

УДК 546.01; 546.02; 546.05; 546.06

СИНТЕЗ, СВОЙСТВА И АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ЦИНКЗАМЕЩЕННОГО ГИДРОКСИАПАТИТА

© 2024 г. М. В. Папежук^{1, *}, С. Н. Иванин¹, В. А. Волынкин¹,
П. П. Якупов², Л. В. Васильева¹

¹Кубанский государственный университет,
Россия, 350040 Краснодар, ул. Ставропольская, 149

²Санкт-Петербургский государственный университет,
Россия, 199034 Санкт-Петербург, Университетская наб., 7-9

*e-mail: marina-marina322@mail.ru

Поступила в редакцию 23.12.2023 г.

После доработки 20.06.2024 г.

Принята к публикации 20.06.2024 г.

В работе получены гидроксиапатит (ГА) и цинкзамещенный (ZnГА) гидроксиапатит методом осаждения из раствора. Значения кристаллографических параметров для ZnГА (a , b = 9.41766 Å, c = 6.88048 Å) по отношению к кристаллографическим параметрам ГА (a , b = 9.41866 Å, c = 6.88158) уменьшаются примерно на 0.001 Å. Изменение кристаллографических параметров исследованного ZnГА подтверждает частичное замещение ионов Ca^{2+} на ионы Zn^{2+} в кристаллической решетке ГА. По ИК-спектрам определено наличие функциональных групп (OH^- , PO_4^{3-}) в составе ГА. По данным растровой электронной микроскопии, размер частиц порошка ZnГА, полученного методом осаждения с последующей термообработкой при 900°C, составляет 200–400 нм. Методом энергодисперсионного микроанализа определены соотношения Ca/P и $(\text{Ca}+\text{Zn})/\text{P}$ для ГА и ZnГА, равные 1.68 и 1.66 соответственно. В среде физиологического раствора увеличение растворимости ZnГА в 2 раза по отношению к ГА указывает на перспективу хорошей резорбции в организме. Исследование образцов в виде дисков в растворе SBF показало, что на поверхности происходит активное формирование нового кальций-фосфатного слоя за счет химической адсорбции ионов Ca^{2+} , Mg^{2+} , HPO_4^{2-} , PO_4^{3-} , OH^- из раствора. Состав ZnГА показал активность как к грамположительным: *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, так и к грамотрицательным микроорганизмам: *Escherichia coli*, *Acinetobacter calcoaceticus*.

Ключевые слова: гидроксиапатит, ионное замещение, рентгенофазовый анализ, бактерицидная активность, раствор SBF

DOI: 10.31857/S0002337X24040084, EDN: MZOYKK

ВВЕДЕНИЕ

Гидроксиапатит кальция ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, ГА) благодаря структурному сходству с минеральным компонентом кости является биоактивным материалом и рассматривается как подходящий для использования в имплантологии [1–5]. ГА является преобладающим неорганическим компонентом костной ткани и эмали зубов человека (60–70% в костной ткани). Он обладает высокой биосовместимостью, отсутствием иммуногенности, канцерогенности и медленным разрушением [6–8]. Кроме того, ГА способен к стимуляции костеобразования [9].

После имплантации в организм материалов на основе как биогенного, так и синтезированного ГА могут возникнуть воспалительные

процессы, вызванные грамположительными бактериями *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) [10]. Поскольку сам ГА не обладает обеззараживающими свойствами, целесообразно его применение с бактерицидными агентами. Так как использование антибиотиков не всегда оправдано, в последние годы внимание исследователей привлекают неорганические антимикробные агенты из-за их стабильности и безопасности [11]. По большей части это неорганические антимикробные агенты [12] — ионы меди [13], серебра [14,15] и цинка [16, 17], которые способны замещать ионы кальция в кристаллической решетке. Замещающие ионы могут провоцировать изменения параметров кристаллической решетки, симметрии кристаллов, морфологии, растворимости, биологических характеристик [18, 19]. Введение в состав ГА катионов металлов придает

керамическим материалам бактерицидные свойства и улучшает пролиферацию остеобластов [9, 20, 21].

Ион Zn^{2+} в отличие от вышеперечисленных ионов является важным компонентом, способствующим метаболической активности в организме человека и поддерживающим здоровье костей. Деление клеток, рост клеток и заживление ран являются важными функциями Zn^{2+} . Большинство исследований [22, 23], проведенных с цинксодержащими ГА, указывают на концентрацию цинка в диапазоне от 0.1 до 4%. Наилучшие результаты биосовместимости и остеокондукции достигаются при концентрации Zn^{2+} ~1–2% [24]. При более высоких концентрациях Zn^{2+} (свыше 2%) в ZnГА эффективность в отношении бактерий эмали (*S. mutans*, *Lactobacillaceae* и *Streptococcus sobrinus*) сохраняется, в то время как биосовместимость нарушается.

Цель работы — проведение комплексного химического исследования ГА $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ и ZnГА $Ca_{9.9}Zn_{0.1}(PO_4)_6(OH)_2$ с целью установления структуры, а также изучение растворимости образцов в физиологическом растворе, способности формирования кальций-фосфатного слоя на их поверхности в модельной среде биологической жидкости и антибактериальной активности.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и методы. $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ («х.ч.», ГОСТ 4142-77), $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ («х.ч.», ГОСТ 5106-77), NaCl («ч.д.а.», ГОСТ 4233-77), стандарт-титр Трилон Б (0.1 Н, ТУ 2642-002-62931140-2014), NaCl («х.ч.», ГОСТ 4233), HCl («х.ч.», 1 моль/л, ГОСТ 3118), $CaCl_2$ («х.ч.», ТУ 6-09-4711-81), Na_2SO_4 («х.ч.», ГОСТ 4166), трис(гидроксиметил)аминометан (ТРИС) $(HOCH_2)_3CNH_2$ («х.ч.», ТУ 6-09-4292-76) — «ЛенРеактив» (Санкт-Петербург, Россия), $(NH_4)_2HPO_4$ («ч.д.а.», ГОСТ 3772-74), NH_4OH 25% («ос.ч.», $NaHCO_3$ («х.ч.», ГОСТ 4201), KCl («х.ч.», ГОСТ 4234), $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ («ч.д.а.», ГОСТ 2493), $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ («ч.д.а.», ГОСТ 4209), — «Ареолаб» (Москва, Россия), Эриохром черный Т («ч.д.а.», ТУ 6-09-1760-87).

Рентгенофазовый анализ для определения фазового состава образцов ГА и ZnГА проводился на рентгеновском дифрактометре Shimadzu XRD-7000 X-RAY Diffractometer. Образцы исследовались в диапазоне углов 2θ от 20° до 60° с шагом сканирования 0.01° и временем экспозиции 2 с на CuK_α -излучении, измерения проводились при комнатной температуре. Функция разрешения рентгеновского дифрактометра Shimadzu XRD-7000 определялась в специальном дифракционном эксперименте на порошке Si (стандарт-

ный эталонный порошок Silicon powder, 99%, 325 mesh фирмы Shimadzu Corporation). Оценка размера и микронапряжений исследуемых порошков ГА осуществлялась по методу Вильямсона-Холла, в соответствии с которым FWHM зависит от θ согласно уравнению

$$FWHM \cdot \cos \theta = \frac{\lambda}{D} + 4\varepsilon \cdot \sin \theta, \quad (1)$$

где FWHM — ширина на полувысоте интегральных пиков, рад; $\lambda = 1.5406$ — длина волны CuK_α -излучения, Å; D — искомый размер ОКР, нм; ε — безразмерное значение микронапряжения; θ — брэгговский угол, рад.

Функциональные группы, присутствующие в образце ZnГА, определяли с помощью инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье (FTIR) с использованием спектрофотометра VERTEX 70 (BRUKER, Германия) в среднем инфракрасном диапазоне $400\text{--}4000\text{ см}^{-1}$.

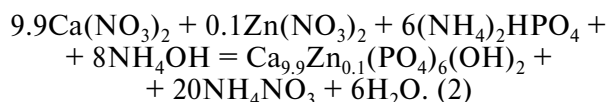
Анализ морфологии поверхности порошков и дисков ГА и ZnГА проводился с использованием сканирующего электронного микроскопа сверхвысокого разрешения JEOL JSM-7500F (Япония). Содержание элементов в образцах ГА и ZnГА определяли с использованием энергодисперсионной приставки Inca X-sight. Для проведения энергодисперсионного анализа синтезированные образцы прессовали в виде дисков под давлением 500 МПа.

Растворимость порошков ZnГА и ГА была оценена по суммарному содержанию ионов Ca^{2+} в физиологическом растворе ($\omega(NaCl) = 0.9\%$), в котором выдерживался образец при 20 ± 1 и $37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 7 суток. Объем раствора и массы образцов определяли согласно рекомендациям ГОСТ ISO 10993-5-2023. Содержание Ca^{2+} в растворе определено методом трилонометрического титрования в присутствии эриохрома черного Т с аммиачным буфером, pH 9–10. Для отбора проб использовали шприцевой мембранный фильтр с размером пор 0.45 мкм.

Биологическую активность ГА оценивали по формированию кальций-фосфатного слоя (КФС) на поверхности образцов ГА в модельном SBF-растворе (SBF — Simulated Body Fluid), имитирующем плазму крови человека, по методике, предложенной Кокубо [25]. Исходный состав реагентов для SBF соответствует работе [26]. Каждый образец помещали в стерильную закрывающуюся пластиковую пробирку с раствором и выдерживали в термостате при $37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 28 суток с ежедневным обновлением раствора.

Анализ антибактериальной активности порошков ГА проводили методом серийных разведений (ГОСТ Р ИСО 20776-1 – 2022). Для анализа образцов были выбраны 4 штамма микроорганизмов: *Escherichia coli*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*. Определение чувствительности бактерий к антимикробному воздействию образцов проводили в планшетах для иммуноферментного анализа на 96 лунок. В лунки вносился питательный мясо-пептонный бульон + 0.2 % глюкозы. Последовательным разбавлением формировался градиент концентраций исследуемых образцов. Опыт проводился в трех повторениях. Для посева из суточных бактериальных культур готовили бактериальные взвеси в 0.15 М NaCl с мутностью 1 по Мак-Фарланду ($\approx 3.0 \times 10^8$ КОЕ). Полученными взвесями контаминировались лунки с образцами и контрольными лунками. Инкубацию проводили при температуре 37°C в течение 24 ч.

Синтез ГА и ZnГА. Для получения образцов ГА готовили стехиометрически необходимое количество нитрата кальция(II) из расчета, что концентрация ионов кальция составляет 0.5 моль/л. В случае ZnГА готовили раствор, содержащий суммарно 0.5 моль/л нитратов кальция(II) и цинка(II). Затем при интенсивном перемешивании в обоих случаях прибавляли раствор гидрофосфата аммония с концентрацией 0.3 моль/л, после чего pH доводили до 10 концентрированным раствором аммиака ($\rho = 0.91$ г/мл). Процесс получения ZnГА приведен ниже:



Полученный осадок вместе с раствором подвергали обработке ультразвуком (UL TRANSONIC CLEANER TC-50, частота 40 кГц, мощность 60 Вт) в течение 30 мин. Осадок отстаивали 48 ч, после чего его отделяли от маточного раствора фильтрованием, промывали горячей (60°C) водой на фильтре, высушивали 2 ч при 100°C, а затем в течение 1 ч при 250°C. После сушки образец отжигали в муфельной печи при 900°C в течение 2 ч.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для описания механизма замещения ионов Ca^{2+} на Zn^{2+} необходимо рассмотреть структуру ГА [27]. Известны две кристаллические формы ГА: моноклинная в пр. гр. $P2_1/b$ и гексагональная в пр. гр. $P6_3/m$ (рис. 1а). Гексагональная фаза встречается чаще, поскольку моноклинная форма легко дестабилизируется присутствием примесей и посторонних веществ [28]. Гекса-

гональная структура содержит два положения Ca1 и Ca2 и фосфатные ионы, пересеченные параллельными каналами, заполненными ионами OH^- . На рис. 1б, 1в можно увидеть, что Ca2 расположены в шахматном порядке треугольной формы, тогда как Ca1 расположены в столбцах параллельно OH^- -каналам [27, 29, 30]. Длины связей составляют: Ca1–P – 3.2 Å, Ca2–P – 3.0 Å, Ca1–H – 5.4 Å, Ca2–H – 2.8 Å.

На рис. 2 приведены данные рентгенофазового анализа синтезированных образцов ГА (а) и ZnГА (б) в диапазоне $20^\circ < 2\theta < 60^\circ$. Полученные образцы демонстрируют хорошо разрешенные дифракционные картины, соответствующие фазе ГА в гексагональной форме. Для уточнения параметров кристаллической решетки и влияния ионов Zn^{2+} на структуру ГА был проведен анализ образцов по методу Ритвельда. Это проверенный метод, обычно используемый для анализа кристаллической структуры [31, 32]. Уточнение выполнено на основании *cif*-файла ГА с гексагональной кристаллической решеткой и пр. гр. $P6_3/m$, полученного авторами [33]. Фон, масштаб, форма линии профиля, параметры кристаллической решетки уточнялись постепенно до получения наименьшего значения параметра соответствия (Goodness of Fit – GOF).

Оценка размера кристаллитов (областей когерентного рассеяния) и микронапряжений исследуемых порошков ГА и ZnГА осуществлялась по методу Вильямсона–Холла [34, 35] (рис. 3).

Определенные значения кристаллографических параметров, размер кристаллитов, величина микронапряжений и параметра соответствия (Goodness of Fit) приведены в табл. 1.

Искажения параметров элементарной ячейки в образце ZnГА вызваны встраиванием модифицирующего иона в кристаллическую решетку ГА. Это явление связано с меньшим значением ионного радиуса цинка (0.74 Å) по отношению к кальцию (0.99 Å) [36]. Изменение параметров элементарной ячейки ГА в образце ZnГА на 0.001 Å является доказательством вхождения ионов Zn^{2+} в кристаллическую решетку ГА, что согласуется с данными [37–39].

На основании данных [2, 40, 41] для синтезированного образца ZnГА определены основные характеристические частоты колебаний групп PO_4^{3-} и OH^- . ИК-спектры образцов ГА и ZnГА приведены на рис. 4.

Полосы поглощения в ИК-спектрах соединений совпадают. Полосы поглощения функциональных групп ГА и ZnГА приведены в табл. 2.

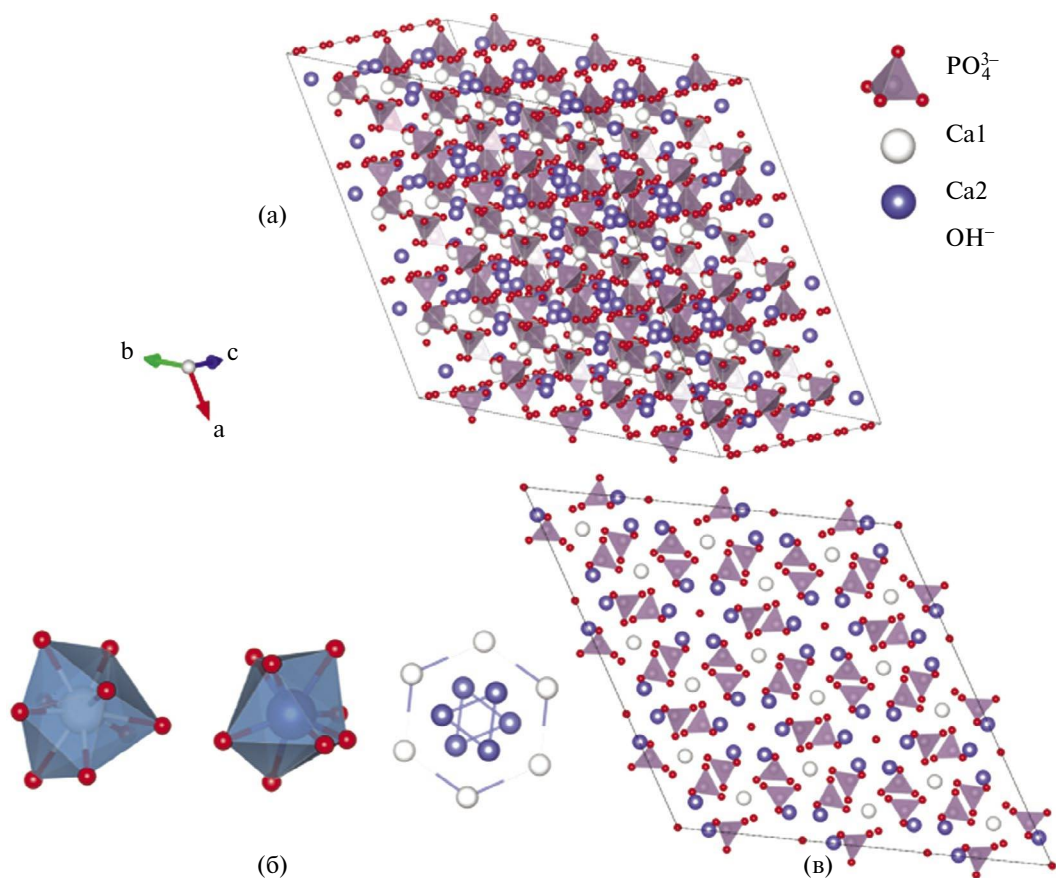


Рис. 1. Решетка ГА с узлами Са (а), координационные полиэдры (б), вид структуры ГА по оси c (в), полученные с помощью программы VESTA 3.

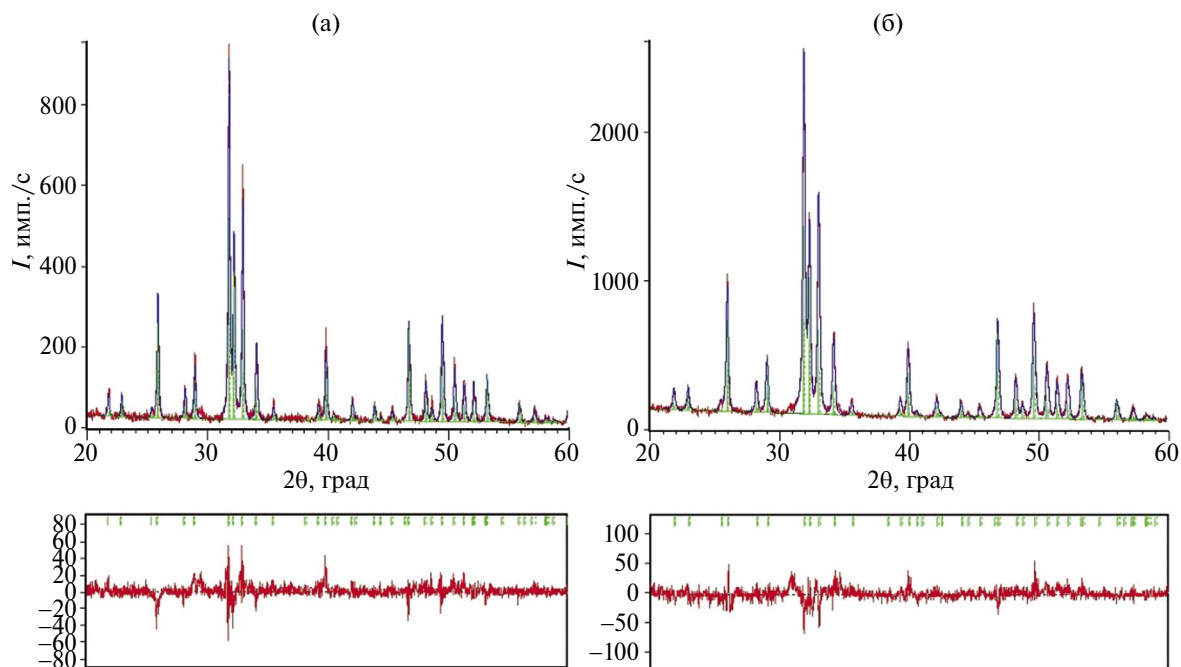


Рис. 2. Рентгеновские дифрактограммы синтезированных образцов ГА (а) и ZnГА (б) и аппроксимация методом Ритвелда: экспериментальные данные представлены красной сплошной линией, расчетный профиль – синяя сплошная линия, кривая разницы (экспериментальная минус рассчитанная) – сплошная красная линия.

Таблица 1. Параметры кристаллической решетки, размеры кристаллитов, величины микронапряжений и параметра соответствия (GOF)

Образец	$a = b, \text{\AA}$	$c, \text{\AA}$	$D, \text{нм}$	$\varepsilon \times 10^4$	GOF
ГА	9.4187 ± 0.0006	6.8816 ± 0.0005	85	1.25	1.69
ZnГА	9.4177 ± 0.0006	6.8805 ± 0.0005	55	1.75	1.71

Таблица 2. Полосы поглощения функциональных групп ГА и ZnГА в ИК-спектрах

Функциональная группа	Полоса поглощения, см^{-1}	Литературные данные
OH^- структурная	3572, 631	[42]
PO_4^{3-} изгиба ν^4	600	[19, 43]
PO_4^{3-} изгиба ν^2	474	[44]
PO_4^{3-} растяжения ν^1	962	[45]
PO_4^{3-} изгиба ν^3	1024, 1087	[46, 47]

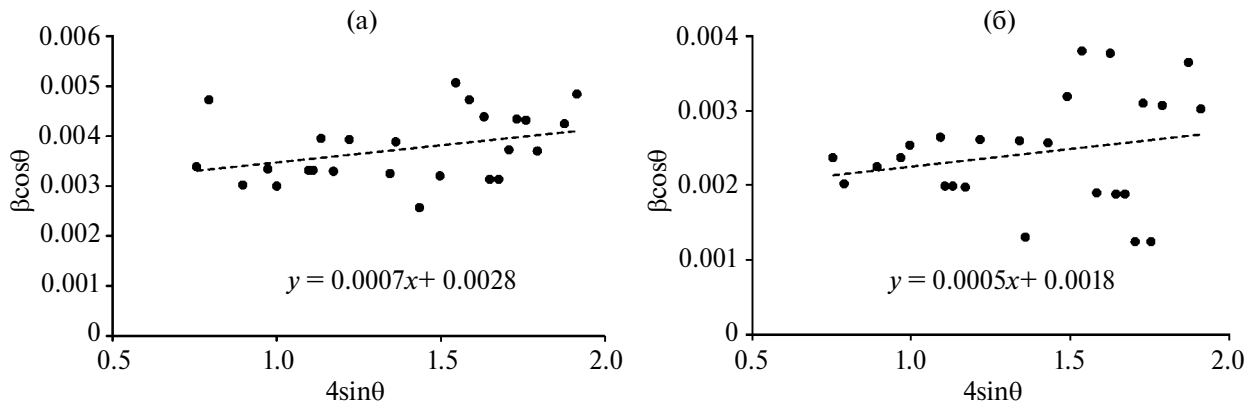


Рис. 3. Зависимости уширения пиков (β) порошков ГА (а) и ZnГА (б) от угла отражения (θ) (ур-е 1), представленные в линеаризованных координатах в соответствии с методом Вильямсона – Холла.

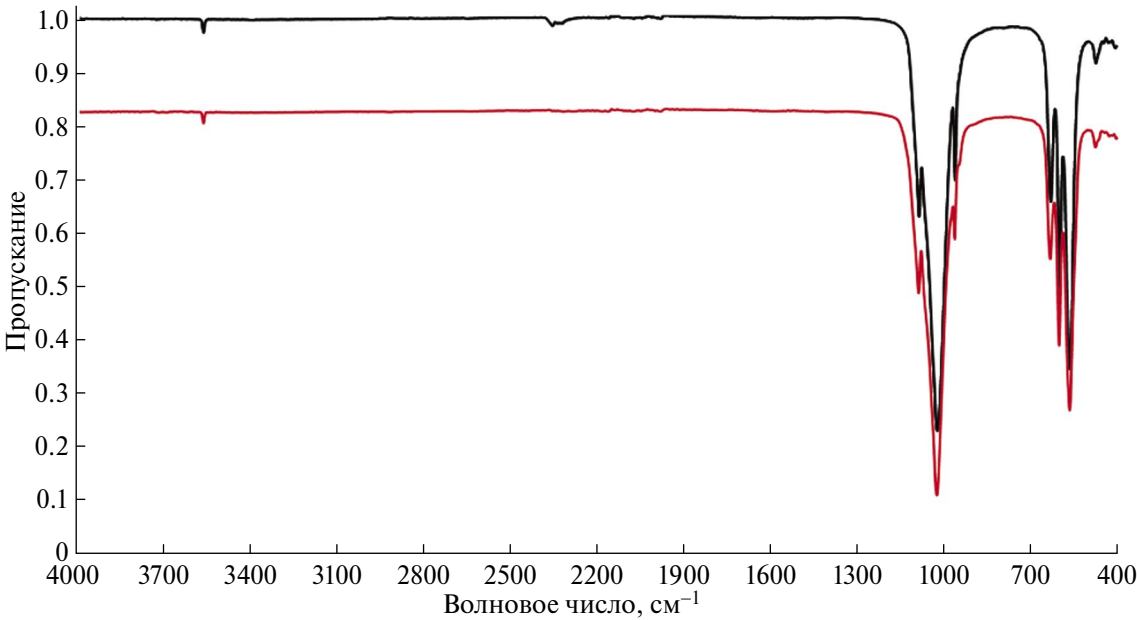


Рис. 4. ИК-спектры образцов ГА (красная линия), ZnГА (черная линия).

Растровая электронная микроскопия использовалась для оценки структуры, размеров частиц и изучения морфологии поверхности образцов на основе ГА и ZnГА в форме дисков. Микроструктура была исследована в режиме детектирования вторичных электронов. Преимущество использования режима регистрации вторичных электронов заключается в возможности исследования морфологии поверхности с зависимостью контрастности от рельефа [48].

На рис. 5а и 5б приведены микрофотографии ГА при увеличении в 2500 и 10000 раз соответственно. Синтезированный образец представляет собой агломераты микрометрового размера, состоящие из более мелких частиц размером 300–500 нм. Анализируя структуру образца ZnГА при увеличении в 2500 и 10000 раз (рис. 5в, 5г), можно сделать вывод, что агломераты образца состоят из спеченных частиц сферической формы с размером 200–400 нм.

На рис. 6 представлены область сканирования 30×20 мкм (а), ЭДА-спектр образца ZnГА (б),

карты распределения элементов в образце ZnГА (в). Аналогичное исследование выполнено для ГА. Результаты энергодисперсионного микроанализа ZnГА приведены в табл. 3. По результатам ЭДА, для исследуемого образца ГА характерно наличие следующих элементов: Са, Р и О. В образце ZnГА присутствует сигнал Zn, который по отношению к пикам других элементов имеет низкую интенсивность, поскольку степень замещения кальция на цинк в ходе синтеза составляет порядка 1%. В результате анализа были рассчитаны соотношения Са/Р и (Са+Zn)/Р, равные 1.68 и 1.66 соответственно. Полученные кальций-фосфатные соотношения близки к значению в стехиометрическом ГА (1.67) [46, 49, 50].

Способность материала к резорбции можно определить с использованием величин растворимости. В табл. 4 приведены значения растворимости порошков ГА и ZnГА в физиологическом растворе при температурах 20 ± 1 и $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

Растворимость ZnГА при комнатной температуре и 37°C выше растворимости незамещенного

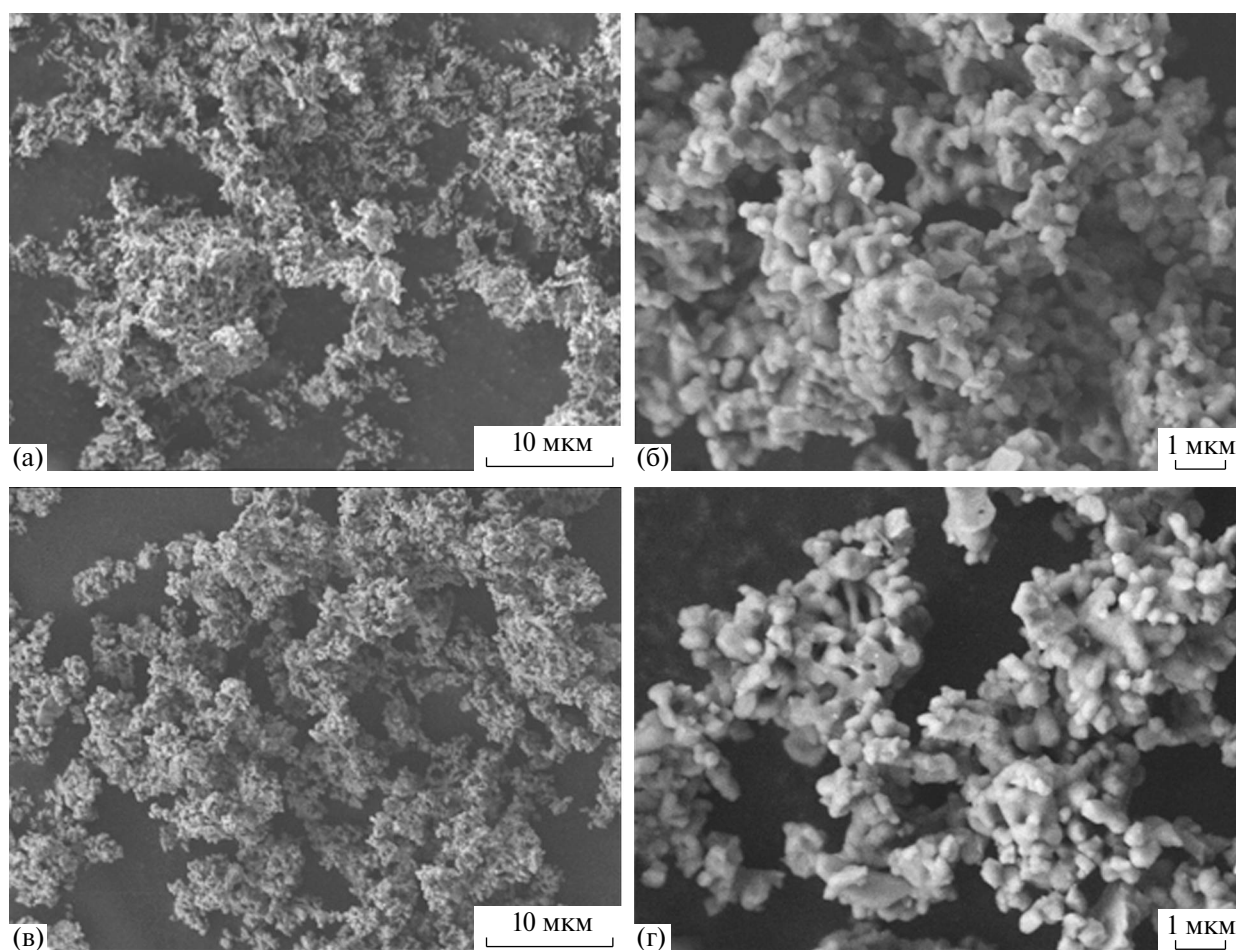


Рис. 5. Микрофотографии образцов ГА (а, б) и ZnГА (в, г) при разных увеличениях.

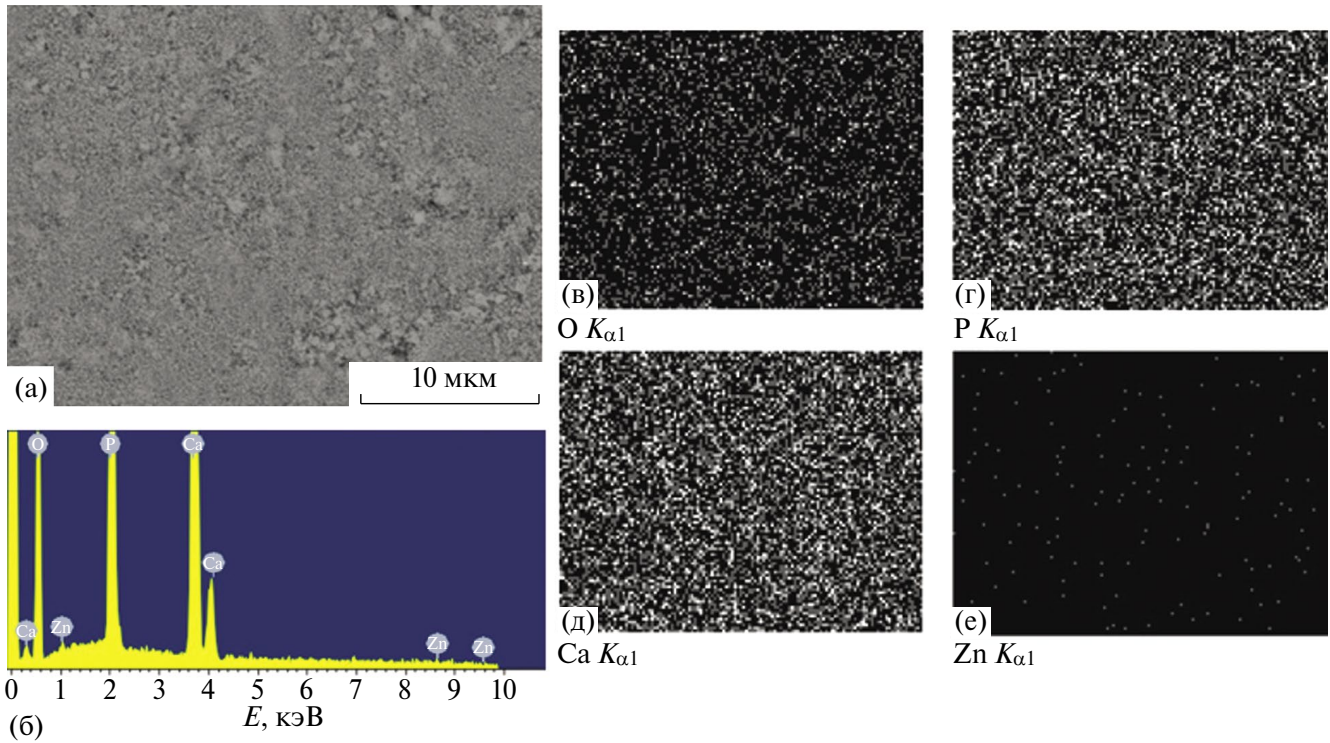


Рис. 6. Область сканирования образца (а), ЭДА-спектр образца ZnГА, карта распределения элементов в образце ZnГА (в–е).

Таблица 3. Элементный состав синтезированных образцов ГА

Элемент	C, ат.%	
	ГА	ZnГА
O	65.42	71.20
P	12.88	10.81
Ca	21.70	17.81
Zn	-	0.18
Ca/P	1.68	-
(Ca+Zn)/P	-	1.66

Таблица 4. Растворимость порошков ГА и ZnГА в физиологическом растворе при pH 7, ω (NaCl) = 0.9%

Образец	Концентрация ионов Ca ²⁺ ×10 ³ , моль/л	
	20°C	37°C
ГА	1	1.5
ZnГА	2	3

ГА в 2 раза. Увеличение растворимости связано с уменьшением размера кристаллитов на 35% (табл. 1), а также с микронапряжениями, возникающими при встраивании ионов Zn²⁺ в структуру ГА в модифицированном образце [51, 52]. В свою очередь увеличение растворимости ZnГА положительно повлияет на резорбируемость материалов на его основе [53].

Способность вещества связываться с костями нередко оценивается при изучении способности апатита образовываться на поверхности материала в моделируемом растворе SBF, содержащем концентрацию ионов, почти равную концентрации ионов плазмы крови человека. Скорость формирования КФС на поверхности таблеток ZnГА, ГА оценена по уменьшению суммарной концентрации ионов кальция и магния (ΔC(Ca²⁺ + Mg²⁺), моль/л) в растворе SBF. На основании измеренной суммарной концентрации ионов Ca²⁺ и Mg²⁺ в растворе построены кинетические кривые (ΔC(Ca²⁺ + Mg²⁺), моль/л – τ, сут) их накопления на поверхностях подложек из раствора SBF (рис. 7). В ежедневно отбираемых пробах комплексонометрическим титрованием определяли суммарное содержание ионов Ca²⁺ и Mg²⁺ в связи с близкими значениями констант устойчивости комплексов кальция и магния с ЭДТА.

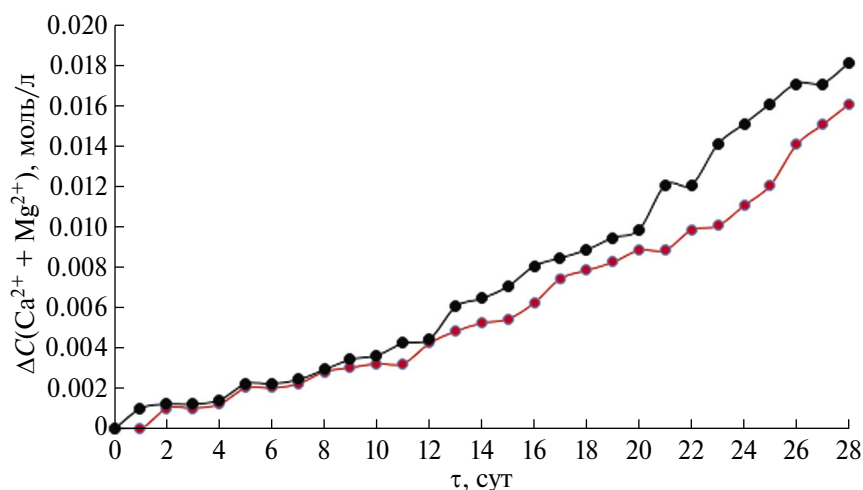


Рис. 7. Кривые накопления ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} на поверхности таблеток ГА (красная линия), ZnГА (черная линия) из раствора SBF.

Согласно данным [54–56], выдерживание образцов ГА в растворе SBF приводит к адсорбции ионов Ca^{2+} , Mg^{2+} , HPO_4^{2-} , PO_4^{3-} , OH^- и образованию нового КФС.

Элементный состав и морфология поверхности дисков, выдержанных в растворе SBF, были оценены перед экспериментом (0 суток), на 14- и 28-е сутки. На рис. 8 можно увидеть, что после выдерживания образца ZnГА в растворе SBF на 14-е сутки происходит укрупнение частиц

вследствие образования апатитового слоя. Размер зерен составляет около 300–400 нм. К 28-м суткам наличие КФС становится явным, размер зерен фосфатов кальция на поверхностном слое составляет 400–600 нм. По истечении 14 суток в спектре ЭДА можно увидеть характерный пик Mg^{2+} , свидетельствующий о его сорбции из раствора.

Для анализа антибактериальной активности образцов были выбраны 4 штамма микроорганиз-

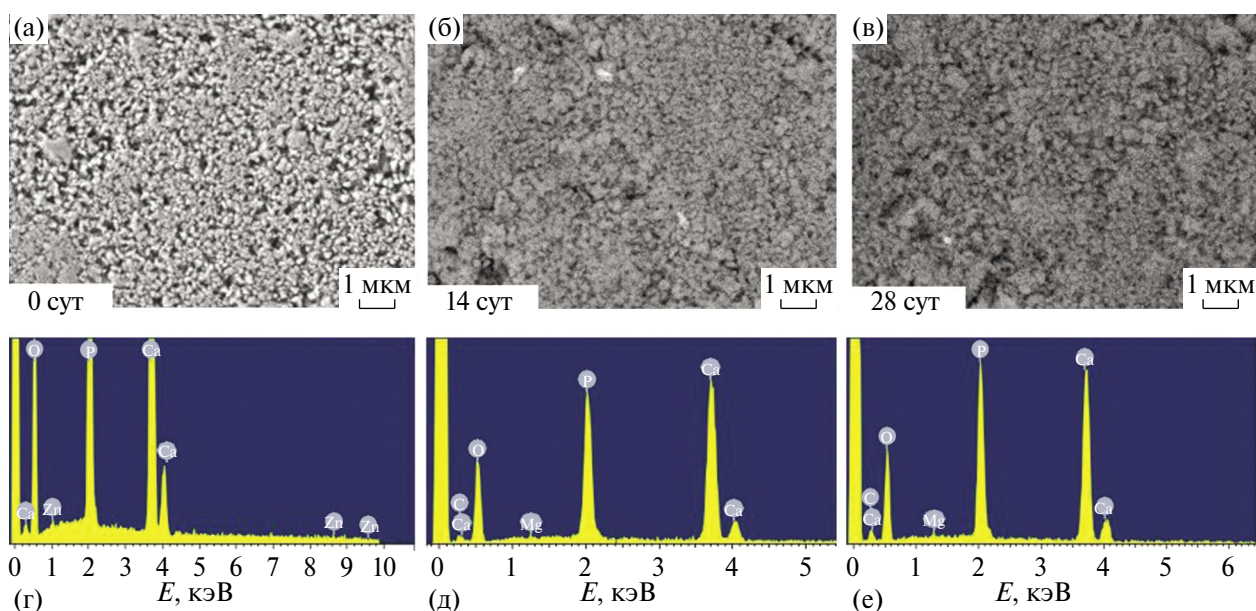


Рис. 8. Микрофотографии поверхности образца ZnГА при увеличении в 10000 раз (а–в), показывающие динамику роста КФС, и ЭДА-спектры (г–е) образца ZnГА, выдержанного в растворе SBF в течение 0, 14, 28 суток.

мов. Два штамма грамотрицательных: *Escherichia coli*, *Acinetobacter calcoaceticus* (клеточная стенка состоит из двух мембран и монослоя пептидогликана), два штамма грамположительных: *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* (клеточная стенка состоит из одной мембраны и множественного слоя пептидогликана). Штаммы микроорганизмов выращивали на плотных питательных средах при 37°C в течение одних суток. Минимальная концентрация образца, которой достаточно для подавления жизнедеятельности бактерии (минимальная ингибирующая концентрация МИК), определялась по отсутствию прорастания бактерий в соответствующих лунках.

Используя метод разведений в бульоне (табл. 5), обнаружили, что образец ZnГА обладает слабыми антибактериальными свойствами [13, 57, 58]. Образец ГА активности не показал.

Образец ZnГА эффективен при концентрации 4000 мкг/мл к *Bacillus cereus*, *S. aureus*, *E. coli*. По отношению к *Ac. calcoaceticus* эффективность проявляется при концентрации 5000 мкг/мл.

Таблица 5. Значения МИК для различных штаммов

Образец	МИК, мкг/мл			
	<i>Bacillus cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Ac. calcoaceticus</i>	<i>E. coli</i>
ZnГА	4000	4000	5000	4000
ГА	-	-	-	-

В статье [59] приводится близкое значение МИК препарата Цефтриаксон, которое равно 0.12 мг/мл по отношению к *E.coli* и от 4 до 64 мг/мл для *St. aureus*. Материал на основе ZnГА можно рассматривать как биоматериал, предназначенный для костной имплантации и обладающий локальным антибактериальным эффектом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синтезированы ГА $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ и $\text{Ca}_{9,9}\text{Zn}_{0,1}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Снижение параметров кристаллической решетки ZnГА относительно незамещенного образца ГА на 0.001 Å указывает на замещение ионов Zn^{2+} в кристаллической решетке ГА. Полученный порошок ZnГА имеет равномерное распределение элементов по поверхности, а соотношение $(\text{Ca}+\text{Zn})/\text{P}$ составило 1.66. ZnГА показал более высокие значения растворимости по сравнению с ГА в физиологическом растворе. При выдерживании ГА в растворе SBF происходит образование КФС

на поверхности. Исследование антибактериальной активности показали, что ГА не обладает антибактериальными свойствами, а ZnГА имеет слабую антибактериальную активность по отношению к грамотрицательным (*Escherichia coli*, *Acinetobacter calcoaceticus*) и к грамположительным микроорганизмам (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*), поэтому материал на основе ZnГА в перспективе может применяться как биоактивный с антибактериальными свойствами для костной имплантации.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Работа выполнена на оборудовании НОЦ ЦКП “Диагностика структуры и свойств наноматериалов” и ИЛ УНПК “Аналит” ФГБОУ ВО “Кубанский государственный университет”.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и образования РФ (проект государственного задания FZEN-2023-0006).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Currey J. Biomaterials: Sacrificial Bonds Heal Bone // Nature. 2001. V. 414. P. 699–708. <https://doi.org/10.1038/414699a>

2. Bakan F., Laçin O., Sarac H. A Novel Low Temperature Sol–Gel Synthesis Process for Thermally Stable Nano Crystalline Hydroxyapatite // Powder Technol. 2013. V. 233. P. 295–302. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2012.08.030>

3. Chatakun P., Nunez-Toldra R., Diaz Lopez E.J., Gil-Recio, C., Martinez-Sarra E., Hernandez-Alfaro F., Ferres-Padro E., Giner-Tarrida L., Atari M. The Effect of Five Proteins on Stem Cells Used for Osteoblast Differentiation and Proliferation: A Current Review of the Literature // Cell Mol. Life Sci. 2014. V. 71. P. 113–142. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1326-0>

4. Пাপежук М.В., Иванин С.Н., Якупов Р.П., Бузько В.Ю., Сухно И.В., Гнеуш А.Н. Синтез микрокристаллического гидроксиапатита с полимерными органическими добавками и получение волокон на его основе методом электроформования // Журн. СФУ. Химия. 2024. Т. 17. № 1. С. 138–150.

5. Ковылин Р.С., Алейник Д.А., Федюшкин И.Л. Современные пористые полимерные имплантаты: изготовление, свойства и применение // Высокомолекулярные соединения (серия С). 2021. Т. 63. № 1. С. 33–53. <https://doi.org/10.31857/S2308114721010039>

6. Папезжук М.В., Пилунова Е.М., Иванин С.Н., Якунов Р.П. Синтез микрокристаллического гидроксиапатита и получение волокон методом электроформования на его основе // Тр. КНЦ РАН. Сер.: Технические науки. 2023. Т. 14. № 2. С. 192–196. <https://doi.org/10.37614/2949-1215.2023.14.2.036>
7. Писарева Е.В., Власов М.Ю., Волова Л.Т. Показатели обмена костной ткани кроликов при введении «Аллогенного гидроксиапатита» // Изв. Самарского научного центра Российской академии наук. 2015. Т. 17. № 5(3). С. 908–912.
8. Романова Д.А., Писарева Е.В., Даниэль М.А., Власов М.Ю. Исследование безопасности применения аллогенного гидроксиапатита при моделировании глюкокортикоидной остеорезорбции в эксперименте на крысах // Остеопороз и остеопатии. 2020. Т. 23. № 2. С. 139–140.
9. Velasco Barraza R., Alvarez Suarez A.S., Villarreal Gomez L.J., Paz González J.A., Iglesias A.L., Vera Graziano R. Designing a Low-Cost Electrospinning Device for Practical Learning in a Bioengineering Biomaterials Course // Rev. Mex. Ing. Bioméd. 2016. V. 37. № 1. P. 7–16. <https://doi.org/10.17488/RMIB.37.1.1>
10. Thomas M., Puleo D. Infection, Inflammation, and Bone Regeneration: a Paradoxical Relationship // J. Dent. Res. 2011. V. 90. № 9. P. 1052–1061. <https://doi.org/10.1177/0022034510393967>
11. Korai H. Current Situation and Future of Inorganic Antimicrobial Agent // J. Inorg. Mater. Jpn. 1999. V. 6. P. 428–436. <https://doi.org/10.1002/vjch.201800068>
12. Singh A., Dubey A.K. Various Biomaterials and Techniques for Improving Antibacterial Response // ACS Appl. Bio Mater. 2018. V. 1. P. 3–20. <https://doi.org/10.1021/acsabm.8b00033>
13. Shanmugam S., Gopal B. Copper Substituted Hydroxyapatite and Fluorapatite: Synthesis, Characterization and Antimicrobial Properties // Ceram. Int. 2014. V. 40. P. 15655–15662. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2014.07.086>
14. Rameshbabu N., Sampathkumar T.S., Prabhakar T.G., Sastry V.S., Murty K.V. G.K., Prasad Rao K. Antibacterial Nanosized Silver Substituted Hydroxyapatite: Synthesis and Characterization // J. Biomed. Mater. Res. A. 2007. V. 80. № 3. P. 581–591. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.30958>
15. Zhang Y., Huang X., Ding Q., Pang X. Antibacterial and Bioactivity of Silver Substituted Hydroxyapatite/TiO₂ Nanotube Composite Coatings on Titanium // Appl. Surf. Sci. 2014. V. 314. P. 348–357. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.07.027>
16. Фадеева И.В., Бакунова Н.В., Комлев В.С., Медвецкий Л., Фомин А.С., Гурин А.Н. Цинк и серебросодержащие гидроксиапатиты: синтез и свойства // Докл. Академии наук. 2012. Т. 442. № 6. С. 780–783. <https://doi.org/10.1134/S0012500812020097>
17. Thian E. S., Konishi T., Kawanobe Y., Lim P.N., Choong C., Ho B., Aizawa M. Zinc-substituted Hydroxyapatite: a Biomaterial with Enhanced Bioactivity and Antibacterial Properties // J. Mater. Sci.: Mater. Med. 2013. V. 24. № 2. P. 437–445. <https://doi.org/10.1007/s10856-012-4817-x>
18. Shi D. Introduction to Biomaterials. World Scientific Publishing, 2006. 253 p.
19. Berzina-Cimdina L., Borodajenko N. Research of Calcium Phosphates Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy // Infrared Spectrosc. – Mater. Sci., Eng. Technol. 2012. V. 6. P. 124–148. <https://doi.org/10.5772/36942>
20. Yang L., Perez-Amodio S., Barrere-de Groot F.Y., Everts V., Van Blitterswijk C., Habibovic P. The Effects of Inorganic Additives to Calcium Phosphate on in Vitro Behavior of Osteoblasts and Osteoclasts // Biomaterials. 2010. V. 31. № 11. P. 2976–2989. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.01.002>
21. Медков М.А., Грищенко Д.Н., Руднев В.С., Шулепин И.В., Череповский А.С., Пономаренко А.И., Дюйзен И.В. Особенности остеорепарации при использовании биоматериалов на основе гидроксиапатита и стронций-замещенного гидроксиапатита // Тихоокеанский медицинский журн. 2015. № 4. С. 48–52.
22. Samani S., Hossainipour S.M., Tamizifar M., Rezaie H.R. In Vitro Antibacterial Evaluation of Sol-gel-derived Zn-, Ag-, and (Zn+Ag)-doped Hydroxyapatite Coatings Against Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus // J. Biomed. Mater. Res. Part A. 2013. V. 101. P. 222–230. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34322>
23. Anwar A., Akbar S., Sadiqa A., Kazmi M. Novel Continuous Flow Synthesis, Characterization and Antibacterial Studies of Nanoscale Zinc Substituted Hydroxyapatite Bioceramics // Inorg. Chim. Acta. 2016. V. 453. P. 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2016.07.041>
24. Chung R.-J., Hsieh M.-F., Huang K.-C., Perng L.-H., Chou F.-I., Chin T.-S. Anti-microbial Hydroxyapatite Particles Synthesized by a Sol-Gel Route // J. Sol-Gel Sci. Technol. 2005. V. 33. P. 229–239. <https://doi.org/10.1007/s10971-005-5618-1>
25. Ohtsuki C., Kushitani H., Kokubo T., Kotani S., Yamamuro T. Apatite Formation on the Surface of Ceravital-Type Glass-Ceramic in The Body // J. Biomed. Mater. Res. 1991. V. 25. P. 1363–1370. <https://doi.org/10.1002/jbm.820251105>
26. Kokubo T., Takadama H. How Useful is SBF in Predicting in vivo Bone Bioactivity // Biomaterials. 2006. V. 27. № 15. P. 2907–2915. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.017>
27. Ressler A., Zuzic A., Ivanisevic I., Kamboj N., Ivankovic H. Ionic Substituted Hydroxyapatite for Bone Regeneration Applications: A Review // Open Ceram. 2021. V. 6. P. 100122. <https://doi.org/10.1016/j.oceram.2021.100122>

28. Boanini E., Gazzano M., Bigi A. Ionic Substitutions in Calcium Phosphates Synthesized at Low Temperature // *Acta Biomater.* 2010. V. 6. P. 1882–1894. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.12.041>.
29. Makshakova O.N., Gafurov M.R., Goldberg M.A. The Mutual Incorporation of Mg^{2+} and CO_3^{2-} into Hydroxyapatite: A DFT Study // *Materials.* 2022. V. 15. P. 9046. <https://doi.org/10.3390/ma15249046>
30. Cipreste M.F., Peres A.M., Cotta A.A.C., Aragon F.H., Antunes A.M., Leal A.S., Macedo W.A.A., Sousa E.M.B. Synthesis and Characterization of ^{159}Gd -Doped Hydroxyapatite Nanorods for Bioapplications as Theranostic Systems // *Mater. Chem. Phys.* 2016. V. 181. P. 301e311. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2016.06.063>
31. Guerra-Lopez J.R., Bianchi A.E., Ramos M.A., Ferraresi-Curotto V., Güida J.A., Echeverría G.A. Novel Synthesis and Crystallographic Results of Zinc Substituted Hydroxyapatite with High Thermal Stability // *Phys. B: Condens. Matter.* 2024. V. 676. P. 415676. <https://doi.org/10.1016/j.physb.2024.415676>
32. Papezhuk M.V., Ivanin S.N., Yakupov R.P., Buz'ko V.Y., Sukhno I.V., Gneush A.N., Petriev I.S. Obtaining Polyvinylpyrrolidone Fibers Using the Electroforming Method with the Inclusion of Microcrystalline High-Temperature Phosphates // *Int. J. Mol. Sci.* 2024. V. 25. P. 2298. <https://doi.org/10.3390/ijms25042298>
33. Hughes J.M., Cameron M., Crowley K.D. Structural Variations in Natural F, OH, and Cl Apatites // *Am. Mineral.* 1989. V. 74. P. 870–876.
34. Rabiei M., Palevicius A., Dashti A., Nasiri S., Monshi A., Doustmohammadi A., Vilkauskas A., Janusas G. X-ray Diffraction Analysis and Williamson-Hall Method in Usdm Model for Estimating More Accurate Values of Stress-Strain of Unit Cell and Super Cells ($2 \times 2 \times 2$) Of Hydroxyapatite, Confirmed by Ultrasonic Pulse-Echo Test // *Materials.* 2021. V. 14. P. 2949. <https://doi.org/10.3390/ma14112949>
35. Горячко А.И., Иванин С.Н., Бузько В.Ю. Синтез, микроструктурные и электромагнитные характеристики кобальт-цинкового феррита // *Конденсированные среды и межфазные границы.* Т. 22. № 4. С. 446–452. <https://doi.org/10.17308/kcmf.2020.22/3115>
36. Shannon R.D. Revised effective ionic radii and systematic studies of interatomic distances in halides and chalcogenides // *Acta Crystallogr., Sect. A.* 1976. V.32. P. 751–767.
37. Shepherd D., Best S.M. Production of Zinc Substituted Hydroxyapatite Using Various Precipitation Routes // *Biomed. Mater.* 2013. V. 8. P. 025003. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/8/2/025003>
38. Thian E.S., Konishi T., Kawanobe Y., Lim P.N., Choong C., Ho B., Aizawa M. Zinc-substituted Hydroxyapatite: A Biomaterial with Enhanced Bioactivity and Antibacterial Properties // *J. Mater. Sci: Mater. Med.* 2013. V. 24. P. 437–445. <https://doi.org/10.1007/s10856-012-4817-x>
39. Friederichs R.J., Chappell H.F., Shepherd D.V., Best S.M. Synthesis, Characterization and Modelling of Zinc and Silicate Co-Substituted Hydroxyapatite // *J. R. Soc. Interface.* 2015. V. 12. № 108. P. 20150190. <https://doi.org/10.1098/rsif.2015.0190>
40. Kannan S., Goetz-Neunhoffer F., Neubauer J., Ferreira J.M.F. Ionic Substitutions in Biphasic Hydroxyapatite and B-Tricalcium Phosphate Mixtures: Structural Analysis by Rietveld Refinement // *J. Am. Ceram. Soc.* 2008. V. 91. № 1. P. 1–12. <https://doi.org/10.1111/j.1551-2916.2007.02117.x>
41. Tazibt N., Kaci M., Dehouche N., Ragoubi M., Atanase L.I. Effect of Filler Content on the Morphology and Physical Properties of Poly(Lactic Acid)-Hydroxyapatite // *Compos. Mater.* 2023. V. 16. P. 809. <https://doi.org/10.3390/ma16020809>
42. Meejoo S., Maneeprakorn W., Winotai P. Phase and Thermal Stability of Nanocrystalline Hydroxyapatite Prepared Via Microwave Heating // *Thermochim. Acta.* 2006. № 447. P. 115–120. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2006.04.013>
43. Han J.-K., Song H.-Y., Saito F., Lee B.-T. Synthesis of High Purity Nano-Sized Hydroxyapatite Powder by Microwave-Hydrothermal Method // *Mater. Chem. Phys.* 2006. № 99. P. 235–239. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2005.10.017>
44. Destainville A., Champion E., Bernache-Assollante D., Laborde E. Synthesis, Characterization and Thermal Behaviour of Apatite Tricalcium Phosphate // *Mater. Chem. Phys.* 2003. № 80. P. 269–277. [https://doi.org/10.1016/S0254-0584\(02\)00466-2](https://doi.org/10.1016/S0254-0584(02)00466-2)
45. Klee W.E., Engel G. Infrared Spectra of the Phosphate Ions in Various Apatite // *J. Inorg. Nucl. Chem.* 1970. V. 32. P. 1837. [https://doi.org/10.1016/0022-1902\(70\)80590-5](https://doi.org/10.1016/0022-1902(70)80590-5)
46. Ma G., Liu X.Y. Hydroxyapatite: Hexagonal or Monoclinic? // *Cryst. Growth Des.* 2009. V. 9. № 7. P. 2991–2994. <https://doi.org/10.1021/cg900156w>
47. Голощанов Д.Л., Кашкаров В.М., Румянцев Н.А., Середин П.В., Ленишин А.С., Агапов Б.Л., Домашевская Е.П. Получение нанокристаллического гидроксиапатита методом химического осаждения с использованием биогенного источника кальция // *Конденсированные среды и межфазные границы.* 2011. Т. 13. № 4. С. 427–441.
48. Buzko V., Babushkin M., Ivanin S., Goryachko A., Petriev I. Study of Electromagnetic Shielding Properties of Composites Based on Glass Fiber Metallized with Metal Films // *Coatings.* 2022. V. 12. № 8. P. 1173. <https://doi.org/10.3390/coatings12081173>

49. Павлова Т.В., Бавыкина Т.Ю. Сравнительная оценка минерального состава и ультрамикроструктуры тканей зуба в норме и при кариесе // Современные наукоемкие технологии. 2009. № 12. С. 15–18.
50. Liu D.-M., Troczynski T., Tseng W.J. Water-Based Sol–Gel Synthesis of Hydroxyapatite: Process Development // *Biomaterials*. 2001. V. 22. P. 1721–1730.
[https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(00\)00332-x](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(00)00332-x)
51. LeGeros R.Z. Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine // *Monogr. Oral. Sci.* 1991. V. 15. P. 1–201.
52. Nelson D.G.A. The Influence of Carbonate on the Atomic Structure and Reactivity of Hydroxyapatite // *J. Dent. Res.* 1981.V. 60. P. 1621–1630.
<https://doi.org/10.1177/0022034581060003S1201>
53. Fulmer M.T., Ison I.C., Hankermayer C.R., Constantz B.R., Ross J. Measurements of the Solubilities and Dissolution Rates of Several Hydroxyapatites // *Biomaterials*. 2002. V. 23. № 3. P. 751–755.
[https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(01\)00180-6](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(01)00180-6)
54. Vargas-Becerril N., Patiño-Carachure C., Rodriguez-Lorenzo L., Téllez-Jurado L. Synthesis of Hybrid Compounds Apatite-alendronate by Reactive Milling and Effects on the Structure and Morphology of the Apatite Phase // *Ceram. Int.* 2013. V. 39. № 4. P. 3921–3929.
<https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2012.10.239>
55. N. Vargas-Becerril, D.A. Sánchez-Téllez, L. Zarazúa-Villalobos, D.M. González-García, M.A. Álvarez-Pérez, C. de León-Escobedo, L. Téllez-Jurado. Structure of Biomimetic Apatite Grown on Hydroxyapatite (HA) // *Ceram. Int.* 2020. V. 46. P. 28806–28813.
<https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2020.08.044>
56. Kim H.-M., Himeno T., Kawashita M., Kokubo T., Nakamura T. The Mechanism of Biomineralization of Bone-like Apatite on Synthetic Hydroxyapatite: an in Vitro Assessment // *J. R. Soc. Interface.* 2004. V. 1. № 1. P. 17–22.
<https://doi.org/10.1098/rsif.2004.0003>
57. Shu X., Liao J., Wang L., Shi Q., Xie X. Osteogenic, Angiogenic, and Antibacterial Bioactive Nanohydroxyapatite Co-Synthesized Using γ -Polyglutamic Acid and Copper // *ACS Biomater. Sci Eng.* 2020. V. 6. № 4. P. 1920–1930.
<https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.0c00096>
58. Хлебникова А.Н., Петрунин Д.Д. Цинк, его биологическая роль и применение в дерматологии // *Вестник дерматологии и венерологии*. 2013. Т. 6. С. 100–116.
59. Юсупов У.К. Минимальная ингибирующая концентрация и антибиопленочная активность эндифитного гриба *Penicillium roqueforti* 12ph, выделенного из растения *Peganum harmala* // *Universum: химия и биология: электрон. научн. журн.* 2022. Т. 2. № 92.
<https://doi.org/10.32743/UniChem.2022.92.2.13021>