

<https://doi.org/10.15407/dopovidi2021.05.075>

УДК 546.185

І.І. Гринюк^{1,2}, <https://orcid.org/0000-0002-9868-0053>

Н.Ю. Струтинська¹, <https://orcid.org/0000-0001-9738-9689>

О.М. Василюк³, <https://orcid.org/0000-0002-6567-1943>

С.В. Прилуцька^{1,4}, <http://orcid.org/0000-0001-5280-8341>

О.В. Лівіцька¹, <https://orcid.org/0000-0003-4942-793X>

М.С. Слободяник¹, <https://orcid.org/0000-0003-2684-9806>

¹ Київський національний університет ім. Тараса Шевченка

² Національний технічний університет України "КПІ ім. Ігоря Сікорського"

³ Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ

⁴ Національний університет біоресурсів та природокористування України, Київ

E-mail: igrnyuk@ukr.net

Синтез та антимікробні властивості Cu, Zn-легованих кальцію фосфатів апатитового типу

Представлено членом-кореспондентом НАН України М.С. Слободяником

Синтезовано наночастинки (30–50 нм) кальцію фосфатів апатитового типу в умовах співсаджень з водних розчинів при мольних співвідношеннях $\text{Ca/P} = 1,67$, $\text{CO}_3^{2-}/\text{PO}_4^{3-} = 1$ та $(\text{Cu}^{2+}, \text{Zn}^{2+}) : \text{Ca} = 1 : 50$ і температурі 25 °С. Згідно з даними хімічного аналізу, синтезовані кальцію фосфати містять катіонні та аніонні допанти: Na^+ (0,19–0,21 % мас.), Cu^{2+} (0,42 % мас.) і Zn^{2+} (0,36 % мас.) та С (0,98–1,02 % мас.). В ІЧ-спектрах модифікованих кальцію фосфатів положення коливальних смуг карбонатних груп (при 870, 1430 та 1450 cm^{-1}) вказують на реалізацію часткового заміщення фосфат-аніона карбонатними групами (Б-тип) в апатитовій матриці. Встановлено, що легування кальцію фосфатів апатитового типу катіонами Cu^{2+} та Zn^{2+} сприяє підвищенню їх пригнічувальної дії щодо грамположитивних (*Staphylococcus aureus*) і грамнегативних (*Pseudomonas aeruginosa*) мікроорганізмів. Відмічено десятикратне інгібування росту клітин *S. aureus* у разі додавання 5 мМ (Na^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} , CO_3^{2-})-вмісного кальцію фосфату, тоді як помітна його дія на грамнегативні бактерії (*P. aeruginosa*) спостерігається лише при кількості 10 мМ зразка. Одержані результати вказують на перспективність використання синтезованих наночастинок (Na^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} , CO_3^{2-})-вмісного кальцію фосфату для розробки матеріалів з антибактеріальними властивостями.

Ключові слова: наночастинки, апатит, цинк, купрум, антимікробна активність.

На сьогодні наночастинки кальцію фосфату апатитового типу ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, гідроксіапатит (ГАП)) і його хімічно модифіковані аналоги, завдяки біосумісності, біоактивності та структурній подібності з кістковою тканиною, широко використовуються в орто-

Цитування: Гринюк І.І., Струтинська Н.Ю., Василюк О.М., Прилуцька С.В., Лівіцька О.В., Слободяник М.С. Синтез та антимікробні властивості Cu, Zn-легованих кальцію фосфатів апатитового типу. *Допов. Нац. акад. наук Укр.* 2021. № 5. С. 75–82. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2021.05.075>

педії та стоматології для покриття ортопедичних і зубних імплантатів, а також для догляду за порожниною рота і захисту зубів від карієсу [1–3]. Відомо, що властивості ГАП та його похідних залежать від розміру їх частинок [4]. Оскільки кристали ГАП кісткової тканини є нанорозмірними, то для розробки остеопластичних матеріалів необхідним є одержання кальцію фосфатів саме нанорозмірів. У ряді робіт показано, що саме нанорозмірний ГАП посилює адгезію, проліферацію, остеогенну диференціацію та утворення нової кістки у порівнянні з ГАП мікронного розміру [5, 6].

Однак використання ГАП має обмеження, які пов'язані із ризиком виникнення інфекції, тому одним із важливих факторів під час розробки нових матеріалів на основі ГАП є їх антибактеріальні властивості. Одним із підходів щодо посилення антимікробної дії матеріалів на основі кальцію фосфатів апатитового типу є модифікація вихідної матриці катіонами з антибактеріальними властивостями. Так, катіони Cu^{2+} та Zn^{2+} виявляють антибактеріальну дію щодо умовно патогенних мікроорганізмів [4, 7–9]. Крім того, Zn^{2+} сприяє росту кісток, уповільнює їх резорбцію, а через дефіцит Cu^{2+} у хондро- і остеобластах знижується активність ферментних систем і уповільнюється обмін білків, у результаті сповільнюється і порушується ріст кісткових тканин. Зважаючи на такі важливі функції іонів Zn^{2+} та Cu^{2+} , досить актуальним є дослідження їх “включення” в матрицю біосумісних кальцію фосфатів і вплив на властивості матеріалів.

Метою дослідження було встановити вплив модифікування кальцію фосфатів апатитового типу іонами Zn^{2+} та Cu^{2+} на їх антимікробну дію щодо штамів *S. aureus*, *S. pyogenes* та *P. aeruginosa*.

Експериментальна частина. Синтез модифікованих кальцію фосфатів апатитового типу здійснювали методом співосадження. Як вихідні компоненти використовували такі речовини (кваліфікації “ч.д.а.”): $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Na_2CO_3 та $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$. Взаємодію досліджували при постійних мольних співвідношеннях $\text{Ca}/\text{P} = 1,67$, $\text{CO}_3^{2-}/\text{PO}_4^{3-} = 1$ та $(\text{Cu}^{2+}, \text{Zn}^{2+}) : \text{Ca} = 1 : 50$ і температурі 25°C . Суміш Na_2CO_3 та $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ розчиняли в дистильованій воді і, інтенсивно перемішуючи, вносили в ємність, що містила розчин суміші нітратів: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ та $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Зразок апатиту без іонів Cu^{2+} та Zn^{2+} для порівняння синтезували за таких самих умов лише без додавання двовалентних іонів у вихідний розчин. В обох випадках отриману гетерогенну систему перемішували протягом 15 хв, а потім аморфні зразки фільтрували і промивали дистильованою водою до видалення розчинних солей. Синтезовані фосфати сушили 72 год при 80°C .

Фазовий аналіз синтезованих зразків проводили методом порошкової рентгенографії на дифрактометрі Shimadzu XRD-6000 з CuK_α -випромінюванням з $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$, в інтервалі $2\theta = 5\div 70^\circ$ з кроком $0,01^\circ$. Типи аніонів у складі синтезованих фаз досліджували методом ІЧ-спектроскопії з використанням спектрометра PerkinElmer SpectrumBX (роздільна здатність 1 cm^{-1}) в діапазоні $400\text{—}4000 \text{ cm}^{-1}$ для зразків, запресованих у таблетки з KBr.

Поверхневі характеристики (форма та розміри) синтезованих фосфатів досліджували за допомогою сканувальної електронної мікроскопії (прилад FEI Quanta 400 ESEM).

Вміст кальцію, натрію, цинку, купруму та фосфору визначали методом атомно-абсорбційної спектроскопії (прилад Thermo Electron M-Series), а кількість вуглецю — методом CHN аналізу (Elementar-Analysensysteme).

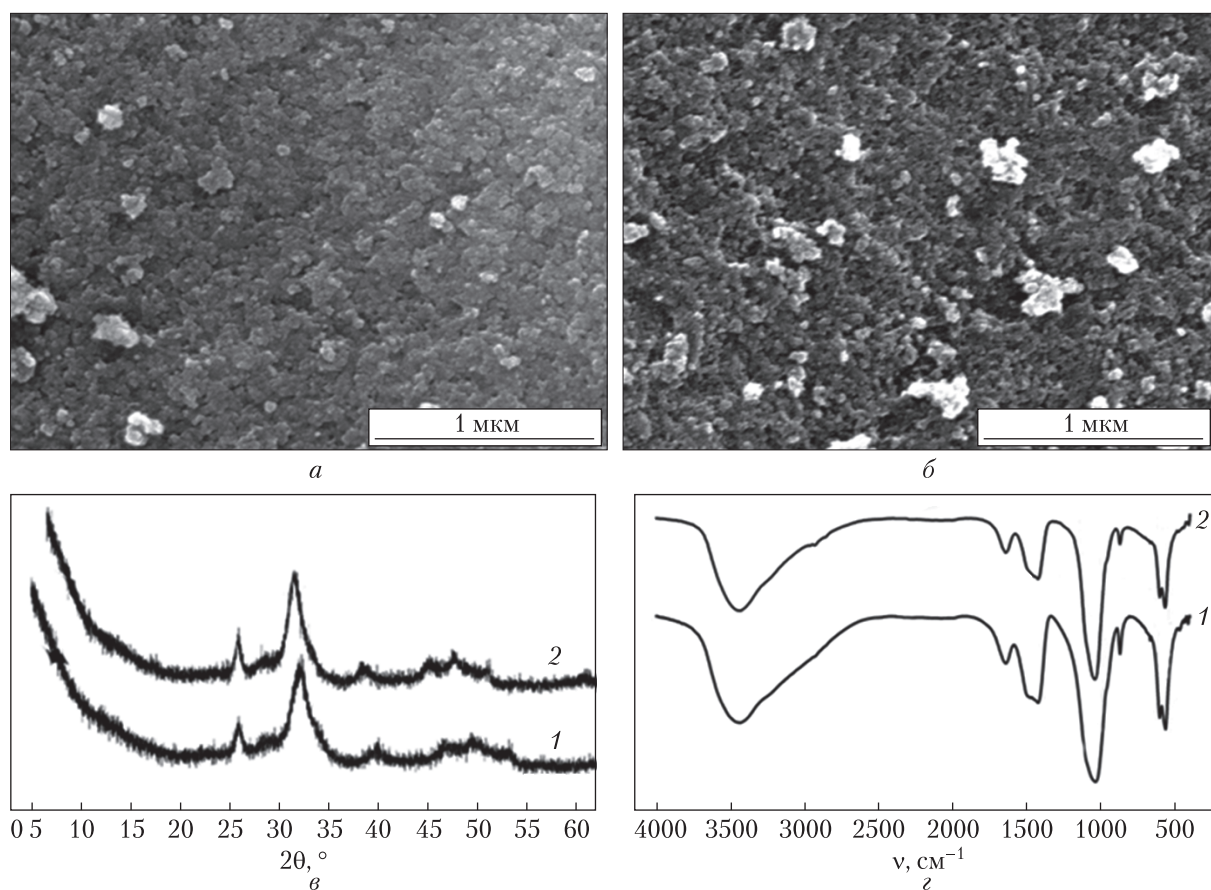


Рис. 1. СЕМ-зображення (а, б), порошкові рентгенограми (в) та ІЧ-спектри (з) синтезованих наночастинок $(\text{Na}^+, \text{CO}_3^{2-})$ -ГАП (криві 1) та $(\text{Na}^+, \text{Cu}^{2+}, \text{Zn}^{2+}, \text{CO}_3^{2-})$ -ГАП (криві 2)

Антимікробну дію синтезованих зразків оцінювали на тест-штамах *Staphylococcus aureus* УКМ IMV В-904 (АТСС 25923), *Streptococcus pyogenes* УКМ IMV В-7505 (АТСС 21059) та *Pseudomonas aeruginosa* УКМ IMV В-900 (АТСС 9027) за методикою, описаною в роботі [10]. Штами умовно патогенних мікроорганізмів культивували протягом 24 год на середовищі соєво-казеїнового бульйону (СКБ) при температурі 37 °С. Зразки фосфатів перед дослідженням стерилізували в автоклаві при 112 °С (0,75 атм) упродовж 30 хв. У флакони із стерильним живильним середовищем СКБ вносили різні кількості фосфату (5, 10 та 20 мМ) і 2 % інокуляту (10^5 КУО/мл) певного штаму. Бактерії інкубували протягом 24 год при 37 ± 1 °С і висівали на соєво-казеїнове середовище. Контролем слугував ріст культури за вказаних умов без додавання синтезованих фосфатів. На наступну добу підраховували кількість колоній референтних штамів на поверхні агаризованого середовища.

Статистичну обробку результатів проводили за загальноприйнятими методами варіаційної статистики з використанням пакетів комп'ютерної програми "Statistika 7.0" (Stat Soft, Inc. США) та загальноприйнятими методиками.

Результати і їх обговорення. Синтез хімічно модифікованого кальцію фосфату передбачав реалізацію комбінованого заміщення в аніонній (фосфатних груп карбонатни-

ми) та катіонній (кальцію катіонами натрію, цинку та купруму) підгратках апатитового типу з формуванням фази складу $\text{Ca}_{10-x-y}(\text{Cu}^{2+}, \text{Zn}^{2+})_x \text{Na}_y (\text{PO}_4)_{6-z} (\text{CO}_3)_z (\text{OH})_2$. З метою з'ясування впливу присутності саме Cu^{2+} та Zn^{2+} на антимікробні властивості хімічно модифікованого апатиту також було синтезовано та досліджено фосфат загального складу $\text{Ca}_{10-x} \text{Na}_x (\text{PO}_4)_{6-z} (\text{CO}_3)_z (\text{OH})_2$.

За даними порошкової рентгенографії, висушені при 80 °С зразки не містять додаткових кристалічних домішок, а уширеність рефлексів на їх рентгенограмах свідчить про низьку кристалічність утворених кальцію фосфатів (рис. 1). Результати сканувальної електронної мікроскопії (SEM) підтверджують формування частинок сферичної форми з розмірами в діапазоні 30–50 нм (див. рис. 1).

Про реалізацію часткового гетеровалентного заміщення PO_4^{3-} на CO_3^{2-} (Б-тип) у структурі апатиту свідчать характеристичні коливання карбонатних груп при 870, 1430 та 1450 cm^{-1} в ІЧ спектрах синтезованих кальцію фосфатів (див. рис. 1) [11]. Інтенсивні моди в частотних діапазонах 560–600 cm^{-1} та 1000–1100 cm^{-1} належать симетричним та асиметричним коливанням (ν_4 , ν_1 та ν_3) фосфатного тетраедра. Широка смуга в діапазоні 3200–3600 cm^{-1} зумовлена коливаннями сорбованої води та структурно зв'язаної ОН-групи в структурі апатиту, тоді як відповідні деформаційні коливання виявлено при 1600 cm^{-1} .

Згідно з даними атомно-абсорбційної спектроскопії та СНN-аналізу, синтезовані зразки є хімічно модифікованими і містять: Na^+ – 0,21 % мас., С – 0,98 % мас., Cu^{2+} – 0,42 % мас. і Zn^{2+} – 0,36 % мас. (зразок Na^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} , CO_3^{2-} -ГАП) та Na^+ – 0,19 % мас. і С – 1,02 % мас. (зразок Na^+ , CO_3^{2-} -ГАП). Відзначимо, що обидва зразки мають близький хімічний склад і відрізняються лише присутністю катіонів купруму та цинку у зразку Na^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} , CO_3^{2-} -ГАП. Це дає змогу проаналізувати саме можливий вплив модифікування кальцію фосфату іонами двовалентних металів на антимікробні властивості.

Таким чином, було синтезовано наночастинки (Na^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} , CO_3^{2-})- та (Na^+ , CO_3^{2-})-вмісних кальцію фосфатів апатитового типу для дослідження їх антимікробної дії щодо умовно патогенних грампозитивних (*S. aureus*, *S. pyogenes*) та грамнегативних (*P. aeruginosa*) штамів мікроорганізмів (рис. 2). Штами *S. aureus*, *S. pyogenes* та *P. aeruginosa* є одними з небезпечних збудників, що спричиняють захворювання суглобів та кісток, зумовлюють сепсис і сприяють руйнуванню зубної емалі.

Дослідження активності синтезованих зразків кальцію фосфатів у різних кількостях (5, 10 та 20 мМ) щодо умовно патогенних мікроорганізмів виявило вплив складу фосфатів на їх антимікробні властивості (див. рис. 2). Так, встановлено пригнічення росту *S. aureus* та *P. aeruginosa* у присутності наночастинок (Na^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} , CO_3^{2-})-вмісного кальцію фосфату, тоді як вплив (Na^+ , CO_3^{2-})-вмісного кальцію фосфату на життєздатність цих штамів мікроорганізмів у досліджуваних умовах практично не спостерігався (див. рис. 2, а). Слід відзначити, що вже у присутності 5 мМ синтезованого (Na^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} , CO_3^{2-})-вмісного кальцію фосфату виявлено десятикратне пригнічення росту клітин *S. aureus*. Подальше збільшення кількості зразка (до 20 мМ) у середовищі інкубації істотно не змінювало даної характеристики (див. рис. 2, а).

Грамнегативні бактерії *P. aeruginosa* були менш чутливими до дії (Na^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} , CO_3^{2-})-вмісного кальцію фосфату – пригнічення їх росту відбувалося лише у разі додавання 10–20 мМ даного зразка (див. рис. 2, в).

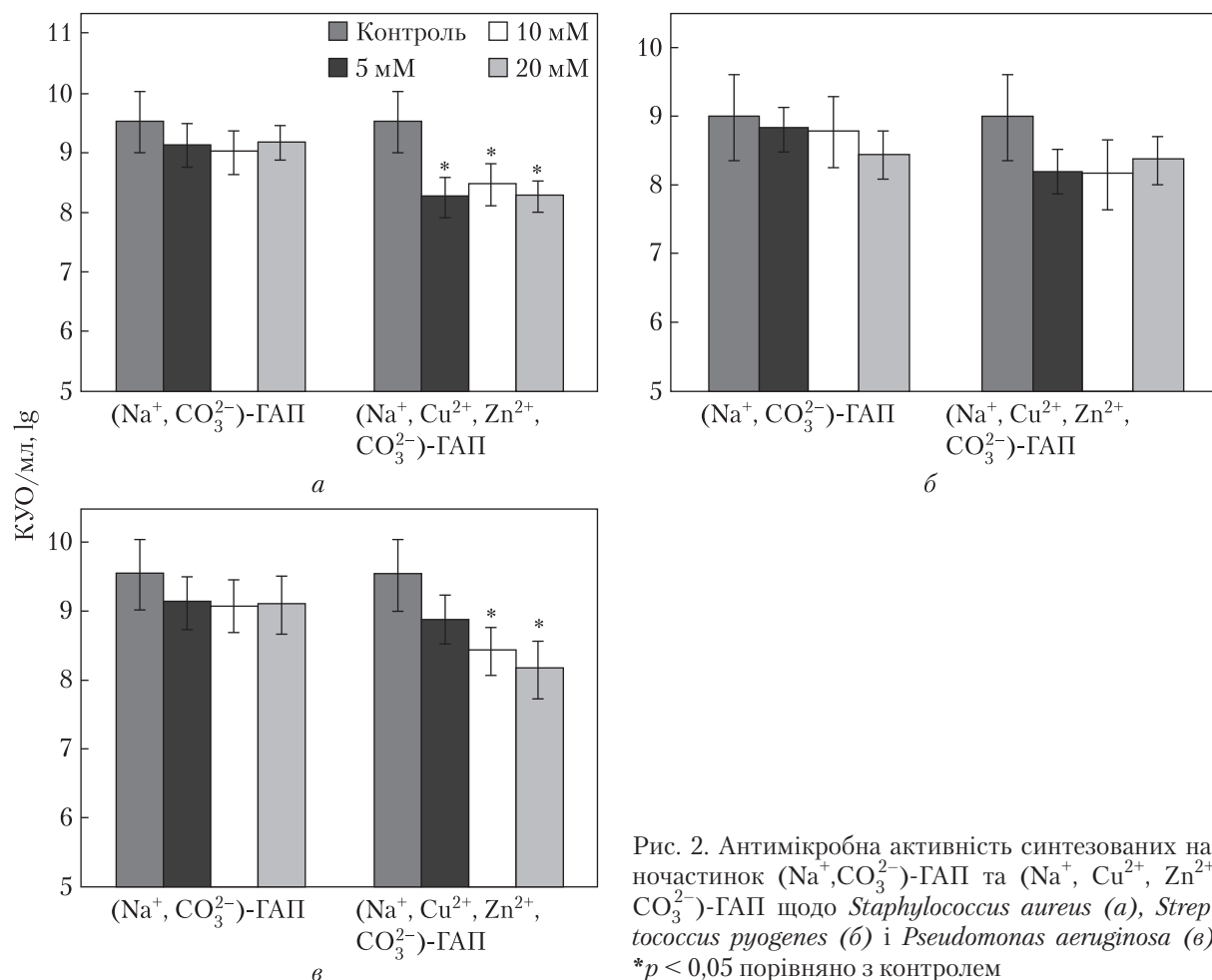


Рис. 2. Антимікробна активність синтезованих наночастинок (Na⁺, CO₃²⁻)-ГАП та (Na⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, CO₃²⁻)-ГАП щодо *Staphylococcus aureus* (а), *Streptococcus pyogenes* (б) і *Pseudomonas aeruginosa* (в). **p* < 0,05 порівняно з контролем

Для обох синтезованих кальцію фосфатів у межах досліджених їх кількостей (5–20 мМ) практично відсутній вплив на життєдіяльність мікроорганізмів штаму *S. pyogenes* (див. рис. 2, б).

Різну чутливість досліджуваних мікроорганізмів до дії синтезованого (Na⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, CO₃²⁻)-вмісного кальцію фосфату можна пов'язувати з відмінностями в механізмах підтримки внутрішньоклітинного рівня катіонів металів у різних видів бактерій. Зокрема, *S. pyogenes* притаманна транскрипційно-чутлива система для експорту Cu²⁺, яка кодується опероном *cop YAZ*. У випадку підвищення внутрішньоклітинного рівня катіонів купруму відбувається заповнення метал-чутливого сайту ендogenous Cu²⁺-чутливого регулятора транскрипції, який, у свою чергу, індукує транскрипцію насоса експорту Cu²⁺. Це призводить до обмеження внутрішньоклітинної доступності Cu²⁺ нижче чітковизначеної межі. У випадку перевантаження транскрипційно-чутливої системи експорту Cu²⁺ додаткові цитоплазматичні компоненти, такі як глутатіон, обмежують доступність Cu²⁺ шляхом його хелатування або “буферизації” і, таким чином, запобігають його токсичності щодо *S. pyogenes* [12]. Крім того, було також показано, що у штамів *S. pyogenes* наявний Dpr-білок стресу, що надає клітині стійкості щодо токсичної дії катіонів металів, а також пероксиду водню [13].

Отже, виявлено підвищення пригнічувальної дії наночастинок кальцію фосфатів щодо умовно патогенних мікроорганізмів внаслідок їх модифікування іонами Cu^{2+} та Zn^{2+} . Раніше також повідомлялося про покращення антимікробної дії наночастинок ГАП внаслідок їх легування іонами цинку [4]. Показано, що нанорозмірний ГАП не впливав на клітини *S. aureus* ATCC 25923 та *E. coli* ATCC 25922 у діапазоні концентрацій від 1,95 до 1000 мкг/мл, а його аналог, легований іонами цинку, пригнічував їх ріст [4]. Також зазначалося, що грампозитивні мікроорганізми *S. aureus* більш чутливі до легованого іонами цинку ГАП порівняно з грамнегативними *E. coli* [4].

Існує декілька механізмів протимікробної дії іонів купруму та цинку. По-перше, іони металів зв'язуються з білками та дезактивують їх. По-друге, іони металів можуть взаємодіяти з мікробною мембраною, спричиняти її структурні зміни та підвищувати проникність. Крім того, вони можуть взаємодіяти з мікробними нуклеїновими кислотами, перешкоджаючи реплікації мікроорганізмів [14]. Токсичність катіонів цинку щодо бактерій також пов'язують з індукцією оксидативного стресу [15].

Таким чином, синтезовано наночастинок (30–50 нм) хімічно модифікованих кальцію фосфатів апатитового типу і досліджено їх антимікробну активність щодо умовно патогенних мікроорганізмів *S. aureus*, *S. pyogenes* та *P. aeruginosa*. За даними хімічного аналізу визначено вміст легувальних добавок: Na^+ – 0,19–0,21 % мас., C – 0,98–1,02 % мас., Cu^{2+} – 0,42% мас. і Zn^{2+} – 0,36 % мас.). Результати ІЧ-спектроскопії свідчать про часткове заміщення фосфату карбонатними групами (Б-тип) у структурі апатитового типу. Встановлено, що модифікування кальцію фосфатів іонами Cu^{2+} та Zn^{2+} сприяє підвищенню їх пригнічувальної дії щодо грампозитивних мікроорганізмів *S. aureus* і грамнегативних *P. aeruginosa*. Стійкість штаму *S. pyogenes* щодо дії кальцію фосфатів, у тому числі і їх аналогів, легованих катіонами купруму та цинку, може бути пов'язана з особливостями підтримки внутрішньоклітинного рівня катіонів металів у зазначеного виду бактерій.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Gomes D.S., Santos A.M.C., Neves G.A., Menezes R.R. A brief review on hydroxyapatite production and use in biomedicine. *Cerâmica*. 2019. **65**, № 374. P. 282–302. <https://doi.org/10.1590/0366-69132019653742706>
2. Naga S.M., Hassan A.M., Awaad M., Killinger A., Gadow R., Bernstein A., Sayed M. Forsterite/nano-biogenic hydroxyapatite composites for biomedical applications. *J. Asian Ceram. Soc.* 2020. **8**, № 2. P. 373–386. <https://doi.org/10.1080/21870764.2020.1743416>
3. Yeo I.-S.L. Modifications of dental implant surfaces at the micro- and nano-level for enhanced osseointegration. *Materials (Basel)*. 2019. **13**, № 1. 89. <https://doi.org/10.3390/ma13010089>
4. Predoi D., Iconaru S.L., Predoi M.V., Motelica-Heino M., Guegan R., Buton N. Evaluation of antibacterial activity of zinc-doped hydroxyapatite colloids and dispersion stability using ultrasounds. *Nanomaterials (Basel)*. 2019. **9**, № 4. 515. <https://doi.org/10.3390/nano9040515>
5. Lu S., McGough M.A.P., Rogers B.R., Wenke J.C., Shimko D., Guelcher S.A. Resorbable nanocomposites with bone-like strength and enhanced cellular activity. *J. Mater. Chem. B*. 2017. **5**, № 22. P. 4198–4206. <https://doi.org/10.1039/c7tb00657h>
6. McGough M.A.P., Boller L.A., Groff D.M., Schoenecker J.G., Nyman J.S., Wenke J.C., Rhodes C., Shimko D., Duvall C.L., Guelcher S.A. Nanocrystalline hydroxyapatite-poly(thioketal urethane) nanocomposites stimulate a combined intramembranous and endochondral ossification response in rabbits. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2020. **6**, № 1. P. 564–574. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.9b01378>

7. Jin S.-E., Jin H.-E. Antimicrobial activity of zinc oxide nano/microparticles and their combinations against pathogenic microorganisms for biomedical applications: from physicochemical characteristics to pharmacological aspects. *Nanomaterials (Basel)*. 2021. **11**, № 2. 263. <https://doi.org/10.3390/nano11020263>
8. Kolmas J., Groszyk E., Kwiatkowska-Różycka D. Substituted hydroxyapatites with antibacterial properties. *BioMed Res. Int.* 2014. **2014**. 178123. <https://doi.org/10.1155/2014/178123>
9. Ge X. Antimicrobial biomaterials with non-antibiotic strategy. *Biosurf. Biotribol.* 2019. **5**, № 3. P. 71–82. <https://doi.org/10.1049/bsbt.2019.0010>
10. Zhou G., Li Y., Xiao W., Zhang L., Zuo Y., Xue J., Jansen J.A. Synthesis, characterization, and antibacterial activities of a novel nanohydroxyapatite/zinc oxide complex. *J. Biomed. Mater. Res.* 2007. **85**, № 4. P. 929–937. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31527>
11. Strutynska N., Zatovsky I., Slobodyanik N., Malysenko A., Prylutsky Y., Prymak O., Vorona I., Ishchenko S., Baran N., Byeda A., Mischanchuk A. Preparation, characterization, and thermal transformation of poorly crystalline sodium- and carbonate-substituted calcium phosphate. *Eur. J. Inorg. Chem.* 2015. **2015**, № 4. P. 622–629. <https://doi.org/10.1002/ejic.201402761>
12. Stewart L.J., Ong C.-L.Y., Zhang M.M., Brouwer S., McIntyre L., Davies M.R., Walker M.J., McEwan A.G., Waldron K.J., Djoko K.Y. Role of glutathione in buffering excess intracellular copper in *Streptococcus pyogenes*. *mBio*. 2020. **11**, № 6. e02804-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.02804-20>
13. Tsou C.-C., Chiang-Ni C., Lin Y.-S., Chuang W.-J., Lin M.-T., Liu C.-C., Wu J.-J. Oxidative stress and metal ions regulate a ferritin-like gene, dpr, in *Streptococcus pyogenes*. *Int. J. Med. Microbiol.* 2010. **300**, № 4. P. 259–264. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2009.09.002>
14. Stanić V., Dimitrijević S., Antić-Stanković J., Mitrić M., Jokić B., Plečaš I.B., Raičević S. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of copper and zinc-doped hydroxyapatite nanopowders. *App. Surf. Sci.* 2010. **256**, № 20. P. 6083–6089. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2010.03.124>
15. Sirelkhatim A., Mahmud S., Seeni A., Kaus N.H.M., Ann L.C., Bakhori S.K.M., Hasan H., Mohamad D. Review on zinc oxide nanoparticles: Antibacterial activity and toxicity mechanism. *Nano-Micro Lett.* 2015. **7**. P. 219–242. <https://doi.org/10.1007/s40820-015-0040-x>

Надійшло до редакції 05.03.2021

REFERENCES

1. Gomes, D. S., Santos, A. M. C., Neves, G. A. & Menezes, R. R. (2019). A brief review on hydroxyapatite production and use in biomedicine. *Cerâmica*, 65, No. 374, pp. 282-302. <https://doi.org/10.1590/0366-69132019653742706>
2. Naga, S. M., Hassan, A. M., Awaad, M., Killinger, A., Gadow, R., Bernstein, A. & Sayed, M. (2020). Forsterite/nano-biogenic hydroxyapatite composites for biomedical applications. *J. Asian Ceram. Soc.*, 8, No. 2, pp. 373-386. <https://doi.org/10.1080/21870764.2020.1743416>
3. Yeo, I.-S. L. (2019). Modifications of dental implant surfaces at the micro- and nano-level for enhanced osseointegration. *Materials (Basel)*, 13, No. 1, 89. <https://doi.org/10.3390/ma13010089>
4. Predoi, D., Iconaru, S. L., Predoi, M. V., Motelica-Heino, M., Guegan, R. & Buton, N. (2019). Evaluation of antibacterial activity of zinc-doped hydroxyapatite colloids and dispersion stability using ultrasounds. *Nanomaterials (Basel)*, 9, No. 4, 515. <https://doi.org/10.3390/nano9040515>
5. Lu, S., McGough, M. A. P., Rogers, B. R., Wenke, J. C., Shimko, D. & Guelcher, S. A. (2017). Resorbable nanocomposites with bone-like strength and enhanced cellular activity. *J. Mater. Chem. B*, 5, No. 22, pp. 4198-4206. <https://doi.org/10.1039/c7tb00657h>
6. McGough, M. A. P., Boller, L. A., Groff, D. M., Schoenecker, J. G., Nyman, J. S., Wenke, J. C., Rhodes, C., Shimko, D., Duvall, C. L. & Guelcher, S. A. (2020). Nanocrystalline hydroxyapatite-poly(thioketal urethane) nanocomposites stimulate a combined intramembranous and endochondral ossification response in rabbits. *ACS Biomater. Sci. Eng.*, 6, No. 1, pp. 564-574. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.9b01378>
7. Jin, S.-E. & Jin, H.-E. (2021). Antimicrobial activity of zinc oxide nano/microparticles and their combinations against pathogenic microorganisms for biomedical applications: from physicochemical characteristics to pharmacological aspects. *Nanomaterials (Basel)*, 11, No. 2, 263. <https://doi.org/10.3390/nano11020263>
8. Kolmas, J., Groszyk, E. & Kwiatkowska-Różycka, D. (2014). Substituted hydroxyapatites with antibacterial properties. *BioMed Res. Int.*, 2014, 178123. <https://doi.org/10.1155/2014/178123>

9. Ge, X. (2019). Antimicrobial biomaterials with non-antibiotic strategy. *Biosurf. Biotribol.*, 5, No. 3, pp. 71-82. <https://doi.org/10.1049/bsbt.2019.0010>
10. Zhou, G., Li, Y., Xiao, W., Zhang, L., Zuo, Y., Xue, J. & Jansen, J. A. (2008). Synthesis, characterization, and antibacterial activities of a novel nanohydroxyapatite/zinc oxide complex. *J. Biomed. Mater. Res.*, 85, No. 4, pp. 929-937. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31527>
11. Strutynska, N., Zatovsky, I., Slobodyanik, N., Malysenko, A., Prylutsky, Y., Prymak, O., Vorona, I., Ishchenko, S., Baran, N., Byeda A. & Mischanchuk, A. (2015). Preparation, characterization, and thermal transformation of poorly crystalline sodium- and carbonate-substituted calcium phosphate. *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2015, No. 4, pp. 622-629. <https://doi.org/10.1002/ejic.201402761>
12. Stewart, L. J., Ong, C.-L. Y., Zhang, M. M., Brouwer, S., McIntyre, L., Davies, M. R., Walker, M. J., McEwan, A. G., Waldron, K. J. & Djoko, K. Y. (2020). Role of glutathione in buffering excess intracellular copper in *Streptococcus pyogenes*. *mBio*, 11, No. 6, e02804-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.02804-20>
13. Tsou, C.-C., Chiang-Ni, C., Lin, Y.-S., Chuang, W.-J., Lin, M.-T., Liu, C.-C. & Wu, J.-J. (2010). Oxidative stress and metal ions regulate a ferritin-like gene, *dpr*, in *Streptococcus pyogenes*. *Int. J. Med. Microbiol.*, 300, No. 4, pp. 259-264. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2009.09.002>
14. Stanić, V., Dimitrijević, S., Antić-Stanković, J., Mitrić, M., Jokić, B., Plečaš, I. B., & Raičević, S. (2010). Synthesis, characterization and antimicrobial activity of copper and zinc-doped hydroxyapatite nanoparticles. *Appl. Surf. Sci.*, 256, No. 20, pp. 6083-6089. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2010.03.124>
15. Sirelkhatim, A., Mahmud, S., Seeni, A., Kaus, N. H. M., Ann, L. C., Bakhori, S. K. M., Hasan, H. & Mohamad, D. (2015). Review on zinc oxide nanoparticles: Antibacterial activity and toxicity mechanism. *Nano-Micro Lett.*, 7, pp. 219-242. <https://doi.org/10.1007/s40820-015-0040-x>

Received 05.03.2021

I.I. Grynyuk^{1,2}, <https://orcid.org/0000-0002-9868-0053>
N.Yu. Strutynska¹, <https://orcid.org/0000-0001-9738-9689>
O.M. Vasyliuk³, <https://orcid.org/0000-0002-6567-1943>
S.V. Prylutska^{1,4}, <http://orcid.org/0000-0001-5280-8341>
O.V. Livitska¹, <https://orcid.org/0000-0003-4942-793X>
M.S. Slobodyanik¹, <https://orcid.org/0000-0003-2684-9806>

¹Taras Shevchenko National University of Kyiv

²National Technical University of Ukraine "Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute"

³Danylo Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the NAS of Ukraine, Kyiv

⁴National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv

E-mail: igrynyuk@ukr.net

SYNTHESIS AND ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF APATITE-RELATED Cu, Zn-DOPED CALCIUM PHOSPHATE

The nanoparticles (30-50 nm) of apatite-related calcium phosphates have been obtained by the coprecipitation method from an aqueous solution at molar ratios $\text{Ca/P} = 1.67$, $\text{CO}_3^{2-}/\text{PO}_4^{3-} = 1$ and $(\text{Cu}^{2+}, \text{Zn}^{2+})$: $\text{Ca} = 1 : 50$ and a temperature of 25 °C. According to chemical analysis data, the prepared calcium phosphates contain cationic (Na^+ (0.19-0.21 wt%), Cu^{2+} (0.42 wt%) and Zn^{2+} (0.36 wt%)) and anionic (C (0.98-1.02 wt%)) dopants. In the FTIR spectra of prepared calcium phosphates, the positions of vibration modes of carbonate groups confirmed the partial substitution of phosphate anion by carbonate group (B type) in the apatite-type structure. It was found that the doping of apatite-related calcium phosphates with Cu^{2+} and Zn^{2+} cations led to their increased inhibitory effect on gram-positive (*Staphylococcus aureus*) and gram-negative (*Pseudomonas aeruginosa*) microorganisms. Tenfold inhibition of *S. aureus* cell growth was observed at the addition of 5 mM of (Na^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} , CO_3^{2-})-containing calcium phosphate, while its noticeable effect on gram-negative bacteria (*P. aeruginosa*) was observed only at its amount of 10 mM. The obtained results indicate the prospects of using synthesized nanoparticles (Na^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} , CO_3^{2-})-containing calcium phosphate in the development of materials with antibacterial properties.

Keywords: nanoparticles, apatite, zinc, copper, antimicrobial activity.