

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені В. Н. КАРАЗІНА

Біологічний факультет

Кафедра молекулярної біології та біотехнології

**«Дослідження механізмів антибактеріальної дії іонів міді та
можливості їх практичного використання»**

Кваліфікаційна робота

студента кафедри

Капелюшно Катерини Іванівни

Допущена до захисту «__»_____25 р.

Завідувач кафедри _____

Науковий керівник:

доцент, к.б.н.

Голтвянський А.В.

Оцінка «_____»

«__»_____25 р.

Харків 2025

АНОТАЦІЯ

Було досліджено антибактеріальну дію міді, нанесеної на тканину, міді в хелатованій та вільній (іонній) формах на інтенсивність росту *Staphylococcus aureus* 124 та *Pseudomonas aeruginosa* 18 в системі in vitro після одноразового або «первинного» контакту. Мідь наносили на тканину за допомогою магнетронної та дугової планарної розрядної систем, а для отримання міді в хелатованій формі використовували культуру мікроводоростей *Dunaliella viridis*, стійких до дії високих концентрацій міді. Було показано, що тонкий шар міді (3 мкм), нанесений на тканину, виявляв виражену антибактеріальну активність проти *Staphylococcus* (85% порівняно з антибіотиком меропенемом) і менш виражену активність проти *Pseudomonas*, який є стійким до меропенему. Мідь в іонній формі інгібувала ріст *Staphylococcus aureus* 124 так само, як і антибіотик, а також ефективно інгібувала ріст *Pseudomonas aeruginosa* 18, тобто іони міді не мали видової специфічності, як антибіотик.

Компоненти клітин мікроводоростей *Dunaliella viridis* мали слабо виражену антибактеріальну дію на ці види бактерій, а додаткове додавання сульфату міді до біомаси мікроводоростей призвело до підвищення їх антибактеріальної активності, що більш виражено для культури мікроводоростей, в якій співвідношення «хелатних/іонних» форм міді зміщується в бік іонної форми. Було показано, що антибактеріальна активність біомаси мікроводоростей після першого введення в досліджувані бактеріальні культури залежить від кількості вільних або «слабо зв'язаних» з

клітинними компонентами іонів міді. Припускається, що антибактеріальний ефект тканини з тонким шаром міді може визначатися двома механізмами: дією іонів міді та механічно-бактерицидним ефектом, тоді як хелатні форми міді можуть мати тривалий ефект на бактеріальні культури.

Робота складається з сторінок і містить малюнків. Список літератури містить джерел, у тому числі зарубіжних.

Ключові слова: *Dunaliella viridis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, форми міді, антибактеріальна активність.

ABSTRACT

It was studied the antibacterial effect of copper applied to the fabric, copper in chelated and free (ionic) forms on the growth intensity of *Staphylococcus aureus* 124 and *Pseudomonas aeruginosa* 18 in the *in vitro* system after a single or “primary” contact. Copper was applied to the fabric by magnetron and arc planar discharge systems, and the culture of microalgae *Dunaliella viridis*, resistant to the action of high concentrations of copper, was used to obtain copper in chelated form. It was shown that a thin layer of copper (3 μm) applied to the fabric showed pronounced antibacterial activity against *Staphylococcus* (85% compared to the antibiotic meropenem) and less pronounced activity against *Pseudomonas*, which is resistant to meropenem. Copper in ionic form inhibited the growth of *Staphylococcus aureus* 124 as well as the antibiotic, and also effectively inhibited the growth of *Pseudomonas aeruginosa* 18 i.e., copper ions did not have species specificity like the antibiotic. Components of *Dunaliella viridis* microalgae cells

had weakly expressed antibacterial effect to these types of bacteria, and supplementary addition of copper sulfate to the biomass of microalgae led to an increase of their antibacterial activity and this is more pronounced for microalgae culture in which the ratio «chelated/ionic» forms of copper is shifted to the ionic form. It was shown that the antibacterial activity of microalgae biomass after the first introduction into the tested bacterial cultures depends on the amount of free or “weakly bound” with cell components copper ions. It is suggested that the antibacterial effect of fabric with a thin layer of copper may be determined by two mechanisms: the action of copper ions and mechano-bactericidal effects, while chelated forms of copper may have a prolonged effect on bacterial cultures.

The work consists of pages and contains figures. The list of references contains sources, including foreign ones.

Keywords: *Dunaliella viridis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, copper forms, antibacterial activity.

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ	2
ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ТА АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ	9
1.1. Фізико-хімічні властивості іонів міді (Cu^{2+}).....	9
1.2. Утворення ROS у клітині	17
1.3. Дія ROS на компоненти клітин	18
1.4. Чутливість різних типів бактерій до іонів міді.....	21
1.5. Порівняння дії іонів міді з іншими антимікробними агентами	24
1.6. Практичне використання іонів міді	27
1.7 Екотоксикологічні аспекти використання іонів міді як антимікробних агентів	31
1.8Перспективи подальших досліджень	33
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ.....	34
2.1. Об'єкт дослідження	34
2.2. Приготування мікробної суспензії.....	34
2.3. Визначення протимікробної активності.....	34
2.4. Способи отримання зразків тонкошарової металізованої міді	36
2.5. Спосіб отримання хелатної форми міді в клітинах мікроводоростей <i>Dunaliella viridis</i>	37
2.6. Статистичні методи	38
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ	39
3.1. Стійкість <i>Staphylococcus aureus</i> 124 і <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 18 до тканини з напиленням тонкого шару міді (3 мкм)	39
3.2. Стійкість <i>Staphylococcus aureus</i> 124 і <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 18 до дії іонів міді	41
3.3. Стійкість <i>Staphylococcus aureus</i> 124 і <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 18 до дії міді в хелатній формі.....	43
3.4. Обговорення	51
ВИСНОВОК	58
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	59

ВСТУП

Відкриття пеніциліну А. Флемінгом у 1928 р. і промислове виробництво антибіотиків, яке розпочалося в 40-х роках 20 століття і триває дотепер, мало три величезні наслідки. Стимулювало розвиток біотехнології, призвело до формування нової ери в медицині, а за 60-70 років активного застосування найширшого спектра антибіотиків, до нової глобальної проблеми - антибіотикорезистентності у більшості госпітальних інфекційних мікроорганізмів. Широке застосування антибіотиків у медичній та у ветеринарній практиці призвело до того, що антибіотики стали новим фактором еволюції для мікроорганізмів, які в підсумку сформували резистентність до широкого спектра антибіотиків [1].

У Сполученому Королівстві споживання антибіотиків протягом 2011-2014 років зросло на 6,5%, а в Сполучених штатах 68% антибіотичних препаратів були назначені неналежним чином. Швидке формування резистентності у бактерій вимушує науковців безперервно розробляти та випускати нові антибіотики. Однак з моменту розробки останнього актуального для використання антибіотика минуло вже 30 років, і лише 3 з 41 нових препаратів, що розробляються, має фактичну дію на резистентні бактерії [2].

Інтерес до іонів міді та їх дії виріс знову після поширення внутрішньолікарняних інфекцій, на які не діяли сучасні антибіотики. У 1983 році дослідження в одній з лікарень, показало, що життєздатні бактерії *Escherichia coli* були присутні на дверних ручках з нержавіючої сталі, але були відсутні на дверних ручках з латуні [3]. Це стало відправною точкою для повторного інтересу до іонів міді. Пошук і розробка нових антибактеріальних засобів стала одним із найактуальніших завдань сучасної біотехнології та медицини [4].

Відомо, що багато іонів металів мають антибактеріальну активність [5], а розвиток сучасних нанотехнологій та отримання наночастинок відновили

інтерес до механізму їхньої дії на клітини бактерій [6]. Особливий інтерес у цьому відношенні становлять іони міді. Купрум (Cu) - це один з найпоширеніших мікроелементів, які обов'язково необхідні для функціонування всіх живих організмів, від бактерій до людини. Таку важливість міді здебільшого їй надають окисно-відновні властивості та здатність легко переходити між станами іонів Cu^+ та Cu^{2+} , яка і надає можливість купруму бути в тому числі незамінним кофактором для багатьох ферментів [7].

На те існує кілька причин: іони міді виявляють добре виражені антибактеріальні ефекти, при цьому вони значно дешевші та доступніші за іони срібла, що володіють подібною дією; мідь є есенціальним мікроелементом і, як правило, досить швидко елімінується з організму. Вона може перебувати в різних станах - металізованому, хелатованому з білками та іншими лігандами, формувати наночастинки або бути в іонній формі. Можна вважати, що різні стани міді можуть мати різну біологічну, зокрема й антибактеріальну активність. Можна припустити, що час біологічної дії (короткостроковий або пролонгований), так само може залежати від стану міді. Очікується, що в разі пролонгованої дії міді можна забезпечувати більш тривалу та вибіркову дію на бактерії та організм. Знання антибактеріальної активності міді, що перебуває в різних формах, може значно розширити сфери її застосування використання як антибактеріального агента та забезпечувати організм необхідним пролонгованим надходженням цього есенціального елемента в організм.

Дослідження впливу міді, нанесеної на тканину, міді в хелатній та іонній формах на ріст *Staphylococcus aureus* 124 і *Pseudomonas aeruginosa* 18 дасть змогу розширити сфери її застосування як антибактеріального засобу та сприятимуть розумінню механізму її дії на біологічні системи.

У зв'язку з цим метою роботи було: дослідити механізми антибактеріальної дії іонів міді на різні види бактерій, а також оцінити

можливість їх практичного застосування у біомедичних, харчових і промислових галузях для зменшення бактеріальної контамінації.

Об'єкт роботи: бактерії *Staphylococcus aureus* 124 і *Pseudomonas aeruginosa* 18.

Предмет роботи: механізми антибактеріальної дії іонів міді на різні види бактерій.

Завдання роботи:

1. Визначити стійкість *Staphylococcus aureus* 124 і *Pseudomonas aeruginosa* 18 до тканини з напиленням тонкого шару міді (3 мкм).
2. Визначити стійкість *Staphylococcus aureus* 124 і *Pseudomonas aeruginosa* 18 до водного розчину іонів міді.
3. Визначити стійкість *Staphylococcus aureus* 124 і *Pseudomonas aeruginosa* 18 до міді в хелатній формі.

РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

1.1. Фізико-хімічні властивості іонів міді (Cu^{2+}).

1.1.1. Загальні відомості Cu, як елементу.

Мідь (Cu), який має порядковий номер 29, є перехідним металом та знаходиться в 11-му періоді та 4 групі у періодичній системі елементів. Атомна маса, яка відображає природний ізотопний склад - 63.546 г/моль. Щодо атомної маси, у різних джерелах можуть траплятись невеликі розбіжності, але у цьому огляді візьмемо значення з довідників CRC, які вважаються загальноприйнятим референсом [8]. Як перехідний метал, вона відома своїми фізичними властивостями такими як: характерний червоно-помаранчевий колір та металевий блиск, ковкість та значну тепло та електропровідність. Як елемент, що знаходиться у d-блоці періодичної системи купрум характеризується активною участю електронів з d-орбіталей у хімічних зв'язках та проявом у вигляді існування декількох ступенів окиснення [9]. Для міді найбільш характерні ступені окиснення +1 та +2, Cu^+ та Cu^{2+} відповідно. Хоч Cu^+ існує у твердих сполуках, саме Cu^{2+} є більш поширеним та стабільним у водних середовищах та у більшості сполук [10].

1.1.2. Електронна конфігурація міді (2+) та її заряд.

Згідно принципу Ауфбау та місцем у періодичній системі, електронна конфігурація нейтрального атома міді має такий вигляд: $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 4s^1 3d^9$. Утворення з нейтрального атома міді іону Cu^{2+} обумовлюється видаленням двох електронів. В процесі, іонізація видаляє найбільші за енергією перші електрони. Тому спочатку видаляється 4s1 електрон, а вже потім електрон з повної 3d10 оболонки. В результаті електронна конфігурація іону міді (2+) має вигляд: $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 3d^9$. Конфігурація 3d9 ключовою для багатьох властивостей іону купруму 2+, а неспарений електрон на d-орбіталі надає іону парамагнітних властивостей.

1.1.3. Роль міді в організмі людини.

Мідь є важливим мікроелементом у організмі людини. Особливий вплив вона має на метаболізм і психічний стан людини та існує у двох формах: у першому та другому ступені окиснення [11]. В здоровому організмі вміст міді коливається у межах 80-150 мг, при цьому найбільшу концентрацію цього елементу мають тканини печінки [12]. Наразі відомо понад 50 білків та ферментів у складі яких є мідь [13]. Купроензими - ферменти, кофактором яких є купрум. Вони каталізують великий спектр реакцій, великий відсоток яких займають окисно-відновні реакції. А здатність міді до швидкої зміни ступеня окиснення ($\text{Cu}^{1+} \leftrightarrow \text{Cu}^{2+}$) робить її ідеальним каталітичним центром для таких реакцій. Прикладом одного з найважливіших купроензимів є цитохром с-оксидаза (ССО) - білковий комплекс внутрішньої мембрани мітохондрій (у анаеробних бактерій в клітинній мембрані), що бере на себе значну роль у процесі клітинного дихання, він каталізує відновлення молекулярного кисню до води (у процесі поступового окиснення 4-х молекул цитохрому с) та використовує вільну енергію цієї реакції для генерації трансмембранного протонного градієнта під час дихання [14]. Реакція, яку каталізує цитохром с-оксидаза: $\text{O}_2 + 4\text{e}^- + 4\text{H}^+ \rightarrow 2\text{H}_2\text{O}$. Енергія, яка виробляється в процесі даної реакції, існує у вигляді градієнту рН та мембранного потенціалу, які формуються внаслідок використання H^+ , а також шляхом транспорту цих протонів через білковий комплекс . ССО є абсолютно необхідним для ефективного виробництва енергії шляхом аеробного дихання. Мідь, що міститься в активних центрах ССО, відіграє ключову роль у перенесенні електронів під час цієї реакції. Порушення функції цього ферменту через дефіцит міді призводить до серйозних порушень енергетичного метаболізму. Купроензими приймають участь у таких процесах, як: виробництво енергії (цитохром с-оксидаза), антиоксидантний захист (супероксиддисмутаза 1), підтримка структури тканин (лізілоксидаза), метаболізм заліза (церулоплазмін), синтез нейромедіаторів (дофамін

β-гідроксилаза) [15]. Саме через різноманітність функцій дефіцит міді у організмі може визвати не лише одне, а ряд порушень.

1.1.4. Токсичність контакту з міддю.

Згубна токсичність контакту з міддю була продемонстрована для щонайменше 90 видів бактерій, 30 типів грибів та 20 типів вірусів, але можна припустити, що контакт з мідними поверхнями може впливати на всі види бактерій та вірусів. Наразі багато досліджень підтверджують цю дію купруму та класифікують різні механізми токсичності. Загально визначено 4 механізми токсичності купрум іонів: пошкодження зовнішньої або внутрішньої бактеріальної мембрани, окислювальне пошкодження високореактивними активними формами кисню, інгібування корисних ферментів та деградація ДНК. Токсичність міді напряду залежить від багатьох факторів, таких як: температура, концентрація, рН, кількість бактеріальних клітин, та їх характеристики, наприклад, форма, розмір та склад поверхні. Тому визначення методу для використання антибактеріальної дії сильно залежить від експериментальної системи та виду організму [16]. На малюнку 1 зображені руйнівні процеси у бактеріальній клітині, спричинені контактом з наночастинками міді.

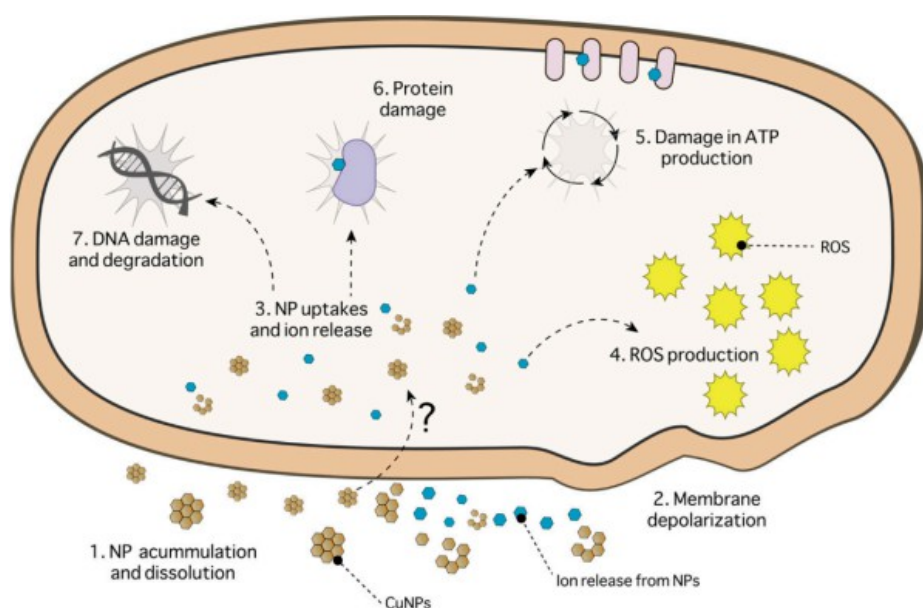


Рис. 1.1. Загальний механізм дії наночастинок міді на бактеріальну клітину. Накопичення, розчинення та проникнення наночастинок у клітину (1), деполаризація та розрив мембрани внаслідок накопичення наночастинок на поверхні клітини (2), проникнення наночастинок в клітину та вивільнення іонів Cu^{2+} через нестабільність НЧ(3), утворення ROS (4), зниження виробництва АТФ (5), пошкодження білків через окислення та заміщення заліза міддю в білках із залізо-сірчаними (Fe-S) центрами (6) та деградація ДНК (7) [17].

1.1.5. Контакт бактеріальних клітин з мідними поверхнями.

Хоч механізм дії контактного знищення бактеріальних клітин ще не повністю відомий, але він вважається найпоширенішим та основним методом застосування антибактеріальних властивостей міді, який використовували ще задовго до відкриття мікроорганізмів та антибіотиків. Багато експериментальних досліджень продемонстрували, що поверхні, які містять щонайменше 55%-70% міді, знищують багато патогенних мікроорганізмів, таких як золотистий стафілокок, кишкова паличка, ентерокок, грибки, такі як *Candida albicans*, і віруси, такі як віруси грипу або вірус імунодефіциту людини (ВІЛ) [18]. У 2008 році Агентство з охорони навколишнього середовища США (EPA) зареєструвало близько 300 мідьвмісних сплавів як антимікробні засоби, що ефективно борються з розмноженням бактерій, відповідальних за небезпечні для життя інфекції. З того часу дослідження антимікробних властивостей міді продовжували значно зростати для використання в різних сферах застосування (очищення води, матеріал для трубопроводів, дезінфектант у гарячій воді для боротьби з легіонелами, робочі поверхні, текстиль, тощо).

Якщо інтерес до міді для очищення води і транспортування більше не обговорюється, то дебати про використання міді в лікарнях і охороні здоров'я все ще відкриті у світлі деяких позитивних результатів досліджень *in vitro*. Контактне знищення уявляє собою механізм, в якому клітинне пошкодження

відбувається саме в результаті контакту з поверхнею, в нашому випадку поверхнею з міді або мідних сплавів. Цей механізм має миттєву та довготривалу дію.

Умови для антимікробної активності міді. Деякі роботи описують мідь як потужний антимікробний агент; мікроорганізми виживають лише кілька хвилин на мідних поверхнях [18]. Однак слід враховувати кілька умов, щоб посилити антимікробну властивість міді: температура та вологість. Ojeil та ін., 2013 р. ініціювали випробування, щоб визнати невідповідність протоколу випробування ефективності антимікробних поверхонь. У цьому дослідженні антимікробну активність мідної поверхні тестували залежно від температури, відносної вологості навколишнього середовища та забруднення, відповідно до модифікованого протоколу JIS Z 2801. Це дослідження показало, що антимікробні мідні сплави були більш ефективними при відносній вологості 37°C - 100% з параметрами, що відповідають умовам, відображеним у стандарті ISO 22196 (ISO 22196:2011), демонструючи $> 4 \log_{10}$ різницю в зниженні через 30 хвилин порівняно з умовами використання при відносній вологості 20°C - 50% або 20°C - 40% (параметри, що відображають умови використання для сухих поверхонь у лікарнях) [19].

Відповідно до цих умов, для отримання аналогічних результатів потрібно було 60 хв. Це дослідження підкреслює ефективність бактеріального "контактного вбивства" в умовах високої температури і високої вологості. Ці результати узгоджуються з результатами інших раніше опублікованих досліджень [20]. Однак це дослідження також підкреслює межі використання міді як антимікробної поверхні; оптимальні умови цього дослідження (37°C - 100% відносна вологість) ілюструють її інтерес для водопроводів, але не узгоджуються з іншими застосуваннями в інших середовищах.

В літературі розділяють два варіанти "сухий" та "вологий" (Dry and Wet). "Вологий" метод відноситься до методу інокуляції, де суспензію

бактеріальних клітин наносять на мідну поверхню. Процес вологого методу починається з розчинення іонів міді у воді, в результаті значного зволоження поверхні, внаслідок це спричиняє клітинне пошкодження. (Рис. 2). Розчинення іонів у воді та активне проникнення та накопичення Cu^+ та Cu^{2+} у клітині викликає клітинний стрес та пошкоджує мембрану. Відбувається це через різницю потенціалів. Після чого всередині клітини іони купрума активно каталізують утворення високореактивних активних форм кисню за присутності H_2O_2 .

Іони міді Cu^{2+} , які проникають у клітину починають конкурувати за місця зв'язування металів у ферментах, таким чином мідь витісняє залізо та зв'язується з сіркою, інактивуючи ферменти. При “сухому” методі, поверхня лише протирається вологим ватним диском, при цьому вода майже моментально випаровується. У літературі немає точних описів механізмів сухого методу. При цьому саме при контакті з не вологою поверхнею мікроорганізми мають швидкий час загибелі. Можемо припустити, що іони накопичуються та проникають у клітину моментально після контакту з поверхнею, а далі за відомим нам механізмом руйнують клітинний вміст (Рис. 3)

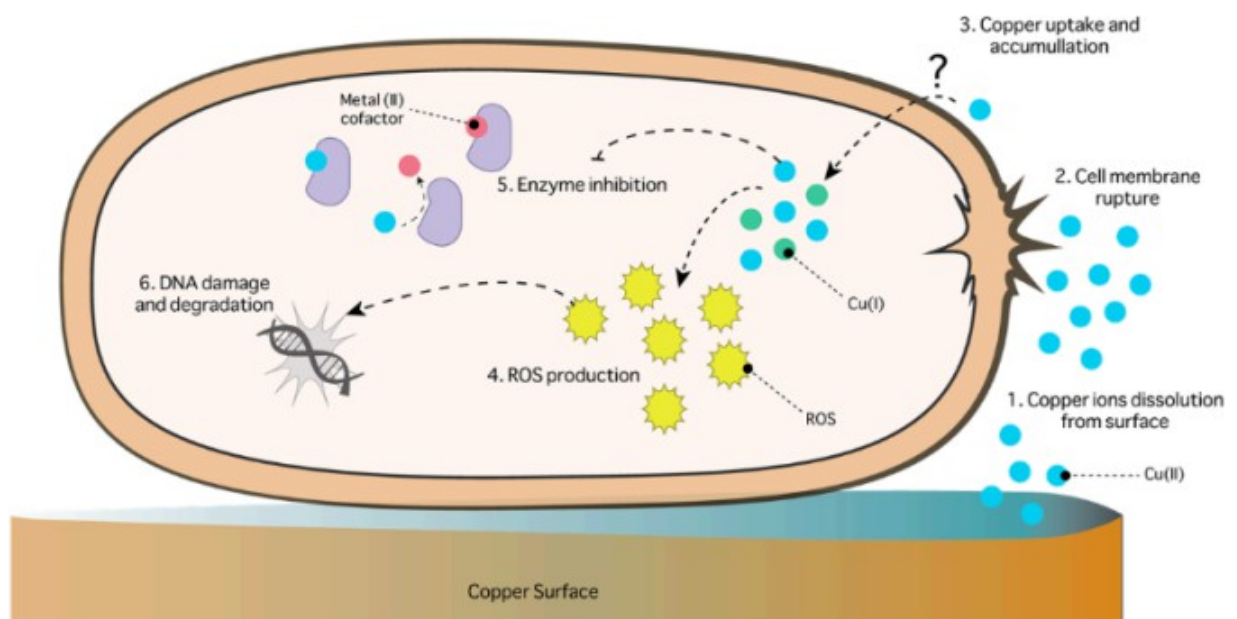


Рис. 2. Дія вологої поверхні з міді на бактеріальну клітину.

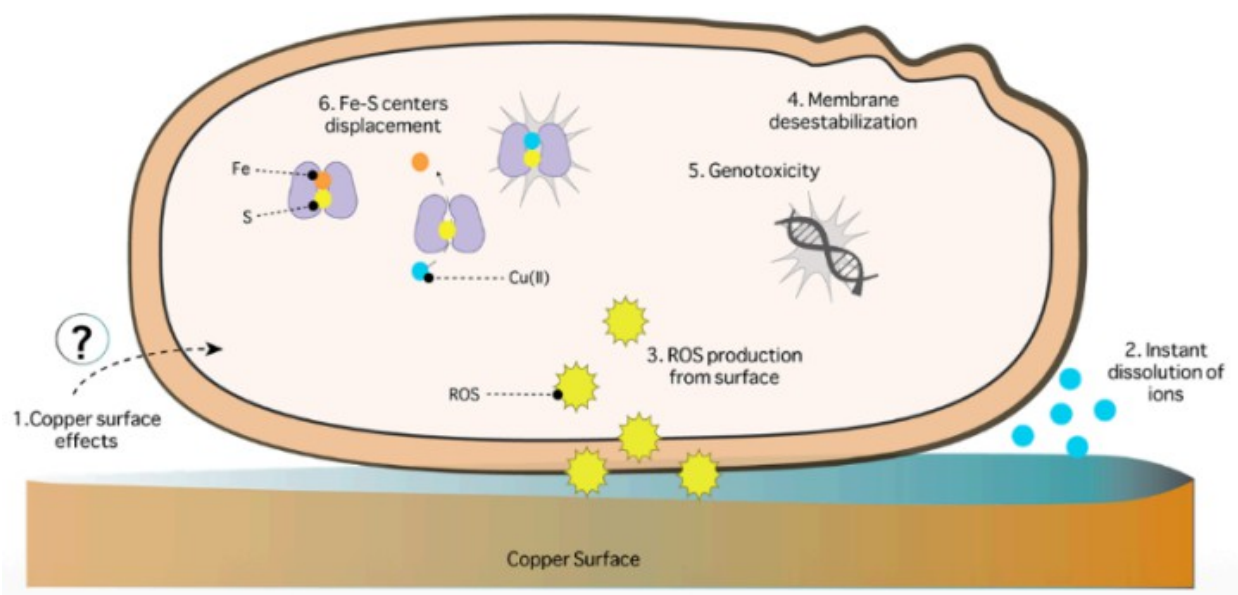


Рис. 3. Дія сухої поверхні з міді на бактеріальну клітину.

В обох умовах, як в мокрому, так і сухому методі не відбувається розмноження бактерій, а час їх інактивації є доволі коротким (від хвилини до години), при цьому саме сухий метод демонструє менший час інактивації клітин [21]. Дослідження, в якому проводять аналіз виживаності бактерій, де у ролі поверхні використовується мідна монета, також підтверджує, що з часом бактерії, що довготривало або часто знаходяться на сухих мідних поверхнях, мають певну резистентність до токсичної дії міді, але при цьому не виживають на вологих мідних поверхнях. Наприклад ізолят *P. stewartii* з монети, штам L10, гинув після 1 години на вологій поверхні, при цьому його контроль виживав протягом тижня на сухій. Дослідження також встановило, що цієї резистентності можуть набувати і грампозитивні бактерії [22]. Хоча певна резистентність і може бути набута, мідь має одночасно велику кількість мішеней у клітині, що значно ускладнює і сповільнює можливість утворення стійкості, в порівнянні антибіотики мають зазвичай лише одну мішень, що відкриває можливість для бактерії швидко набути резистентності.

Також були розглянуті експериментальні процедури нанесення мікроорганізмів на мідні поверхні. Elguindi et al. 2012 показали, що *Cronobacter spp.* гинули протягом 10 хв у вологому стані на 99,9% мідних сплавах і протягом 1 хв після висихання на 99,9% мідних сплавах [23]. Стійкі до *Salmonella typhimurium* штами (DT193 S9, DT120 S19 і DT66 S20) виживали лише 10-15 хв при сухій інкубації замість 0,5-2 год при вологій інкубації, яку проводила та ж група [24]. Ці дослідження узгоджуються з попередніми результатами, отриманими Уорнсом і Ківілом [25], а також з результатами, згаданими Грассом та ін. [26]. У сухих умовах антимікробна ефективність проявляється через кілька хвилин, тоді як у вологих умовах - через кілька годин, що викликає цікаві питання щодо механізму «контактного вбивства». Ці дані є актуальними для застосування міді для захисту населення, оскільки поверхні, що беруть участь у ручному перенесенні (наприклад, дверні ручки), як правило, сухі. Однак більшість мікроорганізмів, таких як сальмонела, не виживають в процесі сушіння, незалежно від того, яка поверхня тестується. Таким чином, довести ефективність антимікробної поверхні, коли ці мікроорганізми висихають на ній, дуже складно. Для підтвердження цих результатів все ще потрібні додаткові дослідження з відповідними протоколами та контролем у цьому напрямку.

Всі дослідження, згадані тут, показують кращу антимікробну ефективність міді за умов концентрації міді, що перевищує або дорівнює 55%. Систематично дослідження з використанням мідних купонів C11000 (99,9% Cu) показують кращу антимікробну дію міді з повною інактивацією за кілька хвилин досліджуваних мікроорганізмів. Чим вища концентрація міді, тим швидше та ефективніше антимікробна дія [26-29].

1.2 Утворення ROS у клітині

1.2.1. Каталіз реакції з утворенням ROS іонами Cu.

Як вже зазначалося, завдяки окисно-відновній активності мідь є одним з найважливіших мікроелементів для існування живих організмів, але

завдяки цій самій активності одночасно і може бути токсичним компонентом. Надлишок зайвих або неправильно зв'язаних іонів міді може викликати та каталізувати утворення високореактивних активних форм кисню (англ. highly reactive oxygen species (ROS)), такі як гідроксильні радикали [30]. Це викликає окислювальний стрес, що і спричиняє пошкодження життєво необхідних компонентів клітин: ліпідів (окиснення мембран), білки (денатурація) та нуклеїнових кислот (розрив ланцюгів) [31]. В основі здатності міді продукувати ROS лежить її природа, як перехідного металу та здатність швидко перемикатись між ступенями окиснення Cu^+ та Cu^{2+} . Хоч ця властивість і надає міді значущої ролі для живих організмів, але в той самий час при надлишку вільних іонів є токсичною. Розглянемо реакції та процеси при яких за участю іонів міді може генеруватись ROS.

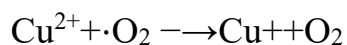
1.2.2. Реакція Фентона (за участю міді).

У цьому процесі початковими є іони саме Cu^+ , які реагують з пероксидом водню H_2O_2 (який є поширеним метаболічним залишком у клітинах), утворюючи високореактивний гідроксильний радикал $\cdot\text{OH}$. Рівняння реакції: $\text{Cu}^+ + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Cu}^{2+} + \cdot\text{OH} + \text{OH}^-$. Завдяки вищезгаданій можливості купруму перемикатись між станами окиснення, після завершення реакція Фентона, отриманий в результаті іон Cu^{2+} може бути відновлений обратно до Cu^+ клітинними відновниками. Наприклад, супероксидними радикалами: $\text{Cu}^{2+} + \cdot\text{O}_2^- \rightarrow \text{Cu}^+ + \text{O}_2$. Утворені іони купруму можуть повторно брати участь в утворенні ROS [32]. Таким чином реакція Фентона може повторюватись велику кількість разів і продукувати велику кількість високореактивних гідроксильних радикалів.

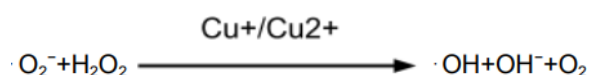
1.2.3. Реакція Габера-Вайса (каталізована міддю).

Ще одна реакція, внаслідок якої можуть утворюватись високореактивні гідроксильні радикали, яка також може бути каталізована іонами міді. Сама реакція відбувається між супероксидними радикалами ($\cdot\text{O}_2^-$) і пероксидом водню (H_2O_2). Ця реакція може існувати і сама по собі, але є дуже повільної,

вона значно прискорюється за допомогою іонів перехідних металів, в нашому випадку - іонами купруму [33].



При цьому загальна реакція буде мати вигляд:



1.3. Дія високореактивного гідроксильного радикалу на компоненти клітин.

Гідроксильний радикал $\cdot\text{OH}$, утворений внаслідок вищезгаданих реакцій, є одним з найпотужніших окисників, які наразі відомі, він може хаотично та сильно пошкоджувати біологічні молекули, такі як: ліпіди (що спричиняє пошкодження мембран), білків (призводячи до денатурації) та нуклеїнові кислоти (повністю пошкоджуючи ДНК або призводячи до мутацій). Ряд таких пошкоджень має назву окислювальний стрес клітин. ROS не є виключно шкідливими, вони відіграють свою значну роль, як сигнальні молекули у помірних концентраціях. Коли рівень ROS підвищується і клітина не може їх нейтралізувати та репарувати спричинені пошкодження, настає окислювальний стрес. ROS взаємодіють з біомолекулами за допомогою кількох основних хімічних механізмів, включаючи відрив атома водню, перенесення електрона та реакції приєднання. Ці первинні реакції часто ініціюють ланцюгові процеси, як у випадку перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), або призводять до утворення вторинних, менш реактивних, але більш стабільних радикалів, що можуть поширювати пошкодження [34-36]. Пошкодження, спричинені ROS, часто є незворотними. Розглянемо декілька механізмів пошкодження у клітині.

Перекисне окислення ліпідів. Мішенню в першу чергу є поліненасичені жирні кислоти, що входять до складу фосфоліпідів клітинних мембран (плазматичної, мітохондріальної та ін.). Перекисне окиснення ліпідів

починається з ініціації, тобто відривання атому водню у поліненасичених жирних кислот радикалом $\cdot\text{OH}$, що призводить до утворення вуглець-центрованого ліпідного радикала (умовно - $\text{R}\cdot$). Ліпідний радикал ($\text{R}\cdot$) швидко реагує з молекулярним киснем (O_2), утворюючи ліпідний пероксильний радикал ($\text{ROO}\cdot$). Цей радикал, у свою чергу, відриває атом водню від сусідньої молекули ПНЖК, утворюючи ліпідний гідропероксид (ROOH) та новий ліпідний радикал ($\text{R}\cdot$), який продовжує багаторазово цей ланцюг руйнівних реакцій. Наслідки являють собою сильну зміну структури та функцій мембран, що в свою чергу може призводити до повної дисфункції та руйнування клітини. Утворення деяких побічних продуктів реакцій, дозволяє пошкодженню поширюватись просторово [37].

Пошкодження білків. Мішенню в даному випадку є всі білки, деякі з них є особливо чутливими до ROS, які мають декілька механізмів пошкодження білків: окиснення амінокислотних залишків, карбонілювання білків, нітрування білків, утворення аномальних дисульфідних зв'язків, ДНК-білкові зшивки (ДБЗ). Якщо узагальнити дію всіх цих можливих процесів, то пошкодження білків АФК призводить до втрати ферментативної активності, порушення структурної цілісності, погіршення сигнальних функцій, місфолдингу та агрегації та зміни імуногенності (модифіковані білки можуть стати неоантигенами або впливати на презентацію антигенів) [38].

Пошкодження нуклеїнових кислот. Мішенню виступають ядерні або мітохондріальні ДНК, досить часто навіть РНК. Окисненню за допомогою ROS піддаються всі азотисті основи, але найбільш чутливим є гуанін, через низький окисно-відновний потенціал. Утворення 8-оксо-7,8-дигідрогуаніну є одним з основних і найбільш мутагенних пошкоджень. Високореактивний гідроксильний радикал також може окислювати дезоксирибозновий залишок. Наслідками такого пошкодження можуть бути мутації (наприклад при помилковому спарюванні при реплікації пошкоджених основ), геномна

нестабільність (хромосомні перебудови), блокування реплікації та транскрипції або повна зупинка клітинного циклу. Пошкодження ДНК, індуковане ROS, є не просто випадковим наслідком, а прямим рушієм ключових патологічних процесів, таких як ініціація раку (через мутації та геномну нестабільність) та старіння. Встановлюється причинно-наслідковий ланцюг: ROS → Пошкодження ДНК → Мутації/Геномна нестабільність → Фенотипи раку/старіння. Особлива вразливість мтДНК додатково пов'язує АФК з мітохондріальною дисфункцією, яка також є однією з ознак старіння та багатьох захворювань [39].

Пошкодження вуглеводів. Мішенню є моносахариди, полісахариди та глікопротеїни. Механізм: окиснення •ОН радикалами, внаслідок якого вони першим етапом відривають С-Н зв'язків цукрового кільця з утворенням вуглець-центрованих радикалів. Подальші реакції можуть призводити до окиснення гідроксильних груп до карбонільних або карбоксильних, розкриття кільця та фрагментації на менші молекули. Пошкодження вуглеводів призводить до нестабільності міжклітинних взаємодій та сигналізації [40].

1.4. Чутливість різних типів бактерій до іонів міді.

Існує відмінність у відповіді грампозитивних та грамнегативних бактерій на дію іонів міді, це відбувається через різницю у їх структурі. Грамнегативні бактерії мають зовнішню мембрану, яка робить їх менш чутливими до антибактеріальних агентів. Отже, грамнегативні бактерії мають дві клітинні мембрани, внутрішню та зовнішню, розділені шаром пептидоглікану (Рис. 4). Ця зовнішня мембрана містить фосфоліпіди, ліпопротеїни та ліпополісахариди. Грампозитивні бактерії мають лише внутрішню мембрану і не мають периплазми, тому є чутливішими. Для захисту внутрішньої мембрани грампозитивні бактерії мають клітинну стінку. Існують атипові бактерії, які можуть бути як грампозитивними, так і грамнегативними, але тонкий шар пептидоглікану або його відсутність унеможливорює їхнє забарвлення за Грамом [41].

В обох випадках клітинна оболонка є першим бар'єрним рівнем захисту від антибактеріальних агентів, тому різниця у впливі іонів міді може відрізнятися від виду бактерії. Хоча захист оболонки є досить сильним, він не зможе стовідсотково впоратись з надмірними концентраціями та кількістю шкідливих агентів, такі як іони міді.

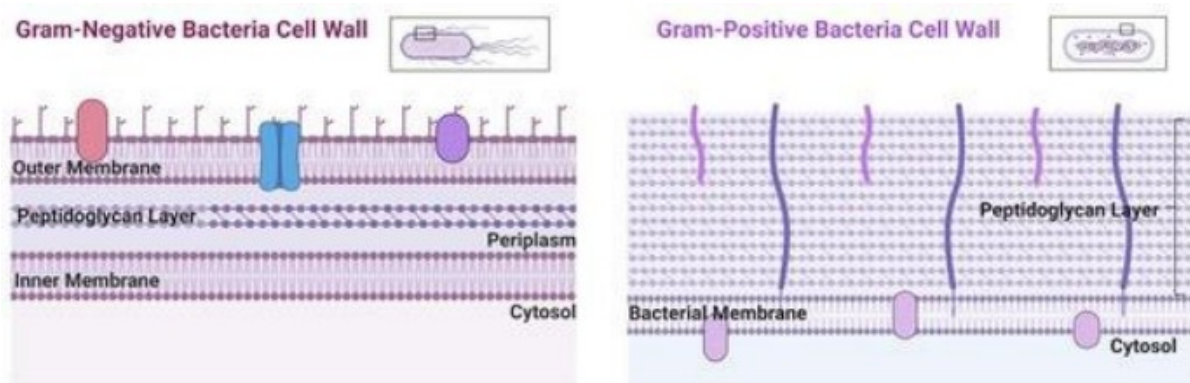


Рис. 4. Різниця грамнегативних та грампозитивних бактерій [42].

Факторами, які моделюють рівень чутливості бактерій до антибактеріальних іонів є:

1. рН. Біодоступність та токсичність міді вище, при низьких показниках рН. Деякі джерела зазначають, що додавання солей міді до середовища спричиняють летальне закислення, інгібуючи ріст незалежно від специфічних генів резистентності, що підкреслює важливість контролю рН в експериментальних умовах.

2. Температура. Підвищені температури пришвидшують рух багатьох реакцій, а тому числі вони підвищують метаболізм клітин, плинність мембран та, відповідно, посилення ефекту "контактного вбивства" мідних поверхонь. Це означає, що при вищих температурах антимікробна дія міді може бути швидшою або потужнішою, можливо, через збільшення швидкості реакцій або бактеріальної метаболічної активності, що призводить до швидшого поглинання/пошкодження.

3. Фізіологічний стан бактерій. Активно ростучі клітини, особливо в експоненціальній фазі, можуть бути більш чутливими через вищі темпи поглинання поживних речовин (і випадково міді) та активний синтез макромолекул, які є мішенями для міді. Клітини стаціонарної фази або персистери можуть виявляти підвищену толерантність. Бактерії у біоплівках відповідно мають підвищений захист та резистентність до антимікробних препаратів. Позаклітинна полімерна матриця (ЕПМ) біоплівок може зв'язувати та секвеструвати іони міді, запобігаючи їх досягненню клітин. Наприклад, біоплівки *P. putida* демонструють високу спорідненість до важких металів, включаючи мідь, забезпечуючи захисний бар'єр [43].

1.4.1. Молекулярні механізми резистентності бактерій до дії міді.

В першу чергу потрапляння міді в клітину блокуються ефлюксними насосами, які розташовані в цитоплазматичній мембрані, які активно транспортують Cu(I) з цитоплазми до периплазми (у грамнегативних) або позаклітинного простору (у грампозитивних). Наприклад: *CopA*, *CueA*, *CopB*. *CopA* є ключовим цитоплазматичним насосом ефлюксу Cu(I) у *E. coli* та деяких інших бактерій. До системи ефлюксу міді також відносять транспортери сімейства RND (Resistance-Nodulation-Cell Division), які зазвичай зустрічаються у грамнегативних бактерій і охоплюють всю клітинну оболонку (внутрішню мембрану, периплазму, зовнішню мембрану). Така система *CusCBA* у *E. coli* (*CusA* – внутрішня мембрана, *CusB* – периплазматичний білок злиття мембран, *CusC* – фактор зовнішньої мембрани) виводить Cu(I) (та Ag^+) з периплазми безпосередньо в позаклітинне середовище. Наступними є секвестрація та детоксикація міді, за допомогою цитоплазматичних та периплазматичних шаперонів іони міді транспортуються, запобігаючи їх взаємодії з неправильними мішенями та доставляючи їх до ефлюксних насосів або купроферментів. В додаток до цього у деяких бактерій виявлені малі, багаті на цистеїн білки, які можуть зв'язувати та секвеструвати велику кількість іонів міді - металотіонеїни [44]. Хоча

система захисту є досить структурованою та складною, бактерії не здатні за допомогою цих механізмів стримувати надмірну кількість іонів, що призведе до окислювального стресу у клітини. Резистентність кожного виду бактерій важко оцінити теоретично, тому проводяться численні експерименти з вивчення впливу антибактеріальних агентів, таких як купрум на певні штами клітин в різних умовах.

1.5. Порівняння дії іонів міді з іншими антимікробними агентами.

1.5.1 Антибактеріальна дія іонів металів.

Іони срібла (Ag^+) подібно до іонів міді можуть провокувати утворення ROS у клітині, яке спричиняє пошкодження важливих компонентів клітин, також вони порушують цілісність бактеріальних клітинних мембран, взаємодіючи з фосфоліпідним бішаром, а це призводить до збільшення проникності та витоку внутрішньоклітинного вмісту. Важливою мішенню іонів срібла є тіольні (-SH) групи в есенціальних бактеріальних ферментах і білках, що призводить до порушення їхньої функції, включаючи ферменти, залучені до процесів дихання та метаболізму. Іони срібла проявляють значну антибактеріальну активність проти *Staphylococcus aureus* (грампозитивні бактерії) та *Escherichia coli* (грамнегативні бактерії). Вони також ефективні проти багатьох штамів бактерій, стійких до кількох лікарських засобів. Дія іонів срібла або його наночастинок може бути значно підвищена в комбінації з антибіотиками [45,46].

Іони цинку (Zn^{2+}), як і іони срібла та міді мають схожий принцип дії на бактерії: провокують утворення ROS, підвищують мембрану проникність за рахунок пошкодження мембран, втручаються в бактеріальний метаболізм та функцію ферментів, можливо, шляхом зв'язування з тіольними групами, а також впливають на процеси реплікації ДНК, транскрипції та трансляції. Порівняно з міддю та сріблом, іони цинку є менш токсичними для клітин ссавців, оскільки в першу чергу є поживною речовиною, і проявляють приблизно таку саму токсичність до бактерій *Staphylococcus aureus* та

Escherichia coli, як і антибіотики. Наночастинки оксиду цинку (ZnO-NPs) проявляють значну антибактеріальну активність і вважаються відносно біосумісними, що робить їх перспективними кандидатами для застосування в таких сферах, як харчова упаковка та медичні пристрої [47,48].

Іони міді (Cu^{2+}). Порівняно з дією інших іонів металів, іони міді мають гіршу сумісність з антибіотиками, що може, як і підсилювати їх дію, так і пригнічувати. Унікальні для міді концепція "контактного вбивства" надає їй переваг. Мідні поверхні можуть безперервно інактивувати бактерії, які контактують з ними, потенційно зменшуючи потребу в частому дезінфікуванні хімічними засобами та допомагаючи запобігати поширенню інфекційних захворювань. Хоча мідь і є есенціальним мікроелементом її токсичність вимагає ретельного контролювання для забезпечення безпеки навколишнього середовища та людей. Концентрацію міді необхідно ретельно контролювати в антимікробних застосуваннях для досягнення ефективного знищення бактерій без спричинення значної шкоди тканинам господаря або сприяння забрудненню навколишнього середовища.

Якщо порівнювати ці три види іонів металів, мідь має унікальну концепцію "контактного вбивства", що дозволяє довготривало діяти на бактерії, які знаходяться на поверхні та дозволяє використовувати мідь та мідні сплави, як доволі безпечний матеріал у лікарнях або в приміщеннях, які потребують стерильності. Срібло, цинк та мідь мають майже ідентичний принцип дії проти бактеріальних клітин. Дослідження вказують, що в різних ситуаціях, проти різних видів бактерій, у різних станах, сполуках та умов середовища кожен метал має різну антибактеріальну дію, тому впевнено не можна заявити, які іони мають більш сильні властивості, але деякі дослідження вказують таке порівняння по силі дії проти *Escherichia coli*: $\text{Ag} > \text{Cu} \approx \text{Zn}$. При цьому цинк зазначається, як менш токсичний для інших клітин організму.

1.5.2. Порівняння з класичними антибіотичними препаратами.

Хоча високо-специфічні антибіотики і дозволяють ефективно вбивати бактерії, але зазвичай їх механізм дії має один основний момент, який руйнує певний критично важливий процес у клітині. Якщо клітина зможе еволюційно обійти або змінити цей процес - вона випрацює резистентність до цього виду антибіотику. Класифікація антибіотиків як бактерицидних (що вбивають бактерії) або бактеріостатичних (що пригнічують ріст бактерій) є ключовою фармакологічною відмінністю, яка впливає на стратегії лікування, особливо при різних типах інфекцій та у різних групах пацієнтів. При тяжких інфекціях або у пацієнтів з ослабленим імунітетом можуть бути переважні бактерицидні антибіотики через їхню здатність безпосередньо знищувати бактерії, тоді як бактеріостатичних антибіотиків може бути достатньо при менш тяжких випадках або у пацієнтів з міцною імунною системою. Також у багатьох пацієнтів може бути присутня сильна алергічна реакція на антибіотичні препарати чи певні їх види, а деяка кількість людей скептично ставляться як до антибіотиків як препаратів, через побічні ефекти або ризики.

Порівнюючи з антибіотиками, іони міді мають значну перевагу - менший ризик появи резистентності у бактерій, це пов'язано з тим, що іони міді можуть викликати порушення у багатьох процесах одразу, що значно ускладнює еволюцію протидії для бактерії. Вузьке терапевтичне вікно для міді порівняно з іншими іонами металів та антибіотиками, що вимагає ретельної оптимізації дози для досягнення антибактеріальної ефективності без спричинення значного пошкодження клітин господаря. Враховуючи всі фактори, можливо зробити висновок, що найефективнішим варіантом у боротьбі з бактеріальними клітинами може бути одночасна комбінація іонів металів (у нашому випадку міді) та антибіотичного препарату. З перелічених іонів металів, найвищу ефективність показують іони срібла, але іони міді є доступнішими, легше виводяться з організму і мають систему "контактного вбивства", що робить їх більш універсальними.

1.6. Практичне використання іонів міді.

1.6.1. Практичне використання іонів міді в медицині.

Мідь, за рахунок своєї антибактеріальної дії та унікального механізму "контактного вбивства" використовується як матеріал для різного роду поверхонь в лікарнях, що може значно знижувати вірогідність утворення внутрішньолікарняних інфекцій, кількість яких значно підвищується через підвищення у бактерій резистентності до антибіотиків. В літературі зазначається, що мідь може використовуватись в тому числі для загоєння ран. Мідь посилює експресію молекул позаклітинного матриксу, таких як фібриноген, формування колагену та інтегринів, які є життєво важливими для прикріплення клітин та відновлення тканин. Це підкреслює прямий механізм, за допомогою якого мідь сприяє структурній цілісності новоутвореної тканини. Тому наночастинки міді можуть використовуватись в численних біоматеріалах (біоактивні стекла, полімерні каркаси та гідрогелі), які ефективно використовуються для загоєння ран, контролюючи мікросередовище [49].

Також розробляються наноматеріали, що містять мідь, з високою пористістю та ферментоподібною активністю для доставки ліків та посилення антибактеріальної ефективності при лікуванні ран. Нанотехнології відкривають можливості для підвищення терапевтичного потенціалу міді за допомогою цільової доставки та покращеної ефективності. MedCu Technologies пропонує пов'язки, просочені мікрочастинками оксиду міді, для лікування гострих, критичних та хронічних ран. Це свідчить про комерційну доступність та клінічну значущість засобів для догляду за ранами на основі міді [50].

Сплави Ti-Cu мають сильну антибактеріальну здатність, але сплави Ti-Cu, отримані різними способами, показали різну антибактеріальну здатність. Для того, щоб виявити механізм контролю, в цій роботі [51] були отримані сплави Ti-Cu з різними існуючими формами елемента Cu. Систематично досліджено вплив наявної форми купруму на мікроструктуру,

механічні, корозійні та антибактеріальні властивості сплавів Ti-Cu. Результати показали, що литі сплави Ti-Cu мають вищу твердість і механічну міцність, а також вищий рівень антибактеріальної (51-64%), але відносно нижчу корозійну стійкість порівняно з чистим титаном. Обробка при 900 °C/2 год (T4) значно підвищила твердість і міцність, покращила корозійну стійкість, але мало вплинула на антибактеріальні властивості. Обробка при 900 °C/2 год + 400 °C/12 год (T6) ще більше підвищила твердість і механічну міцність, покращила корозійну стійкість, а також значно підвищила антибактеріальну ефективність (N90%). Було продемонстровано, що елемент Cu у стані твердого розчину має високу зміцнюючу здатність, але низьку антибактеріальну властивість, тоді як елемент Cu у фазі Ti_2Cu має сильну зміцнюючу здатність і сильну антибактеріальну властивість. Фаза Ti_2Cu відіграє ключову роль в антибактеріальному механізмі. Антибактеріальна здатність сплаву Ti-Cu була сильно пропорційна вмісту міді та площі поверхні фази Ti_2Cu . Високий вміст міді та дрібнодисперсна фаза Ti_2Cu сприяють високій міцності та сильній антибактеріальній здатності [51].

Потенційні ризики: надмірні концентрації міді можуть провокувати утворення великої кількості ROS, які руйнують живі клітини організму. Тому є потреба ретельно контролювати рівень використовуємої для лікування міді.

1.6.2. Практичне застосування іонів міді в харчовій промисловості.

У харчовій промисловості, подібно до медицини, мідь або сплави міді використовуються для виготовлення антибактеріальних поверхонь, які ефективні проти таких патогенів, як *Salmonella enterica* та *Campylobacter jejuni* [52]. Це свідчить про те, що використання міді або мідних сплавів для поверхонь, що контактують з харчовими продуктами, може значно зменшити ризик харчових захворювань. Антибактеріальний ефект міді є більш ефективним при вищих температурах (25°C порівняно з 10°C), що відповідає умовам обробки харчових продуктів та умовам після маніпуляцій. Це вказує на те, що мідні поверхні можуть бути особливо корисними в середовищах, де

температури сприяють росту бактерій. Мідні поверхні можуть пригнічувати адгезію бактерій та утворення біоплівки. Запобігання утворенню біоплівки має вирішальне значення, оскільки біоплівки більш стійкі до очищення та дезінфекції. Іони міді можуть впливати на активність антибіотиків, що є важливим з огляду на використання антибіотиків у тваринництві та потенційні залишки в харчових продуктах. Це свідчить про складну взаємодію між використанням міді та антибіотиків у харчовому ланцюгу, що потребує ретельного розгляду. Це передбачає потенційне використання іонів міді для санітарної обробки побічних продуктів харчової промисловості.

1.6.3. Практичне використання іонів міді у водопостачанні.

Іони міді ефективно обеззаражують воду від бактерій, водоростей та спор у воді. Це досягається за рахунок підвищеної ефективності іонів міді, коли вони знаходяться у водному середовищі. Вони ефективно пригнічують ріст водоростей, що запобігає естетичним та експлуатаційним проблемам. Системи іонізації міді-срібла використовуються для дезінфекції води, особливо для боротьби з *Legionella*, бактеріями, що викликають хворобу легіонерів. Це конкретне застосування для контролю небезпечного патогену, що передається через воду, підкреслює важливість методів дезінфекції на основі міді в охороні здоров'я. Іонізація міді вважається безпечним та здоровим варіантом для обробки спа-салонів та басейнів і може бути модернізована в існуючі системи. Це свідчить про зручну та адаптовану технологію для підтримки якості води в рекреаційних умовах. Дезинфікуючий довготривалий ефект може забезпечувати іонізація міді та довго підтримувати захист від забруднень, іноді краще ніж хлор [53].

Значною перевагою є те, що іони міді можуть контролювати та попереджувати утворення біоплівки у водних системах. Недоліки: ефективність іонів міді може бути сильно залежна від середовища та рН у ньому, тому підтримання оптимального рівня є важливою умовою для ефективної дії іонів. Іонізатори міді потребують дезинфікуючого засобу, такого

як хлор/бром, для щоденної санітарної обробки басейнів та спа-салонів. Іонізація міді може не бути повною заміною традиційних дезінфікуючих засобів у всіх випадках, але може значно зменшити їх використання.

1.6.4. Практичне використання іонів міді у сільському господарстві.

Мідь є елементом, який часто використовується у сільському господарстві як фунгіцид, для захисту врожаю від хвороб. Іони міді знищують спори грибів та бактерії при контакті, денатуруючи їхні білки та ферменти. Мідні фунгіциди ефективні проти широкого спектру грибкових та бактеріальних захворювань, включаючи борошнисту росу, паршу та антракноз та допомагають у боротьбі зі стійкістю до інших фунгіцидів [54].

Мідний купорос був одним з перших гербіцидів і досі використовується як позакореневий фунгіцид. Мідь, як мікроелемент для рослин має значущу роль у фотосинтезі, диханні та метаболізмі вуглеводів та білків. Дефіцит міді може призвести до таких симптомів, як викривлення та скручування стебел, зниження утворення крохмалю, затримка цвітіння та стерильність пилку. Недоліки: Як і в інших сферах, накопичення міді в ґрунті може бути токсичним для рослин та живих організмів, тому використання мідних фунгіцидів має чітко контролюватись. Мідний купорос, сам по собі, як фунгіцид вважається токсичним для бджіл. Іони міді мають значне і різноманітне практичне значення у багатьох сферах. У медицині, сільському господарстві, водопостачанні та харчовій промисловості вони демонструють високу ефективність за рахунок своїх антимікробних властивостей та мають великий потенціал у розвитку та збільшенню сфер застосування у майбутньому. Однак у кожній сфері вони також мають і ризики, пов'язані з високою токсичністю міді, яка може бути загрозою при надмірних концентраціях або не свідомому використанні.

1.7. Екотоксикологічні аспекти використання іонів міді як антимікробних агентів.

Хоча мідь і демонструє сильні антимікробні властивості проти бактерій, вірусів, грибів та водоростей, при цьому її іони є досить токсичними. Оскільки антибіотичні властивості основані в здебільшому на каталізі ROS, то дія ROS не може бути контрольована достатньо, оскільки високореактивні гідроксильні радикали вбивають будь-яку клітину незалежно чи вона є клітиною організму чи бактеріальним патогеном, призводячи до окислювального стресу. Багатогранний механізм атаки міді ускладнює розвиток стійкості у мікроорганізмів, що є значною перевагою порівняно з багатьма антибіотиками, які діють на одну мішень. Однак неспецифічний характер цих механізмів також викликає занепокоєння щодо потенційної токсичності для нецільових організмів у навколишньому середовищі. Навіть використовуючи властивість “контактного вбивства” треба враховувати постійне вивільнення іонів міді у навколишнє середовище.

1.7.1. Поведінка міді в навколишньому середовищі.

Іони міді з антимікробних засобів можуть потрапляти в навколишнє середовище різними шляхами, включаючи скидання стічних вод з домогосподарств, лікарень та промислових підприємств, сільськогосподарський стік, що містить пестициди та добрива на основі міді, та вилуговування з матеріалів, оброблених міддю (наприклад, проти обростаючих фарб). Атмосферні опади від промислових викидів та спалювання викопного палива також сприяють підвищенню рівня міді в навколишньому середовищі. Різноманітність джерел та шляхів вивільнення міді підкреслює складність управління її впливом на навколишнє середовище. Антимікробне використання сприяє загальному навантаженню міді в навколишньому середовищі, додаючись до існуючих природних та антропогенних джерел. Після потрапляння міді у водне середовище, вона може існувати у кількох хімічних формах, які залежать від стану та складу середовища (іон Cu^{2+} вважається найтоксичнішою її формою). Активність міді

у навколишньому середовищі (особливо водному) може нести непередбачувані ризики для екосистем.

1.7.2. Екотоксичність іонів міді у різних екосистемах.

Мідь є високотоксичною для широкого спектра водних організмів, включаючи риб, безхребетних (молюсків, ракоподібних, комах) та водоростей. Риби та ракоподібні, як правило, більш чутливі до токсичності міді, ніж ссавці. Навіть у досить низьких концентраціях мідь може спричинити гостре токсичне отруєння водних організмів: негативні наслідки для росту, розмноження, поведінки, фізіології та імунної функції. Сублетальні ефекти у риб включають зниження росту, порушення плавальної здатності, зниження нюхової чутливості (що впливає на харчування, виявлення хижаків та розмноження) та зміну функції мозку. Жорсткість води, рН, розчинений органічний вуглець (РОВ), солоність та лужність є ключовими факторами, що впливають на біодоступність та токсичність міді у водних середовищах [55].

Мідь, як правило, більш токсична у м'якій воді (з низьким вмістом іонів кальцію та магнію) порівняно з жорсткою водою. Нижчий рН (кислі умови) має тенденцію до посилення токсичності міді. Токсичність міді для водоростей, безхребетних та риб, як правило, зростає зі зменшенням солоності. Високі концентрації міді в ґрунті в свою чергу теж токсичні для рослин, інгібуючи ріст, погіршуючи кореневий ріст, що призводить до порушень у розвитку всієї рослини.

Ґрунтові мікроорганізми, включаючи бактерії та гриби, також можуть негативно реагувати на підвищений рівень міді, потенційно порушуючи кругообіг поживних речовин та інші важливі ґрунтові процеси. Іони міді активно накопичуються в тканинах, це може призвести до потрапляння надлишків міді у організм травоядних тварин, а потім і до інших трофічних рівнів харчового ланцюга, таким чином мідь може переміщатись харчовим ланцюгом і дійти до накопичення цього металу в організмі людини. Такі великі впливи можуть швидко призвести до порушення роботи цілої екосистеми.

Хоча біоаккумуляція може бути не такою вираженою, як у випадку деяких стійких органічних забруднювачів, існує потенціал накопичення шкідливих рівнів у певних організмах. Підвищений рівень міді може призвести до зменшення видового різноманіття як у водних, так і в наземних екосистемах. Чутливі види можуть зникати або їхня кількість зменшуватися, тоді як більш толерантні види можуть ставати домінуючими, що призводить до змін у складі спільнот. Враховуючи довгострокові наслідки впливу надмірної кількості іонів міді (стабільність токсичних речовин у екосистемах), слід з обережністю ставитись до використання міді у будь-якій сфері, ретельно контролюючи вивільнення іонів у навколишнє середовище.

1.8. Перспективи подальших досліджень.

Невідомі аспекти у вивченні антибактеріальної дії іонів міді:

- нові шляхи резистентності: наразі до кінця невідомі всі шляхи захисту або набуття резистентності патогенними клітинами проти іонів міді.
- кількісна оцінка ролі горизонтального переносу генів: наскільки поширений ГПГ генів резистентності до міді у різних екосистемах (грунти, водні середовища, клінічні умови) та які основні рушійні сили та вектори цього переносу? Чи призводить вплив сублетальних концентрацій міді до селекції подій ГПГ та поширення детермінант резистентності?
- еволюція та стабільність високорівневої резистентності: наскільки стабільною може стати резистентність клітин в майбутньому?
- перехід від модельних організмів, таких як *E. coli*, до клінічно значущих патогенів та різноманітних мікробних спільнот навколишнього середовища для розуміння контекстно-залежної резистентності.
- невивчене питання довгострокового токсичного впливу в межах екосистеми.
- синергія іонів міді з класичними антибіотиками. В основному подальші дослідження мають бути спрямовані на вивчення резистентності та її набуття

організмами до антибактеріальної дії іонів міді, оскільки наразі не всі вони відомі.

Огляд наукової літератури підтверджує ефективну антибактеріальну дію іонів міді на клітини, актуальність та широкий спектр практичного застосування у таких галузях, як: медицина, харчова промисловість, водопостачання та сільське господарство. Така властивість міді доступна їй завдяки можливості швидко перемикатись між станами Cu^+ та Cu^{2+} та провокувати у клітині реакція Фентона, результатом якої є утворення високореактивних активних форм кисню, що є дуже токсичними для клітини і руйнують одночасно декілька важливих клітинних процесів, але з іншого боку ця властивість є фундаментально важливою, дозволяючи міді функціонувати як кофактор для багатьох ферментів. Мідь значною мірою має переваги серед інших антимікробних агентів за рахунок свого унікального механізму “контактного вбивства”, що дозволяє поверхням з міді або сплавів міді мати антимікробну дію і використовуватись у якості дезінфікуючих поверхонь в лікарнях, на виробництвах і т.д.

При цьому в порівнянні з іншими перехідними металами, які теж мають антимікробну дію, мідь є досить доступною та легше виводиться з організму, а також за рахунок мультиточкового ураження ROS в клітині, мікробному агенту досить важко наростити стійкість до міді, на відміну від антибіотиків. Одночасно з цим, контроль вмісту рівню міді та викидів у навколишнє середовище має бути чітко контрольований і використання міді не має бути хаотичним, бо це може призвести до акумулювання купруму у водних та ґрунтових середовищах, передаючись по харчовому ланцюгу, тим самим певною мірою отруюючи екосистему.

Хоча повноцінно глобальні та довгострокові ефекти впливу міді ще не вивчені, нам достатньо розуміти їх токсичність в межах окремих організмів, щоб довести необхідність контролю. До перспективи подальших досліджень належать такі теми, як: детальне вивчення механізмів резистентності, як

окремих клітин, як і вже перехід до вивчення стійкостей у цілих мікробних спільнот, можливість синергії іонів міді з іншими антибактеріальними агентами та ефективність цього поєднання, вивчення загального довгострокового впливу великої кількості вільної міді на екосистеми, та можливості їх очищення та чи можлива передача резистентності у відкритих екосистемах від клітини до клітини. Хоча багато питань залишається відкритими, вже доведена сильна антибактеріальна властивість міді, використання якої набуває особливої актуальності у зв'язку з швидким набуттям резистентності патогенних клітин до вже звичних антибіотичних препаратів.

РОЗДІЛ 2: МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Об'єкт дослідження.

Визначення антибактеріальної активності трьох форм міді проводили класичним методом дисків і методом колодязів. Як тест-культури використовували *Staphylococcus aureus* 124 і *Pseudomonas aeruginosa* 18, що містяться в колекції інституту мікробіології та імунології імені Мечникова І.І.

2.2. Приготування мікробної суспензії.

Приготування мікробної суспензії штамів (мікроорганізмів) проводили з використанням приладу Densi-La-Meter (виробництво PLIVA-Lachema, Чехія; довжина хвилі 540 нм). Мікробну суспензію штамів готували згідно з інструкцією, що додається до приладу, та інформаційного листа щодо нововведень у системі охорони здоров'я № 163-2006 «Стандартизація приготування мікробних суспензій», м. Київ. Синхронізацію культур штамів проводили з використанням низької температури (4 °C). Мікробне навантаження становило 10⁷ мікробних клітин на 1 мл середовища і встановлювалося за стандартом McFarland. У досліджах використовували 18-24 годинну культуру штамів мікроорганізмів. Для культивування використовували агар Мюллера-Хінтона (Виробництво - Індія «Himedia Laboratorles Pvt. Ltd India»).

2.3. Визначення протимікробної активності.

Визначення протимікробної активності досліджуваних зразків проводили на двох шарах щільного живильного середовища, розлитого в чашки Петрі (діаметром 100 мм і висотою 15 мм). У нижньому шарі використовували «голодне» незасіяне середовище (агар-агар, вода, солі). Цей шар являє собою підкладку із середовища об'ємом (10,0 ± 0,3) мл, на яку суворо горизонтально встановлюють 6 тонкостінних циліндрів із нержавіючої сталі діаметром 8 мм і висотою 10 мм. Навколо циліндрів заливають верхній шар, що складається з поживного агаризованого середовища, розплавленого й охолодженого до температури (40,0 ± 0,5) °C, у яке вносили відповідний

стандарт добової тест-культури мікроорганізмів двох штамів. Попередньо верхній шар добре перемішували до утворення однорідної маси.

Після застигання циліндри стерильним пінцетом витягали і в лунки, що утворилися, поміщали досліджувані зразки в об'ємі 0,3 мл. Обсяг середовища для верхнього шару становив $(15,0 \pm 0,5)$ мл. Чашки підсушували 30-40 хвилин за кімнатної температури зі збереженням стерильних умов і ставили в термостат на 18-24 години. Після інкубації чашки витягували, фотографували та визначали діаметри зон затримки росту мікроорганізмів, які виражали в мм.

При оцінці антибактеріальної активності досліджуваних зразків застосовували такі критерії:

- відсутність зон затримки росту мікроорганізмів навколо лунки, а також зони затримки до 10 мм вказує на те, що мікроорганізм не чутливий до внесеного в лунку препарату або концентрації антимікробної речовини;
- зони затримки росту діаметром 10 - 15 мм вказують на малу чутливість культури до випробуваної концентрації антимікробної речовини;
- зони затримки росту діаметром 15 - 25 мм розцінюються, як показник чутливості мікроорганізму до випробовуваних субстанцій;
- зони затримки росту, діаметр яких перевищує 25 мм, свідчить про високу чутливість мікроорганізмів до випробуваної концентрації субстанції.

Також було використано метод дисків. На засіяну відповідним мікроорганізмом поверхню агару накладали диски діаметром 3 мм, попередньо змоченим у розчині досліджуваного зразка або накладали невелику кількість біомаси мікроводоростей. Під час оцінювання антибактеріальної активності досліджуваних екстрактів та їхніх модифікацій застосовували такі критерії:

- відсутність зон затримки росту мікроорганізмів навколо диска, вказує на те, що мікроорганізм не чутливий до препарату або концентрації антимікробних субстанцій;

- зони затримки росту діаметром 5-8 мм вказують на малу чутливість культури до випробуваної концентрації антимікробної речовини;
- зони затримки росту діаметром 9-14 мм розцінюються, як показник чутливості мікроорганізму до концентрації випробовуваної речовини;
- зони затримки росту, діаметр яких перевищує 15 мм, свідчить про високу чутливість мікроорганізмів до випробуваної концентрації антимікробної речовини.

2.4. Способи отримання зразків тонкошарової металізованої міді.

У нашій лабораторії розроблено технологію вакуум-плазмового формування металізованих покриттів міддю з високою адгезією та товщиною шару від 0.01 до 3 і більше мкм за допомогою магнетронної та дугової планарних розпилювальних систем [56].

Мідне покриття наносили на тканину, напруга на розряді магнетронної розпилювальної системи становила 600 В, за струму розряду 10 А і вакууму в камері нанесення 8×10^{-2} Па. Була отримана тканина з шаром міді 3 мкм, розміри зразків 1,0x0,6 м². Товщину мідного покриття визначали за допомогою інтерферометра Лінника на зразках-свідках, які розміщувалися в зоні нанесення покриття. Зовнішній вигляд тканини з мідним покриттям відрізнявся від вихідної тканини (рис. 1. I).

Мікроструктуру мідного покриття досліджували за допомогою скануючого растрового електронного мікроскопа РЕМ-101 (рис. 1. II).

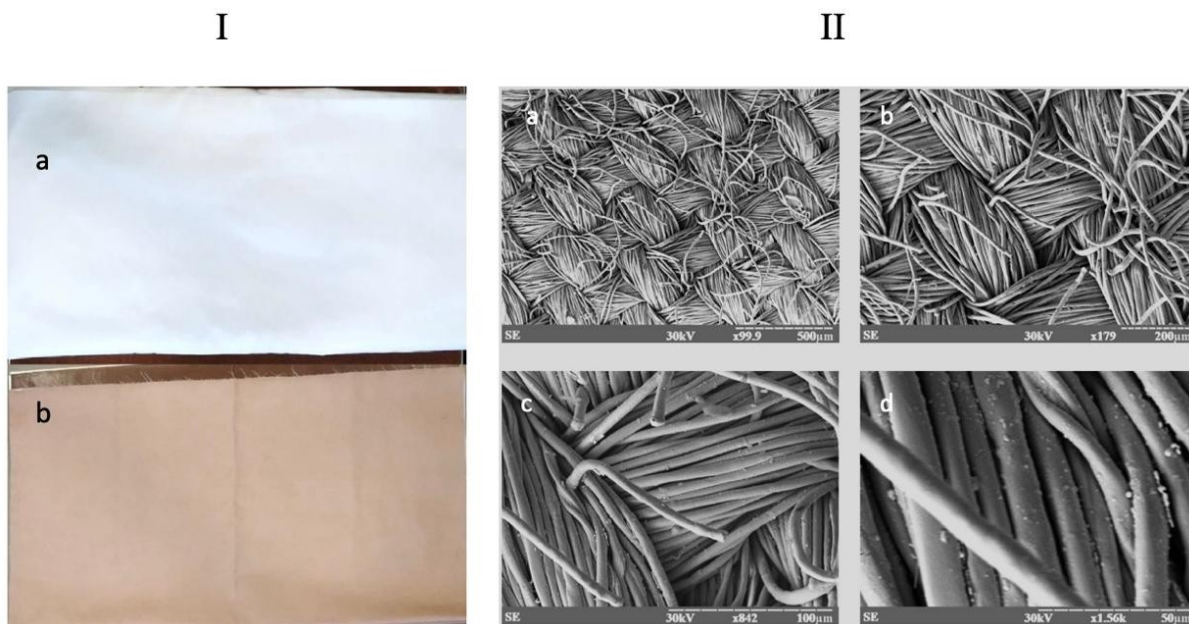


Рис. I - зовнішній вигляд тканинної основи (a), на яку нанесено шар міді завтовшки 3 мкм (b); II - зображення рельєфу поверхні металізованої тканини з міддю за різних збільшень (a - x 99.9, b - x 179, c - x 842, d - x1.56k).

2.5. Спосіб отримання хелатної форми міді в клітинах мікроводоростей *Dunaliella viridis*.

Раніше в нашій лабораторії було отримано штам мікроводоростей *Dunaliella viridis*, здатний виживати в середовищі з високою концентрацією сірчаноокислої міді - 75 мг/л, тобто резистентний до високої концентрації міді - *D.v.CuR*, на відміну від вихідного штаму, чутливого до іонів міді - *D.v.CuS* [57].

Понад 90 % міді у складі клітин пов'язана з білками і більша її частина знаходиться в цитозолі клітин. Для отримання іонів міді, пов'язаної з компонентами клітини, культуру *Dunaliella viridis* осаджували центрифугуванням за 3000g впродовж 15 хв за кімнатної температури, а осад клітин руйнували осмотичним шоком із подальшою гомогенізацією. Незруйновані клітини та фрагменти клітин видаляли після центрифугування за 6000 g протягом 15 хв за кімнатної температури. Отриману водну фазу, до складу якої входили іони міді в комплексі з білками, використовували як

хелатні форми міді. Як контроль використовували культуру клітин *Dunaliella viridis*, яка культивувалася на стандартному середовищі без внесення міді (*D.v.CuS*).

Для визначення залежності антибактеріальної активності іонної форми міді та хелатної форми міді додатково внесено в гомогенати клітин *Dunaliella* сірчаноокислу мідь до кінцевих концентрацій 1, 7, 15 г/л. Культуру перемішували та витримували протягом 30 хв. Після цього суспензію клітин гомогенізували, зразки центрифугували за 6000 g протягом 15 хв за кімнатної температури. В осадах фрагментів клітин та отриманій водній фазі, після осадження фрагментів клітин, визначали вміст міді на атомно-адсорбційному спектрофотометрі іСЕ3500, як описано в роботі [58], а в аліквотах - антибактеріальну активність по відношенню до *Staphylococcus aureus* 124 та *Pseudomonas aeruginosa* 18.

При оцінці антибактеріальної дії іонів міді використовували водний розчин сірчаноокислої міді в концентрації в концентраціях: 0,25, 0,5, 1,0, 7,0, 15,0, 20,0 і 25 г/л, що тестувалась на антибактеріальну активність до двох видів бактерій, як уже було описано.

Електропровідність досліджуваних зразків вимірювали на векторному мережевому аналізаторі Rohde & Schwarz ZNB40 (Німеччина).

2.6. Статистичні методи.

Усі експерименти повторювали щонайменше тричі, за кількох аналітичних повторностей. Отримані результати піддавали статистичному опрацюванню результатів із використанням пакета програм Statistica 5.0 з використанням критерію Манна-Вітні. У таблицях і графіках наведено середні значення з їх стандартними помилками.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Стійкість *Staphylococcus aureus* 124 і *Pseudomonas aeruginosa* 18 до тканини з напиленням тонкого шару міді (3 мкм).

При визначенні антибактеріальної активності як контроль використовували антибіотик меропенем - протимікробний засіб системної дії. Як відомо, меропенем інгібує синтез компонентів клітинних стінок грампозитивних і грамнегативних бактерій шляхом зв'язування з білками РВР (ті самі білки, які зв'язують пеніцилін). Відомо, що різні штами *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* та *Acinetobacter* можуть проявляти резистентність до меропенему, у зв'язку з цим рекомендовано тестувати його дію на місцевих штаммах.

Виявили, що меропенем при тестуванні на двох різних видах бактерій, забезпечував затримку росту для *Staphylococcus aureus* 124, що становила $24,9 \pm 0,5$ мм при використанні тесту паперових дисків (рис. 3.1 А). Водночас, цей антибіотик не пригнічував ріст *Pseudomonas aeruginosa* 18, що проявлялося у відсутності затримки росту цієї бактеріальної культури (рис.3.1 А).

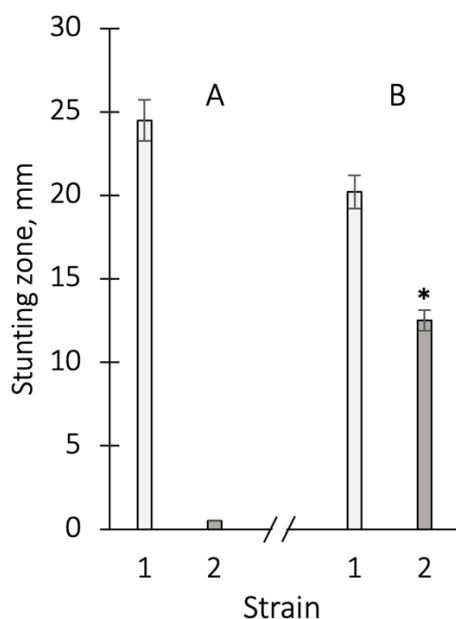


Рис. 3.1 Зони затримки росту *Staphylococcus aureus* 124 (1) і *Pseudomonas aeruginosa* 18 (2) при тестуванні методом паперових дисків антибіотика меропенему (А), а також тканини з нанесеним шаром міді завтовшки 3мкм (В). Наведено середні значення з 3 - 5 експериментів та їхні стандартні помилки. * позначено відмінності між антибіотиком і тканиною для варіантів, у яких $P < 0,05$ порівняно з меропенемом.

Отже, меропенем виявляв яскраво виражену антибактеріальну активність щодо *Staphylococcus aureus* 124 і не чинив жодного впливу на *Pseudomonas aeruginosa* 18. Отримані результати підтверджують наявність вираженої видової бактеріальної чутливості до дії цього антибіотика.

Тканина, на яку було нанесено шар міді в 3 мкм, забезпечувала затримку росту *Staphylococcus aureus* 124 на 21,2 мм, що становило 85 % порівняно з меропенемом і є показником високої чутливості цієї культури до дії міді, нанесеної на тканину (рис. 3.1. В). Важливо відзначити, що тканина з тонким шаром міді пригнічувала ріст не тільки *Staphylococcus*, а й *Pseudomonas*, на відміну від антибіотика, хоча й меншою мірою, лише на 50,2 % порівняно з антибіотиком для *Staphylococcus aureus* 124 (рис. 3.1. В). Отже, тонкий шар міді, нанесений на тканину, виявляв як виражену антибактеріальну активність щодо *Staphylococcus*, так і слабо виражену активність щодо *Pseudomonas*.

Розробка способів отримання та використання міді, нанесеної на тканину, та інші матеріали представляє великий практичний інтерес як потенційні антибактеріальні засоби. Однак, для цього необхідні знання механізмів антибактеріальної дії таких матеріалів. З цією метою перевіряли гіпотезу, згідно з якою, антибактеріальна дія міді, нанесеної на тканину, пов'язана з тим, що під час її контакту з біологічними «субстратами» має місце іонізація міді, яка і проявляє інгібуючу дію на клітини бактерій.

3.2. Стійкість *Staphylococcus aureus* 124 і *Pseudomonas aeruginosa* 18 до дії іонів міді.

При тестуванні стійкості *Staphylococcus aureus* 124 до дії іонів міді (водний розчин сірчаноокислої міді) методом паперових дисків, виявили, що концентрації 0,25 та 0,5 г/л не впливали на ріст цього штаму, а при збільшенні концентрації сірчаноокислої міді до 1 г/л мало місце незначне пригнічення росту, а при 7 г/л зона затримки росту становила від 16 до 20 мм, яку можна кваліфікувати як відносно високу чутливість *Staphylococcus aureus* 124. Однак антибактеріальна активність іонів міді поступалася в пригніченні росту бактерій міді, що була нанесена на тканину (рис. 3.2.А,1). Подальше збільшення концентрації сірчаноокислої міді не впливало на пригнічення швидкості росту *Staphylococcus aureus* 124, тобто мав місце вихід кривої антибактеріальної активності на плато (рис. 3.2.А,1).

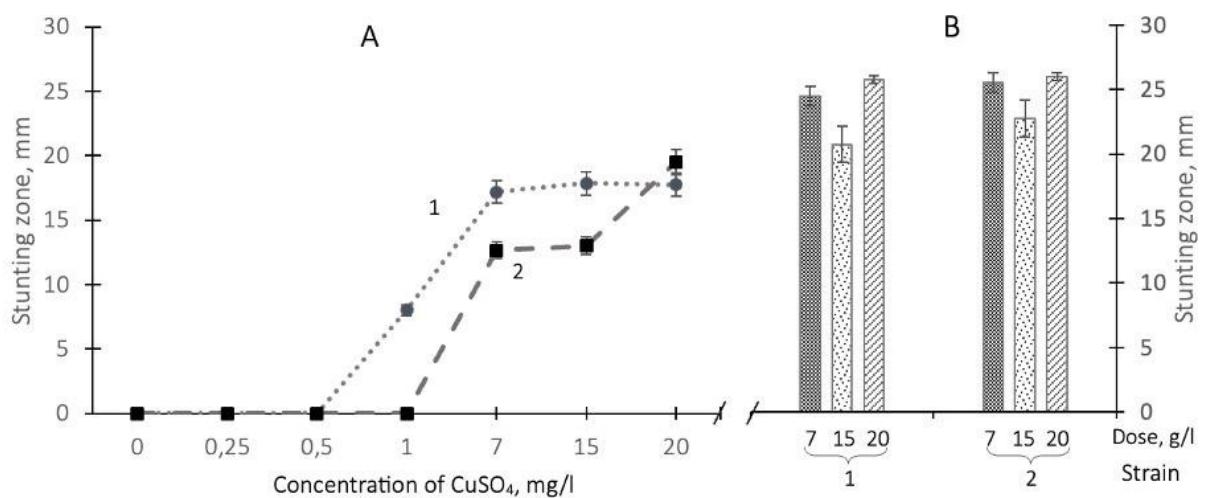


Рис.3.2 Зони затримки росту *Staphylococcus aureus* 124 (1) і *Pseudomonas aeruginosa* 18 (2) при нанесенні сірчаноокислої міді на паперові диски в різних дозах після культивування впродовж 24 годин при температурі -37°C (А) та в разі нанесення сірчаноокислої міді в дозах 7, 15 і 20 г/л у колодязі гелю - для *Staphylococcus aureus* 124 (1) і *Pseudomonas aeruginosa* 18 (2) (В). Наведено середні значення та їхні стандартні помилки з трьох незалежних

експериментів. (* - позначено варіанти, для яких P менше 0,05 для Стафілокока порівняно з Псевдомонас).

Водночас *Pseudomonas aeruginosa* 18 мав меншу чутливість до іонів міді порівняно зі *Staphylococcus aureus* 124 при тестуванні на паперових дисках (Рис. 3.2. А). Необхідно зазначити, що за великих концентрацій сірчаноокислої міді в 7-20 г/л затримка росту для *Pseudomonas aeruginosa* 18 була подібною до такої для *Staphylococcus aureus* 124 (рис. 3.2. А).

Як відомо, зона затримки росту бактеріальних культур залежить не тільки від концентрації досліджуваних сполук, а й від швидкості дифузії антибактеріальних сполук у гель. У зв'язку з цим визначали зони затримки росту культур за використання «дифузійного» методу або нанесення сірчаноокислої міді методом «колодязів». Виявили, що в цьому випадку ефективність затримки росту за високих концентрацій сірчаноокислої міді була такою самою, як і дія міді, нанесеної на тканину, та практично не поступалася мірепенему, однак за оцінювання антибактеріальної активності методом колодязів не виявляли видових відмінностей у стійкості бактерій до іонів міді (рис. 3.2. В).

Отже, іони міді мають здатність інгібувати ріст *Staphylococcus aureus* 124 і *Pseudomonas aeruginosa* 18. Ефективність затримки росту залежить від концентрації, і ця залежність має насичувальний характер. *Pseudomonas aeruginosa* 18 мав меншу чутливість порівняно зі *Staphylococcus aureus* 124 за відносно малих концентрацій, а за досягнення високих концентрацій (7-20 г/л) ефективність гальмування росту іонами міді була однаковою для обох штамів.

На наступному етапі роботи перевіряли припущення, згідно з яким нанесення міді на тканину супроводжувалося формуванням комплексів іонів міді з целюлозними структурами тканини, тобто антибактеріальний ефект міді, яку було нанесено на тканину, міг бути пов'язаний з антибактеріальною дією хелатних комплексів міді. Як альтернативну модель, дослідження

хелатних форм міді на антибактеріальну дію використовували клітини мікроводоростей роду *Dunaliella*, що містять мідь у хелатній формі.

3.3. Стійкість *Staphylococcus aureus* 124 і *Pseudomonas aeruginosa* 18 до дії міді в хелатній формі.

На наступному етапі роботи було отримано гомогенати двох штамів *D. viridis*, з низьким, фізіологічним, вмістом іонів міді, природний штам мікроводоростей *Dunaliella viridis* - (*D.v*-Cu.S) і штам із високим вмістом іонів міді - (*D.v*-Cu.R) та визначено здатність таких гомогенатів (біомаси) цих мікроводоростей виявляти антибактеріальну активність.

Виявили, що біомаса мікроводоростей *D. viridis*, з низьким, тобто фізіологічним, вмістом іонів міді (*D.v*-Cu.S), забезпечувала затримку росту бактерій на 11-12 мм при тестуванні на паперових дисках та на 13-14,7 мм при нанесенні суспензій у колодязі, і це проявлялось однаковою мірою для *Staphylococcus aureus* 124 та *Pseudomonas aeruginosa* 18 (табл.1). Такий самий ступінь затримки росту цих бактеріальних культур виявляла і біомаса мікроводоростей - (*D.v*-Cu.R) (табл.), яка перевершувала *D.v*-Cu.S за кількістю міді в 215 разів (рис. 3.3., етап 1).

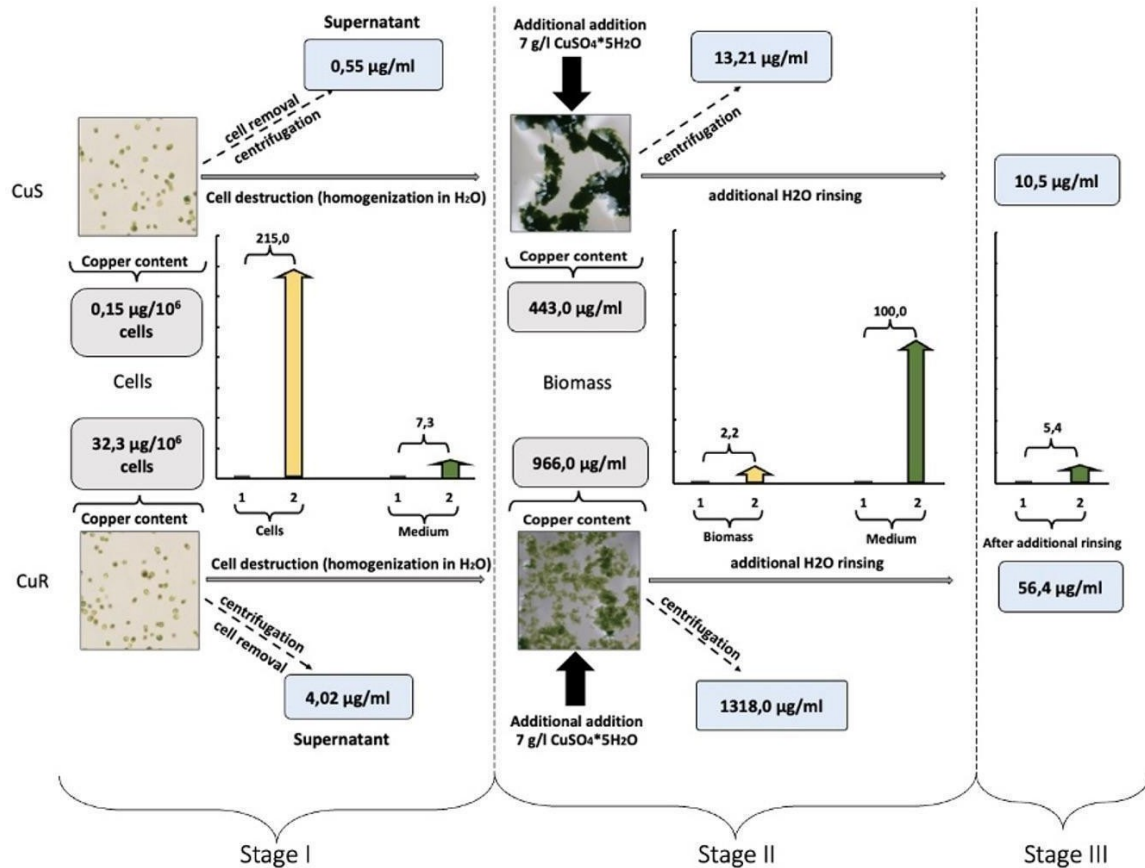


Рис. 3.3. Етапи визначення вмісту іонів міді в досліджуваних зразках. На I етапі визначали кількість іонів міді в нативних клітинах *D.v-Cu.S* та *D.v-Cu.R* (кількість клітин обох штамів у суспензії була однаковою - $3,9 \times 10^9$, а об'єми клітинних суспензій вирівнювали) та кількість іонів міді, які були присутні в їхньому живильному середовищі. На II етапі клітини руйнували, а до отриманої біомаси додавали 7 г/л мідного купоросу (його кількість була однаковою для двох штамів) з подальшим визначенням кількості міді, зв'язаної з біомасою *D.v-Cu.S* та *D.v-Cu.R*, та кількості решти - незв'язаної міді в середовищі. На третьому етапі визначали кількість легко вилученої («слабко зв'язаної») міді з біомаси *D.v-Cu.S* та *D.v-Cu.R* шляхом водної екстракції. Квадрати представляють середні значення кількості міді з трьох визначень, а гістограми - порівняльні відмінності в кількості іонів міді в досліджуваних зразках між *D.v-Cu.S* і *D.v-Cu.R*.

Табл.1

Зони затримки росту в мм для *Staphylococcus aureus* 124 і *Pseudomonas aeruginosa* після нанесення на паперові диски і колодязі клітинного гомогенату двох штамів мікроводоростей: чутливого (*D.v-Cu.S*) і резистентного (*D.v-Cu.R*) до іонів міді. Наведено середні значення з 3 експериментів та їхні стандартні помилки.

Метод тестування	Зразок, який тестується	Бактеріальна культура	
		<i>Staphylococcus aureus</i> 124	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 18
паперові диски	<i>D.v.-CuS</i>	11,7±0,42	11,5±0,50
	<i>D.v.-CuR</i>	12,2±0,60	12,0±0,63
дифузійний метод (колодязі)	<i>D.v.-CuS</i>	14,0±0,41	14,5±1,19
	<i>D.v.-CuR</i>	13,0±0,41	14,8±0,75

Отже, біомаси клітин *Dunaliella viridis* двох різних штамів, до складу яких входили іони міді в хелатній формі в різних кількостях, виявляли слабо виражену антибактеріальну активність, що проявлялася однаковою мірою для *Staphylococcus aureus* 124 та *Pseudomonas aeruginosa*.

Для дослідження залежності антибактеріальної дії від концентрації хелатних форм міді, у наступній серії експериментів у біомасу мікроводоростей *D.v-Cu.S* і *D.v-Cu.R* додатково вносили сірчаноокислу мідь у більших концентраціях: 7; 15 і 20 г/л на однакову кількість клітин ($3,9 \times 10^9$), з яких було отримано біомасу клітин зі збільшеною кількістю хелатних форм міді. Необхідно зазначити, що клітини цих мікроводоростей не мають клітинних стінок і вони швидко руйнуються методом гомогенізації. При тестуванні антибактеріальної активності використовували метод паперових дисків і колодязів.

Виявили, що додаткове внесення сірчаноокислої міді до кінцевих концентрацій 7; 15 і 20 г/л до гомогенатів клітин мікроводоростей

супроводжувалося збільшенням антибактеріальної активності як для біомаси *D.v*-Cu.S, так і для біомаси *D.v*-Cu.R відносно *Staphylococcus aureus* 124, порівняно з біомасами цих клітин без додаткового внесення міді (рис. 3.4. А). При тестуванні цих зразків щодо *Pseudomonas aeruginosa* 18 ефект збільшення антибактеріальної активності після додаткового внесення сірчаноокислої міді проявлявся тільки для зразків *D.v*-Cu.R і після внесення дуже великих концентрацій 15 і 20 г/л сірчаноокислої міді (рис. 3.4. В).

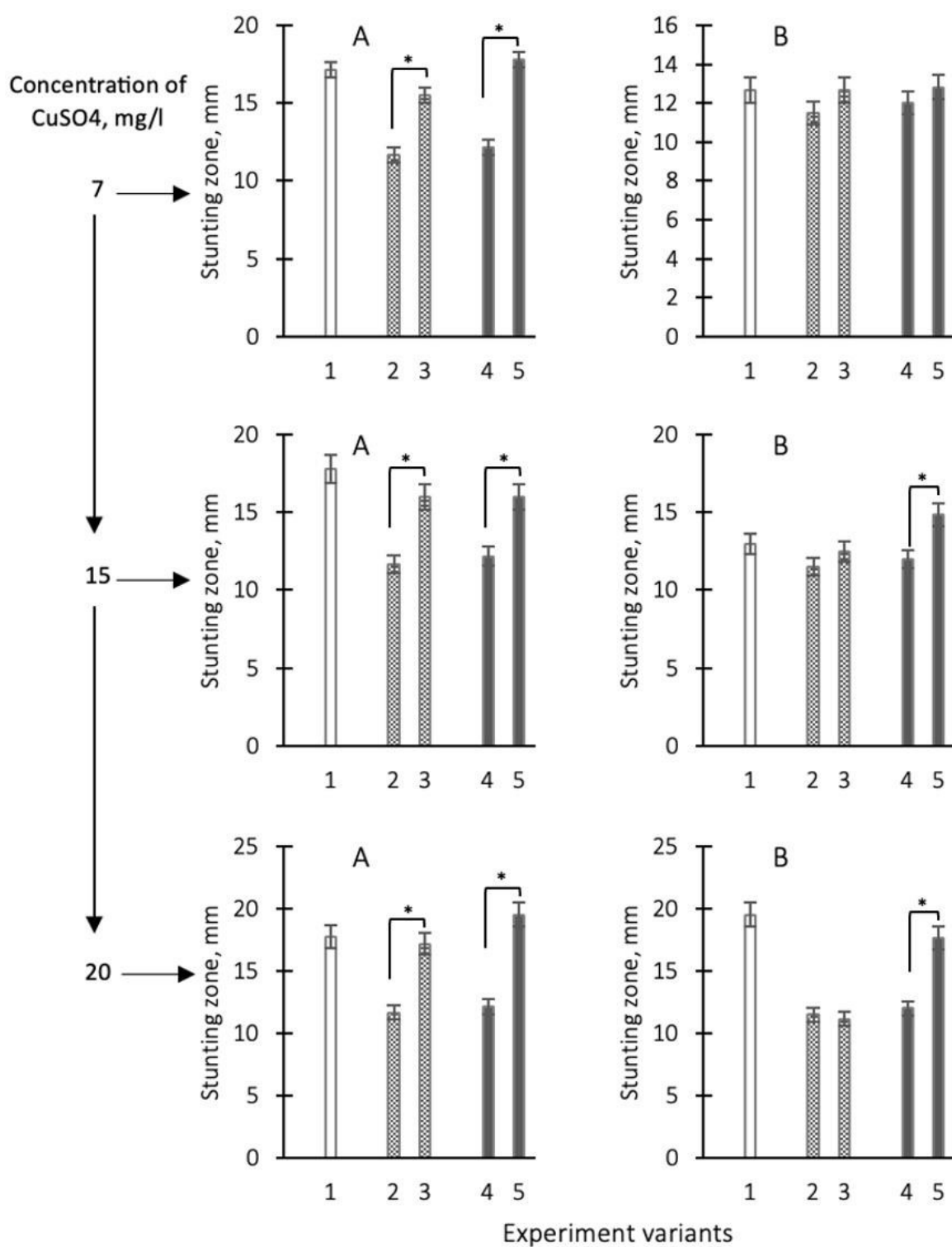


Рис. 3.4. Зони затримки росту *Staphylococcus aureus* 124 (A) і *Pseudomonas aeruginosa* 18 (B) при тестуванні на паперових дисках після нанесення на диск розчину сірчаної кислоти міді (іонна форма) в різних концентраціях: 7; 15 і 20 г/л (показана на додатковій шкалі) відповідно, вони показані на осі

ординат як варіанти 1, варіанти 2 - зони затримки росту в разі нанесення на диски гомогенатів клітин *D.v*-Cu.S, для яких характерний низький вміст міді в хелатній формі, варіанти 3 - зони затримки росту після нанесення гомогенатів клітин *D.v*-Cu. S з додатковим, попереднім внесенням сірчаноокислої міді в гомогенати клітин відповідно 7; 15 і 20 г/л сірчаноокислої міді, варіант 4 - зони затримки росту після нанесення на диски гомогенатів клітин *D.v*-Cu. R (у яких початково містилася відносно велика кількість міді в хелатній формі) і варіант 5 - зони затримки росту після нанесення на диски гомогенати клітин *D.v*-Cu.R з додатковим попереднім внесенням у гомогенати відповідно 7; 15 і 20 г/л сірчаноокислої міді. Наведено середні значення з трьох експериментів та їхні стандартні помилки. Зірочкою позначено відмінності, для яких $P < 0,05$, між варіантами 2-3 і 4-5 відповідно.

При тестуванні антибактеріальної активності дифузійним методом (методом колодязів) ці ефекти були ще більш вираженими (рис. 3.5). Так, ефект посилення антибактеріальної активності після внесення додаткових концентрацій сірчаноокислої міді до випробовуваних зразків гомогенатів клітин мікроводоростей проявлявся не тільки щодо *Staphylococcus aureus* 124, але й щодо більш стійкого *Pseudomonas aeruginosa* 18 (рис. 3.5).

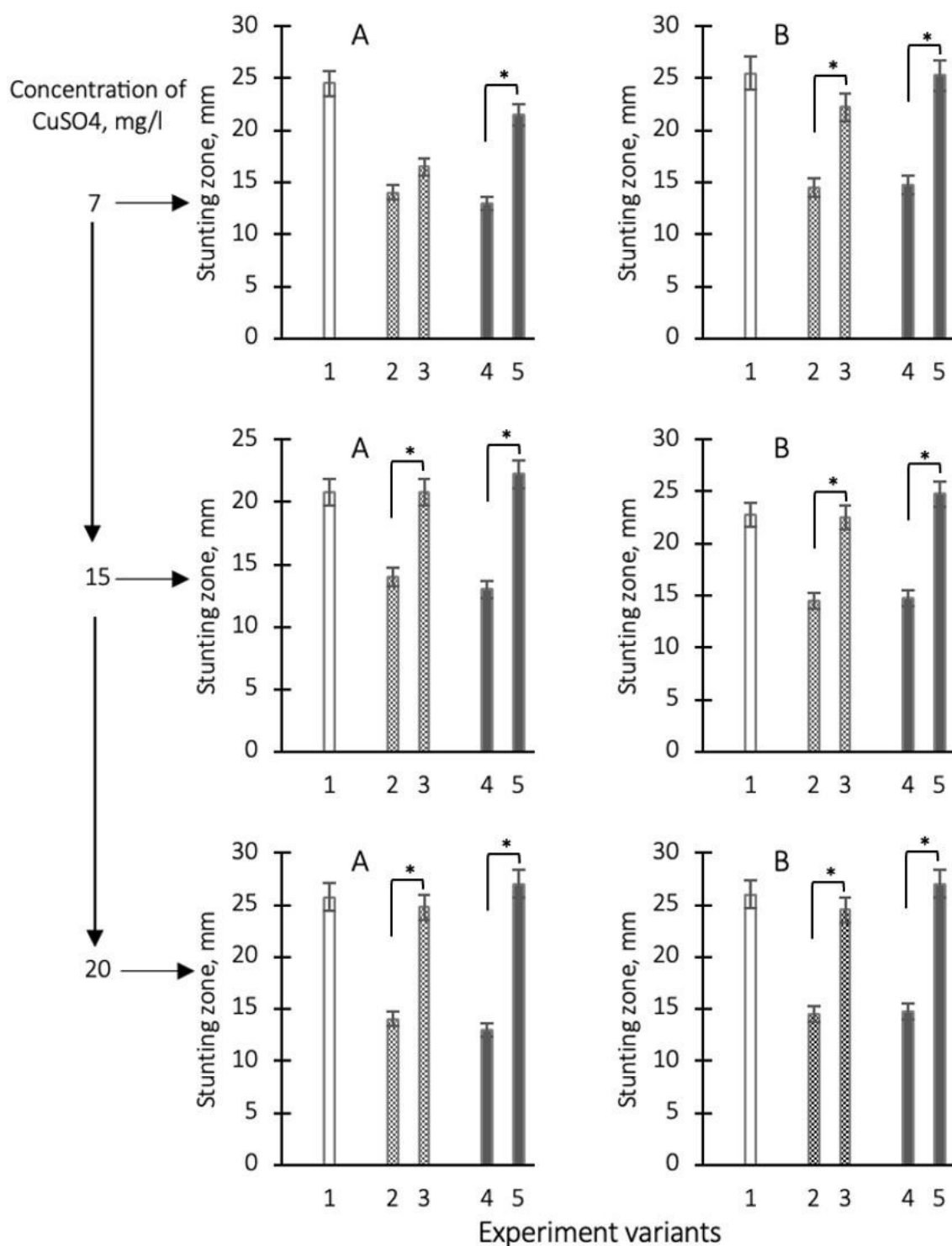


Рис.3.5. Зони затримки росту *Staphylococcus aureus* 124 (A) і *Pseudomonas aeruginosa* 18 (B) під час дифузійного тестування (метод колодязів) після нанесення розчину сірчаної міді (іонна форма) в різних концентраціях: 7; 15 і 20 г/л (показана на додатковій шкалі) відповідно, вони показані на осі ординат як варіанти 1, варіанти 2 - зони затримки росту в разі нанесення на

диски гомогенатів клітин *D.v-Cu.S*, для яких характерний низький вміст міді в хелатній формі, варіанти 3 - зони затримки росту після нанесення гомогенатів клітин *D.v-Cu. S* з додатковим, попереднім внесенням сірчаноокислої міді в гомогенати клітин відповідно 7; 15 і 20 г/л сірчаноокислої міді, варіант 4 - зони затримки росту після нанесення на диски гомогенатів клітин *D.v-Cu. R* (у яких початково містилася відносно велика кількість міді в хелатній формі) і варіант 5 - зони затримки росту після нанесення на диски гомогенати клітин *D.v-Cu.R* з додатковим попереднім внесенням у гомогенати відповідно 7; 15 і 20 г/л сірчаноокислої міді. Наведено середні значення з трьох експериментів та їхні стандартні помилки. Зірочкою позначено відмінності, для яких $P < 0,05$, між варіантами 2-3 і 4-5 відповідно.

Отримані результати дають змогу зробити висновок: 1 - додаткове внесення сірчаноокислої міді до біомас клітин *D.v-Cu.S* і *D.v-Cu.R* збільшувало їхню антибактеріальну активність по відношенню до досліджуваних штамів бактерій від 20 до 110%, при цьому більшою мірою це проявлялося для *D.v-Cu. R*; 2 - між збільшенням дози сірчаноокислої міді, що вноситься до біомаси клітин, та антибактеріальною активністю немає прямої залежності; 3 - швидкість затримки росту *Staphylococcus aureus* 124 та *Pseudomonas aeruginosa* 18 біомасою клітин, до якої додатково вносили сірчаноокислу мідь не перевищувала антибактеріальну активність чистого розчину сірчаноокислої міді; 4 - мідь, що була нанесена на тканину, проявляла таку саму антибактеріальну активність, як і розчин сірчаноокислої міді в максимально високій концентрації, та більшу за антибактеріальну активність, ніж початковою клітинною біомасою мікроводоростей; 5 - найбільші відмінності у збільшенні антибактеріальної активності для біомаси клітин *D.v-Cu.R* порівняно з *D.v-Cu.S* мало місце після додаткового внесення до біомаси клітин додаткових 7 г/л сірчаноокислої міді.

Отримані дані можуть вказувати на те, що внесення іонів міді до біомас мікроводоростей супроводжується утворенням різноманітних і різних структурно-функціональних комплексів, які можуть мати різну антибактеріальну активність, а наявність антибактеріальних ефектів зумовлена не тільки дією іонів міді. Не можна виключати й того, що за присутності великих концентрацій міді в середовищі можуть змінюватися «екстрактивність» клітинних компонентів мікроводоростей, які мають різну антибактеріальну активність. Дослідження цього питання має важливе значення в розумінні можливих механізмів антибактеріальних ефектів.

3.4. Обговорення

Те, що іони міді, як і іони срібла, мають виражену антибактеріальну дію, відомо давно, проте тільки нині спостерігається зростання інтересу до використання іонів міді у розв'язанні широкого кола медичних проблем, зокрема в боротьбі з інфекціями [59]. Показано, що мідь пов'язана з такими патологіями, як рак [60], нейродегенерація [61], ангіогенні дисфункції [62]. Іони міді стали привабливою мішенню для ліків, а також потенційним інструментом для розробки нових зондів, призначених для медичних втручань [63-65]. Описано ефекти антимікробної дії комплексів міді на грамнегативні [66], грампозитивні [67] і мікобактерій [68-69].

Водночас використання міді як антибактеріального засобу пов'язане з цілою низкою обмежень і особливостей. По-перше, іони міді є життєво-необхідним (есенціальним) мікроелементом для всіх форм життя і водночас вони є надзвичайно токсичними. Це пов'язано з тим, що в біологічних системах мідь може перебувати в різних станах: C^0 (наночастинки); Cu^{1+} ; Cu^{2+} та Cu -ліганд (хелатна форма), ба більше, іони міді утворюють комплекси з різними типами макромолекул, і її біологічна активність, зокрема й антибактеріальна, може залежати від балансу між іонними формами, хелатними формами та наночастинками в організмі та концентрації міді.

По-друге, у процесі еволюції, а цей процес, імовірно, розпочався близько 2,7 мільярда років тому, коли рівень кисню на планеті почав підвищуватися, і за таких умов мідь мала «переваги» порівняно із залізом, адже в окисній формі (Fe^{3+}) має тенденцію утворювати нерозчинні мінерали, а за умов, що змінюються, живі системи «навчилися» використовувати мідь у метаболічних процесах, а в разі досягнення нею високих концентрацій сформували механізми захисту від токсичних ефектів міді. Адаптивні механізми до токсичної дії міді надзвичайно різноманітні [70-72]. Мікроорганізми здатні зв'язувати «надлишок» міді з внутрішньоклітинними лігандами та видаляти її з клітини (рис. 3.6 F). Ба більше, не можна виключати того, що застосування міді як антибактеріального засобу також призведе, як і у випадку з антибіотиками, до формування резистентних форм мікроорганізмів.

По-третє, мідь проявляє токсичність не тільки щодо мікроорганізмів, а й щодо організму-господаря, тобто вона не видоспецифічна, зокрема, і щодо бактерій, що показано в цій роботі для *Staphylococcus aureus* 124 і *Pseudomonas aeruginosa* 18. Виходячи з цих особливостей, необхідно розділяти первинну відповідь організмів на дію міді та віддалені наслідки або пролонговані дії міді, а також, відповідь організму, що формуватиметься на багаторазові послідовні дії міді.

У цій роботі, визначали первинну відповідь двох бактеріальних культур *Staphylococcus aureus* 124 та *Pseudomonas aeruginosa* 18, на дії міді, що знаходилась у трьох різних формах: нанесена у вигляді тонкого шару в 3 мкм на бавовняну тканину; в іонній формі та у хелатній формі, зв'язаній з компонентами клітин мікроводоростей *Dunaliella viridis*.

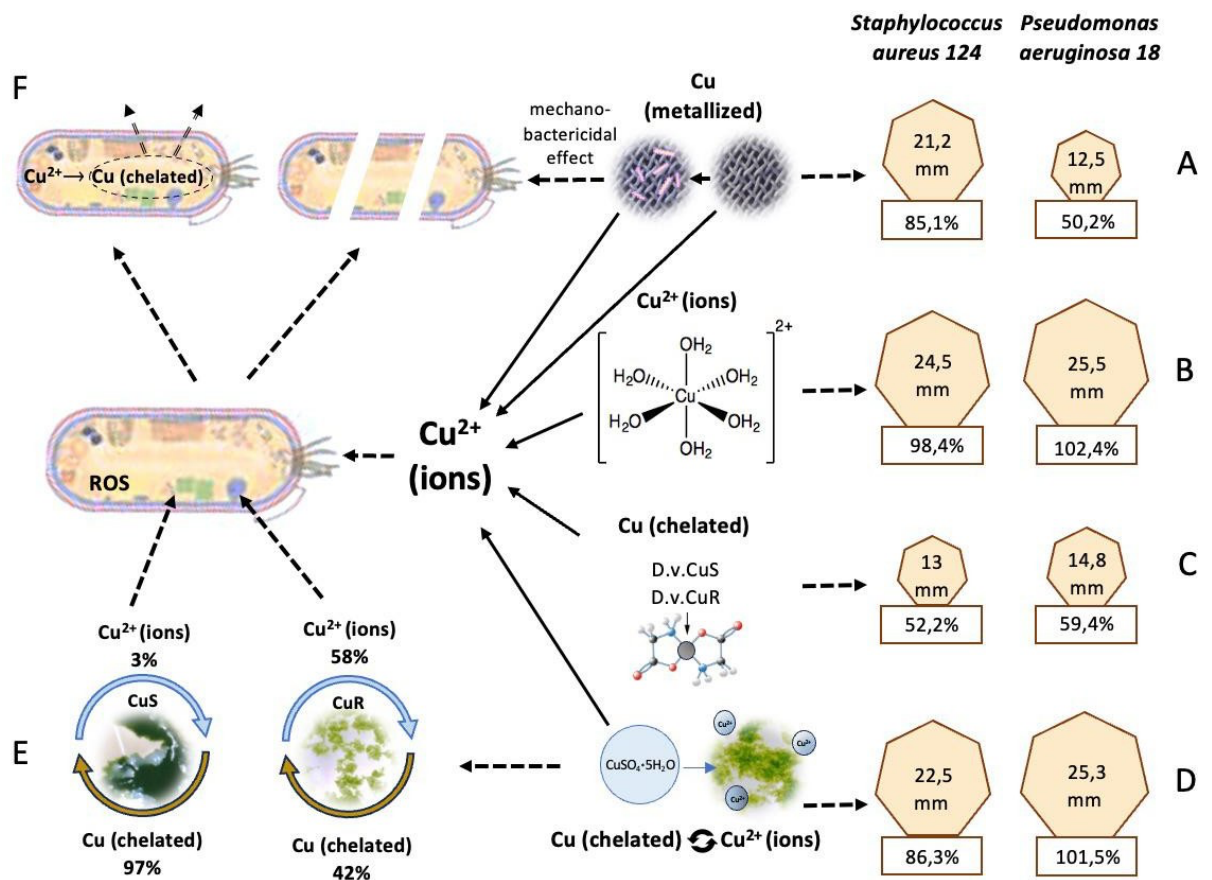


Рис.3.6. Схема, що демонструє ефективність інгібування росту мікроорганізмів *Staphylococcus aureus* 124 та *Pseudomonas aeruginosa* 18 при внесенні до культур бактерій міді, що містилася в металізованій формі - А, іонній формі - В, дію компонентів мікроводоростей *D.v-Cu.S* та *D. v-Cu.R*, яка містила невелику кількість міді (32,2 мкг/106 клітин) у хелатній формі - С, дію компонентів біомаси цих мікроводоростей, до якої додатково вносили сірчаноокислу мідь у концентрації 7 г/л - D, та співвідношення між хелатною та іонною формами міді у *D. v-Cu.S* та *D.v-Cu.R* - Е, а також гіпотетичний механізм антибактеріальної дії іонів міді, що демонструє як загибель більшої частини бактерій за рахунок дії на їх клітинні стінки, так і прооксидантну дію іонів міді і можливу резистентність у невеликої частини бактерій, що здатні забезпечувати ефективне хелатування та її екскрецію з клітин - F.

Є роботи, в яких вказується на те, що мідні металокомплекси можуть долати механізми резистентності бактерій [73], і це пояснюється тим, що ліганд може розширити спектр токсичності іонів міді щодо мікроорганізмів, порівняно з вільною міддю. Результати цієї роботи показали: 1 - тонкий шар міді, нанесений на тканину, виявляв виражену антибактеріальну активність по відношенню до *Staphylococcus* і менш виражену антибактеріальну активність по відношенню до *Pseudomonas*. Так, після первинного контакту *Staphylococcus aureus* 124 з мідною тканиною відбувалося інгібування росту культури, що становило близько 85 % порівняно з дією антибіотика меропенему. Мідна тканина інгібувала і ріст культури *Pseudomonas aeruginosa* 18, що була резистентною до антибіотика, однак у 2 рази менш інтенсивно порівняно з культурою *Staphylococcus aureus* 124 (рис. 3.6. А).

Антибактеріальну дію тонкого шару міді, нанесеної на тканину, можна забезпечити щонайменше двома способами: дією іонів міді, що можуть бути присутніми в такому матеріалі або утворюватися під час тестування в рідких середовищах, і механобактерицидною інактивацією (рис. 3.6. А). Було показано, що формування тривимірних (3D) ієрархічно складних поверхонь із титану (або з інших матеріалів) забезпечувало захоплення клітин *Staphylococcus aureus* та *Pseudomonas aeruginosa*, що супроводжувалося їхньою інактивацією [74]. Автори цієї роботи вважають, що розробка інтелектуальних механобактерицидних поверхонь можуть бути особливо ефективні для інактивації коків, таких як *Staphylococcus aureus*. Можливо, саме цим і пояснюється більший ефект гальмування росту *Staphylococcus aureus* порівняно з *Pseudomonas aeruginosa* тонким шаром міді, нанесеної на тканину (рис. 3.1). Не можна виключати й комбінованої дії (іонна та механобактерицидна) металізованої міді на тканини, яка забезпечує формування складних поверхонь (рис. 2., 3.6).

2 - мідь в іонній формі пригнічувала ріст *Staphylococcus aureus* 124 так само, як і антибіотик, при цьому іонна форма міді також ефективно

пригнічувала ріст і *Pseudomonas aeruginosa* 18, що був резистентним до антибіотика (рис. 3.6. В). Ефективність затримки росту бактеріальних культур залежала від концентрації іонів міді, і ця залежність мала насичувальний характер, вихід дозової кривої на плато (досягнення максимуму інгібування для *Pseudomonas aeruginosa* 18 становила -7 г/л сірчаноокислої міді, та 20 г/л для *Staphylococcus aureus* 124 при тестуванні на дисках. У тому разі, якщо тестування здійснювали методом колодязів, то вихід на стаціонарний рівень інгібування росту досягався за 7 г/л для обох видів (рис. 3.3). Відмінності в ефективності антибактеріальної дії за цих двох методів тестування може пояснюватися тим, що іони міді можуть утворювати комплекси з целюлозою, що сповільнює швидкість дифузії іонів в агаризоване середовище на відміну від прямого нанесення в колодязі.

3 - наявність міді в хелатованій формі в клітинах *Dunaliella viridis* (32,3 мкг міді в 10^6 клітин) не чинила інгібуючої дії на досліджувані види мікроорганізмів. Водночас самі компоненти клітин мікрободоростей після їхньої гомогенізації володіли слабо вираженим антибактеріальним ефектом, що проявлявся однаковою мірою для двох штамів мікрободоростей і становив щонайменше 50 % порівняно з антибіотиком для *Staphylococcus aureus* 124 (рис. 3.6.С).

4 - додаткове внесення сірчаноокислої міді до біомас клітин *D.v-Cu.S* та *D.v-Cu.R*, що були отримані шляхом гомогенізації, збільшувало їхню антибактеріальну активність по відношенню до досліджуваних штамів бактерій, при цьому більшою мірою це проявлялось для *D.v-Cu.R* порівняно з *D.v-Cu.S*. між збільшенням дози сірчаноокислої міді, що вноситься до біомаси клітин, та антибактеріальною активністю немає прямої залежності, а швидкість затримки росту *Staphylococcus aureus* 124 і *Pseudomonas aeruginosa* 18 біомасою клітин мікрободоростей до якої додатково вносили сірчаноокислу мідь не перевищувала антибактеріальної активності чистого розчину сірчаноокислої міді та мідної тканини (рис.3.6. D).

5 - у біомасі клітин *D.v-Cu.R* співвідношення між іонною формою та хелатною формою міді зміщене в бік іонної форми міді (рис. 3.6. Е) та «ступінь зв'язування» міді з компонентами клітин мікроводоростей *D.v-Cu.R* є менш міцним порівняно з *D.v-Cu.S* (рис. 3.3. етап III) і їхня біомаса виявляла більшу антибактеріальну активність. Ця особливість пояснюється тим, що штам мікроводоростей *D.v-Cu.R* адаптований до росту на середовищі з високим вмістом міді та містив до додаткового внесення міді у 215 разів більше міді, порівнюючи з природним штамом *D.v-Cu.S* (рис. 3.3, етап I). Отримані результати показали, що в клітинах *D.v-Cu.R* мало місце «насичення» можливих центрів зв'язування іонів міді та в біомасі цих клітин містилось більше іонів міді порівняно з хелатними формами міді (рис. 3.6. Е), що й забезпечувало більшу антибактеріальну активність порівняно з біомасою *D.v-Cu.S*, куди вносили таку саму кількість сірчаноокислої міді.

6 - додаткове внесення сірчаноокислої міді до біомас мікроводоростей до концентрацій 7 г/л і більше, супроводжувалося значним зменшенням екстрактивності клітинних компонентів мікроводоростей у водне середовище. Це зумовлено формуванням мідьвмісних біокомплексів, що значно зменшувало ступінь екстрактивності та ймовірно призводило до інгібування антибактеріальної активності клітинних компонентів, які входять до складу клітин мікроводоростей. Така дія іонів міді на компоненти клітин мікроводоростей пояснює відсутність адитивного ефекту між антибактеріальною дією компонентів мікроводоростей та додатково внесеними до біомаси клітин іонів міді.

Механізми антибактеріальної дії міді досить складні й остаточно не встановлені. Як уже зазначалося, необхідно розрізняти первинні ефекти дії міді на бактеріальні клітини і пролонговані (наступні) ефекти. Результати цієї роботи дають змогу вважати, що за первинної дії міді, яка може перебувати в різних станах, її механізми антибактеріальної дії пов'язані з дією іонів міді. Як відомо, іони міді здатні порушувати функції бактеріальних клітинних

стінок, індукувати окиснювальний стрес та інгібувати активність насамперед антиоксидантних ферментів [75].

На відміну від багатьох антибіотиків, іони міді здатні чинити різноманітний не специфічний вплив на структурно-функціональну організацію клітин, і ці дії не є настільки видоспецифічними, як у деяких антибіотиків. Водночас у разі відносно невеликих концентрацій іонів міді мають місце і невеликі видові відмінності в чутливості, принаймні для *Staphylococcus aureus* 124 і *Pseudomonas aeruginosa* 18. Це може пояснюватися тим, що ці види різнилися за структурою клітинних стінок і деякими метаболічними особливостями, можливо, і різною ефективністю екскреції міді з клітин.

Не можна виключати того, що після первинного (швидкого) впливу іонів міді, частина бактеріальних клітин зберігали до них стійкість (рис. 3.6 F) і могли формувати резистентність до подальшої (продовженої) дії іонів міді), можна очікувати, що на них можуть впливати хелатовані іони міді, про що писала низка дослідників [67,68,69,76]. Експериментальні дослідження можливої продовженої дії іонних комплексів з різноманітними лігандами є метою подальших досліджень.

Антибактеріальний ефект міді залежить від її агрегатних станів. У різних агрегатних станах можуть реалізовуватися різні механізми інгібування росту бактерій. Використання резистентних до іонів міді мікроводоростей *D.v-Cu.R*, у яких сформовано баланс між іонною та хелатною формами міді, можуть бути, як і нанесення міді на тканину, перспективним антибактеріальним матеріалом.

ВИСНОВКИ

1. Антибактеріальний ефект міді на ріст *Staphylococcus aureus* 124 та *Pseudomonas aeruginosa* 18 в системі *in vitro* залежить від її агрегатних станів.
2. Показано, що тонкий шар міді (3 мкм), нанесений на тканину, виявляв виражену антибактеріальну активність проти *Staphylococcus* (85% порівняно з антибіотиком меропенемом) і менш виражену активність проти *Pseudomonas*, який є стійким до меропенему.
3. Мідь в іонній формі інгібувала ріст *Staphylococcus aureus* 124 так само ефективно, як і антибіотик, а також ефективно інгібувала ріст *Pseudomonas aeruginosa* 18, демонструючи відсутність видової специфічності, на відміну від антибіотика.
4. Використання резистентних до іонів міді мікроводоростей *Dunaliella viridis*, у яких сформовано баланс між іонною та хелатною формами міді, можуть бути, як і нанесення міді на тканину, перспективним антибактеріальним матеріалом.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:

5. Zhu, Y., Huang, W. E., & Yang, Q., 2022. Clinical perspective of antimicrobial resistance in bacteria. *Infection and drug resistance*, 735-746. <https://doi.org/10.2147/IDR.S345574>
6. Arendsen L. P., Thakar R., Sultan A. H. The Use of Copper as an Antimicrobial Agent in Health Care, Including Obstetrics and Gynecology. *Clinical Microbiology Reviews*. 2019. Vol. 32, no. 4. URL: <https://doi.org/10.1128/cmr.00125-18> (date of access: 25.05.2025).
7. Physicochemical properties of copper important for its antibacterial activity and development of a unified model / M. Hans et al. *Biointerphases*. 2016. Vol. 11, no. 1. P. 018902. URL: <https://doi.org/10.1116/1.4935853> (date of access: 25.05.2025).
8. Årdal, C., Balasegaram, M., et al., 2020. Antibiotic development—economic, regulatory and societal challenges. *Nature Reviews Microbiology*, 18(5), 267-274. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0293-3>
9. Durand, G. A., Raoult, D., & Dubourg, G., 2019. Antibiotic discovery: history, methods and perspectives. *International journal of antimicrobial agents*, 53(4), 371-382. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.11.010>
10. Wohlleben, W., Mast, Y., et al., 2016. Antibiotic drug discovery. *Microbial biotechnology*, 9(5), 541-548. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12388>
11. Kaim, W., and Rall, J. (1996). Copper—A “Modern” Bioelement. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 35(1), 43-60. <https://doi.org/10.1002/anie.199600431>
12. Lide D. R. CRC Handbook of Chemistry and Physics (Crc Handbook of Chemistry and Physics). 7th ed. Lewis Pub, 1994. 2624 p.
13. Burkhead J. L., Collins J. F. Nutrition Information Brief—Copper. *Advances in Nutrition*. 2021. Vol. 13, no. 2. P. 681–683. URL: <https://doi.org/10.1093/advances/nmab157> (date of access: 25.05.2025).
14. Conry, R. R. (2005). Copper: Inorganic & Coordination Chemistry Based in part on the article Copper: Inorganic & Coordination Chemistry by Rebecca

R. Conry & Kenneth D. Karlin which appeared in the *Encyclopedia of Inorganic Chemistry, First Edition* .. *Encyclopedia of Inorganic Chemistry*.

<https://doi.org/10.1002/0470862106.ia052>

15. Ghazaryan S. Role Of Copper For Human Organism. European Medical, Health and Pharmaceutical Journal. 2011. Vol. 2. URL: <https://doi.org/10.12955/emhbj.v2i0.336>(date of access: 31.05.2025).

16. Наумко, Роман Федорович, and А. М. Мельниченко. *Роль міді в забезпеченні фізіологічних функцій та у розвитку патологічних процесів*. Diss. Видавництво СумДУ, 2008.

17. Полковенко, Ольга Володимирівна. "ЗНАЧЕННЯ МІДІ ДЛЯ ЗДОРОВ'Я ЛЮДИНИ." *Актуальні проблеми здоров'язбереження в Україні* 1.5 (2013): 222-224.

18. Horn, D., and Barrientos, A. (2008). Mitochondrial copper metabolism and delivery to cytochrome c oxidase. *IUBMB Life*, 60(7), 421-429. <https://doi.org/10.1002/iub.50>

19. Uauy R., Olivares M., Gonzalez M. Essentiality of copper in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1998. Vol. 67, no. 5. P. 952S–959S. URL: <https://doi.org/10.1093/ajcn/67.5.952s> (date of access: 01.06.2025).

20. Physicochemical properties of copper important for its antibacterial activity and development of a unified model / M. Hans et al. *Biointerphases*. 2016. Vol. 11, no. 1. P. 018902. URL: <https://doi.org/10.1116/1.4935853>(date of access: 01.06.2025).

21. Ramos-Zúñiga J., Bruna N., Pérez-Donoso J. M. Toxicity Mechanisms of Copper Nanoparticles and Copper Surfaces on Bacterial Cells and Viruses. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023. Vol. 24, no. 13. P. 10503. URL: <https://doi.org/10.3390/ijms241310503>(date of access: 01.06.2025).

22. Prado, J.V., Vidal, A.R., Duran, T.C., 2012. Application of copper bactericidal properties in medical practice. *Rev. Med. Chil.* 140(10), 1325-1332.

23. Ojeil, M., Jermann, C., Holah, J., et al., 2013. Evaluation of new in vitro efficacy test for antimicrobial surface activity reflecting UK hospital conditions. *J.*

Hosp. Infect 85(4), 274- 281

24. Vincent, Marin, Hartemann, Philippe, Engels-Deutsch, Marc, Antimicrobial applications of copper. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2016.06.003>
25. Ramos-Zúñiga J., Bruna N., Pérez-Donoso J. M. Toxicity Mechanisms of Copper Nanoparticles and Copper Surfaces on Bacterial Cells and Viruses. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023. Vol. 24, no. 13. P. 10503. URL: <https://doi.org/10.3390/ijms241310503>(date of access: 01.06.2025).
26. Espírito Santo C., Morais P. V., Grass G. Isolation and Characterization of Bacteria Resistant to Metallic Copper Surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*. 2010. Vol. 76, no. 5. P. 1341–1348. URL: <https://doi.org/10.1128/aem.01952-09>(date of access: 01.06.2025).
27. Elguindi, J., Alwathnani, H.A., Rensing, C., 2012. Rapid inactivation of *Cronobacter sakazakii* on copper alloys following periods of desiccation stress. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28(4), 1837-1841.
28. Zhu, L., Elguindi, J., Rensing, C., et al., 2012. Antimicrobial activity of different copper alloy surfaces against copper resistant and sensitive *Salmonella enterica*. *Food Microbiol.* 30(1), 303-310
29. Warnes, S.L., Keevil, C.W., 2011. Mechanism of copper surface toxicity in vancomycinresistant enterococci following wet or dry surface contact. *Appl. Environ. Microbiol.* 77(17), 6049-6059.
30. Grass, G., Rensing, C., Solioz, M., 2011. Metallic Copper as an Antimicrobial Surface. *Appl. Environ. Microbiol.* 77(5), 1541-1547.
31. Zhu, L., Elguindi, J., Rensing, C., et al., 2012. Antimicrobial activity of different copper alloy surfaces against copper resistant and sensitive *Salmonella enterica*. *Food Microbiol.* 30(1), 303-310
32. Pandiyarajan, T., Udayabhaskar, R., Vignesh, S., et al., 2013. Synthesis and concentration dependent antibacterial activities of CuO nanoflakes. *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* 33(4), 2020-2024.
33. Souli, M., Galani, I., Plachouras, D., et al., 2013. Antimicrobial activity of

copper surfaces against carbapenemase-producing contemporary Gram-negative clinical isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 68(4), 852-857.

34. Liu, J. et al. (2018). Copper-caused oxidative stress triggers the activation of antioxidant enzymes via ZmMPK3 in maize leaves. *Plos One*, 13(9), e0203612. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203612>

35. Kruk, J. et al. (2019). Oxidative stress in biological systems and its relation with pathophysiological functions: the effect of physical activity on cellular redox homeostasis. *Free Radical Research*, 53(5), 497-521. <https://doi.org/10.1080/10715762.2019.1612059>

36. Boži'c Cvijan, B.; Kora'c Ja'ci'c,J.; Baj'ceti'c, M. The Impact of Copper Ions on the Activity of Antibiotic Drugs. *Molecules* 2023, 28, 5133. <https://doi.org/10.3390/molecules28135133>

37. Kehrer J. P. The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*. 2000. Vol. 149, no. 1. P. 43–50. URL: [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(00\)00231-6](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(00)00231-6)(date of access: 01.06.2025).

38. Reactive Oxygen Species Signaling and Oxidative Stress: Transcriptional Regulation and Evolution / Y. Hong et al. *Antioxidants*. 2024. Vol. 13, no. 3. P. 312. URL: <https://doi.org/10.3390/antiox13030312>(date of access: 01.06.2025).

39. Beckhauser T. F., Francis-Oliveira J., De Pasquale R. Reactive Oxygen Species: Physiological and Physiopathological Effects on Synaptic Plasticity. *Journal of Experimental Neuroscience*. 2016. Vol. 10s1. P. JEN.S39887. URL: <https://doi.org/10.4137/jen.s39887>(date of access: 01.06.2025).

40. The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies / C. A. Juan et al. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. Vol. 22, no. 9. P. 4642. URL: <https://doi.org/10.3390/ijms22094642>(date of access: 01.06.2025).

41. The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies / C. A. Juan et al. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021.

Vol. 22, no. 9. P. 4642. URL: <https://doi.org/10.3390/ijms22094642>(date of access: 02.06.2025).

42. Reactive Oxygen Species Signaling and Oxidative Stress: Transcriptional Regulation and Evolution / Y. Hong et al. *Antioxidants*. 2024. Vol. 13, no. 3. P.312. URL: <https://doi.org/10.3390/antiox13030312> (date of access: 02.06.2025).

43. Cancer Metabolism: The Role of ROS in DNA Damage and Induction of Apoptosis in Cancer Cells / Y. Zhao et al. *Metabolites*. 2023. Vol. 13, no. 7. P. 796. URL: <https://doi.org/10.3390/metabo13070796> (date of access: 02.06.2025).

44. Oxidative Damage to Carbohydrates and Amino Acids / Marco d'Ischia et al. *Oxidative Stress, Disease and Cancer*. 2006. p.333-356 URL: [10.1142/9781860948046_0010](https://doi.org/10.1142/9781860948046_0010)

45. Salah I., Parkin I. P., Allan E. Copper as an antimicrobial agent: recent advances. *RSC Advances*. 2021. Vol. 11, no. 30. P. 18179–18186. URL: <https://doi.org/10.1039/d1ra02149d>(date of access: 02.06.2025).

46. Copper-Based Antibiotic Strategies: Exploring Applications in the Hospital Setting and the Targeting of Cu Regulatory Pathways and Current Drug Design Trends / A. M. Orta-Rivera et al. *Inorganics*. 2023. Vol. 11, no. 6. P. 252. URL: <https://doi.org/10.3390/inorganics11060252>(date of access: 02.06.2025).

47. He M, Tao Y, Mu K, Feng H, Fan Y, Liu T, Huang Q, Xiao Y, Chen W. Coordinated regulation of chemotaxis and resistance to copper by CsoR in *Pseudomonas putida*. *Elife*. 2025 Apr 8;13:RP100914. doi: 10.7554/eLife.100914.

48. Giachino A., Waldron K. J. Copper tolerance in bacteria requires the activation of multiple accessory pathways. *Molecular Microbiology*. 2020. Vol. 114, no. 3. P. 377–390. URL: <https://doi.org/10.1111/mmi.14522>(date of access: 02.06.2025).

49. Antimicrobial Silver in Medicinal and Consumer Applications: A Patent Review of the Past Decade (2007–2017) / W. Sim et al. *Antibiotics*. 2018. Vol. 7, no. 4. P. 93. URL: <https://doi.org/10.3390/antibiotics7040093>(date of access: 02.06.2025).

50. Antibacterial Activity and Mechanism of Action of the Silver Ion in

Staphylococcus aureus and Escherichia coli / W. K. Jung et al. *Applied and Environmental Microbiology*. 2008. Vol. 74, no. 7. P. 2171–2178. URL: <https://doi.org/10.1128/aem.02001-07>(date of access: 02.06.2025).

51. Karahutová L., Bujňáková D. Antimicrobial and anti-biofilm efficacy of different inorganic and organic zinc forms against multidrug-resistant Escherichia, Klebsiella, Staphylococcus and Pseudomonas. *Veterinary Research Communications*. 2024. URL: <https://doi.org/10.1007/s11259-024-10339-7>(date of access: 02.06.2025).

52. Concentration Ranges of Antibacterial Cations for Showing the Highest Antibacterial Efficacy but the Least Cytotoxicity against Mammalian Cells: Implications for a New Antibacterial Mechanism / C. Ning et al. *Chemical Research in Toxicology*. 2015. Vol. 28, no. 9. P. 1815–1822. URL: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.5b00258>(date of access: 02.06.2025).

53. Salvo J., Sandoval C. Role of copper nanoparticles in wound healing for chronic wounds: literature review. *Burns & Trauma*. 2022. Vol. 10. URL: <https://doi.org/10.1093/burnst/tkab047>(date of access: 02.06.2025).

54. Copper incorporated biomaterial-based technologies for multifunctional wound repair / Z. Zhang et al. *Theranostics*. 2024. Vol. 14, no. 2. P. 547–570. URL: <https://doi.org/10.7150/thno.87193>(date of access: 02.06.2025).

55. Erlin Zhang, Xiaoyan Wang, Mian Chen, Bing Hou. Effect of the existing form of Cu element on the mechanical properties, bio-corrosion and antibacterial properties of Ti-Cu alloys for biomedical application. *Materials Science and Engineering*. 2016. V. 69 P. 1210–1221. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.08.033>.

56. G. Faúndez et al. *BMC Microbiology*. 2004. Vol. 4, no. 1. P. 19. URL: <https://doi.org/10.1186/1471-2180-4-19> (date of access: 02.06.2025).

57. Copper Ionization Pool Maintenance: Keep Your Pool Clean - ClearBlue Ionizer. *ClearBlue Ionizer*. URL: <https://www.clearblueionizer.com/en/pool-ionizers/copper-ionization-pool-maintenance/>(date of access: 02.06.2025).

58. Copper Fungicides for Organic and Conventional Disease Management in Vegetables URL: [copper-fungicides-for-organic-disease-management-in-vegetables](#)
59. Hossain M., Rakkibu M. G. EFFECTS OF COPPER ON AQUATIC ECOSYSTEMS - A REVIEW. *Khulna University Studies*. 1999. P. 259–266. URL: <https://doi.org/10.53808/kus.1999.1.2.259-266-ls>(date of access: 02.06.2025).
60. Bobkov, V. V., Alimov, S. S., Andreiev, V. V., Onischenko, A. V., & Starovoitov, R. I., 2002. Transitional Phenomena in Magnetron Discharge. In 29th EPS Conference in Plasma Phys. and Contr. Fusion. Montreux, June (pp. 17-21).
61. Kovaleva, M. K., Menzyanova, N. G., Jain, A., Yadav, A., Flora, S., & Bozhkov, A. I., 2012. Effect of hormesis in *Dunaliella viridis* Teodor. (Chlorophyta) under the influence of copper sulfate. *International Journal on Algae*, 14(1). <https://doi.org/10.1615/InterJAlgae.v14.i1.40>
62. Yurchenko, O. I., Chernozhuk, T. V., Nikolenko, M. V., Baklanov, O. M., & Kravchenko, O. A., 2024. Atomic absorption determination of copper and zinc in pharmaceuticals. *Issues of Chemistry & Chemical Technology/Voprosy Khimii & Khimicheskoi Tekhnologii*, (1). <https://doi.org/10.32434/0321-4095-2024-152-1-115-121>
63. Becker, K. W., & Skaar, E. P., 2014. Metal limitation and toxicity at the interface between host and pathogen. *FEMS microbiology reviews*, 38(6), 1235-1249. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12087>
64. Garber K. Biomedicine. Targeting copper to treat breast cancer. *Science*. 2015 Jul 10;349(6244):128-9.
65. White, A. R., Kanninen, K. M., & Crouch, P. J., 2015. Metals and neurodegeneration: restoring the balance. *Frontiers in aging neuroscience*, 7, 127. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2015.00127>
66. Urso, E., & Maffia, M., 2016. Behind the link between copper and angiogenesis: established mechanisms and an overview on the role of vascular copper transport systems. *Journal of vascular research*, 52(3), 172-196. <https://doi.org/10.1159/000438485>
67. Denoyer, D., Pearson, H. B., Clatworthy, S. A., Smith, Z. M., Francis, P. S.,

- Llanos, R. M., ... & Cater, M. A., 2016. Copper as a target for prostate cancer therapeutics: copper-ionophore pharmacology and altering systemic copper distribution. *Oncotarget*, 7(24), 37064. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9245>
68. Marzano, C., Pellei, M., Tisato, F., & Santini, C., 2009. Copper complexes as anticancer agents. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 9(2), 185-211. <https://doi.org/10.2174/187152009787313837>
69. Neyrolles, O., Wolschendorf, F., Mitra, A., & Niederweis, M., 2015. Mycobacteria, metals, and the macrophage. *Immunological reviews*, 264(1), 249-263. <https://doi.org/10.1111/imr.12265>
70. Djoko, K. Y., Paterson, B. M., Donnelly, P. S., & McEwan, A. G., 2014. Antimicrobial effects of copper (II) bis (thiosemicarbazonato) complexes provide new insight into their biochemical mode of action. *Metallomics*, 6(4), 854-863. <https://doi.org/10.1039/c3mt00348e>
71. Haeili, M., Moore, C., Davis, C. J., Cochran, J. B., Shah, S., Shrestha, T. B.,... & Wolschendorf, F., 2014. Copper complexation screen reveals compounds with potent antibiotic properties against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58(7), 3727-3736. <https://doi.org/10.1128/aac.02316-13>
72. Dalecki, A. G., Haeili, M., Shah, S., Speer, A., Niederweis, M., Kutsch, O., & Wolschendorf, F., 2015. Disulfiram and copper ions kill *Mycobacterium tuberculosis* in a synergistic manner. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59(8), 4835-4844. <https://doi.org/10.1128/aac.00692-15>
73. Shah, S., Dalecki, A. G., Malalasekera, A. P., Crawford, C. L., Michalek, S. M., Kutsch, O., ... & Wolschendorf, F., 2016. 8-Hydroxyquinolines are boosting agents of copper-related toxicity in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 60(10), 5765-5776. <https://doi.org/10.1128/aac.00325-16>
74. Bozhkov, A. I., Kovaleva, M. K., Goltvyanskiy, A. V., Ushakova, E. O., Tsapko, H. Y., & Gavrish, A. O., 2020. Preliminary Adaptation of *Dunaliella viridis* Strains to Copper Sulfate Affects the Thermal Stability of the Culture. *International*

Journal on Algae, 22(1). <https://doi.org/10.1615/InterJAlgae.v22.i1.50>

75. Bozhkov, A. I., Goltvyanskiy, A. V., Kovaleva, M. K., & Menzyanova, N. G., 2018. On the Inheritance of Induced Resistance to Toxic Concentrations of Sulfur Acid of Copper by Subsequent Cell Generations of *Dunaliella viridis* Teodoresco. International Journal on Algae, 20(4). <https://doi.org/10.1615/InterJAlgae.v20.i4.20>

76. Rostama, S., Bozhkov, A. I., & Goltvyanskiy, A. V. (2012). The Effect of Copper, Lead, and Cadmium Ions on Induced Aggregation in Cells of *Dunaliella viridis* (Teodor) (Chlorophyta). International Journal on Algae, 14(2). <https://doi.org/10.1615/InterJAlgae.v14.i2.30>

77. Dalecki, A. G., Haeili, M., Shah, S., Speer, A., Niederweis, M., Kutsch, O., & Wolschendorf, F., 2015. Disulfiram and copper ions kill *Mycobacterium tuberculosis* in a synergistic manner. Antimicrobial agents and chemotherapy, 59(8), 4835-4844. <https://doi.org/10.1128/aac.00692-15>

78. Linklater, D. P., Juodkazis, S., Crawford, R. J., & Ivanova, E. P., 2019. Mechanical inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* by titanium substrata with hierarchical surface structures. Materialia, 5, 100197. <https://doi.org/10.1016/j.mtla.2018.100197>

79. Giachino, A., & Waldron, K. J., 2020. Copper tolerance in bacteria requires the activation of multiple accessory pathways. Molecular microbiology, 114(3), 377-390. <https://doi.org/10.1111/mmi.14522>

80. Djoko, K. Y., Paterson, B. M., Donnelly, P. S., & McEwan, A. G., 2014. Antimicrobial effects of copper (II) bis (thiosemicarbazonato) complexes provide new insight into their biochemical mode of action. Metallomics, 6(4), 854-863. <https://doi.org/10.1039/c3mt00348e>

81. Ruiz L. M., Libedinsky A., Elorza A. A. Role of Copper on Mitochondrial Function and Metabolism. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2021. Vol. 8. URL: <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.711227> (date of access: 01.06.2025).

82. Capaldi R. A. Structure and Function of Cytochrome c Oxidase. *Annual Review of Biochemistry*. 1990. Vol. 59, no. 1. P. 569–596. URL:

<https://doi.org/10.1146/annurev.bi.59.070190.003033>(date of access: 01.06.2025).