка ZnO також використовується для іммобілізації білків з нижчими ізоелектричними точками шляхом утворення електростатичних взаємодій [49]. Крім того, наноматеріали на основі ZnO демонструють контрольовану змочуваність, що дозволяє зменшити об'єм зразка, швидкість відповіді, підвищену чутливість і співвідношення сигнал/шум під час розробки біосенсорів [50].

Раніше повідомлялося про застосування наночастинок ZnO для виявлення збудників інфекційних хвороб у тварин [51]. Є повідомлення про застосування біосенсорів на основі ZnO для виявлення сальмонел [52]. Хороші результати були досягнуті для виявлення специфічних антигенів у межах зміни фотолюмінесценції ZnO. Біоселективний шар формувався антитілами, прикріпленими до поверхні ZnO.

Наноструктурований оксид цинку (ZnO) є одним із найпривабливіших матеріалів для оптичних біосенсорів завдяки високій площі активної поверхні, сильній фотолюмінесценції при кімнатній температурі в діапазоні UV/VIS [53] та високій ізоелектричній здатності [54]. Останні відкриття показують, що морфологія і структурні властивості ZnO є вирішальними для ефективного використання біосенсорів [55]. Порівняльний аналіз поверхні ZnO з різною топографією (наночастинки (НЧ), нанострижні (НР), нанолисти (НС) та нанопромені (NBs)) на процес адсорбції білків показали, що 1D наноструктури ZnO забезпечували більшу кількість сайтів поверхневої адсорбції [56]. Таким чином, щоб підвищити чутливість біосенсорів на основі ZnO, потрібне високе відношення поверхні до об'єму, таке як присутнє в 1D-структурі. Нещодавно було запропоновано новий підхід до отримання 1D ZnO наноструктур з високою поверхневою архітектурою.

Неорганічно-органічні композитні наноматеріали «ядро-оболонка» належать до нового класу матеріалів із передовими оптичними, електричними, електрохімічними та чутливими властивостями [57]. Деякі з цих матеріалів демонструють вдосконалений оптичний сигнал, нові піки фотолюмінесценції і хорошу біосумісність [58].

Серед різних наноматеріалів комбінація ZnO і полідофаміну (PDA) демонструє хороші перспективи для біомедичних [59] і сенсорних застосувань [60]. Функціональні покриття можуть бути нанесені на поверхню ZnO для формування наноструктур з серцевинною оболонкою. Функціональні полімери (поліанілін (PANI), полідопамін (PDA) тощо) та наночастинки Au можуть покращувати оптичні та функціональні властивості ядра ZnO за

рахунок утворення функціональних груп (-NH₂, COOH- групи) на їх поверхні в діапазонах поглинання 420-470 нм і 540-660 нм [61]. Функціональні покриття змінюють початкові оптичні властивості ядра ZnO. Полідопамін є добре відомим біосумісним полімером [62]. PDA можна наносити практично на будь-який тип твердої поверхні, включаючи кераміку, метали, оксиди металів та полімери [63]. Хоча фізична структура PDA остаточно не вивчена, полідопамін широко застосовується в тому числі і у складі електрохімічних сенсорів та біосенсорів. У сенсорах полідопамін дуже часто використовується, як зв'язуючий агент, що покращує характеристики розроблених сенсорів. Наприклад, спектри поглинання, спектри фотолюмінесценції, спектри Рамана та FTIR ZnO змінювалися завдяки взаємодії з Au, PANI та PDA та утворенням р-n-переходу або гетеропереходу на межі між ядром ZnO та функціональною оболонкою [64]. Поверхнева взаємодія між функціональними покриттями та адсорбованими молекулами впливає на електронні та оптичні властивості ядра ZnO [65]. ZnO-Au, ZnO-PDA та ZnO-PANI широко використовуються, як поверхні для плазмонно-резонансних та електрохімічних біосенсорних платформ [66]. Плівкові електроди з нанопористої плівки з самопідтримкою після функціоналізації PDA мали більшу площу поверхні та були використані при розробці сенсорів для визначення H₂O₂ та дофаміну [67]. Повідомлялось про фотоіндуковані УФ-світлом процеси, що відбуваються на інтерфейсі ZnO-PDA, та продемонстровано вплив PDA на деякі оптичні властивості сформованого композиту ZnO-PDA. Показано комплексне моделювання процесів на інтерфейсі ZnO-PDA та вплив шару PDA на інтенсивність фотолюмінесценції, щільність дефектів та квантову ефективність у наноструктурах на основі ZnO-PDA [68]. Визначено, що зміни сигналу фотолюмінесценції ZnO-PDA, такі як зміна спектральних особливостей фотолюмінесценції, збільшення/зменшення її максимумів за рахунок гасіння випромінювання, спостерігаються після адсорбції полілактону та впливають на утворені шари PDA, які були сформовані за допомогою різних концентрацій PDA [68]. Таким чином, завдяки специфічним поверхневим властивостям PDA

та оптичним властивостям ZnO, нанокompозити ZnO-PDA мають великий потенціал для застосування в розробці оптичних сенсорів. Вони мають гарну чутливість і вибірковість по відношенню до молекул-мішеней. Однак, жодних досліджень, щодо застосування цих наноструктур для створення біосенсорів, які ґрунтуються на виявленні фотолюмінесценції не проводили. Крім того, відсутність повідомлень про імунні біосенсори для виявлення *K. pneumoniae* відкриває нові перспективи для створення ефективною біосенсорної платформи із цих композитних наноматеріалів.

Вирішення питань, які стосуються механізмів фотолюмінесценції у ZnO та можливості її використання для виявлення *K.pneumoniae*, дозволить зробити вагомий крок у створенні оптичних біосенсорів для детекції клебсієл, які б відповідали цим вимогам.

2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Матеріали

N-(3-амінопропіл)триетоксисилан (APTES, 99%), 2-бутанол, метанол, етанол, глютар-альдегід, цинк ацетат, гексаметилентетрамін були отримані від Sigma-Aldrich (Німеччина). Бичачий сироватковий альбумін (BSA, фракція V) було отримано від Carl Roth GmbH&Co (Карлсруе, Німеччина). Таблетки з фосфатно-сольовим буфером (PBS) (0,14 М NaCl, 0,0027 М KCl, 0,01 М фосфатний буфер рН 7,4) від AB Medicago (Швеція). Усі хімічні речовини були аналітичного класу або краще. Усі водні розчини готували у воді MiQ (провідність менше 1 мкСм/см), очищений DEMIWA rosa 5 (WATEK, Чехія). Антитіла мічені FITC та специфічні поліклональні антитіла до *K.pneumoniae* було придбано в Abcam (США).

2.2 Вивчення поширеності та біологічних властивостей клінічних ізолятів *K. pneumoniae*

Протягом 2019–2021 років ми дослідили 300 зразків, отриманих від пацієнтів із отоларингологічною патологією. Пацієнти були комплексно обстежені відповідно до стандартів надання медичної допомоги. Для визначення мікробного профілю досліджуваних біотопів проводили мікробіологічне дослідження мазків з носоглотки в бактеріологічній лабораторії Сумського державного університету. Видовий склад і популяційні рівні мікрофлори в уражених тканинах визначали з використанням класичних методів виділення та ідентифікації мікроорганізмів за визначником Берджи. Підрахунок кількості бактерій у досліджуваному матеріалі здійснювали шляхом секторних посівів за Голдом, з подальшим підрахунком кількості колоній.

Оцінку чутливості мікроорганізмів до антибіотиків проводили з використанням диско-дифузійного методу на агарі Мюллера-Хінтона відповідно. Чутливість до основних груп антибіотиків, а саме до інгібіторів β -лактамаз, карбапенемів, макролідів, оксазолідинонів та інших, оцінювали у відповідності до рекомендацій Національного комітету клінічних лабораторних стандартів. Мультирезистентні штами відбирались в подальшому для оцінки впливу наночастинок срібла на життєздатність *K.pneumoniae* та здатність утворювати біоплівки.

Для визначення чутливості виділених мікроорганізмів до НЧ Ag використовували наночастишки з вихідною концентрацією 3 г/л. Наночастишки були кубоподібної форми, розміром від 80 нм до 800 нм, на яких були фіксовані менші наночастишки срібла сферичної форми. Антимікробну активність наночастинок срібла щодо штамів *K.pneumoniae* досліджували з визначенням мінімальної інгібуючої концентрації (МІК), динаміки відмирання, інгібування утворення біоплівки та впливу на життєздатність біоплівки.

МІК оцінювали за допомогою методу мікророзведеннь у бульйоні. Спочатку готували серійні розведення НЧ Ag, і 20 мкл кожної концентрації вносили в 96-лунковий планшет з полістиролу. Інокулят із свіжих культур *K.pneumoniae* готували в бульйоні Мюллера-Хінтона в концентрації 5×10^5 КУО/мл. Потім до розчину срібла додавали 180 мкл бактеріальної суспензії для досягнення бажаних концентрацій срібла (0,31 мкг/мл – 40 мкг/мл). Планшети інкубували при 37°C протягом 24 год. Дослідження проводили у трьох повторях. МІС була найнижчою концентрацією НЧ Ag, що повністю пригнічувала візуальний ріст мікробів.

Залежну від часу динаміку відмирання бактерій визначали при концентрації бактерій 5×10^5 КУО/мл і концентрації НЧ Ag, що дорівнювала МІК. Інкубація бактерій проводилась у бульйоні Мюллера-Хінтона, що містив НЧ Ag, при 37 °C. Через 1, 3, 6, 12, 24 години після початку інкубації аліквоти (10 мкл) з кожної лунки висівались на агар Мюллера-Хінтона з використанням

методу секторних посівів. Середовище інкубувалось при 37 °C у продовж доби, після чого підраховували сформовані колонії.

Вплив НЧ Ag на утворенні біоплівки було встановлено шляхом оцінки коефіцієнта зменшення мікробної маси, утвореної біоплівки, з використанням фарбування генціанвіолетом. Попередньо бактерії інкубували в 96-лункових мікротитраційних планшетах, що містили розчини НЧ Ag при половинній і повній МІК протягом 24 годин. Потім культуральну рідину забирали, та промивали планшет для видалення неадгезованих клітин, а масу біоплівки, прикріплену до лунок, фарбували 0,1% генціановим фіолетовим (30 хвилин). Після цього барвник видаляли, лунки промивали тричі фізрозчином, просушували та заливали 95% розчином етанолу для вимавання зв'язаного клітинами генціанвіолету. Спиртовий розчин барвника переносили в новий планшет та вимірювали оптичну густину розчиненого кристалічного фіолетового за допомогою мікропланшетного фотометра Thermo Scientific Multiscan FC ESW 1.01.16 (довжина хвилі 595 нм). Усі тести проводили тричі. Коефіцієнт зменшення мікробної біомаси розраховували, як пропорцію оптичної густини досліджуваного зразка до оптичної густини контролю у відсотковому еквіваленті.

Для дослідження впливу наночастинок срібла на попередньо сформовані біоплівки мікроорганізми спочатку інкубували протягом різних інтервалів часу (48 і 120 годин). Потім у лунки додавали НЧ Ag у концентраціях 10, 20, 30 та 40 мкг/мл та інкубували протягом 24 год. Потім проводили оцінку життєздатності мікроорганізмів за допомогою колориметричного аналізу редукції Alamar blue таким чином: в планшети після інкубування вносили розчин барвника Alamar blue в поживному середовищі з подальшим інкубуванням упродовж 2-4 год при 37 °C у темряві. На наступному етапі середовище переносили на інший 96-лунковий планшет, та вимірювали поглинання за допомогою зчитувача для планшетів Multiscan FC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, США) на довжинах хвиль 570 та 595

нм. Відсоток життєздатності клітин розраховували за формулою наданою виробником.

Дію НЧ Ag на будову біоплівки оцінювали за допомогою SEM. Для оформлення біоплівки скло занурювали в посів на *K.pneumonia* в бульйоні Мюллера-Хінтона та інкубували протягом 0, 48, 120 год. Після цього додавали НЧ Ag у концентраціях 10, 20, 30 і 40 мкг/мл та інкубували протягом 24 год. Потім скельця фіксували в 2,5% глутарового альдегіду, промивали в буфері, та зневоднювали шляхом занурення у серію розчинів 50, 70, 90 і 100% етанолу. Скло покривали сріблом і досліджували за допомогою скануючої електронної мікроскопії (SEM, Hitachi S-3000N).

2.3 Синтез та характеристика морфологічної структури, оптичних та електронних властивостей наноструктур ZnO

Скляні пластинки (0,5x0,5 мм) очищали шляхом послідовної обробки ультразвуком деіонізованою водою та етанолом із сушінням перед остаточним використанням. Для видалення органічних забруднень проводили кисневу плазмову обробку протягом 15 хв. Шар із наночастинок ZnO було створено на склі шляхом крапельного нанесення 20 мкл цинку ацетату $Zn(CH_3COO)_2$ 5 мМ у розчині 2-бутанолу та наступного відпалювання при 350 °C протягом 1 год. Потім скельця із нанесеними наночастинами ZnO повторно обробляли плазмо-електролітичною оксидацією (75 W, 5 хвилин, O₂ 0.2 mbar). У кінці зразки промивали деіонізованою водою та сушили при кімнатній температурі. Після цього шар полідопаміну (PDA) був нанесений на скляну поверхню. Схематичне зображення формування первинного шару ZnO-PDA відображено на рисунку 2.1.

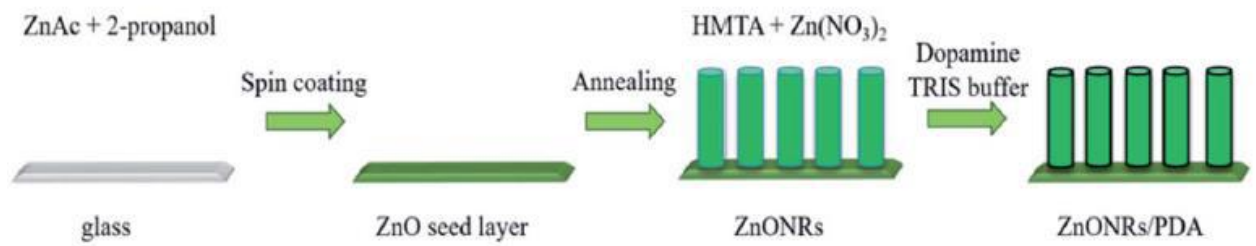


Рисунок 2.1 – Схематичне зображення формування первинного шару ZnO-PDA із застосуванням гідродермального методу

На наступному етапі проводили силінізацію скелець. Для цього 1% розчин APTES наносили на скельце в умовах інертної атмосфери в скляній чашці Петрі. Потім чашку Петрі накривали та ізолювали від контакту з повітрям термостійкою ізоляційною стрічкою. Накриту чашку Петрі поміщали в піч і залишали на ніч при 80°C. Після цього модифікований шар наноламінітів промивали розчинами метанолу, етанолу, дистильованою водою, сушили у печі при 110°C упродовж 2 годин. Таким чином, поверхня наноламінітів ZnO була функціоналізована аміногрупами, які необхідні для ковалентної іммобілізації специфічних антитіл та BSA.

З метою ковалентної іммобілізації специфічних антитіл скельця з наноламінатами ZnO були оброблені 25% розчином глутар альдегіду упродовж ночі при температурі 40°C. У чашці Петрі було розміщено фільтрувальний папір, змочений водою. Потім на скельце наносили 30 мкл 0,05% розчину специфічних антитіл до *K. pneumoniae*, інкубували 1 годину та промивали розчином фосфатного буферу тричі, висушували при кімнатній температурі.

Для блокування неспецифічних сайтів на поверхні скелець із ZnO на наступному етапі на скельце наносили 30 мкл BSA у концентрації 0,1 мг/мл та витримували 30 хвилин. Потім промивали розчином фосфатного буферу тричі, висушували при кімнатній температурі. На останньому етапі на скельце наносили суспензію лізату *K. pneumoniae* у концентрації 10^3 - 10^8 КУО/мл.

2.4 Аналіз структурної та поверхневої характеристики ZnONRs

Для структурної та поверхневої характеристики ZnONRs–PDA модифікованої поверхні використовували XRD (дифрактометр PANalytical Xpert-PRO оснащений детектором Pixel 3D з використанням Cu K α , фільтрованого Ni випромінювання 45 кВ/40 мА), SEM (Zeiss Evo HD15 SEM від Zeiss Ltd (Єна, Німеччина)), HR-TEM (JEOL ARM 200F) з високою роздільною здатністю просвічуючий електронний мікроскоп (200 кВ) з детектором EDX і EELS, вимірюванням раманівського розсіювання, виконано за допомогою мікро-Раман-спектрометра Renishaw, оснащеного конфокальним мікроскопом (Leica) та FTIR-спектроскопією, за допомогою спектрофотометра FTIR-ATR «Frontier» від Перкін Елмер (Уолтем, США).

Оптичні властивості зразків досліджували за допомогою спектроскопії дифузного відбивання з використанням волоконного спектрометра HR2000+ від Ocean Optics (Данідін, США). Низькотемпературні властивості фотолюмінісценції досліджували за допомогою саморобної установки. Дослідний зразок вакуумної камери з кварцовим вікном було зібрано із пластин поліметилметакрилату за допомогою мідного тримача. Рідкий азот вводився у порожнину мідного тримача. Тримач був оснащений термопарою типу К, який контактував з поверхнею зразка. Було забезпечено автоматичний контроль температури в камері з точністю до 1 К. Вимірювання проводили з крок 5 К. ФЛ збуджували Nd:YAG-лазером (266 нм, вихідна потужність 29 мВт), силу відгуку вимірювали спектрометром Horiba iHR320 у діапазоні 77–300 тис.

2.5 Дослідження оптичних властивостей наноструктур ZnONRs–PDA після нанесення антитіл, BSA, антигенів

Для верифікації фіксації специфічних антитіл до поверхні наноструктур ZnONRs–PDA проводили перевірку осадження флюоресціюючих антитіл із

використанням Nikon Eclipse TI fluorescence Microscope (Nikon, Japan) відповідно до наступної методики. На скельця із нанесеними попередньо ZnONRs–PDA наносили розчин APTES та глутаральдегідом, витримували у вологій камері, потім наносили 30 мкл антитіл мічених FITC у концентрації 5, 10, 20, 50, 100 мкл/мл та витримували 1 годину. Після цього скельця промивали, висушували та досліджували за допомогою люмінесцентного мікроскопа.

3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Поширеність та біологічні властивості клінічних ізолятів *K. pneumoniae*

Досліджено 300 зразків, отриманих від пацієнтів з оториноларингологічною патологією, та виділено 41 штамп *K.pneumoniae* (13,7%). Мікроорганізми були виділено переважно в мікробних асоціаціях (97,5% випадків) з грампозитивними (*Staphylococcus spp.*, *S.pyogenes*), грамнегативними (*Enterobacterium spp.*, *P.aeruginosa*) бактеріями та *C.albicans*. Наші дані щодо поширеності збудника в популяції подібні до результатів, наведених у інших роботах [70].

Згідно з профілями стійкості до антибіотиків (рис. 3.1), усі досліджувані штами *K.pneumoniae* були чутливими до левофлоксацину та іміпенему. Найбільша кількість штамів *K.pneumoniae* була стійкою до азитроміцину (9,1%). Аналіз антибіотикорезистентного профілю показав, що 73,2% ізолятів були стійкими до п'яти і більше антибіотиків, а майже чверть штамів – до карбапенему (іміпенему).

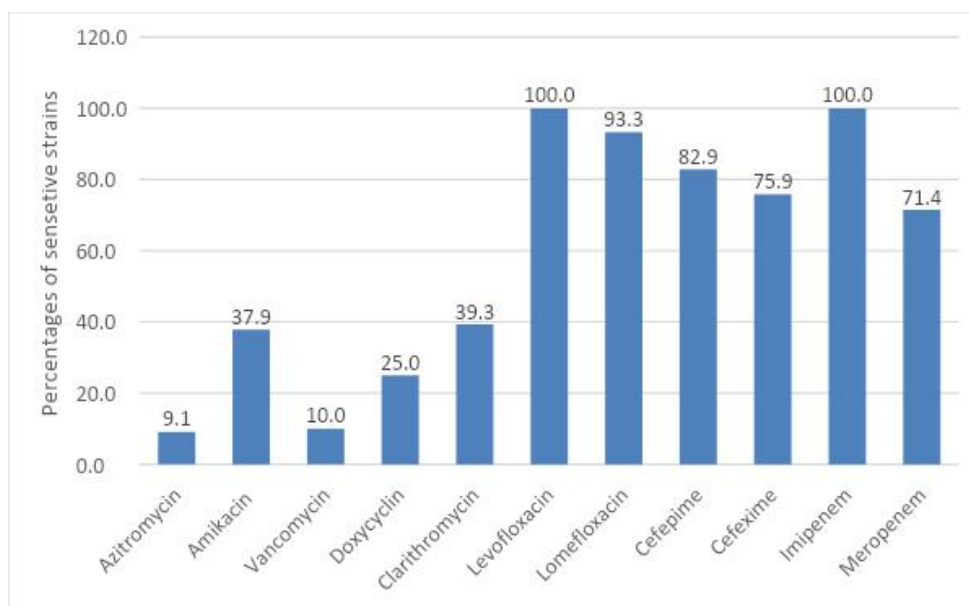


Рисунок 3.1 – Профіль антибіотикорезистентності *K.pneumoniae*

Три чверті ізолятів були мультирезистентними. Гера Нірваті та інші [71] виділяли дещо більшу кількість *K.pneumoniae* (17,36%), але був нижчий рівень стійкості до антибіотиків (54,49%).

Оцінка антимікробної активності НЧ Ag щодо досліджуваних штамів показала, що МІК варіювався від 1,25 мкг/мл до 2,5 мкг/мл. Підвищення концентрації НЧ Ag в 2 рази викликало повне знищення мікробів. Динаміка відмирання *K.pneumoniae* при концентрації Ag в 1 МІК демонструє поступове зниження кількості життєздатних клітин протягом експериментального часу. Кількість бактеріальних клітин досягає 0 log₁₀ КУО/мл до 3 год інкубації (рис. 3.2).

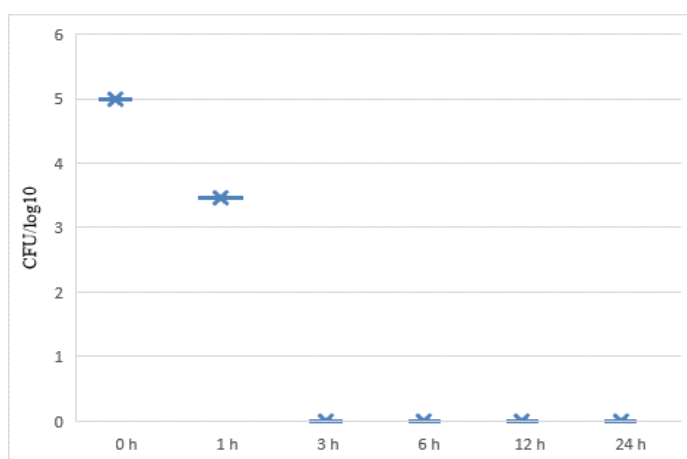


Рисунок 3.2 – Час залежна антибактеріальна активність наночастинок срібла проти *K. pneumoniae*

Дослідження антибіоплівкового ефекту НЧ Ag показало їх незначну інгібуючу дію на утворення біоплівки на початкових етапах. Ми також виявили руйнування зрілої (2 дні) біоплівки при обробці НЧ Ag у концентраціях 20-40 мкг/мл. НЧ Ag, використані в нашому експерименті, продемонстрували вищу ефективність, ніж було повідомлено G. Rajivgandhiat [72], який описує антибіоплівковий ефект наночастинок срібла проти *K.pneumonia* при концентрації 50-100 мкг/мл.

Оцінка здатності НЧ Ag пригнічувати адгезію та утворення біоплівки при концентраціях *K.pneumoniae* 0,5 та 1,0 МІК на початковому етапі показала

незначне зменшення маси біоплівки та кількості живих клітин порівняно з необробленими бактеріями (рис. 3.3).

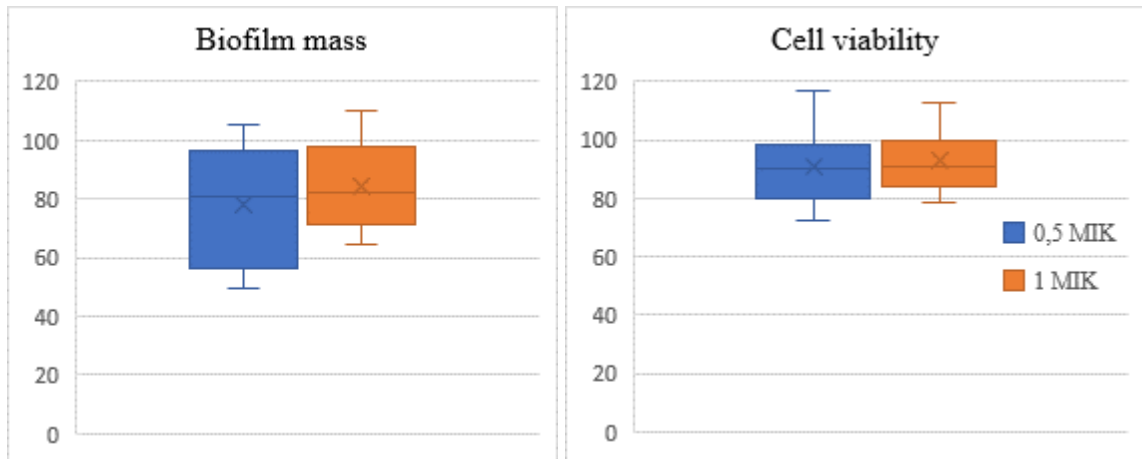


Рисунок 3.3 – Відсоток редукції *K.pneumoniae* біоплівкової маси та живих клітин після обробки НЧ Ag в концентрації 0.5 та 1.0 МІК на початковій стадії

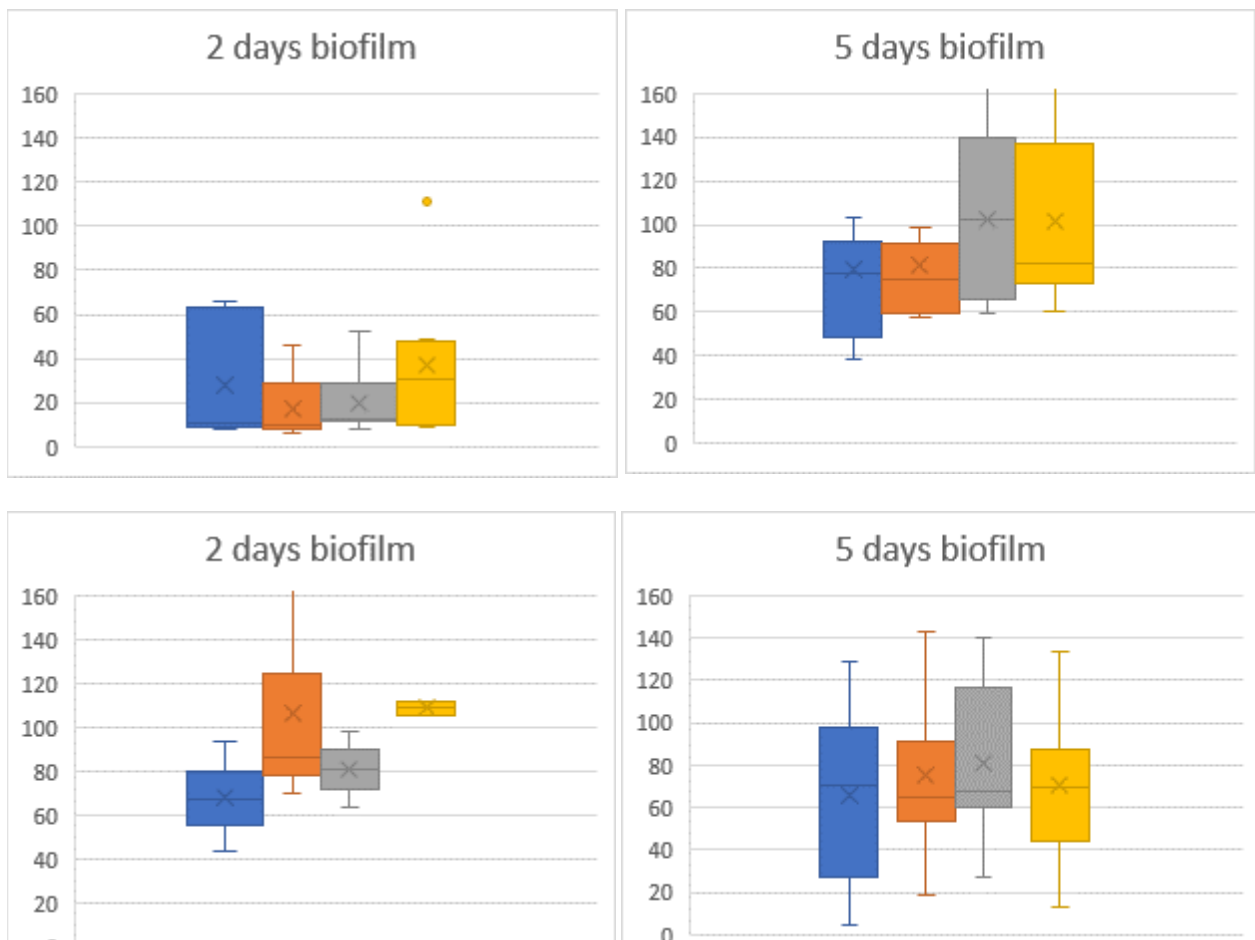


Рисунок 3.4 – Відсоток редукції *K.pneumoniae* біоплівкової маси та живих клітин після обробки зрілої (2-х та 5-ти денної) біоплівки

Ефективність обробки НЧ Ag зрілої біоплівки *K.pneumoniae* залежала від віку біоплівки (рис.3.4). Встановлено зменшення маси 2-х денної біоплівки в середньому на 60 % при концентрації 20-40 мкг/мл. Проте не було ніяких відмінностей у масі біоплівки *K.pneumoniae* та життєздатності клітин на п'ятиденній біоплівці.

Відомо, що НЧ Ag взаємодіють з мікробною поверхнею і можуть призвести до порушення клітинної мембрани. Мікрофотографії СЕМ (рис. 3.5) початкової стадії формування біоплівки в контрольній групі показують, що бактерії щільно прилягають один до одного. Спостереження бактеріальних кластерів на біоплівці другого та п'ятого днів показало, що бактерії пов'язані одна з одною фібрилярною мережею, що складається з великої кількості довгих, гнучких ворсинок, які тягнулися на кілька мікрон від бактерій.

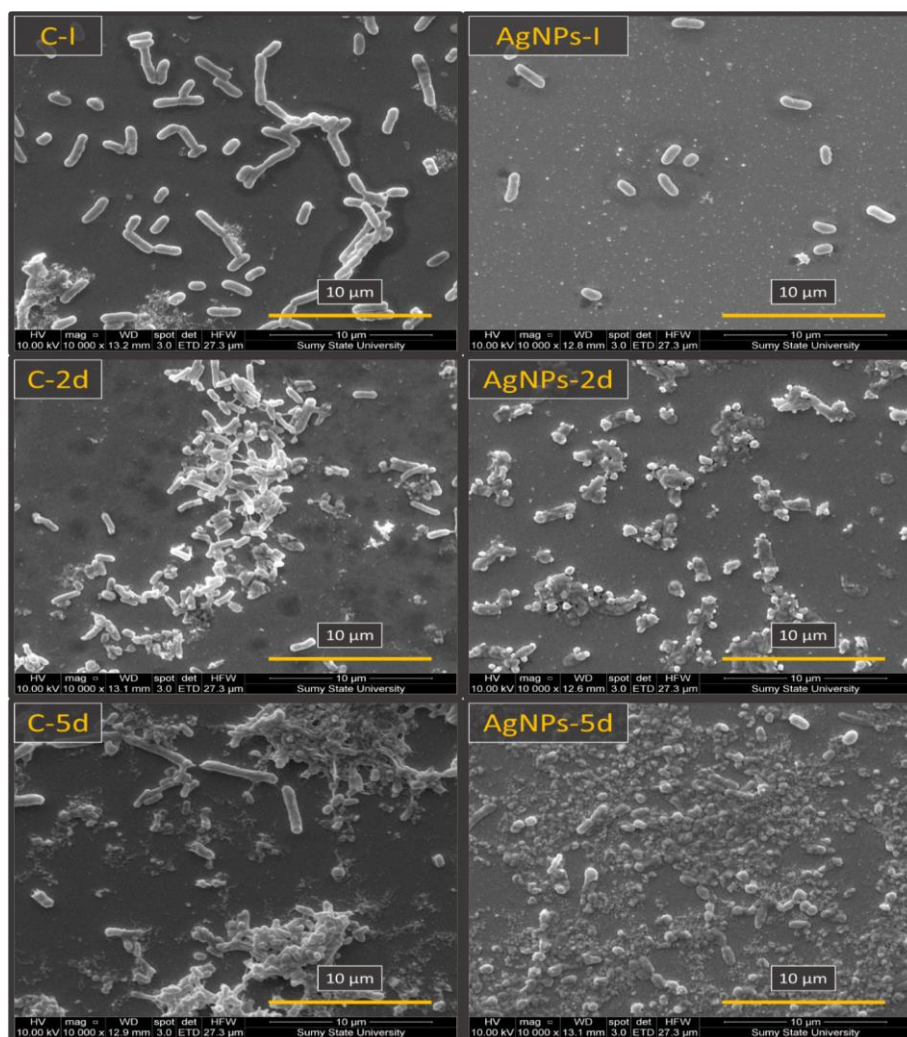


Рисунок 3.5 – Скануюча електронна мікроскопія біоплівок *K. pneumoniae* biofilms сформованих на склі упродовж різних інтервалів попекреднього

культивування без та після обробки наночастинками срібла (К – без обробки сріблом, AgNPs – після обробки сріблом 20 $\mu\text{g/ml}$)

Отримані результати свідчать про значне зменшення розміру біоплівки на початковій стадії прикріплення. У разі первинного спільного культивування НЧ Ag і *K.pneumoniae* ми виявили лише окремі бактеріальні клітини, прикріплені до поверхні. Ці дані показують, що НЧ Ag знижують здатність утворювати біоплівку. Це може бути викликане пригніченням розмноження бактерій або адгезії бактерій.

На зображеннях дводенної біоплівки виявлено лізис бактеріальних клітин після спільного культивування з НЧ Ag. У присутності НЧ Ag порушувалася цілісність мембрани *K.pneumoniae*. СЕМ-аналіз виявив збереження тривимірної структури у випадку п'ятиденної біоплівки після спільного культивування з НЧ Ag.

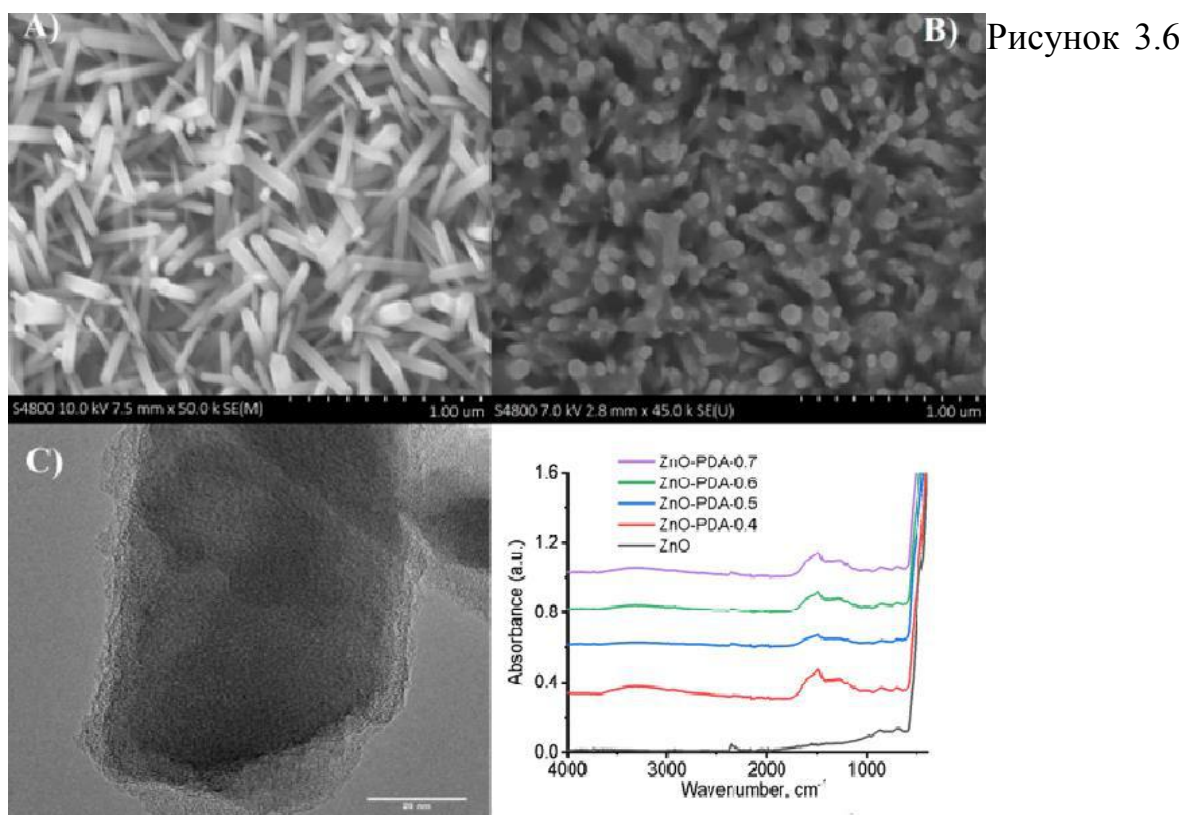
Штами мікроорганізмів, які були мультирезистентними, були відібрані для подальшого використання у якості антигенних зразків для оцінювання специфічності біоселективного шару сенсорів.

3.2 Морфологічна характеристика, оптичні та електронні властивості наноструктур ZnO модифікованих PDA

Структура та морфологія наностержнів ZnO-PDA, нанесених на поверхню скла представлені на рисунку 3.6. Середні розміри наностержнів становили 60 нм в діаметрі і 800 нм в довжину (рис. 3.6 А). Як видно на зображенні PDA утворив шар над наностержнями ZnO та поміж ними (сірі візерунки на рисунку 3.6 В). Вимірювання TEM (рисунку 3.6 С) ілюструють утворення шару PDA товщиною 7 нм над ZnO.

Інфрачервона спектроскопія з перетворенням Фур'є (FTIR) була використана для характеристики поверхні ZnO-PDA (рис 3.6 D). Встановлено, що ZnO-PDA нанокмпозитні структури характеризувались піками, розташованими на 1288 cm^{-1} , 1492 cm^{-1} , 1607 cm^{-1} , і 3362 cm^{-1} , що

відповідало C–O, C=N або/і C=C, C=O та –OH або/і моди коливань N–H відповідно (рис. 3.6 D). Ці режими узгоджуються з попередніми даними для PDA, які спостерігали Hongyong Luo et al. [76]



– A) SEM зображення ZnO-NRs; (B) SEM зображення ZnO-PDA нанокompозиту; (C) TEM зображення ZnO-PDA нанокompозиту, (D) FTIR спектри ZnO та ZnO-PDA нанокompозиту

У згаданому дослідженні, спектри FTIR були обрані для дослідження взаємодій зв'язування між полідопаміновою сферою (PDS) і наночастинок срібла (AgNPs). Характерні піки PDS (1292 см⁻¹, 1512 см⁻¹, 1627 см⁻¹, і 3379 см⁻¹) корелювали з піками, які спостерігалися для ZnO/PDA в нашому дослідженні. Різниця положень піків (4–20 см⁻¹), що спостерігається у зазначеному дослідженні та нашому, може бути пов'язаною з різними протоколами синтезу полідопаміну.

Структурні властивості отриманих матеріалів охарактеризовано за допомогою дифракції рентгенівських променів (рис. 3.7).

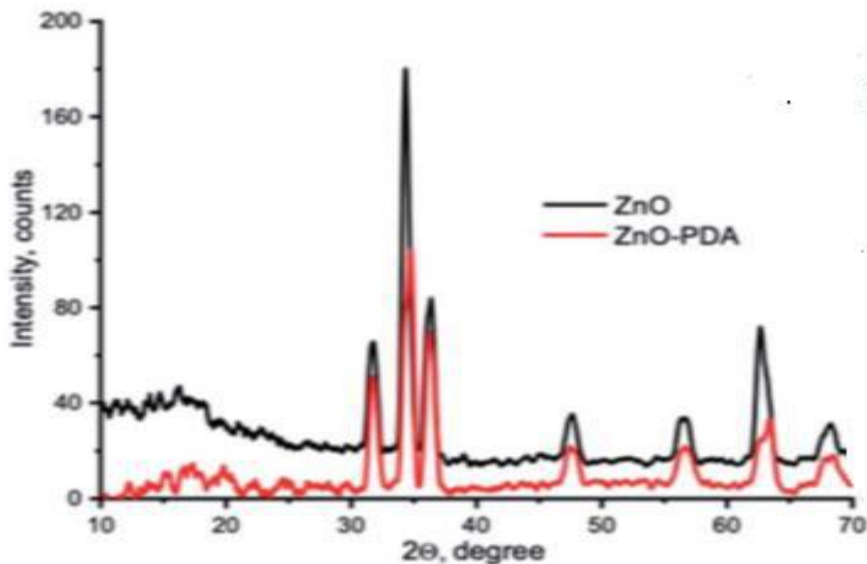


Рисунок 3.7 –XRD синтезованих ZnO та ZnO PDA

На представленому малюнку піки дифрактограми розташовані на 31,7 , 34,3 , 36,5 , 47,6 , 56,5 , 62,5 і 68,3 були віднесені до ZnO вюрциту фаза.56 У XRD-спектрах ZnONRs/PDA немає значних змін кристалічності, та можна виявити після PDA покриття, що підтверджує придатність PDA для ефективного покриття наноповерхні.

ZnO/PDA містить активні хінонові групи, які можуть реагувати з аміногрупами. Зареєстрований новий пік відповідає коливальному режиму вигину C–O [74].

Морфологія та цілісність покриття PDA на ZnONR було досліджено TEM (рис. 3.8 а і б). Ці аналізи виявили, що ZnONR були рівномірно покриті шаром PDA із середньою товщиною менше 5 нм. Аналіз спектроскопії втрат енергії (EELS) на ZnONR, доведено наявність азоту, вуглецю та кисню, про що свідчить утворення PDA в ZnONRs/PDA нанокompозиті і підтвердили однорідне покриття ZnONR. Крім того, оскільки немає видимих структурних змін або деградації ZnONR були дотримані, умови зберігання PDA більше не потребували оптимізації.

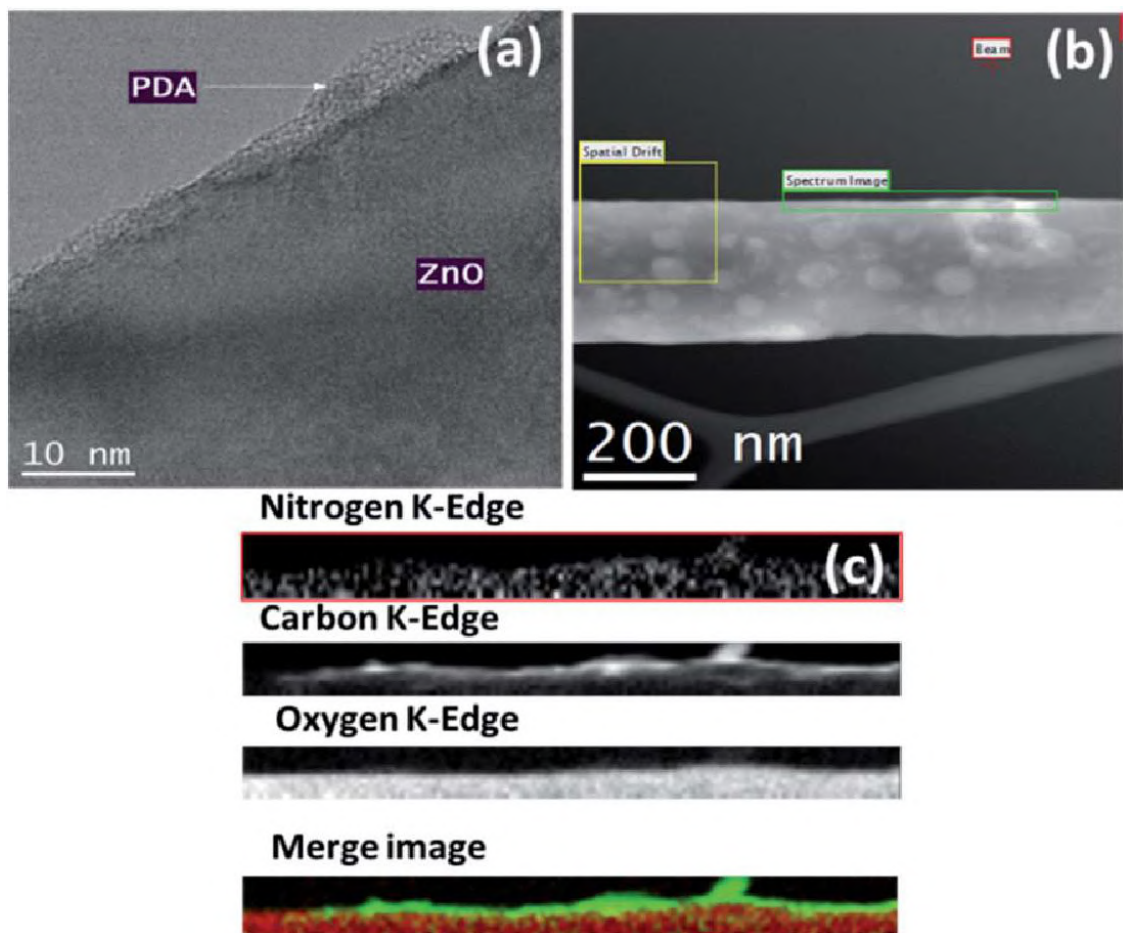


Рисунок 3.8 – TEM зображення ZnONRs/PDA (a) та (b); втрата енергії електронів

З метою визначення складу наноконкомпозитів, також застосовувалася спектроскопія раманівського сполучення. Раман спектри ZnONRs, PDA та ZnONRs–PDA наведені на рис. 3.9. Підготовлені ZnONR показали піки при 333, 376 і 435 cm^{-1} , пов'язані з E₂ – режим полярного оптичного фонона A₁(TO), і E₂ (висока) неполярна мода відповідно. Спостережуваний пік на 435 cm^{-1} (висока 2 режим) відповідає фазі вюрциту ZnO, як це також було підтверджено рентгенограмою. Цей режим пов'язаний з вібрацією атомів кисню в кристалічній решітці. Раман пік на рівні 586 cm^{-1} може бути пов'язаний зі структурними порушеннями (наприклад, як вакансії кисню, проміжний вузол Zn тощо). Спектр PDA показує два характерних піка: 1357 і 1576 cm^{-1} , відповідні ароматичним кільцям PDA (розтягування і деформація). Наноструктури ZnONRs–PDA показали піки при 466, 587, 954, 1214, 1386,

1596 см. Пік Рамана припадає на 1386 і 1596 см відповідають PDA і виникають з ароматичних C–N режиму розтягування індолової структури, та C вібрація ароматичного кільця, відповідно. Таким чином, результати підтверджують успішне осадження PDA на поверхню ZnONR.

Широкі піки на 466 см і 1596 см були розкручені у двох компонентах за допомогою лоренційського тінгу. Отримані піки показали наступні значення: 457 см, 482 см, 1525 см і 1596 см. Наявні піки – 1206 см, 1528 см і 1595 см, і 1386 см з PDA раманівськими модами, які стосуються C–OH або/і коливання C–O, C]C, C–N, N–H та C]O відповідно. Нарешті, пік при 457 см відноситься до ZnO, тоді як піки при 482 см і 954 см відповідають Zn–OH і O–H режим деформації поза площиною. Аналіз показав хорошу відповідність даних отриманих при Раман спектроскопії з результатами, отриманими при проведенні інших досліджень.

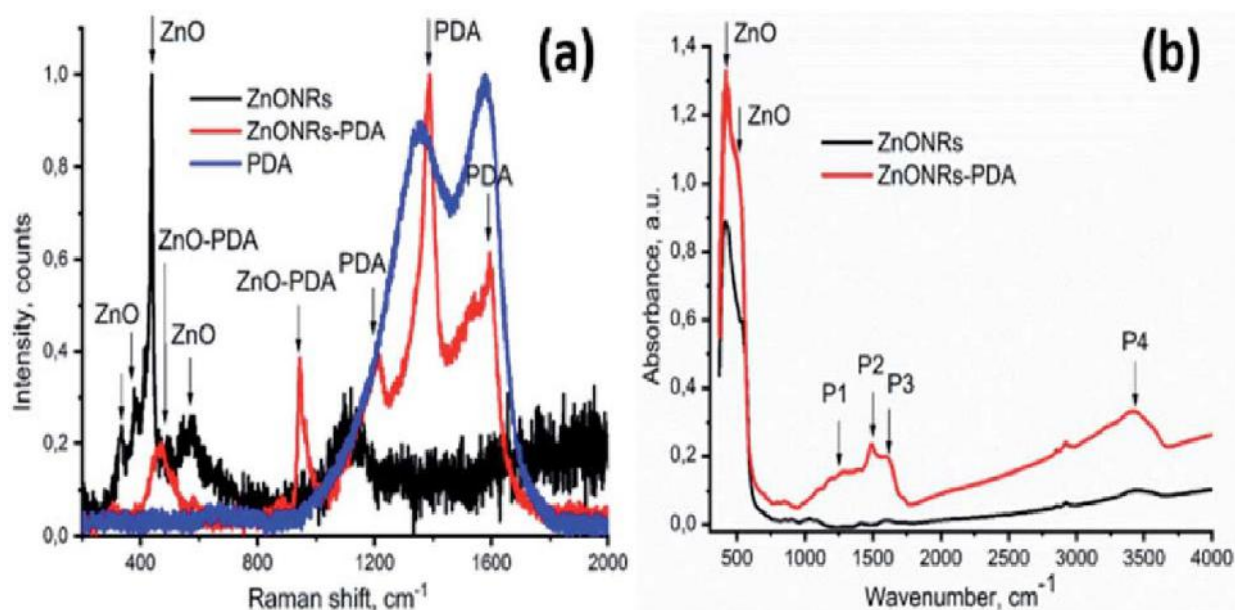


Рисунок 3.9 – Раман спектроскопія ZnONRs/PDA

Оптичні властивості нанокompatитів ZnO/PDA залишаються недостатньо вивченими. Через конформне покриття PDA поверх ZnONR, очікувались зміни екситонного та дефектного випромінювання фотолумінесценції ZnONR. Нами було допущено, що взаємодія ZnO–PDA може включати дефекти ZnO. Концентрація дефектів та їх тип впливають на

оптичні та електронні властивості ZnO, тому порівняння дефектних та екситонних параметрів в ZnONR і композитів ZnONR–PDA може допомогти з'ясувати механізми утворення композитів. Таким чином, аналіз властивостей фотолюмінісценції ZnONR і ZnONRs/PDA, є необхідним для повного розуміння цих механізмів. Дослідження фотолюмінісценції є простим методом для характеристики поверхневих дефектів. Крім того, випромінювання та збудження потужність дозволяє оцінити концентрацію дефектів і квантову ефективність. Спектри фотолюмінісценції при кімнатній температурі ZnONRs–PDA показали зниження інтенсивності та піковий зсув ZnO після осадження шару PDA (рис. 3.10 а).

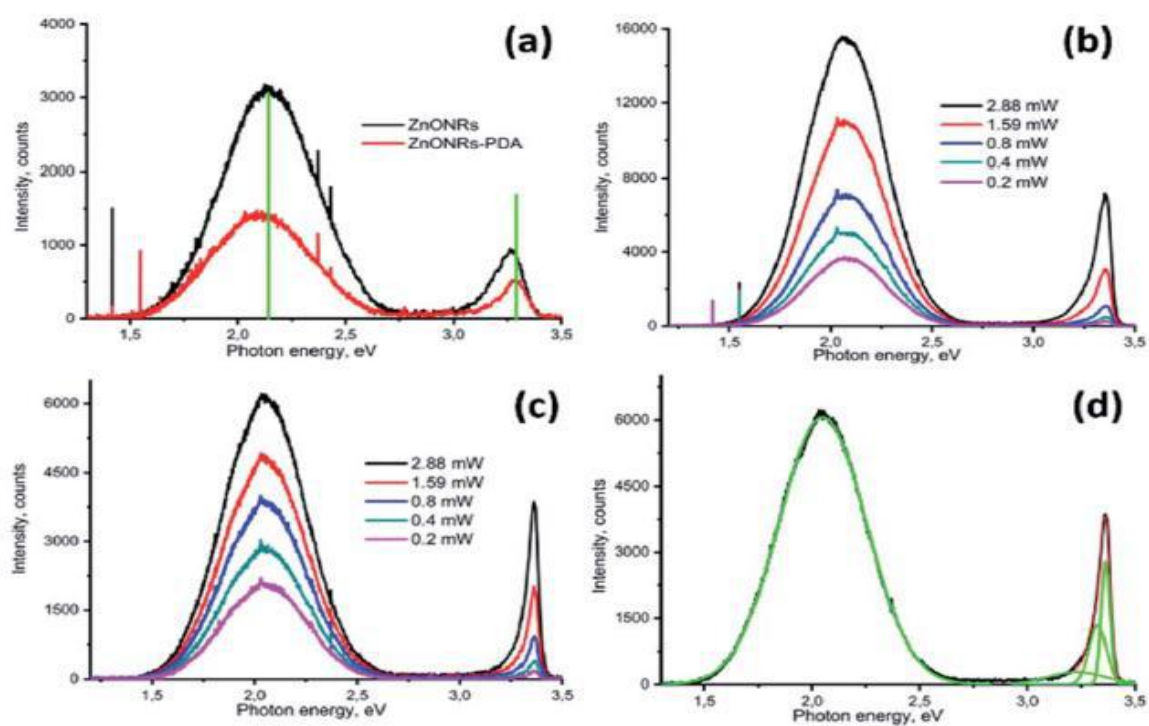


Рисунок 3.10 – Фотолюмінісцентні спектри ZnONRs та ZnONRs–PDA при кімнатній температурі (а); ZnONRs (b) ZnONRs–PDA (c) при 77 К, сила залежна; деконволюція фотолюмінісцентних спектрів ZnONRs–PDA (d).

Припускаємо два можливі механізми зміни спектру фотолюмінісценції ZnONR–PDA:

- оптичне поглинання шаром PDA

- зміна випромінювання параметри ZnO фотолюмінісценції (зниження концентрації центрів викиду, збільшення виснажливого шару тощо).

Показано кореляцію між часом осадження та товщиною шару PDA – за 24 години формувався шар PDA товщиною 70–100 нм. На основі розрахунку товщини шару PDA та оптичного поглинання можна припустити про 6–7% поглинання світла шаром PDA в ZnO NR–PDA наноструктурі. Це оптичне поглинання не пояснює різкого зменшення випромінювання фотолюмінісценції ZnONR–PDA та пікового зсуву. Тому зниження інтенсивності фотолюмінісценції після осадження PDA може пояснюватись зменшенням концентрації дефектів і зміною виснажуючого шару на межі розділу ZnO–PDA. Щоб аналізувати ці механізми, було проаналізовано низькотемпературні вимірювання фотолюмінісценції ZnONR та ZnONR–PDA.

Вплив потужності лазера збудження на випромінювання фотолюмінісценції наноструктури ZnONRs та ZnONRs–PDA при 77 К відображено на рис 3.10 б і в. Різної потужності збудження лазера досягалися використанням нейтральних фільтрів. Зниження збудження потужність призводила до зменшення інтенсивності фотолюмінісценції (рис. 3.10 б і в). Ультрафіолетова інтенсивність випромінювання зменшилася більш різко, порівняно з видимим випромінюванням. Це вказує на різний характер емісії. Раніше ми проводили аналіз спектрів фотолюмінісценції ZnO і розрахунки параметрів випромінювання (квантова ефективність і концентрація дефектів). Через складну поведінку ZnO емісійна деконволюція спектрів випромінювання на окремі потрібне піки випромінювання за допомогою функції Гаусса показала деконволюція спектру фотолюмінісценції ZnO–PDA. Піки, розташовані на 2,05, 3,27, 3,348, 3,368 еВ. Вершини, розташовані при 3,27–3,368 еВ і 2,05 еВ пов'язані з екситоном і дефектом випромінювання відповідно. Встановлено, що потужність збудження залежність інтегральної інтенсивності при 77 К виявилася сублінійною залежність для піків у видимому діапазоні та суперлайнера залежність для УФ-піків (див. таблицю S1, ESI†). Це відомо що дефекти в ZnO є джерелом носіїв заряду, заряду пастки

та емісійні центри фотолюмінесценції. Для спрощення розрахунків припустимо, що викидання тільки одне, а центр представлений у забороненій зоні ZnO та відсутність електронних і діркових пасток (рис. 3.11 а).

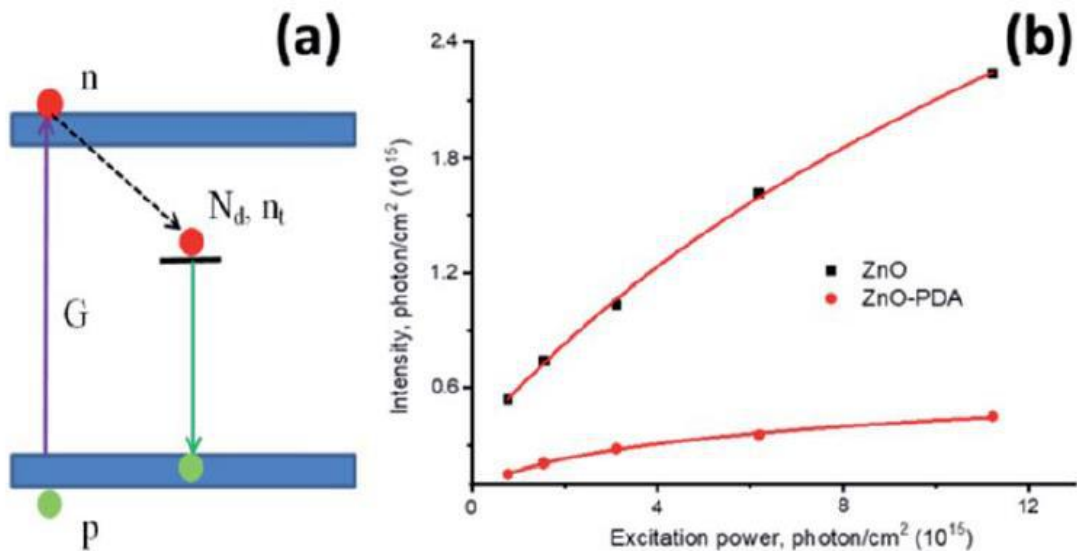


Рисунок 3.11 – Діаграма можливого випромінювального та невивпромінювального переносу електронів (а). Сила-залежна інтегрована інтенсивність ZnO та ZnOPDA (b)

Силіві залежності інтегральних інтенсивностей для ZnONR та ZnONRs–PDA, перенесені в фотон на см², показані в рис. 3.11 b. Побудова кривих дала наступні значення для концентрація дефектів і квантова ефективність: 1,5 10¹⁵ см³ і 0,28 і 1,2 10¹⁴ см³ і 0,12 для ZnONR і ZnONRs–PDA відповідно. Низькотемпературна фотолюмінесценції надає цінну інформацію про гасіння емісійного механізму системи. Температурна залежність фотолюмінесценції для ZnONRs та ZnONRs–PDA в інтервалі температур 77–300 К представлені на рис. 3.12 а і б. Два ефекти спостерігалися в ZnONR і ZnONR-PDA наноструктури: температурне гасіння ФЛ і зсув вершини. Підвищення температури призводило до червоного блиску піку ФЛ в УФ-області та синього відблиску видимого випромінювання.

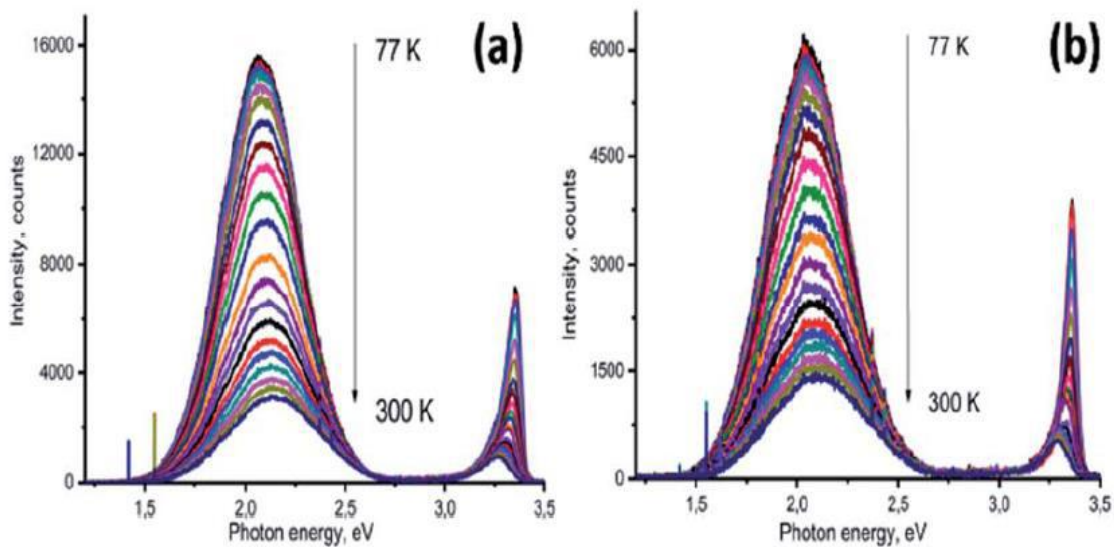


Рисунок 3.12 – Температурна залежність фотолумінесценції ZnO та ZnO/PDA.

Зміна положення піку УФ пов'язана з температурною залежністю ширини забороненої зони та переходів ZnO між зв'язаними і вільними екситонами. Підвищення температури збільшує коливання решітки [74]. Фотонний зв'язок призводить до збільшення випромінюваного фотона енергії. Забезпечує температурне гасіння

Отримані залежності $I(T)$ були зображені як $1/I$ проти $1/T$ і відображені за експоненцією функція (рис. 8а і б) для обчислення енергій активації. Розраховані значення наведені в таблиці 3.1.

Таблиця 3.1 – Оцінка ZnO та ZnO/PDA активаційної енергії

	2.14–2.09 eV	3.28–3.27 eV	3.34–3.33 eV	3.367 eV
ZnO	0.074	0.018	0.024	0.053
ZnO–PDA	0.064	0.01	0.013	0.044

Активация енергії, отримані для УФ-піків, відповідають вільним екситонам (0,056 eV) і дефектно-зв'язаних екситонів (0,024 і 0,018 eV) в ZnO.

Добре видно, що формування шару PDA над ZnONR призвели до зниження енергії активації, що могло бути обумовлено утворенням додаткового локального електричного поля між ZnO та шаром PDA.

Запропоновано наступну модель формування інтерфейсу ZnO/PDA. Модельна схема наноструктури ZnO/PDA представлена на рис. 3.13. На основі FTIR та Раманівського аналізу ми припускаємо, що PDA приєднується до ZnO через –ОН групи в структурі PDA. На основі фотолюмінісцентного аналізу, інтенсивність піків і дефекту концентрація зменшувалася після осадження PDA на ZnONR.

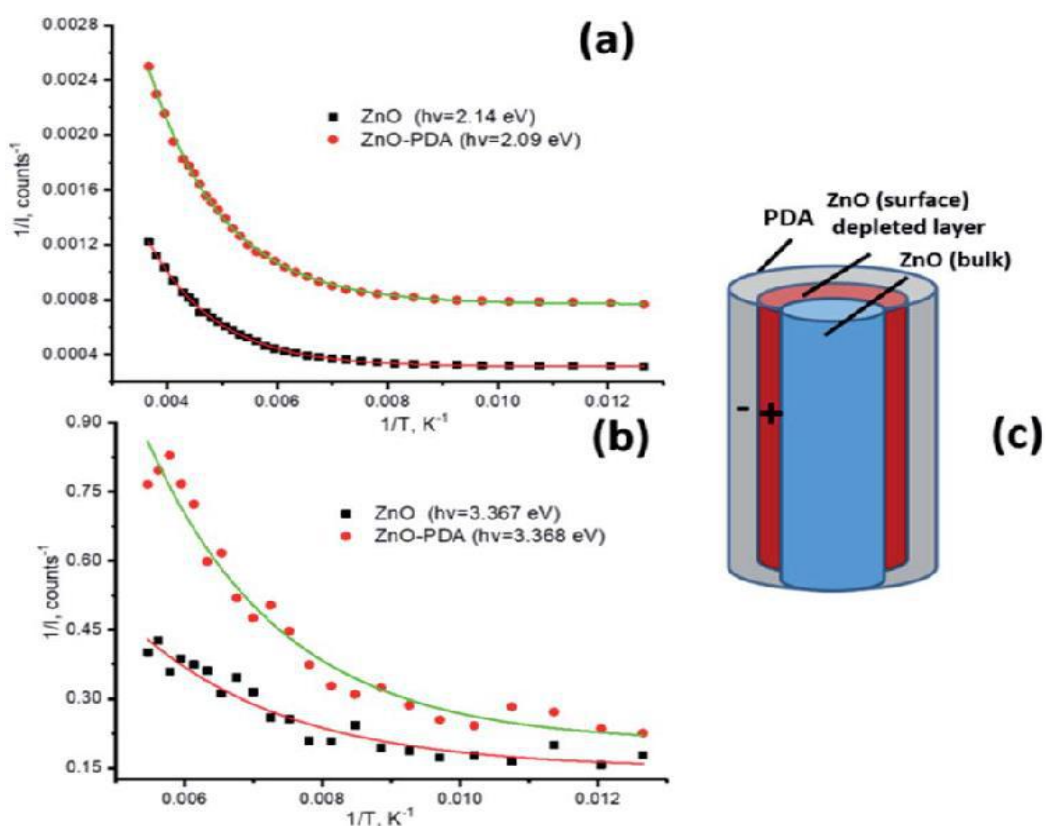


Рисунок 3.13 – Експоненціальні апроксимації для обрахунку активаційної енергії (а та б). Модель формування ZnO/PDA інтерфейсу (с).

Велика кількість точок прикріплення збільшує ймовірність формування інтерфейсу ZnO/PDA та передбачає, зокрема, дефекти ZnO, подвійно іонізовані кисневі вакансії/або кисневі проміжки. Це передбачає, що формування інтерфейсу ZnO/PDA зменшує концентрацію дефектів ZnO. Через нові стани поверхні, утворюється локальне електричне поле, що збільшує

виснажливий шар ZnO. Формування додаткового локального поля призводить до зменшення енергій активації та піків фотолюмінісценції. Інтенсивність фотолюмінісценції модулюється величиною збідненого шару в ZnO. ZnO/PDA, розрахункова щільність емісійних центрів, які є пов'язаний з дефектами донора, становить приблизно $0,87 \cdot 10^{16}$ см. Розрахункове значення різниці довжини Дебая між ZnO та ZnO–PDA становить близько 1,2 нм. Збільшення довжини Дебая викликає розширення виснаженого шару всередину об'ємний розріз зразка і, як результат, загартування фотолюмінісценції і зміну положення піку.

Запропонований механізм гасіння фотолюмінісценції для наноструктури ZnONR–PDA можуть бути поширені на інші матеріали і композити, де збіднений шар модуляції представлено. Враховуючи, що виснажений шар може змінюватись під впливом різних зовнішніх факторів (наприклад, адсорбція молекули; зовнішнє покриття; утворення гетеропереходів; матеріал опромінення тощо), запропонований механізм також міг би пояснити принцип роботи (біо)сенсорів і детекторів.

Підсумовуючи, подальше застосування структур скла/ITO/ZnO-PDA, модифікованих антитілами можна буде використовувати для виявлення антигенів з використанням фотоелектрохімічних датчиків.

Фотоелектрохімічна спектроскопія (ФЕС) – це метод, який дозволяє досліджувати явища переносу заряду на поверхні електрода. Для більш детального аналізу динаміки фотоіндукованих процесів PES можна комбінувати з методом фотолюмінесценції.

Результати циклічної вольтамперометрії (CV) наноструктур ZnO та ZnO-PDA, сформованих при різних концентраціях PDA у темряві (світло вимкнено) та УФ-збудженні (світло увімкнено), показані на рисунку 3.14. Незважаючи на те, що PDA не є провідним матеріалом, збільшення струму порівняно з чистим ZnO спостерігалось для всіх протестованих зразків ZnO-PDA. Значення

струму зменшувалося зі збільшенням концентрації КПК. Збудження зразків УФ-світлом показало аналогічні результати (рис. 3.14 В).

В обох КВ наноструктури ZnO-PDA показали пік окиснення в діапазоні 400-550 мВ і пік відновлення в діапазоні -200 мВ – 0 мВ. CV PDA 0,5 мг/мл показано на малюнку 3.14 С. Визначено зміщення піку окиснення в бік вищих напруг при УФ-збудженні. Було виявлено, що пік окиснення зсувається в бік вищих напруг у разі темнових вимірювань і УФ-збудження.

Товщина шару PDA істотно впливала на співвідношення УФ-струму і темнового струму. Це значення було вище 1 для ZnO та ZnO-PDA 0,3 мг/мл. Підвищення концентрації дофаміну призвело до зменшення коефіцієнта струму.

У цій роботі значення пікового потенціалу окиснення були на 50-80 мВ вищими, ніж для шарів PDA. Це може бути пов'язано з різними методами синтезу КПК. Проте динаміка CV змінюється зі збільшенням концентрації дофаміну, що вказує на роль інтерфейсу ZnO-PDA у цих фотоелектрохімічних процесах. Отримані результати показують захоплення заряду та вплив електричного поля на CV в інтерфейсі ZnO-PDA. Попередньо ми вважали, що фотогенерований заряд у ZnO-PDA розділяється на межі між ZnO та PDA, виявляючи гасіння інтегрованої інтенсивності ФЛ в діапазоні 360-800 нм. Виходячи з цього припущення, очікувалося збільшення фотоструму. Однак, виходячи з результатів фотохімічної спектроскопії це припущення є неповним.

Провідність постійного струму КПК утворюється вільними дірками. Волога атмосфера призводить до збільшення провідності КПК на 5 порядків, а нанесення ПДА на провідну поверхню знижує електропровідність на декілька порядків [75]. Повідомлялося, що теплопровідність Cu-PDA залежить від товщини шару PDA. Теплопровідність зменшувалася з товщиною шару PDA. Зменшення теплопровідності пояснювалося розсіюванням електронів у металі PDA покриттям [76]. Повідомлялося, що у композитах CeO₂-PDA

електропровідність зростає у вологій атмосфері. Явище було пояснено ефектом іонної провідності в PDA [77].

На основі наведених вище результатів ми можемо запропонувати збільшення C-V струму ZnO-PDA через шар PDA та підвищення іонної провідності у воді. Збільшення шару PDA призводить до зменшення струму C-V. УФ-світло створює електронно-діркові пари на ZnO. З іншого боку, УФ-світло може частково поглинатися шаром КПК. Зниження C-V ZnO-PDA під УФ-опроміненням може бути результатом захоплення електронів і рекомбінації з дірками в шарі PDA. Вирішальним параметром такого процесу є товщина шару КПК.

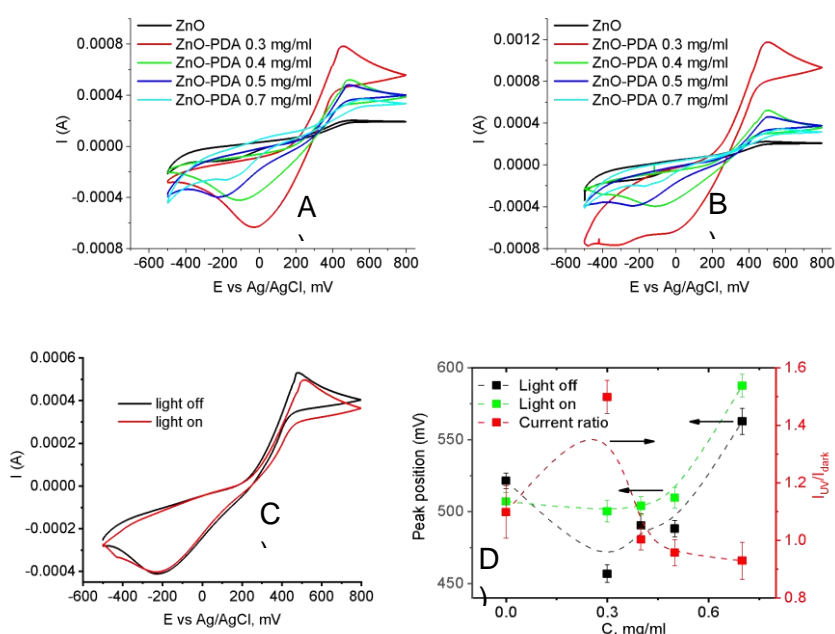


Рисунок 3.14 – Результати електрохімічних вимірювань: Циклічні вольтамперограми у режимі «світло вимкнено» (A); Циклічні вольтамперограми в режимі «увімкнено» (B); Положення піків окислення та коефіцієнт струму (C); Циклічна вольтамперограма електродів на основі FTO, модифікованих 0,5 мг/мл PDA (D)

Результати фотолюмінесцентно-хроноамперметричного дослідження показані на рисунку 3.15. Було визначено, що фотолюмінесценція ZnO-PDA зменшується під дією прикладеного потенціалу (рис. 3.15 A). Оцінка

електрохромного ефекту наноструктур ZnO-PDA при різних концентраціях дофаміну показана на малюнках 3.15 В і 3.15 С. Було встановлено, що інтенсивність ФЛ знижувалася шляхом гасіння ФЛ при всіх концентраціях дофаміну в діапазоні всіх прикладених потенціалів. Насичення інтенсивності спостерігалось в діапазоні 600-800 мВ. Зсув положення піку ФЛ спостерігався в діапазоні 100-500 мВ. При більш високих прикладених потенціалах спостерігалось насичення пікового зсуву ФЛ. Найбільш значні ефекти зсуву піку та зниження інтенсивності ФЛ спостерігалися для FTO-електродів (19 x 12 мм²), модифікованих ZnO-PDA, нанесених при концентрації дофаміну 0,4 мг/мл та 0,5 мг/мл. Варто зазначити, що не спостерігалось зрушення піку ФЛ для FTO-електродів, модифікованих наноструктурами ZnO, не покритих PDA, за будь-якого прикладеного потенціалу.

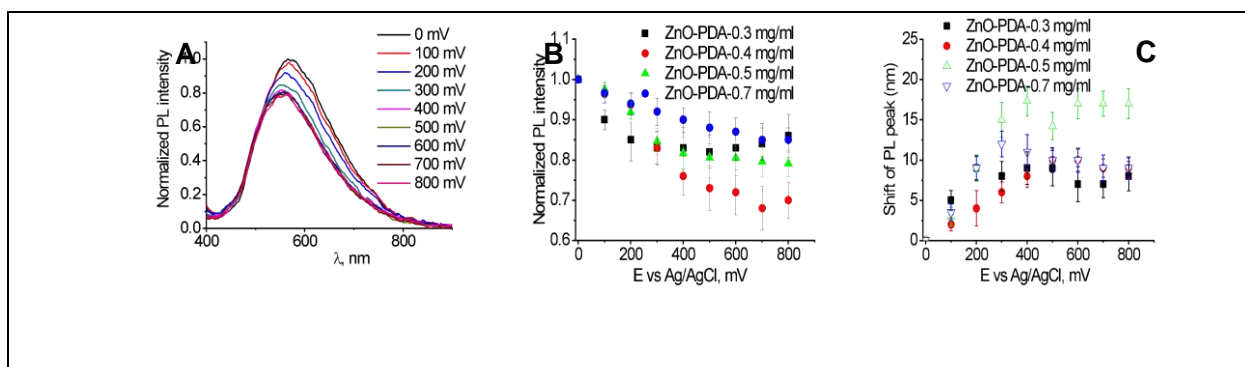


Рисунок 3.15 – Оцінка на основі хроноамперометрії FTO-електроду, модифікованого наноструктурами ZnO-PDA при різних потенціалах: гасіння ФЛ при різних прикладених потенціалах (А); Гасіння інтенсивності ФЛ при різних прикладених потенціалах (В); Зсув PL при різних прикладених потенціалах (С).

Характеристика ZnO та ZnO-PDA за допомогою спектроскопії електрохімічного імпедансу у потенціостатичних умовах за допомогою EIS при прикладених катодних потенціалах -0,3 В та -0,45 В. проти Ag/AgCl, KCl_{sat}. Ці умови катодної поляризації дозволили уникнути можливого окисного стресу на робочому електроді, який міг би спричинити небажане погіршення плівок ZnO та PDA у разі застосування анодних потенціалів. Графік Найквіста на малюнку 3.16 А показує, що електрохімічний імпеданс

електрода FTO-ZnO сильно залежить від прикладеного потенціалу незалежно від освітлення. Розраховані значення параметрів (Таблиця 3.2) модельної еквівалентної схеми (Рис. 3.16 А, вставка) показали, що опір передачі заряду (R_{ct}) зменшується від 35 до 5,6 cm^2 , коли електрод поляризований більш негативно (рис. 3.16 В, чорні стовпці) і R_{ct} дещо зменшується, коли електрод FTO-ZnO запалюється під потенціалом -0,3 В, однак при -0,45 В R_{ct} не залежать від освітлення (рис. 3,16 В, білі стовпці). Значення елемента постійної фази (CPE) також майже не залежать від освітлення, однак CPE збільшується від 164 $\mu\text{F cm}^{-2}$ до 221 $\mu\text{F cm}^{-2}$, коли електрод FTO-ZnO поляризований більш негативно (рис. 3. 16 С). Підсумовуючи дані, представлені на рисунку 4, можна зробити висновок, що імпеданс електрода FTO-ZnO сильно залежить від прикладеного катодного потенціалу, однак майже не залежить від освітлення. Ці результати чітко демонструють, що за допомогою електродного потенціалу -0,45 В можна досягти більш швидкої передачі заряду через інтерфейс електрод-електроліт, ніж за допомогою -0,3 В.

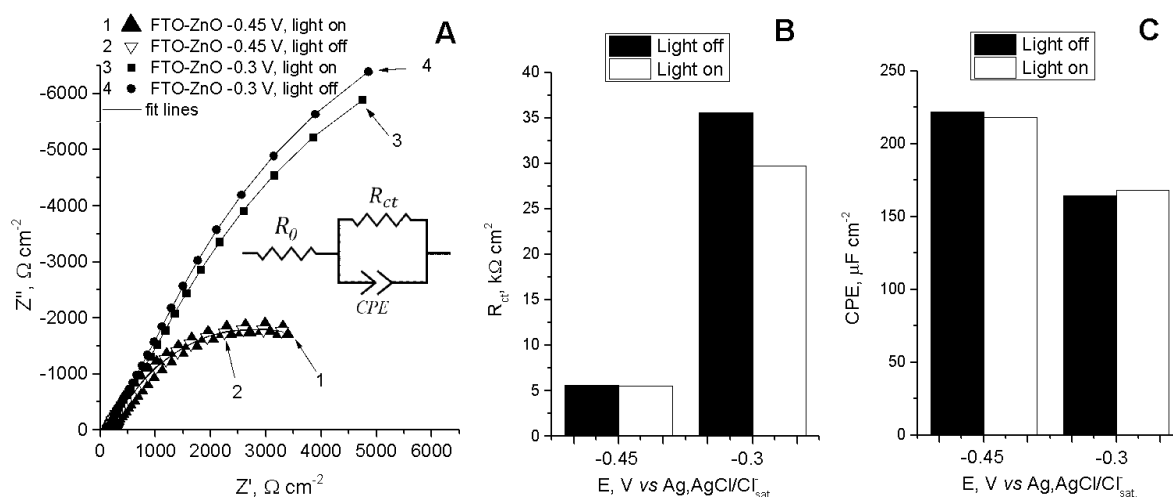


Рисунок 3.16 – Спектри електрохімічного імпедансу електрода FTO-ZnO, зареєстровані при різних потенціалах проти Ag/AgCl/Cl-sat. з вимкненим або увімкненим світлом (А)

Вставка малюнка 3.16 А представляє еквівалентну схему, для якої дані імпедансу були підігнані до: R_0 – опір розчину, CPE – елемент постійної фази,

R_{ct} – опір перенесення заряду. Порівняння змодельованих параметрів - R_{ct} (В) і CPE (С) відповідно до еквівалентної схеми, представленої на вставці рисунка 3.16 А.

Таблиця 3.2 – Значення змодельованих параметрів спектрів імпедансу електрода FTO-ZnO (рис. 3.16 А) відповідно до моделі еквівалентної схеми, представленої на вставці до рисунка 3.16 А.

E, V	Світло ввімкнено			Світло вимкнено		
	R_{ct} , $k\Omega\ cm^2$	CPE , $\mu F\ cm^{-2}$	n	R_{ct} , $k\Omega\ cm^2$	CPE , $\mu F\ cm^{-2}$	n
-0.45	5.6	221.6	0.73	5.56	218.0	0.73
-0.3	35.6	164.4	0.74	29.7	168.5	0.72

Спектри електрохімічного імпедансу реєстрували за допомогою електрода FTO-ZnO-PDA (рис. 6.17), щоб з'ясувати вплив осажденного шару PDA, утвореного при 0,4 мг/мл дофаміну. На відміну від електрода FTO-ZnO, імпеданс покритого КПК електрода лише незначно залежить від прикладеного потенціалу та дуже незначно залежить від освітлення. Шляхом підгонки експериментальних даних (рис. 3.17 А) з використанням еквівалентної схеми (рис. 3.17 А, вставка) були розраховані кінетичні параметри, які представлені в таблиці 3.3. На малюнках 3.17 В і 3.17 С показано ту саму тенденцію розрахованих електрохімічних параметрів, що й для FTO- Електрод ZnO (рис. 3.16). R_{ct} зменшується, коли електрод FTO-ZnO-PDA освітлюється і поляризується більш негативно (рис. 3.17 В), а CPE зменшується, коли електрод освітлюється, і збільшується, коли електрод поляризується більш негативно (рис. 3.17 С).

Однак слід зазначити, що загальний опір системи електрода FTO-ZnO-PDA зменшився приблизно на вдвічі при -0,45 В і в десять разів при -0,3 В електродного потенціалу, порівняно з електродом FTO-ZnO, що вказує на те, що шар PDA діє як провідний матеріал, і цей висновок узгоджується з результатами експериментів на основі CV, представленими на малюнку 3.14.

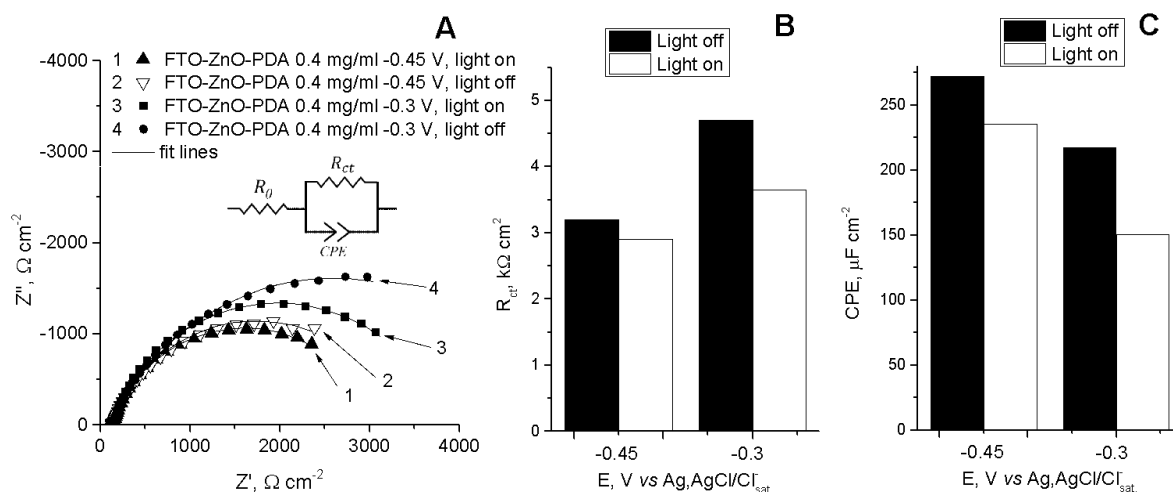


Рисунок 3.17 – Спектри електрохімічного імпедансу електрода FTO-ZnO-PDA, зареєстровані при різних потенціалах (відносно Ag, AgCl/Cl-sat.) у режимі «світло вимкнено» або «світло ввімкнено» (A); Вставка на малюнку 3.16 A представляє еквівалентну схему, яка була використана для оцінки даних імпедансної спектроскопії: R_0 – опір розчину, CPE – елемент постійної фази, R_{ct} – опір перенесення заряду. Порівняння змодельованих параметрів – R_{ct} (B) і CPE (C), розрахованих відповідно до еквівалентної схеми, представленої на вставці рисунка 3.16 A.

Таблиця 3.3 – Значення змодельованих параметрів спектрів імпедансу електрода FTO-ZnO (рис. 3.17 A) відповідно до моделі еквівалентної схеми, представленої на вставці до рисунка 3.17 A.

E, V	Світло ввімкнено			Світло вимкнено		
	R_{ct} , $k\Omega\text{ cm}^2$	CPE, $\mu\text{F cm}^2$	n	R_{ct} , $k\Omega\text{ cm}^2$	CPE, $\mu\text{F cm}^2$	n
-0.45	3.2	272.2	0.78	2.9	235.1	0.79
-0.3	4.7	217.2	0.76	3.6	150.1	0.81

Підсумовуючи, значення опору передачі заряду є вищими для електрода FTO-ZnO, ніж для електрода FTO-ZnO-PDA, незалежно від освітлення чи прикладеного катодного потенціалу -0,3 В або -0,45 В порівняно з Ag/AgCl/KCl/sat. Це відкриття показує, що швидкість перенесення заряду на межі FTO-ZnO електрод/буферний розчин можна збільшити шляхом

модифікації електрода шаром PDA, сформованим при 0,4 мг/мл дофаміну. Важливо відзначити, що опір передачі заряду (R_{ct}) на межі FTO-ZnO-PDA електрод/буферний розчин залежить від прикладеного потенціалу, оскільки експериментальні результати цього дослідження показав, що R_{ct} зменшується приблизно вдвічі при застосуванні потенціалу електрода -0,45 В, однак воно зменшується навіть у десять разів при застосуванні потенціалу електрода -0,3 В проти Ag/AgCl/KCl sat.

3.3 Характеристика взаємодії поверхневих та специфічних білків стандартними методами (реакція імунофлюоресценції)

Для підтвердження можливості хімічної взаємодії специфічних антитіл з поверхнею попередньо підготовлених скелець із нанесеними наноламінатами ZnO нами було проведено імунологічне дослідження із використанням реакції імунофлюоресценції з антитілами міченими FITC у 5 різних концентраціях (5, 10, 20, 50, 100 мкг/мл). Результати цього дослідження наведені на рисунку 3.18.

Як видно з наведеного, антитіла рівномірно фіксуються до поверхні наноламінатів цинку оксиду та відсутня відмінність у інтенсивності забарвлення у межах тих концентрацій, які використовувались під час мікроскопії. Що підтверджує формування на поверхні наноламінатів оксиду цинку функціональних груп, які забезпечують ковалентне зв'язування антитіл. Це є достатніми підґрунтями для подальшого вивчення можливості специфічної антитіло-антиген взаємодії із використанням явища фотолюмінісценції та встановлення залежності інтенсивності відгуку в залежності від кількості досліджуваних антигенів у зразках.

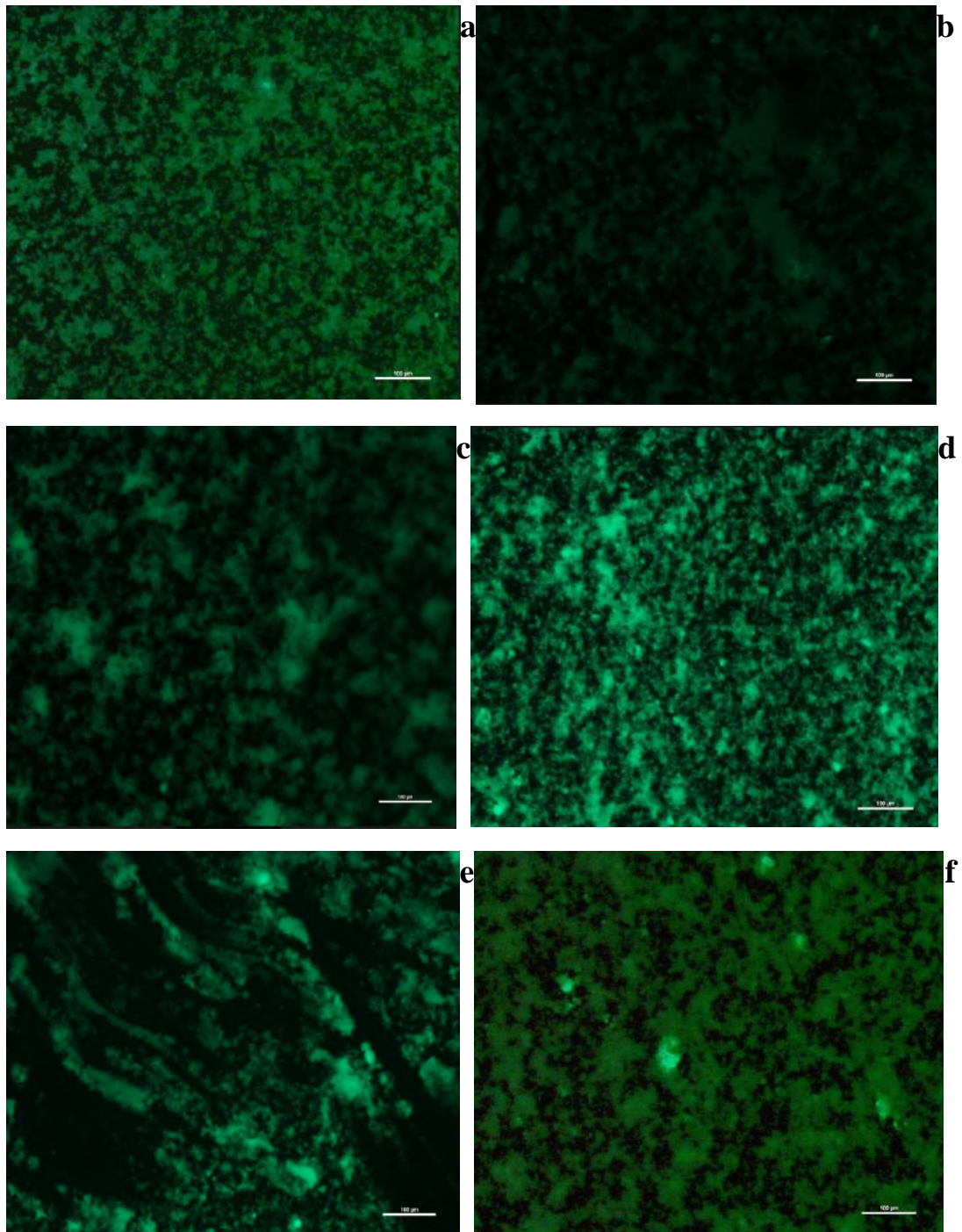


Рисунок 3.18 - Фіксація FITC мічених антитіл на наноламінатах ZnO-PDA (a- концентрація 5 мкг/мл, b - 10 мкг/мл, c - 20 мкг/мл, d- 50 мкг/мл, e - 100 мкг/мл, f - контроль FITC).

3.4 Дослідження реакції біосенсора на білки-мішені методом фотолюмінесценції в проточній камері

Для ефективного застосування наноламінатів ZnO під час створення оптичних імуносенсорів слід оцінити вплив кількох параметрів, які можуть впливати на чутливість оптичної системи. Моделювання проводилося в умовах зовнішнього відображення на різних етапах створення моделі біосенсора та з використанням концентрацій антигену від 10^3 - 10^8 КУО/мл. Результати отримані під час вимірювання інтенсивності фотолюмінесценції наведено на рисунках 3.19-3.22. Порівняльний аналіз точок фотолюмінесценції ZnO в наноструктурах ZnO після депозиції APTES результує в зростанні видимої фотолюмінесценції при збільшенні концентрації антигенів *K.pneumoniae* (рис. 3.19).

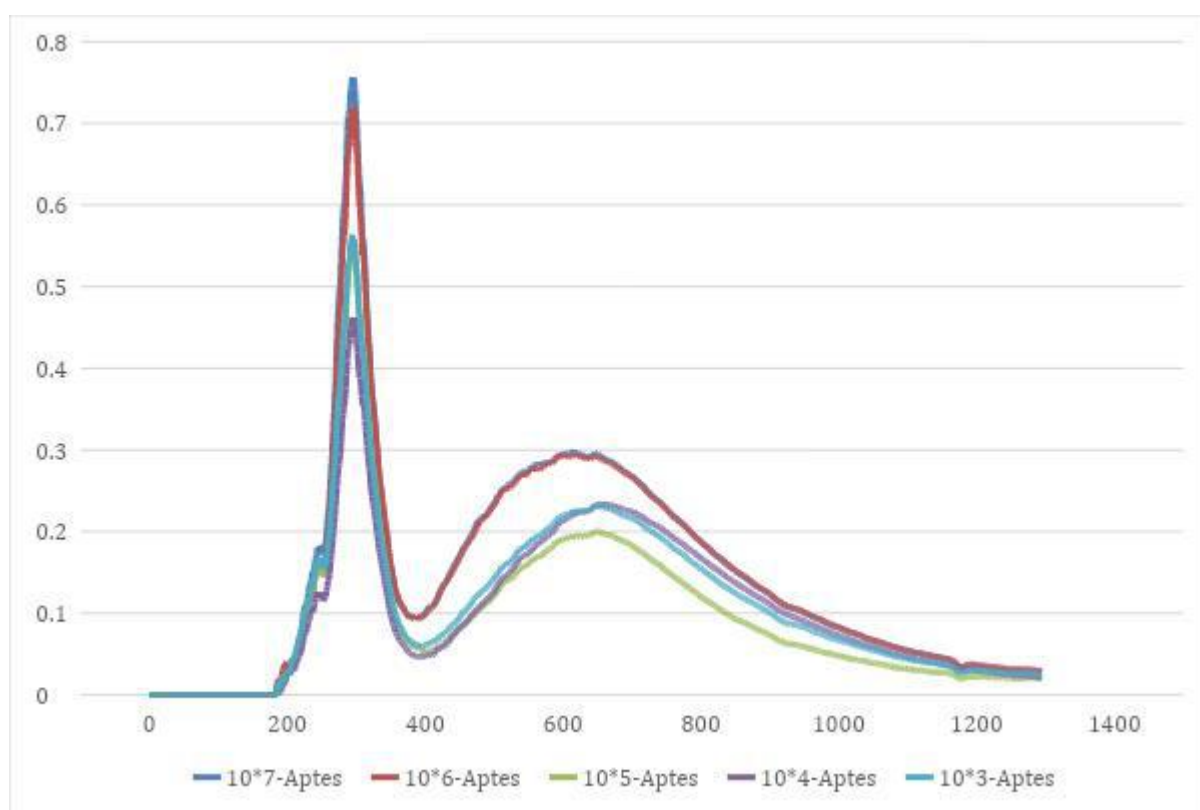


Рисунок 3.19 – Фотолюмінесценція нановолокон ZnO після нанесення Aptes.

Порівняльний аналіз точок фотолюмінесценції ZnO в наноструктурах ZnO після депозиції APTES та специфічних до клебсієл поліклональних

антитіл навпаки результує у загальному підсиленні відклику та зниженні інтенсивності видимої фотолюмінесценції при збільшенні концентрації антигенів *K.pneumoniae* (рис. 3.20).

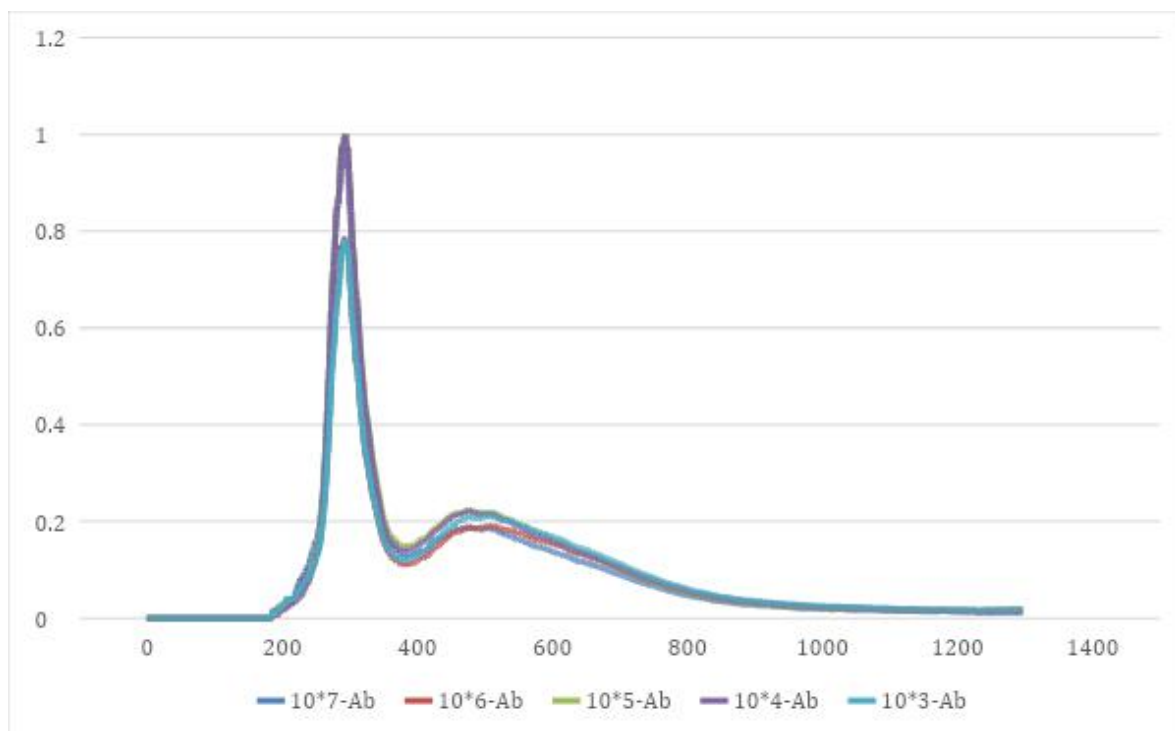


Рисунок 3.20 – Фотолюмінесценція нановолокон ZnO після нанесення APtes та специфічних до *K.pneumoniae* антитілами.

Порівняльний аналіз точок фотолюмінесценції ZnO в наноструктурах ZnO після депозиції APTES, специфічних до клебсієл поліклональних антитіл та BSA продемонструвало парадоксальні результати відносно інтенсивності відклику видимої фотолюмінесценції при збільшенні концентрації антигенів *K.pneumoniae*. Як відображено на рисунку 3.21 при концентрації антигену від 10^5 до 10^7 КУО/мл інтенсивність відклику видимої фотолюмінесценції зростала, в той же час при концентрації 10^3 до 10^4 КУО/мл інтенсивність відклику видимої фотолюмінесценції була ще вищою ніж при концентраціях антигена 10^7 КУО/мл. Це вказує на необхідність додаткового вивчення впливу BSA на інтенсивність фотолюмінесценції та проведення детального аналізу

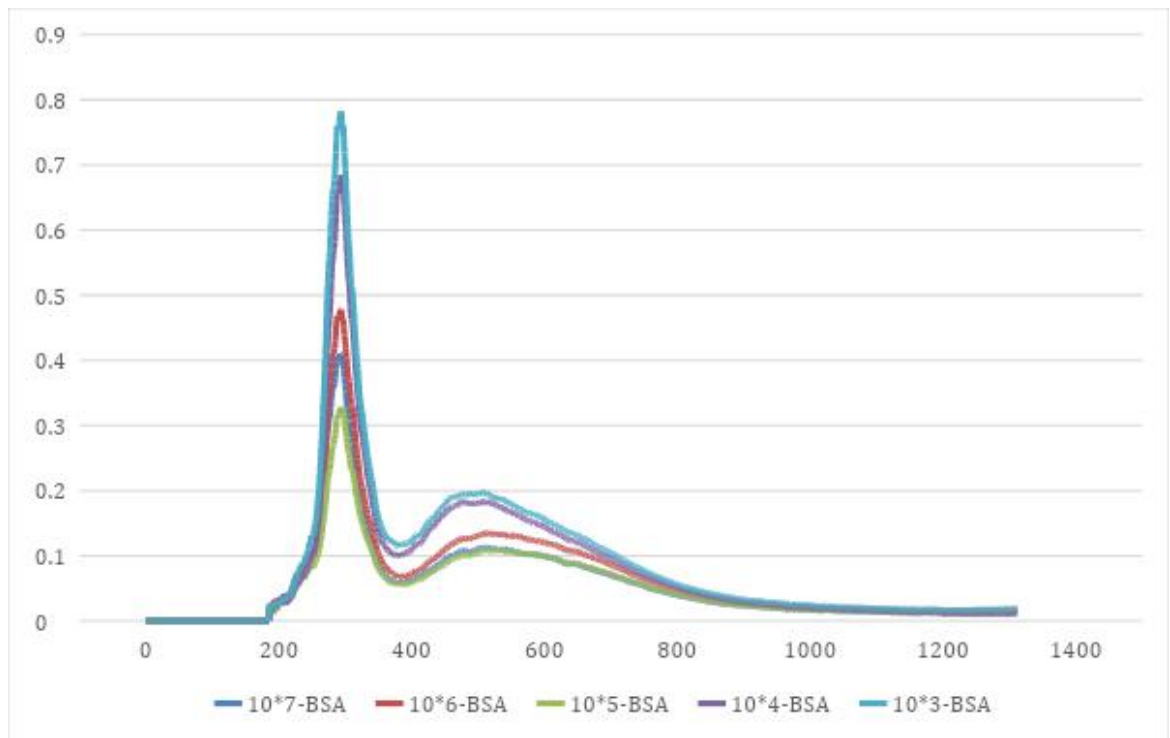


Рисунок 3.21 – Фотолюмінесценція нановолокон ZnO після нанесення Artes, специфічних до *K.pneumoniae* антитіл та BSA.

Порівняльний аналіз точок фотолюмінесценції ZnO в наноструктурах ZnO після депозиції APTEs, специфічних до клебсієл поліклональних антитіл, BSA та антигенів *K.pneumoniae* відображено на рисунку 3.22

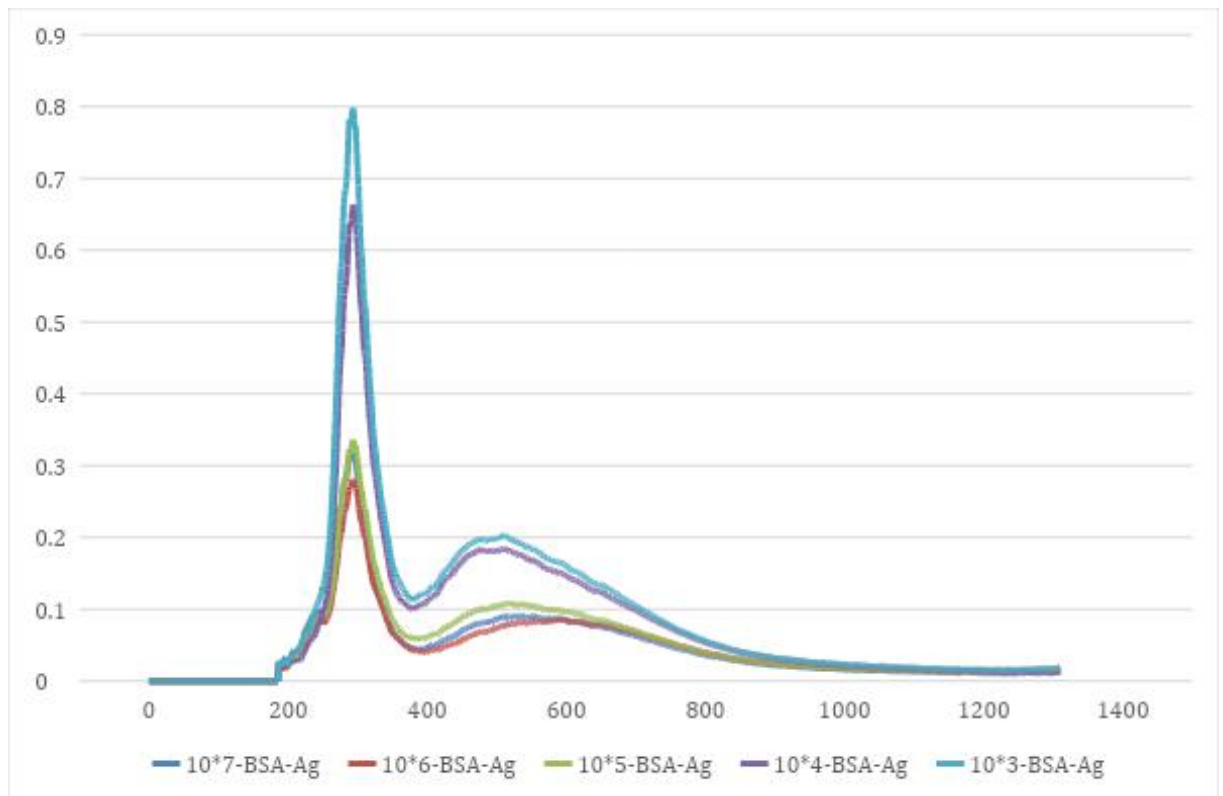


Рисунок 3.22 – Фотолюмінісценція нановолокон ZnO після нанесення Artes, специфічних до *K.pneumoniae* антитіл, BSA та антигенів.

Показники інтенсивності відклику видимої фотолюмінісценції були в зворотній залежності від концентрації антигену, при збільшенні концентрації антигенів *K.pneumoniae* інтенсивність фотолюмінісценції знижувалась.

ВИСНОВКИ

1. *K.pneumonia* є поширеним (13,7%) патогеном серед пацієнтів із отолярингологічною патологією, якому притаманний високий рівень (73,2%) мультирезистентності до антибіотиків. НЧ Ag мають потужний антибактеріальний та антибіоплівковий потенціал проти мультирезистентних *K. pneumoniae*.
2. Комбінування НЧ ZnO з полідопаміном призводить до підвищення квантової ефективності зразків, зменшення енергії активації та значного зниження опору передачі заряду на межі розділу електрод/буферний розчин, що призводить до поліпшення структурних та оптичних властивостей та підтверджує можливість створення конформного PDA покриття поверх наностержнів ZnO. Електрохімічні властивості наноструктур FTO-ZnO та FTO-ZnO-PDA можуть змінюватись залежно від прикладеного електричного потенціалу і/або експозиції до освітлення.
3. Встановлено наявність взаємодії між біоселективним шаром на поверхні наноструктур ZnO та міченими FITC антитілами в концентраціях 5-100 мкг/мл.
4. Реакція біосенсора на білки-мішені в проточній камері є нелінійною та супроводжувалась зменшенням рівня імунофлюоресценції при зростанні концентрації антигенів.
5. Композити НЧ ZnO з PDA можуть бути використаними для розробки електрохімічних оптичних біосенсорів для детекції *K. pneumoniae*. Межа виявлення *K. pneumoniae* при застосуванні електрохімічних оптичних біосенсорів після 1 години співінкубування становить $10^3 - 10^8$ КУО/мл.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. На основі розробленої методики виготовлення фотолюмінісцентних нанокомпозитів на основі ZnO, функціоналізації їх поверхні та формування біоселективного шару запропоновано схему оптичного біосенсора, що може бути використана для детекції *K.pneumoniae* в біологічних матеріалах.

2. Розроблено експериментальну камеру для дослідження оптичних властивостей композитів на основі ZnO методом фотолюмінісцентної спектроскопії та застосовано розроблений зразок камери для оптичного фотолюмінісцентного тестування біосенсорів для дослідження матеріалів, які містять антигени *K.pneumoniae*.

ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ

1. Joseph E Marturano, et al., ESKAPE Pathogens in Bloodstream Infections Are Associated With Higher Cost and Mortality but Can Be Predicted Using Diagnoses Upon Admission, *Open Forum Infectious Diseases*, V 6, Issue 12, 2019.
2. W. Jian-li *et al.*, “Serotype and virulence genes of *K. pneumoniae* isolated from mink and its pathogenesis in mice and mink,” *Sci. Rep.*, V 7, №1, pp.1–7, 2017.
3. N. Raffelsberger *et al.*, “Gastrointestinal carriage of *Klebsiella pneumoniae* in a general adult population: a cross-sectional study of risk factors and bacterial genomic diversity,” *Gut Microbes*, vol. 13, no. 1, pp. 1–14, 2021.
4. M. Vading, et al., “Invasive infection caused by *Klebsiella pneumoniae* is a disease affecting patients with high comorbidity and associated with high long-term mortality,” *PLoS One*, vol. 13, no. 4, pp. 1–13, 2018.
5. John V. Ashurst; Adam Dawson, *Klebsiella Pneumonia*, StatPearls Publishing; 2022 Jan, ID: NBK519004PMID: 30085546
6. H. Erdem *et al.*, “Surveillance, control and management of infections in intensive care units in Southern Europe, Turkey and Iran - A prospective multicenter point prevalence study,” *J. Infect.*, vol. 68, no. 2, pp. 131–140, 2014.
7. Machuca I, et al., Mortality Associated with Bacteremia Due to Colistin-Resistant *Klebsiella pneumoniae* with High-Level Meropenem Resistance: Importance of Combination Therapy without Colistin and Carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017 Jul 25;61(8):e00406-17.
8. J. Ayatollahi, M. Sharifyazdi, R. Fadakarfarid, and S. Hossein, “Antibiotic resistance pattern of *Klebsiella pneumoniae* in obtained samples from Ziaee Hospital of Ardakan , Yazd , Iran during 2016 to 2017,” vol. 02, pp. 32–36, 2020.
9. A. Hasani *et al.*, “Serotyping of *klebsiella pneumoniae* and its relation with capsule-associated virulence genes, antimicrobial resistance pattern, and clinical infections: A descriptive study in medical practice,” *Infect. Drug Resist.*, vol. 13, pp. 1971–1980, 2020, doi: 10.2147/IDR.S243984.

10. S. Hernando-Amado, et al., "Antibiotic Resistance: Moving From Individual Health Norms to Social Norms in One Health and Global Health," *Frontiers in Microbiology*, vol. 11. 2020, doi: 10.3389/fmicb.2020.01914.
11. R.-W. Tsay, et al., "Characteristics of Bacteremia Between Community-Acquired and Nosocomial *Klebsiella pneumoniae* Infection," *Arch. Intern. Med.*, vol. 162, no. 9, p. 1021, 2002, doi: 10.1001/archinte.162.9.1021.
12. S. Derakhshan, S. N. Peerayeh, and B. Bakhshi, "Association between presence of virulence genes and antibiotic resistance in clinical *klebsiella pneumoniae* isolates," *Lab Med.*, vol. 47, no. 4, pp. 306–311, 2016.
13. Y. J. Pan *et al.*, "Genetic analysis of capsular polysaccharide synthesis gene clusters in 79 capsular types of *Klebsiella*" *SciRep.*, V. 5, №10, 2014, pp. 1–10, 2015.
14. S. Brisse *et al.*, "Wzi gene sequencing, a rapid method for determination of capsular type for *klebsiella* strains," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 51, no. 12, pp. 4073–4078, 2013, doi: 10.1128/JCM.01924-13.
15. G. Cortés, et al., "Molecular analysis of the contribution of the capsular polysaccharide and the lipopolysaccharide O side chain to the virulence of *Klebsiella pneumoniae* in a murine model of pneumonia," *Infect. Immun.*, vol. 70, no. 5, pp. 2583–2590, 2002, doi: 10.1128/IAI.70.5.2583-2590.2002.
16. J. F. Turton, et al., "PCR characterization and typing of *Klebsiella pneumoniae* using capsular type-specific, variable number tandem repeat and virulence gene targets," *J. Med. Microbiol.*, vol. 59, no. 5, pp. 541–547, 2010.
17. E. D. Candan and N. Aksöz, "*Klebsiella pneumoniae*: Characteristics of carbapenem resistance and virulence factors," *Acta Biochim. Pol.*, vol. 62, no. 4, pp. 867–874, 2015, doi: 10.18388/abp.2015_1148.
18. T. Le, et al., "Clinical and microbiological characteristics of nosocomial, healthcare-associated, and community-acquired *Klebsiella pneumoniae* infections in Guangzhou, China," *Antimicrob. Resist. Infect. Control*, V.10, no. 1, pp. 1–11, 2021.
19. M. H. Siddique *et al.*, "Effect of Silver Nanoparticles on Biofilm Formation and EPS Production of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae*," *Biomed Res. Int.*, vol. 2020, 2020, doi: 10.1155/2020/6398165.

20. PMC5279835 PMID: 28182124 L 338/2 EN Official Journal of the European Union 22.12.2005 Commission Regulation (EC) No 2073/2005
21. Tatsuya Tominaga Klebsiella oxytoca, Raoultella ornithinolytica and other related bacteria in food by lateral-flow test strip immunoassays. *Journal of Microbiological Methods* (2018) doi: 10.1016/j.mimet.
22. L. Su, W. Jia, C. Hou, and Y. Lei, "Microbial biosensors: A review," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 26, no. 5, pp. 1788–1799, 2011, doi: 10.1016/j.bios.2010.09.005.
23. A. Liu, et al., A novel photoelectrochemical immunosensor by integration of nanobody and ZnO nanorods for sensitive detection of nucleoside diphosphatase kinase-A, *Anal. Chim. Acta.* 973 (2017) 82–90. doi:10.1016/j.aca.2017.03.048.
24. Hossain SMZ, et al. Multiplexed paper test strip for quantitative bacterial detection. *Anal Bioanal Chem.* 2012;403(6):1567–76
25. Song H, et al., Identification of outer membrane proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis.* 2008;88(6):526–44
26. Kang T, et al., Patterned multiplex pathogen DNA detection by Au particle-on-wire SERS sensor. *Nano Lett.* 2010;10(4):1189–93.
27. Arora R, et al., Detecting anthrax in the mail by coherent Raman microspectroscopy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012;109(4):1151–3.
28. Pahlow S, et al. Rapid identification of *Pseudomonas* spp. via Raman spectroscopy using pyoverdine as capture probe. *Anal Chem.* 2016;88(3):1570–7.
29. Baig NF, et al., Multimodal chemical imaging of molecular messengers in emerging *P. aeruginosa* bacterial communities. *Analyst.* 2015;140(19):6544–52.
30. Linman MJ, et al., Detection of low levels of *Escherichia coli* in fresh spinach by surface plasmon resonance spectroscopy with a TMB-based enzymatic signal enhancement method. *Sensor Actuat B Chem.* 2010;145(2):613–9.
31. Chung J, et al., Fast and continuous microorganism detection using aptamer-conjugated fluorescent nanoparticles on an optofluidic platform. *Biosens Bioelectron.* 2015;67:303–8.
32. Pahlow S, et al. Rapid identification of *Pseudomonas* spp. via Raman spectroscopy using pyoverdine as capture probe. *Anal Chem.* 2016;88(3):1570–7.

33. Tripathi SM, et al. Long period grating based biosensor for the detection of *Escherichia coli* bacteria. *Biosens Bioelectron.* 2012;35(1):308–12.
34. Pages JM, et al. New peptide-based antimicrobials for tackling drug resistance in bacteria: single-cell fluorescence imaging. *ACS Med Chem Lett.* 2013;4(6):556–9.
35. Adak AK, et al. Bishydrazide Glycoconjugates for Lectin Recognition and Capture of Bacterial Pathogens. *Bioconjugate Chem.* 2010;21:2065–75.
36. Valerii Myndrula , et al., Photoluminescence label-free immunosensor for the detection of Aflatoxin B1 using polyacrylonitrile/zinc oxide nanofibers *Materials Science & Engineering C* 118 (2021) 11140
37. Ahmed A, et al., Biosensors for whole-cell bacterial detection. *Clin Microbiol Rev.* 2014 Jul;27(3):631-46. doi: 10.1128/CMR.00120-13.
38. T. Tominaga, “Rapid detection of *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Raoultella ornithinolytica* and other related bacteria in food by lateral-flow test strip immunoassays,” *J. Microbiol. Methods*, vol. 147, no. January, pp. 43–49, 2018.
39. Ramanavicius, S.; Ramanavicius, A. Conducting Polymers in the Design of Biosensors and Biofuel Cells. *Polymers* 2021, 13, 49.
40. Lakard, B. Electrochemical Biosensors Based on Conducting Polymers: A Review. *Appl. Sci.* 2020, 10, 6614.
41. V. Myndrul, I. Iatsunskyi, Nanosilicon-based composites for (bio)sensing applications: current status, advantages, and perspectives, *Materials (Basel)*. 12 (2019) 2880, <https://doi.org/10.3390/ma12182880>
42. D. Han, et al., Harnessing photoluminescent properties of carbon nitride nanosheets in a hierarchical matrix, *Adv. Funct. Mater.* 29 (2019) 1905576
43. A. Tamashevski, et al., Zinc oxide nanorod based immunosensing platform for the determination of human leukemic cells, *Talanta*. 200 (2019) 378–386
44. M. Maisonneuve, I.-H. Song, S. Patskovsky and M. Meunier, *Opt. Express*, 2011, 19, 7410.
45. K. Hinrichs, K. J. Eichhorn, G. Ertl, D. L. Mills and H. Lüth, *Springer Ser. Surf. Sci.*, DOI:10.1007/978-3-642-40128-2
46. S. Otsuki, K. Tamada and S. Wakida, *Appl. Opt.*, 2005, 44, 1410–5

47. Z. Balevicius, D. Ignatjeva, G. Niaura, I. Ignatjev, V. Vaicikauskas, G. J. Babonas and G. Valincius, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 2015, 131, 115–121
48. R. Yakimova, *Front. Biosci.*, 2012, E4, 254.
49. J. X. Wang, et al., *Appl. Phys. Lett.*, , DOI:10.1063/1.2210078
50. R. Viter, et al., Application of room temperature photoluminescence from ZnO nanorods for Salmonella detection, *IEEE Sensors J.* 14 (2014) 2028–2034.
51. R. Viter *et al.*, “Photoluminescence immunosensor based on bovine leukemia virus proteins immobilized on the ZnO nanorods,” *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 285, no. January, pp. 601–606, 2019, doi: 10.1016/j.snb.2019.01.054.
52. Y. Zhang, et al., Synthesis, characterization, and applications of ZnO nanowires, *J. Nanomater.* 2012 (2012) 1–22, <https://doi.org/10.1155/2012/624520>
53. A. Tamashevski, et al., Zinc oxide nanorod based immunosensing platform for the determination of human leukemic cells, *Talanta.* 200 (2019) 378–386,
54. A. Tereshchenko, et al., Optical biosensors based on ZnO nanostructures: advantages and perspectives., *Sensors Actuators B Chem.* 229(2016) 664-677.
55. F. Liu, et al., Effects of nanoparticle size and cell type on high sensitivity cell detection using a localized surface plasmon resonance biosensor, *Biosens. Bioelectron.* 55 (2014) 141–148, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.11.075>.
56. C.H. Sang, S.J. Chou, F.M. Pan, J.T. Sheu, Fluorescence enhancement and multiple protein detection in ZnO nanostructure microfluidic devices, *Biosens. Bioelectron.* 75 (2016) 285–292, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.08.050>
57. N. German, et al., Development and Practical Application of Glucose Biosensor Based on Dendritic Gold Nanostructures Modified by Conducting Polymers, *Biosensors.* 12 (2022). <https://doi.org/10.3390/bios12080641>.
58. Viktoriia Fedorenko, et al., Synthesis and photoluminescence properties of hybrid 1D core–shell structured nanocomposites based on ZnO/polydopamine, *RSC Adv.* 10 (2020) 29751–29758. <https://doi.org/10.1039/D0RA04829A>.
59. S. Tavakoli, et al., Polydopamine coated ZnO rod-shaped nanoparticles with noticeable biocompatibility, hemostatic and antibacterial activity, *Nano-Structures & Nano-Objects.* 25 (2021) 100639. doi.org/10.1016/J.NANOSO.2020.100639.

60. V. Fedorenko, D. et al., Application of Polydopamine Functionalized Zinc Oxide for Glucose Biosensor Design, *Polym.* 2021, Vol. 13, Page 2918. 13 (2021).
61. G. Gasparotto, J. P. C. Costa, P. I. Costa, M. A. Zaghete, and T. Mazon, "Electrochemical immunosensor based on ZnO nanorods-Au nanoparticles nanohybrids for ovarian cancer antigen CA-125 detection," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 76, pp. 1240–1247, 2017, doi: 10.1016/j.msec.2017.02.031.
62. L. Haeshin, et al., "Mussel-Inspired Surface Chemistry for Multifunctional Coatings," *Science*, vol. 318, no. OCTOBER. pp. 426–431, 2007, Available: <http://science.sciencemag.org/content/early/2017/12/13/science.aam7588.full>.
63. Z. Wang *et al.*, "Dielectric properties and thermal conductivity of epoxy composites using quantum-sized silver decorated core/shell structured alumina/polydopamine," *Compos. Part A Appl. Sci. Manuf.*, vol. 118, no. October 2018, pp. 302–311, 2019, doi: 10.1016/j.compositesa.2018.12.022.
64. Y. Li, M. Jiao, H. Zhao, and M. Yang, "High performance gas sensors based on in-situ fabricated ZnO/polyaniline nanocomposite: The effect of morphology on the sensing properties," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 264, pp. 285–295, 2018,
65. D. Aguilar-Ferrer, et al., "Recent developments in polydopamine-based photocatalytic nanocomposites for energy production: Physico-chemical properties and perspectives," *Catal. Today*, no. March, 2021.
66. X. Dong *et al.*, "Photoelectrochemical response to glutathione in Au-decorated ZnO nanorod array," *J. Mater. Chem. C*, vol.7,no.19,pp.5624–5629, 2019.
67. J. Gao *et al.*, "Polydopamine/graphene/MnO₂ composite-based electrochemical sensor for in situ determination of free tryptophan in plants," *Anal. Chim. Acta*, vol. 1145, no. xxxx, pp. 103–113, 2021, doi: 10.1016/j.aca.2020.11.008.
68. A. Arroquia, et al., Self-assembled gold decorated polydopamine nanospheres as electrochemical sensor for simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine, uric acid and tryptophan, *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 109, no. December 2019, p. 110602, 2020, doi: 10.1016/j.msec.2019.110602.

69. V. Fedorenko, et al., Synthesis and photoluminescence properties of hybrid 1D core-shell structured nanocomposites based on ZnO/polydopamine, *RSC Adv.*, vol. 10, no. 50, pp. 29751–29758, 2020, doi: 10.1039/d0ra04829a.
70. F. Håkonsholm, et al., Antibiotic sensitivity screening of *Klebsiella* spp. and *Raoultella* spp. isolated from marine bivalve molluscs reveal presence of CTX-M-producing *K. pneumoniae*, *Microorganisms*, vol. 8, no. 12, pp. 1–15, 2020.
71. H. Nirwati *et al.*, “Biofilm formation and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* isolated from clinical samples in a tertiary care hospital, Klaten, Indonesia,” *BMC Proc.*, vol. 13, no. Suppl 11, pp. 1–8, 2019.
72. G. N. Rajivgandhi *et al.*, “Anti-oxidant, anti-bacterial and anti-biofilm activity of biosynthesized silver nanoparticles using *Gracilaria corticata* against biofilm producing *K. pneumoniae*,” *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 600, no. April, p. 124830, 2020, doi: 10.1016/j.colsurfa.2020.124830.
73. H. Luo, et al., “RSC Advances Facile synthesis of novel size-controlled antibacterial hybrid spheres using silver nanoparticles loaded with poly-dopamine spheres,” pp. 13470–13477, 2015, doi: 10.1039/c4ra16469e.
74. W. Muhammad, N. Ullah, M. Haroon, and B. H. Abbasi, “Optical, morphological and biological analysis of zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) using Papaver,” pp. 29541–29548, 2019, doi: 10.1039/c9ra04424h.
75. A. A. Chaaya, et al., “Supporting Information Tuning Optical Properties of Al₂O₃ / ZnO Nanolaminates Synthesized by Atomic Layer Deposition,” pp. 2–3.
76. “Optical, morphological and biological analysis of zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) using *Papaver somniferum* L.”